LARISSA EMIDIO DE FRANÇA SILVA

O papel das proteínas SOCS e STAT na diferenciação das células T CD4+ *naïve* no desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em modelo experimental de 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: Dra. Fernanda Degobbi
Tenório Quirino dos Santos Lopes

(Versão Corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2019

LARISSA EMIDIO DE FRANÇA SILVA

O papel das proteínas SOCS e STAT na diferenciação das células T CD4+ *naïve* no desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em modelo experimental de 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: Dra. Fernanda Degobbi
Tenório Quirino dos Santos Lopes

(Versão Corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da 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

Silva, Larissa Emidio de França

O papel das proteínas SOCS e STAT na diferenciação das células T CD4+ naive no desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em modelo experimental de exposição à fumaça de cigarro / Larissa Emidio de França Silva. -- São Paulo, 2019.

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

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Fernanda Degobbi Tenório Quirino dos Santos Lopes.

Descritores: 1.Doença pulmonar obstrutiva crônica 2.Tabagismo 3.Fatores de transcrição STAT 4.Proteínas supressoras da sinalização de citocina 5.Célula T-auxiliar 6.Imunidade adaptativa

USP/FM/DBD-386/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

*Dedico este trabalho ao
meu querido noivo Anderson
e aos meus familiares, especialmente
meus avós Gilda e Paulo,
pelo carinho e amor incondicional.*

Agradecimentos

Hoje concluo mais uma importante etapa em minha vida. Um momento que sonhei por muitos anos e até cheguei a duvidar que aconteceria. Mas por sorte, meus caminhos se cruzaram com os de muitas pessoas queridas, que me deram as mãos e me trouxeram a certeza de que tudo daria certo... Sou muito grata a todas elas!

Primeiramente, agradeço a Deus, aos anjos e seres de luz por me manterem determinada nesta jornada. Apesar das dificuldades e restrições dos anos de estudos, obtive grandes realizações que fortaleceram a minha fé a cada dia.

À minha orientadora Fernanda Lopes principalmente pela paciência e por compartilhar seu conhecimento comigo. Sei que me orientar em alguns momentos não foi fácil, mas ela acreditou em mim. Graças as suas críticas construtivas, posso dizer que cresci muito como pessoa e como aluna, e eu a admiro muito por isso.

Ao apoio financeiro da Capes, Fapesp e dos LIMs para a execução deste trabalho.

Aos animais utilizados, que foram fundamentais nesse estudo.

Aos meus colegas de grupo Juliana Tiyaqi, Juliana Dias, Kaique Rodrigues, Júlia Benini, Alyne Riani e Daniela Cervilha. Muito obrigada pela colaboração nos experimentos, pela parceria e horas de descontração... A convivência com cada um me proporcionou um enorme aprendizado!

À Dra Walcy Paganelli e aos amigos do LIM 17, Lais Brito, Zelita Queiroz, Lizandre Keren, Jurandir Tomaz e Ana Patricia, pela receptividade, ajuda e apoio quando os experimentos não saiam conforme o planejado. Tenho um enorme carinho por todos desse laboratório, que durante muito tempo foi a minha segunda casa.

Aos professores Rodolfo de Paula, Clarice Olivo, Sérgio Catanozi, Rodrigo Tallada e Solange Carrasco pela receptividade, auxílio com os experimentos e sugestões para melhorá-los.

Aos membros da banca examinadora da qualificação Luiz Fernando (Burns), Ana Paula Velosa e Francine Almeida por suas importantes considerações para a melhoria deste estudo.

Aos meus queridos colegas da FMUSP, Suellen Karoline, Thamyres Castro, José Manuel Capccha, Nivaldo Silva, Sara Hamagushi, Rebeca Silveira, Daiane

Pereira, Jéssica Souza e Roseane Martins pelo apoio em diversos momentos em que desanimei e pela alegria que me proporcionaram com a sua simples presença. Foi um imenso prazer estar com eles!

Aos professores e colegas das disciplinas da pós-graduação, Maria Eugenia Vanzolini, Lucia Garcia, Adriana Girardi, Renato Crajoinas, Débora Bandeira e Daniela Ferreira. Obrigada pelos ensinamentos e contribuição direta ou indireta na elaboração deste trabalho.

Aos colegas Fernanda Roncon, Rafael Cossi, Marciana Veloso, Paula Fernandes, Izabella Genaro, Vitor Ponci, Eliane Tigre e Soraya Nogueira pelos ensinamentos, gentileza e disposição em me ajudar .

Aos membros da banca examinadora da defesa deste trabalho: Carla Máximo, Renato Righetti e Iolanda Tibério por terem aceito o convite e pelo tempo dedicado na leitura e nas considerações feitas para aperfeiçoar esta dissertação.

Aos funcionários da FMUSP, Luiz Afonso, Rosana Paes, Reginaldo Silva, Ivan, Irina Pieroni e principalmente ao Davi Francisco por sua receptividade, amizade e por seu entusiasmo a cada êxito nas minhas análises.

Aos amigos Cris Gimenez, José Alexandre e Luzia Rezende. Obrigada por sempre acreditarem em mim, pelo incentivo, pelas horas tão agradáveis de conversas e aprendizado. Estar com eles foi a mais eficiente das terapias para a renovação das minhas energias.

Por último e não menos importante, agradeço ao meu noivo Anderson e sua mãe Maria das Graças, que desde o início me incentivaram e foram muito compreensivos. Nas suas férias e aos finais de semana, meu amor renunciava seu descanso para me levar na FMUSP e Unifesp para finalizar as análises; me ajudava a ensaiar para as apresentações de congresso e não se aborrecia quando eu passava semanas em frente ao computador estudando, pelo contrário, estava sempre de bom humor. Sua presença me trazia a paz após um dia estressante e o seu carinho me revigorava para um novo dia de trabalho.

Meus familiares também tiveram grande participação nessa conquista, meus pais, irmãs, tios e tias, principalmente meus avós queridos Gilda e Paulo, que apesar da minha ausência em diversos momentos, nunca me senti abandonada pois eles estavam lá, cheios de carinho e preocupação com o meu bem estar... Esse sentimento de amor e gratidão estará em meu peito por todos os dias da minha vida!

*“Faça o melhor que puder. Seja o melhor que puder.
O resultado virá na mesma proporção de seu esforço.”*

Mahatma Gandhi

*“Ninguém pode prever o quanto você pode voar,
nem você mesmo, até abrir as asas.”*

Rayanne Antonio

RESUMO

SILVA LEF. *O papel das proteínas SOCS e STAT na diferenciação das células T CD4+ naive no desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em modelo experimental de exposição à fumaça de cigarro* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2019.

O tabagismo é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), entretanto outros fatores intrínsecos ao indivíduo, bem como o papel da imunidade inata e adaptativa estão envolvidos na sua patogênese. Em estudo prévio, foi demonstrado que a diminuição da densidade de células T regulatórias (Treg) associada à diminuição da densidade de células positivas para interleucina (IL) -10 e TGF- β em indivíduos fumantes com obstrução comparados aos fumantes sem obstrução poderia ser um dos mecanismos envolvidos na progressão da DPOC. Considerando o papel das proteínas intracelulares STAT (do inglês “*Signal Transducers and Activators of Transcription*”) e SOCS (do inglês “*Supressor of Cytokine Signaling*”) na diferenciação das células TCD4+ *naive*, pretende-se com este estudo avaliar o papel das proteínas SOCS e STAT no desenvolvimento da DPOC em modelo experimental de exposição à fumaça de cigarro. Camundongos C57BL/6 foram expostos à fumaça de cigarro (duas vezes ao dia, 30 minutos/ 5 dias por semana/ durante 3 e 6 meses), e os animais controle foram mantidos em ar ambiente nos mesmos períodos. Foi avaliado pela técnica de ELISA os níveis de IL-6, IL-10, IL-17 e TGF- β . Foi feita a quantificação da densidade de células positivas para Treg, IL-17, STAT3 e STAT5 totais e fosforiladas, SOCS1 e SOCS3 no parênquima e nas áreas peribroncovasculares por imuno-histoquímica, assim como, foi realizada a dupla marcação por esta técnica para a visualização de SOC1 e 3 nas células STAT3 e 5 fosforiladas. Por *immunoblotting*, foi feita a expressão relativa de STAT3 e STAT5 totais e fosforiladas; SOCS1 e SOCS3. Foi observado um alargamento dos espaços alveolares associado a um perfil de resposta Th17 caracterizado pelo aumento de SOCS1 com concomitante redução de SOCS3 desde o terceiro mês de exposição à fumaça de cigarro. O aumento, tanto na densidade de células positivas para IL-17 como da expressão desta interleucina foi observado somente no sexto mês. As células positivas para Treg, STAT5 e sua forma fosforilada, assim como a expressão de IL-10 e de TGF- β apresentaram redução no terceiro mês, das quais apenas STAT5, IL-10 e TGF- β se mantiveram reduzidas até o final do protocolo. Nossos resultados corroboram com os achados clínicos e experimentais prévios, reforçando a importância do equilíbrio da resposta Th17/Treg. Além disso, este é o primeiro estudo que fez uma análise temporal e comparativa entre diferentes compartimentos das proteínas SOCS e STAT, demonstrando que desde o início do desenvolvimento da doença a sinalização intracelular para a resposta Treg e liberação de IL-10 foram comprometidas, propiciando uma resposta inflamatória e progressão da DPOC.

Descritores: Doença pulmonar obstrutiva crônica; Tabagismo; Fatores de transcrição STAT; Proteínas supressoras da sinalização de citocina; Célula T-auxiliar; Imunidade adaptativa.

