## **JULIANA DIAS LOURENÇO**

# Avaliação do tratamento com um inibidor para serinoprotease em modelo experimental de enfisema induzido por exposição à fumaça de cigarro

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

Programa de Fisiopatologia Experimental Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Degobbi Tenório Quirino dos Santos Lopes

## **JULIANA DIAS LOURENÇO**

# Avaliação do tratamento com um inibidor para serinoprotease em modelo experimental de enfisema induzido por exposição à fumaça de cigarro

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

Programa de Fisiopatologia Experimental Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Degobbi Tenório Quirino dos Santos Lopes

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lourenço, Juliana Dias

Avaliação do tratamento com um inibidor para serinoprotease em modelo experimental de enfisema induzido por exposição à fumaça de cigarro / Juliana Dias Lourenço. -- São Paulo, 2016.

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

Orientadora: Fernanda Degobbi Tenório Quirino dos Santos Lopes.

Descritores: 1.Modelos animais 2.Doença pulmonar obstrutiva crônica 3.Enfisema pulmonar 4.Tabaco 5.Inibidores de proteases 6.Metaloproteinases da matriz

USP/FM/DBD-033/16

#### **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Ricardo e Luci e minha irmã Rafaela, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e me amarem incondicionalmente.

Ao Thalisson, por todo amor e companheirismo, e por fazer dos meus sonhos os dele também.

#### **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço imensamente à minha orientadora Dra. Fernanda Lopes, por ter me acolhido no laboratório e no seu grupo de pesquisa em 2010, e desde então ser minha "mãe" no mundo da ciência. Por me ensinar diariamente com muito carinho e alguns puxões de orelha, as práticas laboratoriais e o valor do nosso trabalho. Sem ela, esse trabalho não existiria. Muito obrigada!

À Dra Clarice Olivo, que esteve presente e me ajudou diversas vezes, desde que entrei no laboratório.

Ao professor Sérgio Sasaki e suas alunas Adriana Durán e Luana Neves, por disponibilizarem tempo e recursos para a produção do inibidor usado neste estudo.

Ao professor Chin Jia Lin e sua aluna Natália, por disponibilizarem o laboratório de biologia molecular e ensinarem os princípios teóricos e práticos para a realização dos experimentos.

Ao professor Mílton de Arruda Martins por prover o subsídio material para a realização do trabalho e por sua disponibilidade e atenção diversas vezes ao sanar nossas dúvidas.

Ao Davi, Dani e Tiyaki, por me ensinarem e ajudarem com as padronizações de imunohistoquímica e estarem presentes em diversos experimentos e reuniões.

À Alyne e Eleonardo que me ajudaram nas exposições ao fumo.

À Camila e Fabíola que também me ajudaram e acompanharam nos experimentos de biologia molecular.

Aos demais funcionários do laboratório Davi Francisco, Rosana e Edna, por toda a boa vontade em ajudar no dia a dia.

Aos membros da banca de qualificação, que contribuíram com as correções e ideias para a finalização deste trabalho: Dra Elnara Negri, Dr. Rildo Volpini e Dr. Rodolfo Vieira.

A todos os companheiros de LIM-20, Davi, Daniela, Tiyaki, Alyne, Júlia, Jussara, Camila, Isabela, Thayse, Clarice, Fernanda Lopes, Fernanda Arantes e Beatriz, pela amizade, companhia e risadas diárias.

Às minhas amigas e companheiras de vida: Aline, Ana, Bárbara, Débora, Giovanna, Joyce, Laureen, Luana, Nani, Renata, Tatiani e Thalita por sempre torcerem por mim, pelo tempo, risadas e experiências que compartilhamos e por tornarem a vida mais leve.

Aos meus pais Ricardo e Luci, e minha irmã Rafaela: à vocês eu devo tudo. Meus pais que durante toda a vida não mediram esforços para educar a mim e minha irmã, sempre com muita dedicação e amor. E minha irmã que sempre foi minha companheira e me apoiou em tudo, mesmo quando criança. Eu amo vocês!

E ao Thalisson, que há mais de 6 anos é meu companheiro e evolui junto comigo. Sempre com amor, esteve presente nos momentos de conquista e nos momentos difíceis, me tornando dia após dia, um ser humano melhor.

A todos vocês, a minha eterna gratidão! MUITO OBRIGADA!

# **EPÍGRAFE**

"Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is not to stop questioning"

**Albert Einstein** 



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

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria

# Lista de Abreviaturas e Siglas

#### Lista de Símbolos

# Lista de Figuras

#### Lista de Quadros e Tabelas

#### **RESUMO**

#### **Abstract**

1.	. INTRODUÇAO 1
	1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)
	1.2 Fisiopatologia da DPOC
	1.2.1 Células Inflamatórias
	1.2.2 Metaloproteases de Matriz (MMPs)
	1.2.3 Hipótese Protease-Antiprotease
	1.3 Modelos Experimentais para o estudo da Fisiopatologia da DPOC 5
	1.3.1 Modelo de Enfisema induzido por Exposição à Fumaça de Cigarro 5
	1.3.2 Modelo de Enfisema induzido por Instilação de Elastase 6
	1.4 Utilização de Inibidores Proteicos de Proteases em Modelos Experimentais de Enfisema
	1.4.1 Inibidor de serinoproteases do carrapato <i>Rhipicephalus Boophilus</i> microplus
2	. JUSTIFICATIVA11
3.	. <b>OBJETIVOS</b>
	3.1 Objetivo Geral
	3.2 Objetivos Específicos
4.	. <b>MÉTODOS</b>
	4.1 Primeiro Protocolo
	4.1.1 Indução do Enfisema Pulmonar
	4.1.2 Tratamento com Inibidor de Proteases
	4.1.3 Grupos Experimentais

	4.1.4 Avaliação da Mecânica Respiratória	. 17
	4.1.5 Análise Histológica	. 18
	4.1.6 Avaliação Morfométrica	. 18
	4.2 Segundo Protocolo	. 20
	4.2.1 Indução do enfisema	. 20
	4.2.2 Tratamento com Inibidor de Proteases	. 20
	4.2.3 Grupos Experimentais	. 20
	4.2.4 Avaliação da Mecânica Respiratória	. 21
	4.2.5 Avaliação Morfométrica	. 21
	4.3 Estudo da expressão gênica para Metaloproteases	. 23
	4.3.1 Criopreservação de tecidos e Extração de RNA	. 24
	4.3.2 Análise da Qualidade do RNA	. 24
	4.3.3 Quantificação do RNA total	. 25
	4.3.4 Transcrição reversa	. 25
	4.3.5 Real-time RT-qPCR	. 26
	4.4 Análise Estatística	. 28
5	. RESULTADOS	. 31
	5.1. Primeiro Protocolo	. 31
	5.2 Segundo Protocolo	. 33
6	. DISCUSSÃO	. 42
7	. CONCLUSÃO	. 50
8	. ANEXOS	. 52
9	. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	. 54

#### Lista de Abreviaturas e Siglas

**α1-AT** Alfa 1-Antitripsina

BAL Lavado Broncoalveolar

BALB/c Camundongo isogênico (inbred) utilizados principalmente como

modelo em imunologia

**cDNA** Ácido Desoxirribonucleico complementar

CO Monóxido de Carbono

Ct Cycle Threshold

C57BL/6 Camundongo isogênico (inbred) utilizados principalmente como

modelo em imunologia.