ABSTRACT

Silva LEF. *The role of the SOCS and STAT proteins on differentiation cells T CD4+ naive in the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in a cigarette smoke-induced model* [dissertation]. Sao Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Smoking is considered the main risk factor for the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD); however, other individual intrinsic factors, as well as the role of innate and adaptive immunity are involved in their pathogenesis. In a previous study, it was demonstrated that decreasing regulatory T (Treg) cell density associated with decreasing in IL-10 and TGF- β positive cells density in obstructed smokers compared to smokers without obstruction could be involved in the COPD progression. Considering the role of the *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) and SOCS (*Suppressor of Cytokine Signaling*) proteins in the differentiation of *naive* CD4+ T cells, this study aims to evaluate the mechanisms involved in this differentiation, especially for Th17 cells and Treg cells, considering the role of SOCS and STAT in these events. Methods: For induction of pulmonary emphysema, C57BL/6 mice were exposed to cigarette smoke (twice daily/ 30 minutes / 5 days per week/ for 3 and 6 months), and control groups were remained exposed to filtered air at the same times. By ELISA technique were evaluated the IL-6, IL-10, IL-17 and TGF- β . Positive cells for Treg, IL-17, STAT3 and STAT5 total and phosphorylated, SOCS1 and SOCS3 were quantified in the parenchyma and peribroncovascular areas by immunohistochemistry, and in addition, double labeling was performed by this technique for visualization of SOCS1 and 3 in phosphorylated STAT3 and 5 cells. By immunoblotting, the relative expression of total and phosphorylated STAT3 and STAT5; SOCS1 and SOCS3 was made. We observed an increase in alveolar enlargement associated with a Th17 profile response characterized by the increase of SOCS1 with a concomitant reduction of SOCS3 from the third month of exposure to cigarette smoke. The increase of both the density of IL-17 positive cells and expression of this interleukin was observed only in the sixth month. The positive cells for Treg, STAT5 and their phosphorylated form, as well as IL-10 and TGF- β expression decreased in the third month, of which only STAT5 positive cells, IL-10 and TGF- β remained reduced until the end of the protocol. Our results corroborate with previous clinical and experimental findings, reinforcing the importance of the Th17/Treg balance in the development of COPD. In addition, this is the first study to perform a temporal and comparative analysis between different compartments of the SOCS and STAT proteins, demonstrating that since the beginning of disease development the intracellular signaling for Treg response and IL-10 release has been compromised, provinding and inflammatory response and progression of COPD.

Descriptors: Pulmonary disease, chronic obstructive; Cigarette smoking; STAT transcription factors; Supressor of citokyne signaling proteins; T-lymphocytes; Adaptive immunity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC).....	15
1.2. Fatores de risco para o desenvolvimento da DPOC.....	15
1.3. Fisiopatologia da DPOC.....	16
1.4. Mecanismos para o desenvolvimento da DPOC: papel da imunidade inata e adaptativa para a progressão da doença.....	16
1.4.1. Linfócitos T CD8+ e T CD4+.....	17
1.4.2. Células T regulatórias (Treg).....	18
1.4.3. Transdutores de sinal e Ativadores de fator de transcrição e os Supressores de sinalização para citocinas: STAT e SOCS.....	19
1.4.3.1. O papel das proteínas SOCS e STAT na diferenciação das células TCD4+ <i>naive</i>	20
1.4.3.2. A ativação das STAT na progressão da DPOC.....	21
1.4.3.3. O papel das SOCS na progressão da DPOC.....	22
1.5. Desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da fisiopatologia da DPOC.....	23
1.5.1. Modelo de DPOC induzido por exposição à fumaça de cigarro	23
1.6. Justificativa do estudo.....	25
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. MÉTODOS.....	27
3.1. Animais.....	27
3.2. Modelo de exposição à fumaça de cigarro.....	27
3.3. Grupos experimentais.....	28

3.4. Coleta e processamento do tecido pulmonar para análises histológicas.....	29
3.4.1. Avaliação do intercepto linear médio (Lm).....	29
3.4.2. Imuno-histoquímica.....	30
3.4.3. Dupla marcação por imuno-histoquímica.....	31
3.4.4. Análise morfométrica.....	32
3.5. Extração e quantificação de proteínas totais no tecido pulmonar...	34
3.5.1. <i>Immunoblotting</i>	35
3.5.2. Dosagem de interleucinas por ELISA.....	36
3.6. Análise estatística.....	38
4. RESULTADOS	39
4.1. Alargamento alveolar no parênquima pulmonar.....	39
4.2. Desequilíbrio Th17/Treg e sinalização intracelular no espaço peribroncovascular.....	40
4.2.1 Dupla marcação no espaço peribroncovascular.....	46
4.3 Desequilíbrio Th17/Treg e sinalização intracelular no parênquima pulmonar.....	48
4.4 Quantificação das bandas imunorreativas por <i>Immunoblotting</i>	50
4.5 Quantificação das citocinas por ELISA.....	52
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura e função das proteínas SOCS.....	20
Figura 2.	Papel das proteínas STAT e SOCS na diferenciação das células T CD4+.....	21
Figura 3.	Esquema ilustrativo da caixa de exposição à fumaça de cigarro.....	28
Figura 4.	Retículo de Weibel com 100 pontos e 50 retas utilizado para a quantificação dos parâmetros morfométricos.....	30
Figura 5.	Seleção da área total, luz da via aérea e luz do vaso sanguíneo.....	32
Figura 6.	Imagem demonstrativa da seleção da área total, do espaço em branco e da área de parênquima pulmonar.....	33
Figura 7.	Lm no parênquima pulmonar distal	39
Figura 8.	Desequilíbrio Th17/Treg e sinalização intracelular no espaço peribroncovascular.....	41
Figure 9.	Fotomicrografia representativa dos linfócitos marcados por SOCS1 e SOCS3 no espaço peribroncovascular.....	42
Figure 10.	Fotomicrografia representativa dos linfócitos marcados por STAT5 e STAT3 no espaço peribroncovascular.....	43
Figure 11.	Fotomicrografia representativa dos linfócitos marcados por pSTAT5 e pSTAT3 no espaço peribroncovascular.....	44
Figure 12.	Fotomicrografia representativa dos linfócitos marcados por FOXP3 e IL-17 no espaço peribroncovascular.....	45
Figura 13.	Fotomicrografia da dupla marcação para pSTAT3 com SOCS1 e SOCS3.....	46
Figura 14.	Fotomicrografia da dupla marcação para pSTAT5 com SOCS1 e SOCS3.....	47

Figura 15.	Desequilíbrio Th17/Treg e sinalização intracelular no parênquima pulmonar.....	49
Figura 16.	Valores de SOCS3 e SOCS1 no homogenato pulmonar.....	50
Figura 17.	Valores de STAT5 e pSTAT5 no homogenato pulmonar....	51
Figura 18.	Valores de STAT3 e pSTAT3 no homogenato pulmonar.....	51
Figura 19.	Níveis de citocinas no homogenato pulmonar.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Descrição dos anticorpos utilizados para Imuno-histoquímica	31
Tabela 2.	Descrição dos anticorpos utilizados para <i>Immunoblotting</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CO	Monóxido de carbono
CVF	Capacidade vital forçada
DAB	3,3 <i>Diaminobenzidine</i>
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
EP	Erro padrão
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
GOLD	<i>Global Initiative for Obstructive Lung Disease</i>
H&E	Hematoxilina-eosina
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IFN-γ	Intérferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
JAK	Janus quinase
Kg	Quilo
L	Litro
Lm	Intercepto linear médio
M	Molar
mM	Minimolar
m³	Metro cúbico
mA	Miliampere
mg	Miligrama
MHC-2	<i>Major histocompatibility complex-2</i>
Min	Minuto
MPT	Material particulado total
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetros
NP40	Nonidet™ P 40
OMS	Organização Mundial da Saúde
PMSF	Parametil Sulfonilfluoreto
ppm	Partes por milhão
pSTAT	<i>Phospho- Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOCS	<i>Supressor Of Cytokine Signaling</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline (TBS) + Polysorbate 20 (Tween 20)</i>
TGF-β	Fator de crescimento transformador- β
TLR	<i>Toll Like Receptors</i>
Th	<i>T helper</i>
Treg	T regulatórias
V	Volts

VEF	Volume expirado forçado
α1–AT	Alfa-1 antitripsina
µg	Micrograma
µm²	Micrômetro quadrado
µl	Microlitros

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença evitável e tratável, caracterizada pela persistente limitação do fluxo aéreo geralmente progressiva, associada a uma resposta inflamatória crônica nas vias aéreas e nos pulmões, a partículas ou gases nocivos (1).

As principais manifestações clínicas da DPOC são a bronquite crônica e o enfisema pulmonar. A bronquite crônica é caracterizada pela obstrução das pequenas vias aéreas e presença de tosse com duração superior a três meses por mais de dois anos consecutivos. No enfisema pulmonar, se observa o alargamento dos espaços aéreos distais com destruição do parênquima pulmonar, perda da elasticidade pulmonar e obstrução de pequenas vias aéreas sem evidência de fibrose (2, 3).

A DPOC é considerada uma importante causa de morbidade e mortalidade mundial e estima-se que em 2030 seja considerada a terceira principal causa de morte. Em torno de 11,7% dos portadores dessa doença em 2010 tinham idade superior a 30 anos em todo o mundo (4). No Brasil, as maiores taxas de mortalidade por DPOC encontram-se nas regiões Sul e Sudeste (5).

1.2. Fatores de risco para o desenvolvimento da DPOC

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o tabagismo ainda é o principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC (1, 6). Em vários países, a DPOC também está relacionada à inalação de poluentes decorrentes da queima de combustíveis fósseis e a exposições inalatórias ocupacionais a poeiras e gases tóxicos. Entretanto, nem todos os tabagistas desenvolvem DPOC clinicamente significativa, o que sugere que há outros fatores intrínsecos ao indivíduo envolvidos na sua patogênese (1).

Um dos fatores de risco genético para o desenvolvimento da DPOC e consequente destruição progressiva e irreversível do pulmão é a deficiência hereditária de alfa-1 antitripsina (α_1 -AT), uma antiprotease de elastase neutrofílica produzida naturalmente pelo corpo (7).