**DEPC** Dietilpirocarbonato

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**DPOC** Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

**FMUSP** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GOLD Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

Gtis Resistência tecidual

HE Coloração Hematoxilina-eosina

**HNE** Elastase de Neutrófilos Humana

Htis Elastância tecidual

**HuPK** Calicreína Plasmática Humana

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de Hidrogênio

Lm Intercepto Linear Médio

**MMP** Metaloprotease de Matriz

**mRNA** Ácido Ribonucleico mensageiro

NaCl Cloreto de Sódio

**NADPH** Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato

**NE** Elastase de Neutrófilos

**NIH** National Institutes of Health

OMS Organização Mundial de Saúde

PBS Tampão Fosfato-Salino

PCR Polymerase Chain Reaction

**PPE** Elastase Pancreática de Porco

**Ppm** Partes por milhão

Raw Resistência de Vias aéreas

rBmTl-A recombinant Rhipicephalus Boophilus microplus inhibitor

RNA Ácido Ribonucleico

RT Transcrição reversa

RT-qPCR Método quantitative de PCR em tempo real

**TBE** Tris, Borato, EDTA

**TIMP** Inibidor de Metaloprotease de Matriz

**TNF-α** Fator de Necrose Tumoral Alfa

**TPM** Concentração Total de Partículas em Suspensão

**VE** Veículo

#### Lista de Símbolos

°C Grau Centígrado

cmH₂O Centímetros de água

f Frequência

**g** Gramas

**h** Horas

i Unidade imaginária

I<sub>aw</sub> Inertância das Vias Aéreas

**L** Litros

**L/min** Litros por minuto

**mg** Miligramas

mg/Kg Miligramas por quilograma

**ml** Mililitro

ml/kg Mililitro por quilograma

**ng**/μ**l** Nanograma por microlitro

**pmol** Picomol

S Inclinação da reta de regressão

**Z(f)** Impedância em função da frequência

**Zrs** Impedância

μg/m³ Micrograma por metro cúbico

μl Microlitro

**μm** Micrômetro

 $\alpha \qquad \frac{2}{\pi} \cdot \arctan\left(\frac{H}{G}\right)$ 

**π** Pi

**Δ** Delta

< Menor

% Percentual

# Lista de Figuras

Figura 1:	Esquema ilustrativo da caixa de exposição à fumaça de cigarro 16						
Figura 2:	Esquema ilustrativo de como o inibidor rBmTI-A foi administrado na primeira fase do estudo16						
Figura 3:	Modelo do retículo de Weibel utilizado nas análises morfométricas						
Figura 4:	Esquema ilustrativo de como o inibidor rBmTI-A foi administrado na segunda fase do estudo						
Figura 5:	Fotomicrografia de eletroforese em gel de agarose25						
Figura 6:	Parâmetro de Raw (A), Gtis (B) e Htis (C) no primeiro protocolo do estudo31						
Figura 7:	Valores do Intercepto Linear Médio (Lm) e fotomicrografias no primeiro protocolo do estudo						
Figura 8:	Parâmetro de Raw (A), Gtis (B) e Htis (C) no segundo protocolo do estudo						
Figura 9:	Valores do Intercepto Linear Médio (Lm) e fotomicrografias no segundo protocolo do estudo						
Figura 10:	Proporção de fibras de colágeno (A) e elástica (B) no parênquima pulmonar35						

Figura 11:	Células positivas no parênquima pulmonar para MAC-2 (A), MMP-					
	12 (C), MMP-9 (D), TIMP-1 (E) e contagem de células					
	polimorfonucleares (B)37					
Figura 12:	Células positivas para GP91phox no parênquima pulmonar38					
Figura 13:	Células positivas para TNF-α no parênquima pulmonar39					
Figura 14:	Expressão gênica para as metaloproteases 12 (A) e 9 (B) no					
	parênquima pulmonar40					

# Lista de Quadros e Tabelas

Tab	ela <sup>·</sup>	1: /	Anticorpos	usados nas	reações c	de imuno	histoquímic	:a22
-----	------------------	------	------------	------------	-----------	----------	-------------	------

Lourenço JD. Avaliação do tratamento com um inibidor para serinoprotease em modelo experimental de enfisema induzido por exposição à fumaça de cigarro [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: Demonstramos previamente que em modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por instilação de elastase, o inibidor de serinoprotease rBmTI-A promoveu a melhora da destruição tecidual em camundongos. Considerando que o tabagismo é o principal fator de risco para o desenvolvimento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e que o modelo de exposição à fumaça de cigarro é considerado o que melhor mimetiza esta doença em humanos, este estudo teve por objetivo verificar a ação do inibidor para serinoproteases rBmTI-A sobre os processos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento do enfisema pulmonar, em modelo de exposição ao tabaco. Métodos: Para a indução do enfisema pulmonar, os animais foram expostos à fumaça de cigarro (duas vezes ao dia/ 30 minutos/ 5 dias por semana/ durante 12 semanas), e os animais controle permaneceram expostos ao ar ambiente. Dois protocolos de tratamento com o inibidor rBmTI-A foram realizados. No primeiro, os animais receberam duas administrações do inibidor rBmTI-A ou de seu veículo (Solução Salina 0,9%) por via intranasal, sendo a primeira após 24h do término das exposições ao cigarro e outra, 7 dias após à primeira instilação do inibidor. No segundo protocolo, os animais receberam 3 administrações do inibidor rBmTI-A, durante o tempo de exposição (1ª dose: 24h antes do início da exposição à fumaça de cigarro; 2ª dose: um mês após o início da exposição; 3ª dose: dois meses após o início). Após o término dos protocolos de exposição e tratamento, os animais foram submetidos aos procedimentos para coleta dos dados de mecânica respiratória e avaliação do Intercepto Linear Médio (Lm). Para o segundo protocolo, realizamos também as medidas para quantificação de fibras de colágeno e elástica, da densidade de células positivas para MAC-2, MMP-12 e 9, TIMP-1, Gp91phox e TNF-α no parênquima através de imunohistoquímica, contagem de células polimorfonucleares além da expressão gênica de MMP-12 e 9 no pulmão através de RT-qPCR. Resultados e Discussão: O tratamento

com o inibidor para serinoprotease rBmTI-A atenuou o desenvolvimento do enfisema pulmonar apenas no segundo protocolo, quando foi administrado durante a exposição à fumaça de cigarro. Embora os grupos Fumo-rBmTIA e Fumo-VE apresentem aumento de Lm comparados aos grupos controles, houve uma redução deste índice no grupo Fumo-rBmTIA comparado ao grupo Fumo-VE. O mesmo comportamento foi observado para as análises de proporção em volume de fibras de elástica e colágeno no parênquima. Além disto, observamos aumento de macrófagos, MMP-12, MMP-9 e TNF-α nos grupos expostos à fumaça de cigarro, mas o tratamento com o inibidor rBmTI-A diminuiu apenas a quantidade de células positivas para MMP-12. Na avaliação da expressão gênica para MMP-12 e 9, não observamos diferença entre os grupos experimentais e o mesmo comportamento foi observado para a quantidade de células polimorfonucleares no parênquima. Além disso, observamos aumento de GP91phox e TIMP-1 nos grupos tratados com rBmTI-A. **Conclusões:** Tais resultados sugerem que o inibidor rBmTl-A não foi efetivo como tratamento da lesão após a doença instalada. Entretanto, atenuou o desenvolvimento da doença quando administrado durante a indução do enfisema, possivelmente através do aumento de GP91phox e TIMP-1, acompanhados pela diminuição de MMP-12.

**Descritores:** modelos animais; doença pulmonar obstrutiva crônica; enfisema pulmonar; tabaco; inibidores de proteases; metaloproteinases da matriz.

Lourenço JD. Evaluation of a serine protease inhibitor treatment in an experimental model of cigarette smoke-induced emphysema [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

**Introduction:** We have previously showed that in an elastase-induced model of emphysema, the treatment with a serine protease inhibitor rBmTI-A, resulted in an improvement of tissue destruction in mice. Considering that smoking is the main risk factor for the development of COPD, and the cigarette smoke (CS) exposure is considered the best model to reproduce physiopathologic similarities with such disease in humans, this study aimed to verify the rBmTI-A treatment on the physiopathological processes involved in the development of cigarette smoke-induced emphysema. **Methods:** To induce pulmonary emphysema, animals were exposed to cigarette smoke (twice a day/ 30 minutes/ 5 days per week/ for 12 weeks) and the control animals were exposed to room air. Two treatment protocols with rBmTl-A inhibitor were performed. In the first one, animals received two administrations of rBmTl-A inhibitor or its vehicle (Saline Solution 0.9%) by nasal instillation, one dose at 24 hours after the end of exposure to tobacco smoke and another one, 7 days after the first instillation of the inhibitor. In the second protocol, animals received 3 rBmTI-A inhibitor administrations during the exposition time (1st dose: 24 hours before the start of exposure to cigarette smoke; 2<sup>nd</sup> dose: one month after the start of exposure, 3<sup>rd</sup> dose: two months after the start). After the end of exposure and treatment protocols, animals were submitted to procedures for collection of respiratory mechanics and evaluation of the Mean Linear Intercept (Lm). For the second protocol, we also measured the volume proportion of collagen and elastic fibers, the density of positive cells for MAC-2, MMP-12 and -9, TIMP-1, GP91phox and TNF-α in lung parenchyma by immunohistochemistry. Also, we evaluated the measurement of polymorphonuclear cells and the lung gene expression for MMP-12 and 9 by RT-qPCR. Results and Discussion: Treatment with the serine protease inhibitor rBmTI-A attenuated the development of emphysema only in the second protocol, when it was administered during exposure to cigarette smoke. Although Smoke-rBmTIA and

Smoke-VE groups showed an increase of Lm measure compared to Control groups, there were a decrease in the Smoke-rBmTIA group compared to Smoke-VE group. The same response was observed for the analysis of volume proportion of elastic and collagen fibers in parenchyma. In addition, we observed an increase of macrophages, MMP-12, MMP-9 and TNF-α in groups exposed to cigarette smoke, but treatment with rBmTI-A inhibitor only decreased the number of positive cells for MMP-12. We did not observed difference between the experimental groups in lungs gene expression for MMP-12 and 9, and the same behavior was observed for the amount of polymorphonuclear cells in parenchyma. Moreover, we observed an increase of GP91phox and TIMP-1 in groups treated with rBmTI-A. Conclusions: These results suggest that rBmTI-A inhibitor was not effective for treatment of parenchymal lesions after established disease. However, this inhibitor attenuated the development of disease when administered during the induction of emphysema, possibly by an increase of GP91phox and TIMP-1, accompanied by a decrease of MMP-12.

**Descriptors:** models, animal; pulmonary disease; chronic obstructive; pulmonary emphysema; tobacco; protease inhibitors; matrix metalloproteinases.

#### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença comum, prevenível e tratável, caracterizada pela persistente limitação ao fluxo aéreo que é geralmente progressiva e associada ao aumento da resposta inflamatória nos pulmões e nas vias aéreas, a gases ou partículas tóxicas. A exacerbação e a comorbidade contribuem para a intensidade dessa doença em pacientes dependendo dos fatores intrínsecos aos indivíduos, como alterações genéticas e maior exposição a fatores ambientais, como poluição atmosférica<sup>1</sup>.

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

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80 milhões de pessoas têm DPOC moderada a severa. Em 2005, três milhões de mortes por DPOC foram relatadas, e a OMS acredita que, no ano de 2030 a DPOC será a terceira principal causa de morte, sendo que em 1990 ocupava a sexta posição<sup>3</sup>. Há alguns anos a DPOC ainda era tida como uma doença progressiva e irreversível, mas nas atuais diretrizes internacionais (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) e American Thoracic Society/European Respiratory Society), a DPOC é considerada uma doença modificável e tratável<sup>4,5</sup>. No Brasil, ocupa o sexto lugar de causa de mortalidade. Estima-se que 4,5 a 6 milhões de brasileiros sejam portadores da DPOC, representando altos custos com seu tratamento e grande impacto sobre a sociedade, sobre os familiares e sobre os planos de saúde<sup>6,7</sup>.

O principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC é o tabagismo. A inalação da fumaça de cigarro e outras partículas nocivas, como

a fumaça de combustíveis de biomassa, causam uma resposta inflamatória no pulmão, que em pacientes que desenvolvem a DPOC ocorre de maneira exacerbada.

Com a progressão do processo inflamatório pode ocorrer aprisionamento de ar e limitação progressiva do fluxo aéreo, o que por sua vez, resulta na falta de ar e outros sintomas característicos da DPOC¹. Durante muitos anos, considerou-se que apenas 15% dos fumantes desenvolveriam DPOC, no entanto, mais recentemente demonstrou-se que a continuidade do tabagismo determinaria obstrução ao fluxo de ar em vias aéreas em até 50% em indivíduos com mais de 70 anos³. A deficiência em α-1 antitripsina (α1-AT), um inibidor de proteases produzido pelo próprio corpo, é outro fator de risco importante para o desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica. Em um estudo desenvolvido por Eriksson³ demonstrou-se que 2-3% dos pacientes que apresentavam DPOC, também apresentavam deficiência grave em α-1 antitripsina.

#### 1.2 Fisiopatologia da DPOC

#### 1.2.1 Células Inflamatórias

Entre os tipos celulares descritos na DPOC, estão os neutrófilos, os quais estão relacionados ao aumento da liberação de oxidantes e proteases, perpetuando o desequilíbrio protease anti-protease<sup>10</sup>.

O hábito de fumar provoca o aumento do número de neutrófilos no pulmão e a consequente liberação de elastase neutrofílica<sup>11</sup> associada a um aumento da produção de muco, agravando a obstrução ao fluxo aéreo e a destruição das paredes alveolares<sup>10</sup>. Muitos estudos demonstram o potencial proteolítico dos neutrófilos e a produção de metaloproteases como MMP-9 e MMP-8<sup>12</sup>.

Outro tipo celular que está presente nas vias respiratórias, vias aéreas distais, no Lavado Broncoalveolar (BAL) e escarro dos pacientes com DPOC, são os macrófagos. Estas células são responsáveis pela liberação de

mediadores inflamatórios como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ânion superóxido, proteases (MMP-12), fatores de crescimento e quimiocinas<sup>10</sup>.

Sabe-se ainda que existe uma relação direta entre o número de macrófagos alveolares e a destruição do pulmão, e que as metaloproteases de matriz (MMPs) são produzidas durante a lesão pulmonar. Dessa forma, tem havido considerável interesse no papel das MMPs derivadas de macrófagos na degradação da matriz pulmonar no enfisema<sup>13</sup>.

#### 1.2.2 Metaloproteases de Matriz (MMPs)

As metaloproteases compõem uma família de enzimas que apresentam ação proteolítica sobre os componentes da matriz extracelular. Estas enzimas podem ser subdivididas em colagenases (MMP-1, - 8, -13), gelatinases (MMP-2, -9), estromelisinas (MMP-3, - 10, -11), matrilisina (MMP-7), metaloelastase de macrófagos (MMP-12), MMPs de membrana (MMP-14, -15, -16, -17) e outras MMPs<sup>14</sup>. A atividade das MMPs é regulada por inibidores endógenos específicos: inibidores de metaloproteases de matriz (TIMPs), como TIMP1, 2,3 e 4<sup>13</sup>.

Há evidências que as MMPs não só degradam a matriz extracelular, mas também estão entre as principais responsáveis na regulação do processo inflamatório em modelos experimentais de exposição à fumaça de cigarro<sup>15</sup>.