Segundo o GOLD (Global Initiative for Obstructive Lung Disease) (1) atualizado em 2019, a DPOC pode ser classificada em quatro estágios baseados tanto nos sintomas apresentados pelos pacientes (tosse crônica e produção de escarro), quanto nos parâmetros espirométricos escolhidos para a avaliação da limitação ao fluxo aéreo. Entre estes parâmetros, o mais utilizado é o VEF₁: volume expirado forçado no primeiro segundo, bem como a razão entre esta variável e a CVF (capacidade vital forçada): VEF₁/CVF. Valores desta razão, em espirometria pós broncodilatador, menores que 0,70 caracterizam a presença de limitação ao fluxo aéreo.

1.3. Fisiopatologia da DPOC

A principal característica da DPOC é o desenvolvimento de uma resposta inflamatória crônica à inalação de fumaça de cigarro ou outras partículas nocivas (1). Diversos mediadores inflamatórios atraem células inflamatórias específicas para diferentes partes do pulmão, onde mudanças estruturais ocorrem à medida que se repete o processo de lesão e reparo (8).

Essa resposta favorece a destruição do parênquima pulmonar, uma vez que os mecanismos normais de reparo e defesa são prejudicados (1). Além disso, estes eventos promovem a perda das vias aéreas pequenas e podem contribuir com a limitação do fluxo aéreo. Importante ressaltar que as alterações das vias aéreas aumentam com a gravidade da doença e após a cessação do tabagismo, esse quadro ainda persiste (9). Para Barnes (2016) (8) a inflamação sistêmica pode ter um papel relevante nas múltiplas comorbidades encontradas em pacientes com DPOC.

1.4. Mecanismos para o desenvolvimento da DPOC: papel da imunidade inata e adaptativa para a progressão da doença

Embora a maior parte dos fumantes apresente evidências de algum processo inflamatório pulmonar, somente parte destes apresentará uma resposta inflamatória amplificada, sendo que os mecanismos envolvidos neste processo ainda estão pouco descritos (10). Acredita-se que a progressão da DPOC esteja relacionada à mudança da imunidade inata (inespecífica) para a imunidade adaptativa (adquirida) (11, 12).

A resposta imune inata compreende a primeira linha de defesa pulmonar que atua de maneira rápida e não específica, em resposta aos componentes irritantes da fumaça do cigarro, ao estresse celular e à lesão tecidual. Esta resposta é fornecida pela barreira epitelial, pelo transporte mucociliar, pelos fatores humorais e por células como macrófagos, células dendríticas, monócitos, neutrófilos, e mastócitos (13).

A exposição à fumaça de cigarro promove lesão de células epiteliais e consequente liberação de produtos derivados desta destruição, os quais irão se ligar aos receptores de membrana *Toll* (*Toll Like Receptors* - TLR) no epitélio, induzindo as células epiteliais remanescentes a produzirem mediadores inflamatórios (14).

Esta sequência de eventos acarreta na maturação das células dendríticas (apresentadoras de antígenos) e a migração destas células para os órgãos linfóides, onde, se as condições forem favoráveis, ocorrerá a ativação de células T. A resposta imune adaptativa manifesta-se quando há uma falha no mecanismo imunorregulador ou uma deficiência na tolerância do sistema imune, e resulta na progressão e consequente agravamento da DPOC (15).

A imunidade adaptativa mediada por células T está fortemente envolvida na inflamação das vias aéreas durante o desenvolvimento da DPOC (13). Em pacientes com DPOC grave, além do aumento de linfócitos T CD4+ e CD8+ (16, 17) ocorre também o aumento de células B (18), as quais continuam aumentadas mesmo após anos de abandono do tabagismo.

1.4.1 Linfócitos T CD8+ e CD4+

Se o processo inflamatório causado pela exposição à fumaça de cigarro não for controlado, as células dendríticas irão expressar altos níveis de proteínas como as do complexo-histocompatibilidade classe II (MHC-II) e moléculas como CD80 e CD86. Na região dos folículos linfóides ocorrerá a apresentação dos antígenos as células T promovendo a ativação, diferenciação e migração de linfócitos T CD4+ e CD8+ para o trato respiratório (19).

Existem pelo menos dois tipos de linfócitos T CD4+ efetores em pulmões de pacientes com DPOC: os T helper 1 (Th1) e os T helper 17 (Th17).

(16, 20). Os linfócitos Th1 de pacientes enfisematosos secretam maiores quantidades de interferon- γ (IFN- γ) quando comparados aos controle (16). Já as células Th17 estão envolvidas na progressão e exacerbação da destruição alveolar pela liberação de interleucina (IL) -17 (13, 21, 22).

1.4.2 Células T regulatórias (Treg)

O controle da proliferação e migração de células T para o trato respiratório é mediado por subtipos de linfócitos T CD4+, que são as células T regulatórias (Treg), as quais apresentam funções imunorregulatórias, inibindo a autoimunidade e suprimindo a inflamação. Esse efeito imunossupressor ocorre devido à produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) (13).

Cosio e colaboradores (2009) (15) propõem que a progressão da DPOC e a gravidade desta doença são determinadas tanto pela habilidade das células dendríticas em estimularem as células T, quanto através dos mecanismos imunorregulatórios dependentes das células Treg.

Lee e colaboradores (2007) foram uns dos primeiros autores que propuseram que a redução de células Treg estava associada à progressão da DPOC. Em seu estudo foi observada em pulmão de pacientes com DPOC uma redução de expressão nos níveis de RNAm para FOXP3 (fator de transcrição das células Treg), bem como menor expressão de IL-10, uma interleucina de caráter anti-inflamatório produzida predominantemente pelas Treg, reforçando a teoria de uma menor resposta regulatória em pacientes com DPOC (11).

Em estudo anterior desenvolvido por nosso grupo, foi observada uma redução de IL-10 em vias aéreas pequenas e grandes dos indivíduos fumantes obstrutivos, quando comparados aos fumantes sem obstrução e não fumantes, sugerindo a importância das Treg no controle do processo inflamatório mediado pela produção de IL-10 (23).

Na literatura, alguns estudos sugerem o papel das células Treg via liberação de IL-10 no controle desta resposta imunológica em pacientes com DPOC. Entretanto, são poucos os estudos que correlacionam o papel das células Treg e da produção de IL-10 por estas células na regulação da resposta imune adaptativa. Acredita-se que as células Treg são importantes para a

regulação da resposta inflamatória na tentativa de suprimir a resposta a auto-antígenos e sua ausência em outros compartimentos pulmonares não permite que esse mecanismo tenha sua função completa, o que favorece a inflamação persistente e contribui para a perpetuação da doença (13).

1.4.3. Transdutores de sinal e ativadores de fator de transcrição e os Supressores de sinalização para citocinas: STAT e SOCS

A diferenciação das células T depende de estímulos microambientais produzidos pela liberação de citocinas que atuam na mediação extracelular e são responsáveis por transmitir sinais entre as células e desta forma promover a manutenção de alguns processos inflamatórios e progressão de doenças como descrito acima. Estes sinais são recebidos por subunidades de receptores intracelulares associados às proteínas do tipo Janus quinases (JAK) (24), conforme mostrado na **Figura 1**.

A ativação das JAK promove a propagação destes sinais para o meio intracelular para promover um perfil de transcrição correto de determinadas proteínas através da ativação das STAT (do inglês *Signal Transducers and Activators of Transcription*) (25). Esta complexa cascata de transmissão de sinais intracelulares é responsável pela manutenção da homeostase destas células resultando em sua proliferação, diferenciação e sobrevivência como é o caso da diferenciação das células T CD4+. Muitas doenças resultam das alterações nestes processos de sinalização e transdução de sinais (26).

Ainda a respeito do processo de homeostase celular, existem as proteínas supressoras da sinalização JAK/STAT, do inglês "*Supressor Of Cytokine Signaling*", denominadas SOCS. São pequenas proteínas intracelulares que desempenham um importante controle das respostas celulares às diferentes citocinas e fatores de crescimento (27-30).

Figura 1. Estrutura e função das proteínas SOCS.
 Fonte: Yoshimura e colaboradores (2012) (24).

1.4.3.1 O papel das proteínas SOCS e STAT na diferenciação das células T CD4+ *naive*

A diferenciação de células T CD4+ *naive* depende da ativação de citocinas específicas como descrito na **Figura 2**, determinando os diferentes subtipos celulares: Th1, Th17 e Treg.

Até hoje já foram descritos 7 tipos de proteínas supressoras (SOCS) (26), todavia as mais descritas são as SOCS1 e SOCS3, as quais estão envolvidas na diferenciação das células T CD4+ *naive* (24).

Para resposta Th1, se observa a diminuição da SOCS1 e aumento de SOCS3. A SOCS3 está envolvida com a inibição da STAT3, o que acarreta inibição de resposta Th17. Mas também promove inibição de resposta Th1 por suprimir a ativação de STAT4 via IL-12 ou via aumento da produção de IL-10 e TGF- β (31) (**Figura 2**).

Para a resposta Th17, observa-se menor expressão de SOCS3 e aumento da expressão de SOCS1, a qual inibe resposta Th1 via supressão de IFN- γ (**Figura 2**).

O desvio de resposta para diferenciação em células Treg se deve a ativação da STAT5, a qual está envolvida diretamente com aumento da expressão de FOXP3. Embora a deleção de SOCS1 promova o aumento de

células Treg, estas células apresentam piora na função e expressão de citocinas (32). Entretanto, em presença de SOCS1 há menos células Treg, mas com as funções celulares preservadas (33) (**Figura 2**).

Figura 2. Papel das proteínas STAT e SOCS na diferenciação das células T CD4+
Fonte: Yoshimura e colaboradores (2012) (24).

1.4.3.2. A ativação das STAT na progressão da DPOC

Considerando o importante papel das STAT na persistência dos processos inflamatórios, incluindo os envolvidos na progressão da DPOC, existe um interesse no desenvolvimento de inibidores da cascata de reações JAK-STAT como alternativa terapêutica para o tratamento da DPOC (34). Entretanto, ainda pouco se sabe sobre o papel das STAT na progressão da DPOC.

Yew-Booth e colaboradores (2015) (34) avaliaram por western blotting tecidos de indivíduos não fumantes, fumantes sem presença de obstrução e fumantes com obstrução (DPOC), obtidos em cirurgias de transplantes. Os resultados demonstraram um aumento das proteínas fosforiladas STAT1 e STAT3 nos indivíduos fumantes sem e com obstrução comparados aos não fumantes, embora este aumento tenha sido estatisticamente significativo somente no grupo com DPOC.

Outro estudo na literatura demonstra uma forte associação entre os níveis de IL-6 e enfisema. Ruwanpura e colaboradores (2014) (35) demonstraram em camundongos que a IL-6 esteve mais associada ao

desenvolvimento do enfisema do que a presença de STAT3. Isto se deve ao fato da IL-6 promover o desenvolvimento do enfisema por aumentar a apoptose celular e consequente aumento da liberação de radicais livres e estresse oxidativo e as STAT3 estarem associadas apenas ao aumento da migração de células inflamatórias para o pulmão.

A IL-6 desempenha um papel fundamental na diferenciação celular de T CD4+ *naive* em Th17 via STAT3 para a expressão de IL-17, que contribui para a progressão da inflamação no parênquima pulmonar (35). Este aumento de STAT3 juntamente com os níveis elevados de IL-6 demonstrados tanto em amostras de escarro quanto em amostras de tecidos de pacientes DPOC já foi visto em trabalhos prévios (36, 37).

Além desses estudos que destacam a importância das STAT1 e STAT3 na DPOC, Di Stefano e colaboradores (2004) (38) pela técnica de imuno-histoquímica, demonstraram a presença de outro tipo de STAT: as STAT4, que estavam aumentadas em tecidos de fumantes com e sem obstrução comparados a não fumantes.

Com relação as STAT5, os achados de Zhao e colaboradores (2018) (39) demonstraram com a utilização de uma substância tradicional na medicina chinesa, chamada Bufe Yishen formula (BYF patente ZL201110117578.1), o restabelecimento dos níveis de STAT5 em modelos experimentais com DPOC. No estudo foi observado um aumento de IL-10 e de FOXP3, que promoveu uma redução nas citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-17, IL-1 e TNF- α . A fosforilação de STAT3 também foi inibida e consequentemente a diferenciação das células Th17. Dessa forma, a progressão da doença foi suprimida e o equilíbrio entre Th17/Treg foi restaurado.

1.4.3.3. O papel das SOCS na DPOC

Também são poucos os estudos na literatura descrevendo o papel das SOCS na progressão da DPOC e parte destes demonstra o uso de diferentes tratamentos com medicamentos em cultura de células e em modelos experimentais para o aumento da expressão das SOCS3 (40, 41).

Nasreen e colaboradores (2014) (41) demonstraram que o tratamento com Propionato de Fluticasona e Salina em cultura de células epiteliais de

pacientes com DPOC promoveu o aumento de SOCS3, sugerindo um novo mecanismo deste medicamento para induzir um efeito anti-inflamatório.

Em um estudo prévio, esse mesmo grupo demonstrou em cultura de células epiteliais de pacientes que apresentavam rinite alérgica e em modelo experimental de inflamação alérgica crônica de vias aéreas, o mesmo efeito no aumento para expressão de SOCS3, com consequente ação anti-inflamatória (40).

Por outro lado, Springer e colaboradores (2013) (42) demonstraram uma diminuição da expressão de SOCS3 em biópsias de pulmões de pacientes com DPOC, sugerindo o papel do desequilíbrio entre os supressores de citocinas (SOCS) e as citocinas para a progressão da DPOC.

1.5. Desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da fisiopatologia da DPOC

Tendo em vista o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DPOC, das mudanças funcionais e dos efeitos de possíveis fármacos como novos tratamentos, torna-se importante o desenvolvimento e estudo de modelos experimentais que mimetizem a doença em humanos, pois estes estudos podem ser realizados “in vivo”. Entretanto, é de extrema importância se considerar as vantagens e desvantagens da utilização de cada um destes modelos, uma vez que são modelos não espontâneos da doença e que até o momento não se encontrou um modelo experimental ideal que mimetize por inteiro o fenótipo da doença. Atualmente, os modelos mais utilizados para indução do enfisema são os que utilizam administração de proteases ou inalação de gases tóxicos, como a fumaça de cigarro.

1.5.1 Modelo de DPOC induzido por exposição à fumaça de cigarro

A exposição à fumaça de cigarro é o modelo considerado mais próximo do observado em humanos, uma vez que o cigarro é a principal causa de desenvolvimento de DPOC. Nestes estudos, os animais são expostos à fumaça de cigarro, diariamente, em sistemas nos quais os animais permanecem com o corpo todo ou somente o nariz exposto à fumaça de cigarro (43).

A grande vantagem desse modelo, 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 (43).

No entanto, a lesão tecidual observada é considerada inferior a observada nos modelos que utilizam a instilação de proteases e em humanos com enfisema e, 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 (44).

Outro importante fator a ser levado em consideração, é o longo tempo de exposição à fumaça de cigarro requerido para a indução do enfisema pulmonar. Wright e colaboradores (2008) (43) encontraram desenvolvimento de enfisema em camundongos em 6 meses de exposições diárias. No entanto, Valença e colaboradores (2004) (45) demonstraram presença de lesão do parênquima em 2 meses de exposições diárias (3X ao dia), porém a avaliação do intercepto linear médio, que contempla o alargamento dos espaços aéreos distais, demonstrou uma lesão tecidual menor do que a obtida em modelos de exposição de seis meses ao fumo. Experimentos prévios em nosso laboratório demonstraram que a exposição crônica duas vezes ao dia durante 3 meses, provocou enfisema em camundongos (46, 47).

Apesar disso, estudos ainda demonstram que o modelo de exposição à fumaça de cigarro é o modelo mais indicado para avaliar o efeito de medicamentos e terapias, além do desenvolvimento da doença (43, 48).

1.6. Justificativa do estudo

Embora o desequilíbrio Th17/Treg já esteja bem descrito na patogênese da DPOC, o papel da expressão de STAT e SOCS na diferenciação das células T nas diferentes fases do desenvolvimento dessa doença é pouco compreendido.

Desta forma, pretende-se com este estudo avançar no entendimento do papel das SOCS e das STAT nessa diferenciação, em modelo experimental de exposição à fumaça de cigarro.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o papel das proteínas SOCS e STAT no desenvolvimento da DPOC em modelo experimental de exposição à fumaça de cigarro.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o papel das citocinas envolvidas na diferenciação dos subtipos de linfócitos T CD4+: Th17 e Treg;
- Avaliar e comparar a expressão das proteínas SOCS1, SOCS3, STAT3 e STAT5 totais e fosforiladas em diferentes compartimentos pulmonares: parênquima e espaço peribroncovascular.
- Demonstrar as células positivas para estas proteínas nos subtipos de linfócitos citados.

3. MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com idade entre 6-8 semanas e peso médio de 20-25g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). Importante destacar que este estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP, protocolo nº 070/16.

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), sendo acondicionados em baias específicas para camundongos (aproximadamente 8 animais/baia) com as medidas de 425 X 266 X 185 mm, no Biotério do Laboratório de Terapêutica Experimental. Foram alimentados e hidratados *ad libitum* e mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas em temperatura ambiente de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, por um profissional treinado e capacitado.

3.2. Modelo de exposição à fumaça de cigarro

Os animais foram expostos à fumaça de cigarro em uma câmara de inalação (28L/min), com duas entradas (para ar e fumo), uma saída e um ventilador, para aumentar a mistura entre o ar e a fumaça dentro da caixa. O fluxo de ar sintético na primeira entrada foi de 2 L/min, e a segunda entrada recebeu um fluxo de ar sintético, que passa através de um Sistema Venturi ligado a um cigarro aceso, aspirando a fumaça do cigarro e conduzindo-a para dentro da caixa. A taxa de fluxo de ar nesta segunda entrada pode ser alterada fornecendo mais ou menos mistura de fumo para a caixa. Foi definida a taxa de fluxo de 1,5 L/min, o que produziu níveis de CO variando de 250 a 350 ppm (partes por milhão). A concentração de carboxihemoglobina em camundongos expostos ao fumo foi mantida a 10% ($\pm 1,3$). Os camundongos expostos à fumaça do cigarro foram mantidos na caixa durante 30 minutos, duas vezes por dia, 5 dias por semana, durante 3 ou 6 meses e foram utilizados de 10 à 12 cigarros comercialmente filtrados por exposição (0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono por cigarro) com concentração de

material particulado total (MPT) de $354,8 \pm 50,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ por dia. 45. Os animais dos grupos controle permaneceram no biotério e foram expostos ao ar filtrado durante o período de estudo.

Figura 3. Esquema ilustrativo da caixa de exposição à fumaça de cigarro.
Fonte: Toledo e colaboradores (2012) (49).

3.3. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais de acordo com o tempo de exposição:

- Grupo Controle (C3): Animais mantidos ao ar filtrado por 3 meses;
- Grupo Fumo (F3): Animais expostos à fumaça de cigarro por 3 meses;
- Grupo Controle (C6): Animais mantidos ao ar filtrado por 6 meses;
- Grupo Fumo (F6): Animais expostos à fumaça de cigarro por 6 meses.

Foram utilizados 10 animais para cada grupo experimental, totalizando 40 animais.

Foram realizados dois protocolos de exposição, um para a coleta de tecidos e marcações específicas para imuno-histoquímica e outro no qual foi feita a coleta de tecido para processarmos as técnicas de *Immunoblotting* e imuno-ensaio *enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA).

Contabilizando os dois protocolos, utilizou-se o total de 80 animais.

Importante destacar que não houve perdas neste protocolo experimental e que a exposição nos dois tempos estudados se iniciou no mesmo dia.