A metaloprotease 12 (MMP-12) tem como principal substrato a elastina, bem como outros componentes da matriz extracelular e é produzida predominantemente por macrófagos alveolares<sup>16</sup>. Em estudo realizado por Haumataki et al.<sup>17</sup>, camundongos *knockout* para MMP-12 (ou seja, camundongos deficientes na produção de MMP-12) foram expostos à fumaça de cigarro por 6 meses, seis dias por semana, e apresentaram menor número de macrófagos no tecido, sem desenvolvimento de lesão tecidual quando comparados com camundongos selvagens expostos as mesmas condições, demonstrando desta forma que esta metaloprotease está associada ao desenvolvimento de enfisema induzido por fumo. Dessa forma, a inibição ou deleção de MMPs pode reduzir significativamente ou mesmo anular totalmente o desenvolvimento do enfisema<sup>18</sup>.

Churg et al.<sup>19</sup> demonstraram que animais expostos à fumaça de cigarro e tratados com um inibidor para metaloproteases 9 e 12 , o AZ11557272, apresentaram menor diminuição do fluxo de ar em comparação aos animais expostos somente ao fumo, demonstrando desta forma um efeito protetor para as alterações teciduais. Shapiro et al.<sup>20</sup> demonstraram em estudo com camundongos deficientes em elastase de neutrófilos (NE-/-) e em MMP-12 (MMP-12 -/-) expostos à fumaça de cigarro, que a elastase neutrofilica degrada o inibidor tecidual de metaloproteases TIMP-1, aumentando a quantidade de MMP-12; e inversamente, a MMP-12 degrada a α-1AT aumentando a ação da elastase de neutrófilos. Assim, a elastase neutrofílica e a MMP-12 atuam conjuntamente no aumento do potencial proteolítico uma da outra, sustentando a hipótese protease- antiprotease.

A MMP-9 é uma gelatinase B secretada por células epiteliais dos brônquios, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e macrófagos alveolares. Estudos em humanos e em modelos animais demonstram a ligação da MMP-9 com a DPOC. Foi identificado o aumento da expressão de MMP-9 em pulmões de pacientes fumantes pelo método de coloração por imunohistoquímica<sup>21</sup>. Em modelos animais, Vlahos et al.<sup>22</sup> demonstrou que os níveis de MMP-9 em camundongos se elevam após 3 dias de exposição a 9 cigarros, e que houve aumento dose dependente de MMP-9 em camundongos BALB/c expostos a 3-9 cigarros por 4 dias.

#### 1.2.3 Hipótese 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<sup>6</sup>. Esta teoria provém de observações clínicas em pacientes deficientes em α1-AT que desenvolveram enfisema grave, embora seja raro o aparecimento de enfisema somente devido à ausência desta antiprotease<sup>23</sup>. 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 α1-AT. Assim, se há baixos níveis séricos de α1-AT, o processo de destruição do tecido pulmonar leva ao enfisema<sup>24</sup>.

A exposição crônica ao cigarro comanda a invasão das células inflamatórias nos espaços aéreos alveolares e a consequente liberação de grandes quantidades de elastases, o que para pacientes deficientes em  $\alpha$ 1-AT se torna muito mais crítico<sup>25</sup>.

Além do desequilíbrio protease-antiprotease e da inflamação consequente, mediada principalmente por macrófagos e neutrófilos, há também outros mecanismos como o estresse oxidativo e a apoptose de células estruturais, que estão envolvidos no desenvolvimento do enfisema pulmonar<sup>10,</sup> 18, 26, 27, 28, 29

#### 1.3 Modelos Experimentais para o estudo da Fisiopatologia da DPOC

O estudo da fisiopatologia da DPOC em seres humanos é restrito ao uso de observações morfológicas e moleculares em fragmentos de tecido de pulmões retirados de pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos, ou estudos "in vitro" limitados a um único tempo. Dessa forma, existe uma grande expectativa quanto ao uso de modelos desenvolvidos em animais de laboratório para o estudo da patogênese, das mudanças funcionais e dos efeitos de possíveis fármacos como novos tratamentos, sendo que estes estudos podem ser feitos "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. Os dois modelos experimentais de DPOC mais utilizados são os que utilizam instilação de proteases e exposição à fumaça de cigarro.

#### 1.3.1 Modelo de Enfisema induzido por Exposição à Fumaça de Cigarro

A exposição à fumaça de cigarro é o modelo considerado o 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<sup>30</sup>.

No entanto, um fator importante a ser levado em consideração, é o longo tempo de exposição à fumaça de cigarro requerido para a indução do enfisema pulmonar. Wright et al.<sup>30</sup> encontraram desenvolvimento de enfisema em camundongos após 6 meses de exposições diárias. No entanto, Valença et al.<sup>31</sup> demonstraram presença de lesão do parênquima após 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 por 3 meses, duas vezes ao dia, provocou enfisema em camundongos.

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<sup>30</sup>.

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 <sup>32</sup>.

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<sup>18, 30</sup>.

#### 1.3.2 Modelo de Enfisema induzido por Instilação de Elastase

A utilização de proteases, entre estas a Elastase Pancreática de Porco (PPE), em estudos experimentais surgiu com base em descrições clínicas de

indivíduos deficientes em  $\alpha$ 1-Antitripsina que desenvolviam precocemente enfisema pulmonar, originando a hipótese protease/antiprotease. Nos estudos que elucidaram essa hipótese, foram usados vários tipos de enzimas e, observou-se que apenas as enzimas que degradavam as fibras elásticas do pulmão, causavam o enfisema provando que a destruição das fibras constituintes do parênquima é fundamental para o desenvolvimento dessa doença $^{33,34}$ .

A vantagem da utilização de proteases é que a gravidade da doença que se quer provocar pode ser determinada pela concentração da protease em questão e requer apenas uma única dose de administração da droga. Estudos demonstram que após 21 dias da data da indução, pode se obter lesão e remodelamento do parênquima pulmonar<sup>35,36</sup>.

A maior desvantagem desse modelo é que não são observados todos os eventos fisiopatológicos que ocorrem mediante exposição ao fumo, e por isso, a relevância de terapias utilizadas nesse modelo são menos claras do que as utilizadas em modelo de fumo.

## 1.4 Utilização de Inibidores Proteicos de Proteases em Modelos Experimentais de Enfisema

Os inibidores enzimáticos proteicos exercem um importante papel regulador em células que participam de processos inflamatórios, atribuindo-lhes desta forma, um possível uso para fins farmacológicos. A utilização de inibidores de elastase neutrofílica humana em modelos experimentais têm apresentado resultados satisfatórios na redução da migração de células inflamatórias<sup>37</sup>, da liberação de quimiocinas<sup>38</sup> e consequentemente do processo inflamatório pulmonar<sup>39</sup>.

Wright et al.<sup>40</sup> testaram o efeito de um inibidor sintético de serino elastase em um modelo experimental de enfisema. Cobaias foram expostas à inalação de fumaça de cigarro agudamente (3 dias) e cronicamente (6 meses) e parte destes animais foi tratada conjuntamente com ZD0892, um inibidor de elastase. A administração do ZD0892 diminuiu os efeitos inflamatórios em ambos os tempos. Nos animais expostos agudamente observou-se redução no

número de neutrófilos no lavado broncoalveolar e diminuição da destruição do parênquima pulmonar. Nos animais expostos cronicamente, observou-se também diminuição da atividade inflamatória e destruição de parênquima com diminuição também do fator de necrose tumoral (TNF-α).