3.4. Coleta e processamento do tecido pulmonar para análises histológicas

Todos os animais foram anestesiados com Thiopental (50 mg/kg, por via intraperitoneal), eutanasiados através da transecção da aorta abdominal e seus pulmões foram coletados.

Para as análises morfométricas, os pulmões foram fixados em formaldeído (10%) infundidos através da traqueia sob pressão constante de 20 cmH₂O por 24 horas, para posterior confecção de lâminas histológicas. Foram confeccionadas lâminas em branco para imuno-histoquímica e lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para análise do intercepto linear médio (Lm).

Para as demais técnicas, o pulmão removido foi congelado em freezer -80°C e somente descongelado no momento de realização das análises.

3.4.1. 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 alveolar (50). Para a análise morfométrica convencional foi utilizado o retículo de Weibel (1963) (51) de 100 pontos e 50 retas, com área conhecida (62.500 μm^2 , em aumento de 400X), 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 400X. Foram analisados 20 campos aleatórios e não coincidentes no parênquima pulmonar distal. Após obtidos os valores das médias dos campos para cada lâmina, o Lm foi calculado pela seguinte equação:

$$Lm = L_{total}/MI$$

Onde L_{total} 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 micrometros ($cél/\mu m^2$).

Figura 4. Retículo de Weibel com 100 pontos e 50 retas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos. Fonte: Weibel (1963) (51).

3.4.2. Imuno-histoquímica

Para as reações de imuno-histoquímica, foi feita a desparafinização dos cortes (em xilol quente a 60-65°C) e reidratação. Logo após, foi feita a recuperação dos epítomos antigênicos sob alta temperatura em tampão citrato 10 mM (pH= 6,0) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com peroxidase endógena. A incubação das lâminas foi feita *overnight* a 4°C com o anticorpo primário e posteriormente a incubação a 37°C com o seu respectivo anticorpo secundário, das marcas Vector ABC Kit (Vector Laboratories, CA, USA) ou Histofine Simple Stain MAX PO (Nichirei Biosciences, Tokyo, JPN). Para a revelação, foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina (DAB, Sigma, EUA) e contra corados com hematoxilina de Harris (Merck KGaA, Darmstadt, GER).

Abaixo estão listados os anticorpos primários utilizados para as reações de imuno-histoquímica. As diluições para cada anticorpo foram determinadas em testes prévios seguindo as instruções do fabricante:

Tabela 1. Descrição dos anticorpos utilizados para imuno-histoquímica.

MARCADOR	CÓDIGO	ISOTIPO	DILUIÇÃO	EMPRESA
SOCS1	ab211288	Mouse IgG	1:200	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
SOCS3	ab78341	Mouse IgG	1:200	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
STAT5	sc-836	Coelho IgG	1:750	Santa Cruz (Dallas, Texas, USA)
P-STAT5	sc-12893	Cabra IgG	1:100	Santa Cruz (Dallas, Texas, USA)
STAT3	D1B2J	Coelho IgG	1:5000	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)
P-STAT3	D3A7	Coelho IgG	1:150	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)
FOXP3	ab54501	Coelho IgG	1:700	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
IL-17	ab79056	Coelho IgG	1:200	Abcam (Cambridge, Reino Unido)

3.4.3. Dupla marcação por imuno-histoquímica

Para ilustrar a presença do fator de transcrição pSTAT5, fundamentais para a diferenciação das Treg concomitante à expressão de SOCS3 foi realizada a dupla marcação para esses mediadores em áreas peribroncovasculares. Primeiro, as seções de tecido pulmonar foram coradas com anti-pSTAT5 usando um procedimento de imunoperoxidase e cromógeno DAB (Sigma, MO, EUA), como descrito acima. Em seguida, as seções foram incubadas com anti-SOCS3 seguindo o protocolo equivalente e coradas usando um procedimento de fosfatase imunoalcalina e um produto de reação de cor vermelha (PermaRed / AP, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA).

O mesmo procedimento foi feito para marcar as células positivas para pSTAT5 (com anti-pSTAT5) com SOCS1 (com anti-SOCS1), assim como para identificar o fator de transcrição pSTAT3 (com anti-pSTAT3) com as células positivas para SOCS1 e SOCS3.

Finalmente, a hematoxilina de Harris (Merck KGaA, Darmstadt, GER) foi utilizada para contra corar o tecido. As imagens do pulmão foram capturadas usando o microscópio OLYMPUS BX51 (Tokyo, Japão), pelo software ImageJ (US *National Institutes of Health*) em aumento de 1000X para a área peribroncovascular.

3.4.4. Análise Morfométrica

Após coradas em reação de imuno-histoquímica as lâminas com os cortes de tecido pulmonar foram então escaneadas utilizando o *Scanner* Digital para lâminas histológicas de alta resolução automatizado para amostras histológicas para campo claro (Pannoramic Scan, 3D Histech, Budapeste, Hungria). Para a análise digital com posterior seleção da área a ser estudada, e análise morfométrica, foi utilizado o software Panoramic Viewer 1.5 (3D Histech, Budapeste, Hungria) com o aumento de 200X para análise de todo o tecido e 400X para os cortes selecionados.

Para o cálculo da densidade de células por área de tecido, foram selecionados 5-10 campos aleatórios correspondentes à área peribroncovascular (**Figura 5**), onde foram contabilizados os linfócitos positivos e, posteriormente, dividido pela área total corrigida (representada pela via aérea e espaço peribroncovascular, após a subtração da luz do vaso sanguíneo e da luz da via aérea). A média deste resultado foi feita para cada lâmina e expresso na unidade de células/ μm^2 .

Figura 5: Seleção da área total, luz da via aérea e luz do vaso sanguíneo. Seta indicativa para o linfócito positivo marcado. Aumento de 200X e escala de 100 μm .

A contagem de células positivas também foi feita na região do parênquima (**Figura 7**). Foram selecionados 3-5 campos aleatórios, íntegros e sem a presença de vias aéreas ou vasos sanguíneos. A seleção das imagens foi feita pelo software Panoramic Viewer 1.5 (3D Histech, Budapeste, Hungria) no aumento de 200X para a posterior análise pelo software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Para o cálculo, o valor de área total (**Figura 6A**) foi subtraído pelo valor de área em branco (corado em vermelho – **Figura 6B**) para a obtenção do valor de área do parênquima (corado em vermelho – **Figura 6C**). Foram contabilizados os linfócitos positivos no aumento de 400X e divididos pela área de parênquima. Por fim, foi calculada a média dos valores em cada campo por lâmina.

A

B

C

Figura 6: (A) Seleção da área total de parênquima pulmonar. Seta indicativa para os linfócitos positivos marcados. Imagem demonstrativa da (B) seleção da área em branco (corada em vermelho) e da (C) área de parênquima pulmonar (corada em vermelho). Aumento de 200X e escala de 100µm.

3.5. Extração e quantificação de proteínas totais no tecido pulmonar

Para a quantificação das proteínas totais, os pulmões foram individualmente colocados em tubos com 1 ml de tampão de lise/extração de proteínas (Tris 1M, pH 7,5; EDTA 0,2M pH 7 e água destilada) misturado ao coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Fluoreto de sódio 100mM; Pirofosfato de sódio 17mM; Ortovanadato de sódio 10mM; Aprotinina e Fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) 2mM previamente diluído em etanol). Posteriormente foram homogeneizados com um polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, modelo PT 10/35) por 30 segundos. A seguir, 100 µl de TRITON-X foram adicionados as amostras. Estas foram incubadas em gelo por 15 minutos e centrifugadas pelo mesmo tempo a 12.000G/4°C para a remoção do material insolúvel.

Foi utilizado o método de Bradford (*Protein Assay*, Bio-rad, Califórnia, USA) com uma curva de proteínas conhecida, sendo albumina de soro bovino (BSA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 (mg/mL) e água destilada (branco) em duplicata. O extrato proteico foi utilizado na diluição 1:40 em água destilada e adicionados aos 300 µl de reagente de Bradford em cada poço da placa. Após a pipetagem, as placas foram mantidas no escuro por 10 minutos e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro de placa (Epoch - Biotek, Vermont, EUA) pelo programa GEN 5.1.1.1 sob a absorbância de 450 nm.

Utilizando o software GraphPad InStat (versão 3.0, Califórnia, EUA), os valores obtidos em absorbância foram corrigidos pelo seu branco. Foi feita a equação da reta obtida pela curva estabelecida de BSA e os dados foram convertidos e expressos em mg/ml.

Essa quantificação foi utilizada para a normatização da quantidade de proteínas totais da amostra para o método de *Immunoblotting* e ELISA.

3.5.1. Immunoblotting

Para cada 200 µl de amostra de pulmão previamente homogeneizado, foi acrescentado 50 µl de Laemmli Sample Buffer (Bio-rad, Califórnia, USA) com DTT (Dithiothreitol) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) - sendo 1 ml de Laemmli para 0,15g de DTT - que foram fervidos em banho seco por 5 minutos.

O fracionamento das proteínas foi realizado em gel de poliacrilamida 10% com SDS (20 minutos, 300V) com 2µl de marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein™*, Bio-rad, Califórnia, USA). A transferência para a membrana de nitrocelulose (Bio-rad, Califórnia, USA) foi realizada por 30 minutos na função *High* (Transblot Turbo, Bio-rad, Califórnia, USA). Na sequência, foram realizadas lavagens em TBST. O bloqueio foi feito por 2 horas em leite (0,5%) diluído em TBST.

Os anticorpos primários: SOCS1, SOCS3, STAT5, pSTAT5, STAT3, pSTAT3 e β -actina para controle endógeno, foram diluídos conforme as instruções do fabricante e incubados *overnight* sob agitação em câmara fria. Foram realizadas 3 lavagens de 3 minutos em TBST e a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1 hora. Bandas imunorreativas foram detectadas por quimioluminescência (ChemiDoc™ Imaging Systems, Bio-rad, Califórnia, USA), após a membrana ser exposta aos reagentes do Kit ECL (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-rad, Califórnia USA).