Em outro estudo, desenvolvido por Kuraki et al. 41, utilizou-se um inibidor oral de elastase neutrofílica (ONO-6818) em dois modelos experimentais de doença pulmonar em ratos, um modelo de lesão pulmonar aguda e outro de enfisema pulmonar. O pré-tratamento com o ONO-6818 inibiu o desenvolvimento tanto da lesão pulmonar aguda quanto do enfisema pulmonar e estes efeitos foram dose dependentes. Outro estudo realizado em nosso laboratório 42, mostrou que a administração do inibidor de serinoproteases rBmTl-A (*Rhipicephalus Boophilus microplus* inhibitor) tanto 1 hora quanto 21 dias após a indução do enfisema por instilação de Elastase Pancreática de Porco (PPE), resultou na melhora da lesão do parênquima pulmonar, diminuiu o número de células positivas para MMP-12 e de fibras de colágeno, aumentadas nos animais que não receberam o tratamento com o inibidor.

# 1.4.1 Inibidor de serinoproteases do carrapato *Rhipicephalus Boophilus microplus*

Diversos inibidores de serinoproteases foram descritos no carrapato *Rhipicephalus Boophilus microplus* com atividades inibitórias sobre tripsina bovina, Calicreína Plasmática Humana (HuPK) e Elastase de Neutrófilos Humana (HNE)<sup>43,44</sup>. O sequenciamento de DNA complementar (cDNA) de diferentes tecidos de *B. microplus* realizado por Guerrero e seus colaboradores<sup>45</sup> identificou um grande número de sequências de cDNA que traduzem para inibidores de serinoproteaes do carrapato. Dentre essas sequências foi identificada a sequência do DNA do inibidor BmTI-A.

Rhipicephalus (B.) microplus é um importante ectoparasita bovino com extensa distribuição geográfica nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, especialmente no Brasil<sup>46</sup>. Foi descrito, nas larvas e ovos desse carrapato, uma atividade inibitória para serinoproteases, que protege o hospedeiro de infecções por patógenos ou parasitas, inibe proteases de fungos e bactérias, e

que provavelmente regula as proteases envolvidas na coagulação e ativação de citocinas<sup>47</sup>.

#### 2. JUSTIFICATIVA

Resultados obtidos em estudo anterior, demonstraram que o tratamento com rBmTl-A atenuou a lesão do parênquima pulmonar em camundongos submetidos a um protocolo de enfisema pulmonar induzido através da instilação de elastase pancreática de porco.

Considerando os diferentes mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento do enfisema pulmonar, o fato de que até o momento não exista nenhum tratamento eficaz com reversão do processo de lesão tecidual, e que o modelo de exposição à fumaça de cigarro é o que melhor mimetiza o enfisema em humanos, torna-se importante verificar a ação deste inibidor específico sobre os processos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento do enfisema induzido por este modelo experimental, o que poderá auxiliar em futuros estudos para o tratamento desta doença.

#### 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel do inibidor de serinoprotease rBmTl-A, sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento do enfisema pulmonar em camundongos submetidos a um protocolo de exposição à fumaça de cigarro.

## 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os parâmetros de mecânica pulmonar (Raw, Gtis e Htis)
   nos animais controle e doentes, tratados e não tratados.
- Avaliar a destruição tecidual no parênquima pulmonar nos grupos experimentais propostos.
- Quantificar a proporção em volume de fibras de colágeno e elástica no parênquima pulmonar, nos grupos experimentais propostos.
- Quantificar a densidade de macrófagos (MAC-2) e de células positivas para MMP-12, MMP-9, TIMP-1, GP91phox e TNF-α no parênquima pulmonar dos grupos experimentais propostos
- Quantificar a densidade de células polimorfonucleares no parênquima pulmonar nos grupos experimentais propostos.
- Quantificar a expressão gênica para MMP-12 e MMP-9 no pulmão dos animais controle e doentes, tratados e não tratados.

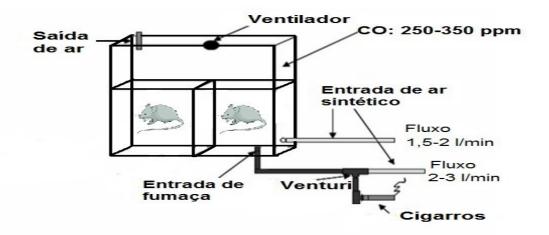
## 4. MÉTODOS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos (peso médio 26g), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). 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). Número do Projeto CEUA: 119/13

#### **4.1 Primeiro Protocolo**

### 4.1.1 Indução do Enfisema Pulmonar

Para indução do enfisema pulmonar, os animais foram expostos à fumaça de cigarro. A exposição ao fumo foi realizada em uma câmara de inalação (28L), 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. Definimos a taxa de fluxo de 1,5 L/min, o que produz 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% (± 1,3). Os animais foram expostos a 12 (±1) cigarros comercialmente filtrados (0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono por cigarro) com concentração total de partículas em suspensão (TPM) 354,8 ± 50,3 µg/m³ por dia. Os camundongos expostos à fumaça 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 permaneceram expostos ao ar ambiente.



**Figura 1**. Esquema ilustrativo da caixa de exposição à fumaça de cigarro (adaptado de Biselli<sup>48</sup>).

#### 4.1.2 Tratamento com Inibidor de Proteases

Após o término das exposições à fumaça de cigarro, esperamos 24h horas para fazer a primeira instilação do inibidor de serinoproteases, o rBmTl-A (*Boophilus microplus* trypsin inhibitor). Cada animal recebeu 35,54 pmol de rBmTl-A em 50 µL de solução também por via intranasal. O veículo utilizado foi solução salina 0,9%. Foram feitas duas instilações, com intervalo de 7 dias entre elas, como mostra a Figura 2.



Figura 2: Esquema ilustrativo de como o inibidor rBmTI-A foi administrado na primeira fase do estudo.

#### 4.1.3 Grupos Experimentais

No plano inicial, foram descritos quatro grupos experimentais:

**Grupo Controle-VE:** Animais que foram mantidos por 12 semanas no biotério expostos ao ar ambiente, e que ao final desse tempo, receberam duas instilações de solução salina (NaCL 0,9%), veículo do rBmTl-A (n=9)

**Grupo Controle-rBmTIA:** Animais que foram mantidos por 12 semanas no biotério expostos ao ar ambiente, e que após este período receberam duas doses de tratamento com rBmTI-A (n=9).

**Grupo Fumo-VE:** Animais que foram expostos à fumaça de cigarro durante 30 minutos, duas vezes por dia, 5 dias por semana, durante 12 semanas. Após o término da exposição estes animais receberam duas instilações de solução salina (NaCL 0,9%), veículo do rBmTI-A (n=7)

**Grupo Fumo-rBmTIA:** Animais que foram expostos à fumaça de cigarro durante 30 minutos, duas vezes por dia, 5 dias por semana, durante 12 semanas. Após o término da exposição estes animais receberam duas doses de tratamento com rBmTI-A, (n=7)

### 4.1.4 Avaliação da Mecânica Respiratória

Após 15 dias do término de exposição ao fumo e após as duas instilações de rBmTl-A, os animais de cada grupo foram anestesiados com Thiopental (50 mg/kg, por via intraperitoneal), traqueostomizados com um cateter intravascular 20G e conectados a um respirador para pequenos animais (FlexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá). Os animais foram ventilados com um volume corrente de 10 mL/kg e frequência respiratória de 120 ciclos/minuto. Foi calculada a impedância do sistema respiratório (Zrs) dos animais de cada grupo, para tanto foi utilizado um sinal de perturbação em volume de 16 segundos. A ventilação mecânica foi interrompida somente para a aplicação das perturbações. Após a perturbação, os dados foram coletados.

Para análise das impedâncias obtidas, utilizamos o modelo de fase constante, descrito por Hantos<sup>49</sup>.

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

O Raw é a resistência de vias aéreas, law é a inertância das vias aéreas, Gtis caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares, Htis caracteriza a energia acumulada nos tecidos do pulmão, i é a unidade

imaginária, f é a freqüência e 
$$\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan\left(\frac{H}{G}\right).$$

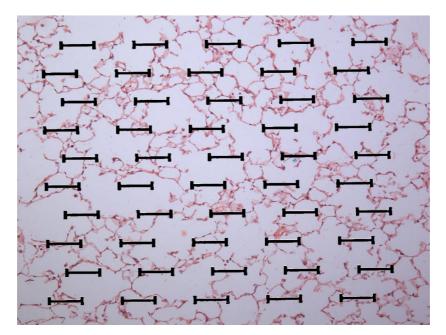
O parâmetro Raw (resistência de vias aéreas), nos permite a análise isoladamente das vias aéreas, sem a interferência do tecido pulmonar. O parâmetro Gtis avalia a resistência tecidual, enquanto que o parâmetro Htis seria a elastância do tecido pulmonar.

# 4.1.5 Análise Histológica

Os pulmões foram fixados em formaldeído (4%) sob pressão constante de 20 cmH<sub>2</sub>O por 24 horas. Após a fixação fizemos cortes destes pulmões para análises morfométricas e de imunohistoquímica. Para as análises morfométricas foram feitas colorações com Hematoxilina-Eosina, Picrossírius Red (para as fibras de colágeno) e Resorcina-Fucsina (para fibras elásticas)<sup>50</sup>.

#### 4.1.6 Avaliação Morfométrica

Para a análise morfométrica, foi realizada uma leitura cega (o pesquisador não sabia a que grupo experimental as lâminas pertenciam) através da utilização do retículo de Weibel<sup>51</sup>, composto por 100 pontos e 50 retas acoplado à ocular de um microscópio óptico convencional, como mostra a Figura 3:



**Figura 3:** Modelo do retículo de Weibel utilizado nas análises morfométricas. Na foto acima, ele se encontra sobre uma fotomicrografia de parênquima pulmonar corado com Hematoxilina e Eosina. Adaptado de Weibel et al<sup>51</sup>.

# Medidas do Intercepto Linear Médio (Lm)

O intercepto linear médio 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 segmentos do retículo cruzam as paredes dos alvéolos em um aumento de 200X<sup>52</sup>.

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

# Lm = 2500 µm/média do número de vezes que os segmentos cruzaram as paredes dos alvéolos.

O valor de 2500 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 2500µm.

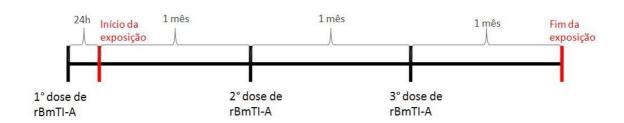
### 4.2 Segundo Protocolo

#### 4.2.1 Indução do enfisema

Foi utilizado a mesma forma de indução do enfisema pulmonar descrito na primeira fase do estudo.

#### 4.2.2 Tratamento com Inibidor de Proteases

Os animais receberam 3 doses do inibidor rBmTI-A, sendo a primeira delas administrada 24 horas antes do início da exposição à fumaça de cigarro; a segunda dose um mês após o início da exposição e, a terceira dose dois meses após o início da exposição, como mostra a figura 4. Cada animal recebeu 35,54 pmol de rBmTI-A em 50 µL de solução também por via intranasal em cada uma das doses. O veículo utilizado foi solução salina 0,9%.



**Figura 4**: Esquema ilustrativo de como o inibidor rBmTI-A foi administrado na segunda fase do estudo.

#### 4.2.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos:

**Grupo Controle-VE:** Animais que foram mantidos por 12 semanas no biotério expostos ao ar ambiente, e que receberam tratamento com solução salina (NaCL 0,9%), veículo do rBmTl-A (n= 8)

**Grupo Controle-rBmTIA:** Animais que foram mantidos por 12 semanas no biotério expostos ao ar ambiente, e que receberam tratamento com o inibidor rBmTI-A (n= 7)

**Grupo Fumo-VE:** Animais que foram expostos à fumaça de cigarro durante 30 minutos, duas vezes por dia, 5 dias por semana, durante 12 semanas e que receberam tratamento com solução salina (NaCL 0,9%), veículo do rBmTI-A (n= 6)

**Grupo Fumo-rBmTIA:** Animais que foram expostos à fumaça de cigarro durante 30 minutos, duas vezes por dia, 5 dias por semana, durante 12 semanas e que receberam tratamento com o inibidor rBmTI-A (n= 8)

## 4.2.4 Avaliação da Mecânica Respiratória

Após 24 horas do final da exposição, os animais foram devidamente anestesiados, submetidos à análise da mecânica respiratória e em seguida, eutanasiados seguindo a mesma metodologia do primeiro protocolo.

## 4.2.5 Avaliação Morfométrica

A análise morfométrica foi feita para a segunda fase do experimento seguindo a mesma metodologia já descrita acima para avaliação do Intercepto Linear Médio no primeiro protocolo.

### Medida das Fibras de Colágeno e das Fibras de Elástica

Para quantificação de fibras colágenas e elásticas utilizamos a técnica de contagem de pontos. Para tanto, foram contados o número de pontos que incidiam sobre as fibras de colágeno e de elástica e também os pontos que incidiam no parênquima remanescente<sup>53</sup>. Para o cálculo, utilizou-se a seguinte equação:

Proporção de Fibras de Colágeno e Elástica no Parênquima

Remanescente = número de pontos que incidiam nas fibras de colágeno

(ou elástica) / número de pontos que incidiam no parênquima.

Foram contados 15 campos por lâmina com um aumento de 400X.

## <u>Imunohistoquímica</u>

Para imunohistoquímica, cortes dos pulmões foram desparafinizados e hidratados. Após bloqueio com peroxidase endógena foi feita recuperação do antígeno com tampão citrato (pH=6) em temperatura alta ou em tripsina.

Através da imunohistoquímica, realizamos a quantificação para os seguintes marcadores, demonstrados abaixo na Tabela 1. Como anticorpo secundário, utilizamos o Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), de acordo com o seu respectivo anticorpo primário. O cromógeno 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foi utilizado para revelação e, em seguida, os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Harris.

Tabela 1. Anticorpos usados nas reações de imunohistoquímica		
Marcador	Anticorpo Primário	Diluição
MAC-2	Anticorpo monoclonal produzido em rato (Clone M3/38; Cedarlene Laboratories, Canadá).	1:5000
MMP-12	Anticorpo policional produzido em cabra (SC-8839 Sta. Cruz Biotechnology, USA)	1:500
MMP-9	Anticorpo policional produzido em cabra (SC-6840 Sta. Cruz Biotechnology, USA)	1:200
TIMP-1	Anticorpo policional produzido em coelho (SC-5538 Sta. Cruz Biotechnology, USA)	1:100
GP91phox	Anticorpo policional produzido em cabra (SC-5827 Sta. Cruz Biotechnology, USA)	1:400
TNF-α	Anticorpo monoclonal produzido em camundongo (SC-52B83 Sta. Cruz Biotechnology, USA)	1:1000

**Tabela 1:** Anticorpos usados nas reações de imunohistoquímica, bem como seus fabricantes e diluições utilizadas.

# Quantificação da Densidade de Macrófagos e Células Positivas para MMP-12, MMP-9, GP91phox, TIMP-1 e TNF-α

A densidade de macrófagos, células positivas para MMP-12, MMP-9, GP91phox, TIMP-1 e TNF-α no parênquima alveolar foi obtido através da contagem do número de pontos. Utilizando o mesmo retículo de 100 pontos e 50 retas com área conhecida (62.500 μm² no aumento de 400X) foi contado o número de pontos que caíram no parênquima para cada campo escolhido. A área de tecido alveolar para cada campo foi calculada de acordo com o número de pontos que interceptaram os septos alveolares.