Foi feito o *Stripping buffer* (15 g glicina, 1 g de SDS, 10 mL de Tween 20, 1 litro de água destilada, pH to 2.2) para a posterior normatização com β -actina em cada membrana. Após a revelação, foi utilizado o software ImageJ (US *National Institutes of Health*) para determinar a densitometria óptica das bandas marcadas. Para esta análise, os valores foram calculados como expressão relativa, sendo a somatória das densidades ópticas absolutas de todas as bandas, dividido pela densidade absoluta das bandas de β -actina.

Foram analisadas de 5 a 7 amostras por grupo.

Tabela 2. Descrição dos anticorpos utilizados para *Immunoblotting*.

PRODUTO	CÓDIGO	ISOTIPO	DILUIÇÃO	EMPRESA
SOCS1	ab211288	Mouse IgG	1:10000	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
SOCS3	ab78341	Mouse IgG	1:10000	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
STAT5	D206Y	Coelho IgG	1:10000	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)
P-STAT5	D47E7	Cabra IgG	1:1000	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)
STAT3	D1B2J	Coelho IgG	1:8000	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)
P-STAT3	D3A7	Coelho IgG	1:2000	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)
β -ACTINA	A5316	Mouse IgG	1:5000	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri)

3.5.2. Dosagem de citocinas por ELISA

Os níveis de TGF- β , IL-10, IL-6 e IL-17 foram determinados por ELISA, nos quais microplacas (Costar, Cambridge, MA, USA) para cada citocina foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos. Após lavagem e distribuição dos extratos pulmonares, foram adicionados anticorpos específicos para as diferentes citocinas conjugados à biotina. Para a revelação da ligação, a solução reveladora contendo o 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 pelo software GraphPad InStat.

Foram utilizados os kits específicos para camundongos da marca R&D Systems (Boston, EUA) para detecção de TGF- β (MGD150), IL-10 (M1000B), IL-6 (M6000B) e IL-17 (M1700).

Foram analisadas de 5 a 8 amostras por grupo.

3.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). A normalidade da distribuição dos dados foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk e os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP). Os dados foram analisados

por meio do teste T para dados de distribuição paramétrica ou teste de Mann-Whitney para dados de distribuição não paramétrica. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do intercepto linear médio

Foram quantificados os valores de Lm dos Grupos Controle e Fumo 3 e 6 meses, os quais estão representados na **Figura 7**. Foi observado um aumento de Lm no terceiro mês de exposição à fumaça de cigarro que se manteve elevado até o sexto mês.

Figura 7: Valores de Lm no parênquima pulmonar nos grupos Controle em 3 e 6 meses e Fumo em 3 e 6 meses. Comparados aos seus respectivos controles: (A) Houve aumento do Lm em 3 (* $P=0.002$, teste-T) e 6 (* $P=0.001$, teste-T) meses. (B-E) Fotomicrografias representativas do Lm no parênquima distal dos grupos (B) Controle e (C) Fumo 3 meses, e (D) Controle e (E) Fumo 6 meses. ($n=9$ animais por grupo). Dados expressos como média $\pm$ EP. Aumento de 200x e barra de escala em 100 μ m.

4.2. Desequilíbrio Th17/Treg e sinalização intracelular no espaço peribroncovascular

Desde o terceiro mês de exposição à fumaça de cigarro houve uma redução na densidade de células positivas para SOCS3 e STAT5 no espaço peribroncovascular, que se mantiveram reduzidas até o sexto mês (**Figura 8A e 8C**). Adicionalmente, houve uma redução de pSTAT5 e de FOXP3 em 3 meses de exposição à fumaça de cigarro (**Figura 8E e 8G**).

Entretanto foi observado um aumento de células positivas para SOCS1 (**Figura 8B**) no espaço peribroncovascular em 3 e 6 meses de exposição à fumaça de cigarro e somente em 6 meses de exposição houve um aumento na densidade de células positivas para STAT3 (**Figura 8D**), pSTAT3 (**Figura 8F**) e IL-17 (**Figura 8H**).

Figura 8: Desequilíbrio Th17/Treg e sinalização intracelular no espaço peribroncovascular. Densidade de células positivas para (A) SOCS3; (B) SOCS1; (C) STAT5; (D) STAT3; (E) pSTAT5; (F) pSTAT3; (G) FOXP3 e (H) IL-17 nos grupos Controle 3 e 6 meses e Fumo 3 e 6 meses. Comparados aos seus respectivos controles: (A) Houve redução em F3 (*P=0.015, teste-T) e F6 (*P=0.046, teste-T); (B) Houve aumento em F3 (*P=0.035, teste-T) e F6 (*P=0.013, teste-T); (C) Houve redução em F3 (*P=0.036, teste-T) e F6 (*P=0.022, teste-T); (D) Houve aumento em F6 (*P=0.028, teste-T); (E) Houve redução em F3 (*P=0.032, teste de Mann-Whitney); (F) Houve aumento em F6 (*P=0.031, teste-T); (G) Houve redução em F3 (*P=0.039, teste-T); (H) Houve aumento em F6 (*P=0.032, teste de Mann-Whitney). Foram utilizados de 6 a 9 animais por grupo. Dados expressos como média $\pm$ EP.

Figura 9: Fotomicrografia representativa dos linfócitos positivos marcados por SOCS1 e SOCS3 no espaço peribroncovascular, nos grupos controle e fumo durante 3 e 6 meses. Aumento de 200x e cada inserto no aumento de 1000x.

Figura 10: Fotomicrografia representativa dos linfócitos positivos marcados por STAT5 e STAT3 no espaço peribroncovascular, nos grupos controle e fumo durante 3 e 6 meses. Aumento de 200x e cada inserto no aumento de 1000x.

Figura 11: Fotomicrografia representativa dos linfócitos positivos marcados por pSTAT5 e pSTAT3 no espaço peribroncovascular, nos grupos controle e fumo durante 3 e 6 meses. Aumento de 200x e cada inserto no aumento de 1000x.

Figura 12: Fotomicrografia representativa dos linfócitos positivos marcados por FOXP3 e IL-17 no espaço peribroncovascular, nos grupos controle e fumo durante 3 e 6 meses. Aumento de 200x e cada inserto no aumento de 1000x.

4.2.1. Dupla marcação por Imuno-histoquímica no parênquima pulmonar

Figura 13: Fotomicrografia representativa da dupla marcação para pSTAT3 (reação em marrom) com SOCS1 (reação em vermelho) (A-D) e com SOCS3 (reação em vermelho) (E-H). (A e E) Controle 3 meses; (B e F) Fumo 3 meses; (C e G) Controle 6 meses e (D e H) Fumo 6 meses. Em (A) Observa-se uma marcação fraca para ambos os marcadores assim como em (C). Em (B e D) as cores mescladas entre os dois marcadores são evidenciadas. Em contraste, em (E e G) nota-se uma coloração avermelhada mais evidente, indicando uma maior presença de SOCS3. A coloração marrom de pSTAT3 predomina em (F e H). Aumento de 1000x e escala de 10 μ m.

Expressão de pSTAT5

Figura 14: Fotomicrografia representativa da dupla marcação para pSTAT5 (reação em marrom) com SOCS1 (reação em vermelho) (A-D) e com SOCS3 (reação em vermelho) (E-H). (A e E) Controle 3 meses; (B e F) Fumo 3 meses; (C e G) Controle 6 meses e (D e H) Fumo 6 meses. Em (A e C) Observa-se uma marcação marrom mais evidente. Em (B e D) a coloração avermelhada prevalece. Em contraste, nota-se uma mistura de ambas as cores em (E e G). A dupla marcação também aparece em (F e H), mas de forma mais sutil para os marcadores estudados. Aumento de 1000x e escala de 10 μ m.

4.3. Desequilíbrio Th17/Treg e sinalização intracelular no parênquima pulmonar

Desde o terceiro mês de exposição à fumaça de cigarro houve uma redução na densidade de células positivas para STAT5 no parênquima pulmonar, que se manteve reduzida até o sexto mês (**Figura 15C**). Em contrapartida, foi observado um aumento de células positivas para IL-17 (**Figura 15H**) no parênquima somente em 6 meses de exposição. Não houve diferença entre os grupos Controle e Fumo no terceiro e no sexto mês quanto à densidade de células positivas para SOCS3 (**Figura 15A**), SOCS1 (**Figura 15B**), STAT3 (**Figura 15D**), pSTAT5 (**Figura 15E**), pSTAT3 (**Figura 15F**) e FOXP3 (**Figura 15G**).

Figura 15: Desequilíbrio Th17/Treg e sinalização intracelular no parênquima pulmonar. Densidade de linfócitos positivos para (A) SOCS3; (B) SOCS1; (C) STAT5; (D) STAT3; (E) pSTAT5; (F) pSTAT3; (G) FOXP3 e (H) IL-17 dos grupos Controle 3 e 6 meses e dos grupos Fumo 3 e 6 meses. Comparados aos seus respectivos controles: (A, B, D-G) Não houve diferença; (C) Houve redução em F3 (* $P=0.038$, teste de Mann-Whitney) e F6 (* $P=0.027$, teste de Mann-Whitney); (H) Houve aumento em F3 (* $P=0.012$, teste-T). Somente em (B-G) houve diferença com relação ao tempo de exposição ao fumo em F6, respectivamente (# $P=0.043$, teste de Mann-Whitney) e (# $P=0.047$, teste de Mann-Whitney). Foram utilizados de 6 a 9 animais por grupo. Dados expressos como média $\pm$ EP.

4.4. Quantificação das bandas imunorreativas por *Immunoblotting*

As proteínas SOCS3, SOCS1, STAT5, pSTAT5, STAT3 e pSTAT3 foram quantificadas no homogenato pulmonar e foi observado uma redução de SOCS1 apenas em 3 meses de exposição à fumaça de cigarro (**Figura 16C**). Entretanto, houve um aumento de STAT5 em 6 meses de exposição (**Figura 17B**), assim como um aumento em 3 meses para pSTAT3 (**Figura 18C**).