Depois foi contado o número de células positivas presentes no tecido do parênquima. A densidade de células foi determinada pela seguinte equação:

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

O resultado está expresso como células/µm². Foram contados 15 campos por lâmina com um aumento de 400X.

# Quantificação da Densidade de Células Polimorfonucleares (PMN)

A densidade de células PMN no parênquima pulmonar foi avaliada por morfometria convencional, utilizando-se o mesmo retículo com 100 pontos e 50 retas e área conhecida (10.000 μm², aumento de 10x), acoplado à ocular de um microscópio óptico convencional. Foram escolhidos 10 campos aleatórios do parênquima pulmonar para ser feita a contagem do número de células na área do retículo, dividida pelo número de pontos que caiam no parênquima. Os resultados foram expressos em células por micrômetros quadrados<sup>54,55</sup>.

## 4.3 Estudo da expressão gênica para Metaloproteases

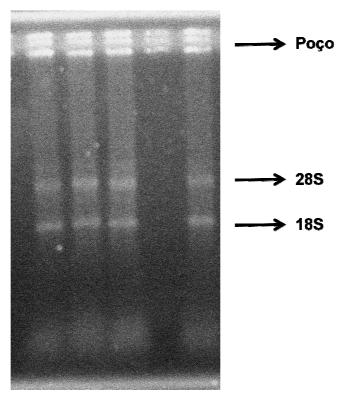
Para o estudo da expressão gênica para metaloproteases no pulmão dos animais, o segundo protocolo de indução do enfisema por exposição à fumaça de cigarro e tratamento com o inibidor rBmTI-A foi repetido. Os mesmos 4 grupos experimentais foram mantidos.

### 4.3.1 Criopreservação de tecidos e Extração de RNA

Para estudos moleculares, os pulmões dos animais foram preservados por congelamento, após o protocolo de indução do enfisema e tratamento com o inibidor rBmTI-A, seguido da eutanásia. Para isso, o tecido coletado foi primeiro imerso durante uma noite a 4 °C em solução de preservação RNAlater (Ambion, Autsin, TX). No dia seguinte, os tubos contendo as amostras foram centrifugados brevemente e o excesso de RNAlater foi removido por aspiração. Os tecidos foram então transferidos para outros tubos de criopreservação e guardados a -80 °C. O tecido pulmonar foi homogeneizado em presença de 1ml de mistura de extração de RNA (TRIzol, Invitrogen, Carlsbad, CA) utilizando um homogeneizador de alta freqüência (Precellys 24, Bertin). O isolamento do RNA foi completado pelo método modificado de isotiocianato de guanidina/fenol/clorofórmio em etapa única. A quantidade e a qualidade dos RNAs produzidos foram verificadas pela espectrofotometria e pela eletroforese em gel de agarose para todos os grupos experimentais, para poder dar início aos experimentos de transcrição reversa.

#### 4.3.2 Análise da Qualidade do RNA

A qualidade do RNA extraído foi verificada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1%. Para aplicação dessa técnica, as amostras de RNA obtidas foram ressuspendidas em 50 µl de água DEPC e desnaturadas a 65° C por 10 minutos. O gel de agarose foi preparado em cuba de eletroforese na concentração de 1g de agarose em pó para 100ml de tampão TBE (TRis; Borato; EDTA). Foram preparados 6 µl de cada amostra com a composição de 4 µl de água DEPC, 1 µl da amostra e 1 µl de tampão (6X Loading Die). Após a realização da eletroforese, as placas de gel foram imersas em solução de Brometo de Etídio por 20 minutos e fotografadas em câmara escura. As amostras que apresentaram as bandas 28S e 18S nítidas foram consideradas de boa qualidade e puderam ser utilizadas nas etapas seguintes, como mostra a Figura 5.



**Figura 5:** Fotomicrografia de eletroforese em gel de agarose. Podem-se ver as bandas de RNA ribossomal 28S e 18S bem definidas.

### 4.3.3 Quantificação do RNA total

O total de RNA das amostras foi quantificado por espectrofotometria de massa. Foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e o software NanoDrop ND-1000. Para cada amostra, foram utilizados 2 µl de material e o valor de concentração de RNA ([] ng/µl) dado pelo software e anotado para possibilitar o cálculo do volume de cada amostra necessário para a transcrição reversa em cDNA.

### 4.3.4 Transcrição reversa

Os RNAs totais que passaram pelo controle de qualidade foram submetidos à transcrição reversa para a síntese de cDNA. Isso foi feito com a utilização de cerca de 1µg de massa de RNA total. O volume de cada amostra

26

necessário para a reação foi calculado pela fórmula:

Vamostra =  $1 / [] ng/\mu l$  amostra x 1000

Para a transcrição reversa (RT) do RNA em cDNA foi utilizado o kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). O volume final de cada reação foi de 20 µl, sendo 11 µl do Master Mix e 9 µl a soma do volume de RNA já calculado anteriormente com a água DEPC, de acordo com o manual do produto. Os ciclos de RT foram programados no termociclador da seguinte forma:

Passo 1 – 60 minutos a 37º C

Passo 2 – 5 minutos a 95º C

Passo 3 – Espera a 4º C.

# 4.3.5 Real-time RT-qPCR

A expressão das metaloproteases de matriz MMP-9 e MMP-12 foram avaliadas para todos os grupos experimentais pelo método quantitativo de PCR em tempo real (Real Time RT-qPCR).

O sistema TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foi escolhido para o estudo da expressão da MMP-12 (Mm00500554\_m1), e MMP-9 (Mm00442991\_m1) pois já existem ensaios padronizados neste sistema para estes alvos. O sistema TaqMan® utiliza um par de iniciadores (primers) para amplificar por PCR uma região do mRNA de interesse. A identidade do produto amplificado é verificada pela hibridação de uma sonda marcada com fluorocromo (VIC ou FAM) na extremidade 5` e um atenuador (quencher) de emissão fluorescente na extremidade 3`. Se o produto de PCR gerado derivar do mRNA de interesse, a hibridação da sonda ao produto amplificado fará com que o fluorocromo se afaste do atenuador o que permite que fótons sejam

emitidos pelo corante fluorescente excitado.

As reações RT-qPCRs foram executadas em placas de 96 poços com a utilização de 2μL de produto de transcrição reversa, 10μL de TaqMan Gene Expression Master Mix (2×), 1μL do ensaio TaqMan Gene Expression Assay (20×) e 7μL de água deionizada, em volume final de 20 μl. O perfil térmico das reações consistiu de 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 15 s de desnaturação a 95 °C e 1 min a 60 °C. As amplificações foram executadas em um termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Para que a expressão dos genes de interesse seja comparável entre os experimentos, as amplificações foram normalizadas utilizando o gene Gapdh como controle endógeno, já que este é um dos genes cuja expressão se mantém relativamente constante no pulmão dos camundongos independentemente dos estados fisiológicos das células. Diferente dos demais genes, a RT-qPCR em tempo real para avaliar a expressão do Gapdh foi realizada utilizando um corante que gera fluorescência quando ligado ao DNA fita-dupla (5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) Solis Biodyne).