Figura 16: Valores de SOCS3 e SOCS1 no homogenato pulmonar.

Valores de SOCS3 e SOCS1 no homogenato pulmonar dos grupos Controle em 3 e 6 meses e do grupo Fumo em 3 e 6 meses. (A) Análise densitométrica dos níveis de SOCS3 e SOCS1 normalizadas com β-actina. Comparados aos seus respectivos controles: (B) Não houve diferença; (C) Houve redução em F3 (* $P=0.012$, teste-T). Foram utilizados de 5 a 7 animais por grupo. Dados expressos como média $\pm$ EP.

Figura 17: Valores de STAT5 e pSTAT5 no homogenato pulmonar.

Valores de STAT5 e pSTAT5 no homogenato pulmonar dos grupos Controle em 3 (n= 7 e 7, respectivamente) e 6 (n= 7 e 7, respectivamente) meses e do grupo Fumo em 3 (n= 7 e 7, respectivamente) e 6 (n= 6 e 7, respectivamente) meses. (A) Análise densitométrica dos níveis de STAT5 e pSTAT5 normalizadas com β -actina. Comparados aos seus respectivos controles: (B) Houve aumento em F6 (*P=0.018, teste-T); (C) Não houve diferença. Foram utilizados de 6 a 7 animais por grupo. Dados expressos como média $\pm$ EP.

Figura 18: Valores de STAT3 e pSTAT3 no homogenato pulmonar.

Valores de STAT3 e pSTAT3 no homogenato pulmonar dos grupos Controle em 3 (n= 5 e 6, respectivamente) e 6 (n= 5 e 5, respectivamente) meses e do grupo Fumo em 3 (n= 5 e 6, respectivamente) e 6 (n= 7 e 5, respectivamente) meses. (A) Análise densitométrica dos níveis de STAT3 e pSTAT3 normalizadas com β -actina. Comparados aos seus respectivos controles: (B) Não houve diferença; (C) Houve aumento em F3 (*P=0.013, teste-T). O grupo F3 também apresentou aumento comparado ao tempo de exposição a fumaça de cigarro (#P=0.026, teste-T). Foram utilizados de 5 a 7 animais por grupo. Dados expressos como média $\pm$ EP.

4.5. Quantificação das citocinas por ELISA

Dentre as citocinas avaliadas no homogenato pulmonar, houve uma redução nos níveis de IL-10 e TGF- β em 3 e 6 meses de exposição à fumaça de cigarro (**Figura 19A e 19B**). Em contrapartida, houve um aumento nos níveis de IL-6 e IL-17 somente no sexto mês de exposição à fumaça de cigarro (**Figura 19C e 19D**).

Gráficos: Elisa

Figura 19: Níveis de citocinas no homogenato pulmonar.

Níveis de (A) TGF- β ; (B) IL-10; (C) IL-6 e (D) IL-17 no homogenato pulmonar dos grupos Controle em 3 e 6 meses e do grupo Fumo em 3 e 6 meses. Comparados aos seus respectivos controles: (A) Houve redução em F3 (* $P=0.029$, teste de Mann-Whitney) e F6 (* $P=0.016$, teste de Mann-Whitney); (B) Houve redução em F3 (* $P=0.030$, teste de Mann-Whitney) e F6 (* $P=0.040$, teste de Mann-Whitney); (C) Houve aumento em F6 (* $P=0.004$, teste de Mann-Whitney); (D) Houve aumento em F6 (* $P=0.007$, teste-T) e somente neste grupo houve aumento em relação ao tempo de exposição a fumaça de cigarro (# $P=0.032$, teste -T). Foram utilizados de 5 a 8 animais por grupo. Dados expressos como média $\pm$ EP.

5. DISCUSSÃO

Neste modelo de exposição à fumaça de cigarro foi demonstrado que a diminuição de sinalização intracelular para diferenciação de células Treg, bem como para a produção de IL-10 ocorreu previamente ao desvio para resposta Th17. A diminuição de células positivas para STAT5+, pSTAT5+ no espaço peribroncovascular e a expressão de IL-10 ocorreram desde os primeiros estágios do desenvolvimento da DPOC e somente em momento posterior, foi observado o aumento de células positivas para STAT3+, pSTAT3+ e expressão de IL-17.

A FOXP3 é um fator de transcrição expresso por células Treg, o qual é essencial para o desenvolvimento e manutenção da atividade imunossupressora destas células (52, 53) e o TGF- β é a citocina responsável pela ativação deste fator de transcrição (54).

Tais achados corroboram com estudo desenvolvido em nosso laboratório por Sales e colaboradores (2017) (23), os quais demonstraram que a obstrução em pacientes fumantes estava associada à diminuição de células Treg e de células positivas para IL-10 nas vias aéreas pequenas de pacientes fumantes. Além disso, também verificaram que o aumento do número de células positivas para IL-17 estava presente em ambos os grupos de fumantes, independentemente da presença da obstrução. Somente o hábito de fumar já propiciou uma resposta perfil Th17 nestes pacientes.

Em um estudo temporal em modelo experimental de exposição à fumaça de cigarro, Ito e colaboradores (2017) (47) demonstraram a redução de células Treg e de células positivas para IL-10. Os autores observaram a diminuição de células positivas para IL-10 desde o primeiro mês, e se manteve até o sexto mês de exposição, corroborando com os achados do presente estudo, que mostra a redução de células Treg no terceiro e sexto mês nos grupos experimentais comparados aos seus controles.

A importância da proteína STAT5 para expressão da FOXP3 e atividade da célula Treg está descrito em experimentos “in vivo” e “in vitro” (55). Duan e colaboradores (2016) (56) demonstraram que quanto maior o tempo de

exposição à fumaça de cigarro, menor a proporção de células Treg e da expressão de FOXP3 e IL-10 em pulmões de camundongos.

Neste estudo, uma possível explicação para estes resultados seria que apesar da presença de Treg, a produção de IL-10 por estas células esteja associada à diminuição tanto da pSTAT5+ quanto da FOXP3. Alguns estudos apontam que a atuação das Treg mediada por IL-10 seja fundamental no controle desta resposta imunológica em pacientes com DPOC (57, 58).

Entretanto, são poucos os estudos que relacionam o papel das Treg com sua produção de IL-10 na regulação desta resposta. Acredita-se que as Treg atuem na regulação da resposta inflamatória na tentativa de suprimir a resposta à auto-antígenos, e a ausência ou mau funcionamento destas células contribua para a inflamação persistente e consequente desenvolvimento e progressão da doença (13, 59).

Embora tenha sido detectada diminuição da resposta anti-inflamatória e aumento de Lm desde o terceiro mês de exposição à fumaça de cigarro, bem como o aumento da expressão de IL-6, o desvio para a resposta Th17 somente ocorreu no sexto mês, quando foi observado o aumento das células positivas para STAT3 e pSTAT3 no espaço peribroncovascular.

Estes achados estão em concordância com estudos clínicos e experimentais. Ruwanpura e colaboradores (2012) (37) demonstraram em modelo experimental que o aumento da expressão de IL-6 induziu a ativação de STAT3 e concomitante diferenciação de células Th17. Yew-Booth e colaboradores (2015) (34) também observaram aumento dos níveis de IL-6 e de STAT3 tanto em amostras de escarro, quanto de pulmões em pacientes com DPOC em estágios mais avançados da doença.

Li e colaboradores (2014) (60) desenvolveram um estudo em pacientes com DPOC com exacerbação aguda, pacientes com DPOC estáveis e fumantes que apresentavam função pulmonar normal, e observaram aumento do perfil Th17 tanto em sangue periférico quanto em amostras de escarro nos pacientes com DPOC comparados ao grupo dos fumantes com função pulmonar normal. Além disto, houve uma redução de células Treg em ambos

os grupos DPOC, embora os pacientes com DPOC com exacerbação aguda tenham tido menor número de células Treg comparados aos DPOC estáveis.

Ainda, Zhang e colaboradores (2013) (61), analisaram por ELISA amostras de escarro e soro de indivíduos com DPOC, fumantes com função pulmonar normal e não fumantes e também detectaram uma correlação positiva entre a progressão da doença e o aumento de IL-17, reforçando a importância da resposta Th17 no desenvolvimento desta doença.

Para um maior entendimento dos mecanismos intracelulares na diferenciação para resposta Th17, foi avaliada a densidade de células positivas para SOCS1 e SOCS3. Notou-se uma diminuição de células positivas para SOCS3 no espaço peribroncovascular desde os 3 meses, concomitantemente ao aumento da expressão de IL-6. Crocker e colaboradores (2003) (62) demonstraram que a falta de SOCS3 induz aumento de IL-6 em cultura de células de hepatócitos e macrófagos. Além disso, Chen e colaboradores (2014) (53) detectaram uma redução de SOCS3 em amostras de diafragma e em biópsias brônquicas de pacientes com DPOC.

Entretanto, no espaço peribroncovascular as análises de SOCS1 demonstraram aumento com 3 meses de experimento, sendo que o mesmo foi mantido até o sexto mês nos grupos expostos à fumaça de cigarro. Knosp e Johnston (2012) (63) demonstraram que a presença de SOCS1 promove a diferenciação para Th17 pela regulação de SOCS3 e pelo bloqueio de IFN- γ . A SOCS1 também pode promover a diminuição da produção de FOXP3⁺ no timo, o que corrobora em parte com os nossos resultados (32, 64).

Em nosso estudo, foi observado que os resultados obtidos para a expressão de proteínas avaliada pela técnica de *immunoblotting* não foram em sua maioria consistentes com as observadas pela avaliação de morfometria no espaço peribroncovascular. Uma vez que o *immunoblotting* é feito em homogenato do pulmão e contempla outras regiões que não somente a peribroncovascular, foram feitas as avaliações dos mesmos parâmetros por morfometria na região do parênquima.

A maior parte dos resultados observados no parênquima é condizente com os dados do *immunoblotting* e não demonstram diferenças estatísticas,

não revelando assim o papel de algumas das proteínas intracelulares na diferenciação de células Th17 e Treg.

Para este modelo experimental, a técnica que demonstrou maior diferença entre os parâmetros obtidos foi a análise morfométrica em regiões peribroncovasculares, região esta onde se encontra a maior densidade de células inflamatórias em modelo experimental de indução de DPOC por exposição à fumaça de cigarro (46).

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados corroboram com os achados clínicos e experimentais prévios, demonstrando que desde o início do desenvolvimento da doença, as proteínas SOCS e STAT já estão envolvidas na diferenciação das células T CD4⁺ naive e no equilíbrio da resposta Th17/Treg.

A sinalização intracelular para a diferenciação de células Treg e o comprometimento da liberação de IL-10 ocorreram em estágios iniciais da doença, enquanto que a resposta com perfil Th17 se inicia em momento posterior, sugerindo que esta falha no controle do processo inflamatório mediado pelas células Treg tenha papel fundamental no desenvolvimento e progressão da DPOC.

Além disso, este estudo temporal nos possibilitou uma melhor compreensão a respeito do papel das proteínas SOCS e STAT em diferentes compartimentos e sua importância no controle do processo inflamatório, podendo ser utilizadas como futuros alvos terapêuticos para o tratamento de pacientes com DPOC.

7. REFERÊNCIAS

1. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2019.
2. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(6):532-55.
3. Zhang X, Shan P, Jiang G, Cohn L, Lee PJ. Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema. *J Clin Invest*. 2006;116(11):3050-9.
4. Adeloye D, Chua S, Lee C, Basquill C, Papana A, Theodoratou E, et al. Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2015;5(2):020415.
5. (IBGE) FIBdGeE. Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas - Brasil, grandes regiões e unidades da federação 2013.
6. Eisner MD, Balmes J, Katz PP, Trupin L, Yelin EH, Blanc PD. Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Environ Health*. 2005;4(1):7.
7. Rahaghi FF, Miravittles M. Long-term clinical outcomes following treatment with alpha 1-proteinase inhibitor for COPD associated with alpha-1 antitrypsin deficiency: a look at the evidence. *Respir Res*. 2017;18(1):105.
8. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):16-27.
9. McDonough JE, Yuan R, Suzuki M, Seyednejad N, Elliott WM, Sanchez PG, et al. Small-airway obstruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2011;365(17):1567-75.
10. Baraldo S, Saetta M. To reg or not to reg: that is the question in COPD. *Eur Respir J*. 2008;31(3):486-8.
11. Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med*. 2007;13(5):567-9.

12. Cosio MG, Majo J, Cosio MG. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells. *Chest*. 2002;121(5 Suppl):160S-5S.
13. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*. 2011;378(9795):1015-26.
14. Jiang D, Liang J, Li Y, Noble PW. The role of Toll-like receptors in non-infectious lung injury. *Cell Res*. 2006;16(8):693-701.
15. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2009;360(23):2445-54.
16. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, et al. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med*. 2004;1(1):e8.
17. Sullivan AK, Simonian PL, Falta MT, Mitchell JD, Cosgrove GP, Brown KK, et al. Oligoclonal CD4+ T cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(5):590-6.
18. van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, et al. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(7):751-8.
19. Lambrecht BN, Prins JB, Hoogsteden HC. Lung dendritic cells and host immunity to infection. *Eur Respir J*. 2001;18(4):692-704.
20. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, et al. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol*. 2009;157(2):316-24.
21. 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(3):1331-40.
22. Zhang JC, Chen G, Chen L, Meng ZJ, Xiong XZ, Liu HJ, et al. TGF-beta/BAMBI pathway dysfunction contributes to peripheral Th17/Treg imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep*. 2016;6:31911.
23. Sales DS, Ito JT, Zanchetta IA, Annoni R, Aun MV, Ferraz LFS, et al. Regulatory T-Cell Distribution within Lung Compartments in COPD. *COPD*. 2017;14(5):533-42.
24. Yoshimura A, Suzuki M, Sakaguchi R, Hanada T, Yasukawa H. SOCS, Inflammation, and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2012;3:20.

25. Kiu H, Nicholson SE. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors*. 2012;30(2):88-106.
26. Linossi EM, Nicholson SE. Kinase inhibition, competitive binding and proteasomal degradation: resolving the molecular function of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunol Rev*. 2015;266(1):123-33.
27. Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, et al. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J*. 1995;14(12):2816-26.
28. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*. 1997;387(6636):917-21.
29. Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*. 1997;387(6636):924-9.
30. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*. 1997;387(6636):921-4.
31. Yamamoto K, Yamaguchi M, Miyasaka N, Miura O. SOCS-3 inhibits IL-12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor beta2 subunit. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310(4):1188-93.
32. Lu LF, Thai TH, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, et al. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity*. 2009;30(1):80-91.
33. Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*. 2010;142(6):914-29.
34. Yew-Booth L, Birrell MA, Lau MS, Baker K, Jones V, Kilty I, et al. JAK-STAT pathway activation in COPD. *Eur Respir J*. 2015;46(3):843-5.
35. Ruwanpura SM, McLeod L, Brooks GD, Bozinovski S, Vlahos R, Longano A, et al. IL-6/Stat3-driven pulmonary inflammation, but not emphysema, is dependent on interleukin-17A in mice. *Respirology*. 2014;19(3):419-27.

36. Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, Zissler U, Rosewich M, Baer PC, et al. Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine*. 2010;50(2):152-7.
37. Ruwanpura SM, McLeod L, Miller A, Jones J, Vlahos R, Ramm G, et al. Deregulated Stat3 signaling dissociates pulmonary inflammation from emphysema in gp130 mutant mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;302(7):L627-39.
38. Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, Gnemmi I, Ricciardolo FL, Oates T, et al. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2004;24(1):78-85.
39. Zhao P, Li J, Tian Y, Mao J, Liu X, Feng S, et al. Restoring Th17/Treg balance via modulation of STAT3 and STAT5 activation contributes to the amelioration of chronic obstructive pulmonary disease by Bufei Yishen formula. *J Ethnopharmacol*. 2018;217:152-62.
40. Nasreen N, Warren A, Burkhalter Z, Mohammed KA. Suppressor Of Cytokine Signaling-3 (SOCS-3): A Quantitative Biomarker For The Efficacy Of Therapy In COPD. 2010:A1401-A.
41. Nasreen N, Gonzalves L, Peruvemba S, Mohammed KA. Fluticasone furoate is more effective than mometasone furoate in restoring tobacco smoke inhibited SOCS-3 expression in airway epithelial cells. *Int Immunopharmacol*. 2014;19(1):153-60.
42. Springer J, Scholz FR, Peiser C, Dinh QT, Fischer A, Quarcoo D, et al. Transcriptional down-regulation of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 in chronic obstructive pulmonary disease. *J Occup Med Toxicol*. 2013;8(1):29.
43. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(1):L1-15.
44. Wright JL, Sun JP. Effect of smoking cessation on pulmonary and cardiovascular function and structure: analysis of guinea pig model. *J Appl Physiol* (1985). 1994;76(5):2163-8.
45. Valenca SS, da Hora K, Castro P, Moraes VG, Carvalho L, Porto LC. Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. *Toxicol Pathol*. 2004;32(3):351-6.

46. Ito JT CD, Sales DS, Lourenço JD, Simão JJ, Olivo CR, Martins MA, Macchione M, Lopes FDTQS. Importance of Tregs and IL-10 in COPD Progression Induced by Cigarette Smoke Exposure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2016.
47. Ito JT, Cervilha DAB, Silva LEF, Lourenço JD, Moreira AR, Kohler JB, Negri EM, Macchione M, Mauad T, Martins MA, Lopes FDTQS. Regulatory T cells in COPD development: How the animal model resembles the human pathophysiological features. *European Respiratory Journal* 2017 50: PA4934.
48. 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(4):L612-31.
49. Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJ, Moriya HT, et al. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J*. 2012;39(2):254-64.
50. Margraf LR, Tomashefski JF, Jr., Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis*. 1991;143(2):391-400.
51. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest*. 1963;12:131-55.
52. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*. 2013;38(3):414-23.
53. Chen W, Hong YQ, Meng ZL. Bioinformatics analysis of molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(23):3557-63.
54. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 2009;30(5):626-35.
55. Passerini L, Allan SE, Battaglia M, Di Nunzio S, Alstad AN, Levings MK, et al. STAT5-signaling cytokines regulate the expression of FOXP3 in CD4+CD25+ regulatory T cells and CD4+CD25- effector T cells. *Int Immunol*. 2008;20(3):421-31.
56. Duan MC, Zhang JQ, Liang Y, Liu GN, Xiao J, Tang HJ, et al. Infiltration of IL-17-Producing T Cells and Treg Cells in a Mouse Model of Smoke-Induced Emphysema. *Inflammation*. 2016;39(4):1334-44.

57. 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(3):555-62.
58. Hou J SY, 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(12):1131-9.
59. 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(2):75-86.
60. Li XN, Pan X, Qiu D. Imbalances of Th17 and Treg cells and their respective cytokines in COPD patients by disease stage. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(12):5324-9.
61. Zhang L, Cheng Z, Liu W, Wu K. Expression of interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in serum and sputum of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *COPD*. 2013;10(4):459-65.
62. Croker BA, Krebs DL, Zhang JG, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, et al. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol*. 2003;4(6):540-5.
63. Knosp CA, Johnston JA. Regulation of CD4+ T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins. *Immunology*. 2012;135(2):101-11.
64. Zhan Y, Davey GM, Graham KL, Kiu H, Dudek NL, Kay T, et al. SOCS1 negatively regulates the production of Foxp3+ CD4+ T cells in the thymus. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(6):473-80.