Visto que a expressão do gene normalizador foi determinada com reagente diferente do utilizado para avaliar a expressão dos genes de interesse, para que os cálculos fossem válidos, as eficiências de amplificação do alvo (Ensaios Taqman) e da referência endógena (Ensaios EvaGreen) devem ser aproximadamente iguais. Se a eficiência de amplificação do Gapdh, realizada com ensaio por EvaGreen, for a mesma da eficiência de amplificação dos genes de interesse (realizados com ensaio pelo sistema TaqMan), nenhum ajuste é necessário. Caso contrário, é preciso que ajustes matemáticos sejam realizados para que a expressão relativa dos genes de interesse possa ser calculada.

A determinação da eficiência de amplificação foi realizada utilizando diluições seriadas de produto de transcrição reversa das amostras de RNA utilizadas em nosso estudo. Uma amostra que apresentou expressão gênica alta para os genes alvo foi selecionada e amplificada como um ensaio de PCR em tempo real utilizando os reagentes apropriados (EvaGreen para Gapdh e TagMan para os genes-alvos). As curvas padrões de amplificação foram

construídas utilizando como coordenadas o logaritmo na base 10 das concentrações dos produtos de transcrição reversa e o Ct (Cycle Threshold) obtido em cada diluição, e a relação entre esses parâmetros determinada pela regressão linear. A equivalência da eficiência de amplificação de Gapdh às eficiências de amplificação dos genes-alvo foi verificada comparando a inclinação da reta que representa a curva padrão e também através da eficiência de amplificação, calculada pela equação:

# Eficiência da PCR = 10^(1/S)-1 onde S é a inclinação da reta de regressão.

O valor de Ct corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente da reação cruze o limiar (threshold) acima do ruído de fundo (background), ou seja, a expressão do gene só é detectada quando o sinal fluorescente acumulado ultrapassa o threshold. Dessa forma, quanto menor o Ct, menor o número de ciclos de PCR necessários para detectar um gene, e portanto maior sua expressão.

Em nosso estudo, encontramos uma divergência entre a eficiência de amplificação dos genes alvos (MMP-9 e MMP-12) e o gene endógeno (Gapdh). Dessa forma, decidimos não utilizar o método de 2 -ΔΔCt como procedimento de normalização. No lugar deste método, construímos curva padrão com a amostra calibradora, relacionando os Cts e as concentrações de produto de RT utilizadas na amplificação. Os resultados do acúmulo de RNA para as MMPs e Gapdh (expresso como uma fração do expresso na amostra calibradora) foram obtidos pela interpolação nas curvas padrões.

#### 4.4 Análise Estatística

A análise estatística foi feita através da utilização do software Sigma Stat (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA).

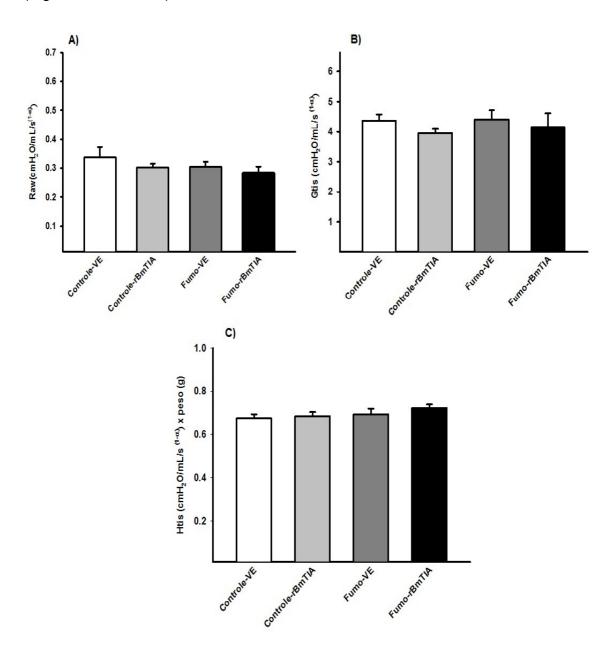
Para a análise de todos os dados referentes ao primeiro e segundo protocolos do estudo utilizamos a análise de variância para dois fatores,

seguido do teste de múltiplas comparações: Holm-Sidak. Todos os dados obtidos foram expressos como média e erro padrão relativos. Um valor de p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## 5. RESULTADOS

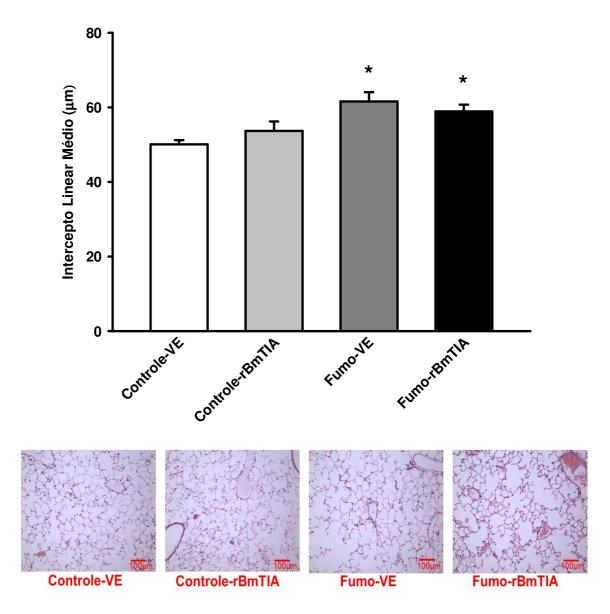
### 5.1. Primeiro Protocolo

Ao analisarmos as medidas de mecânica respiratória, não observamos diferença estatística entre os grupos para as medidas de Raw, Gtis e Htis (Figura 6A, 6B e 6C).



**Figura 6.** Parâmetros de Raw (A), Gtis (B) e Htis (C) no primeiro protocolo do estudo. Não houve diferença estatística entre os grupos para as três medidas.

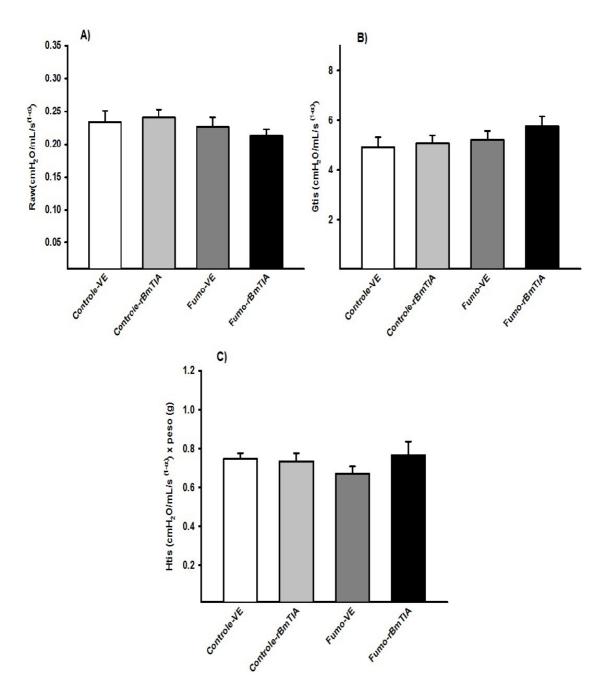
No entanto, quando analisamos as medidas de Lm, podemos observar que os grupos Fumo (Fumo-VE e Fumo-rBmTIA) apresentam aumento da lesão tecidual, quando comparados aos grupos Controle (Controle-VE e Controle-rBmTIA) (p=0,003) e que o tratamento com rBmTI-A não diminuiu essa lesão (Figura 7).



**Figura 7.** Valores do Intercepto Linear Médio (Lm) e fotomicrografias no primeiro protocolo do estudo. \*p=0,003 comparado aos grupos Controle-VE e Controle-rBmTIA. Abaixo as fotos demonstram a lesão tecidual referente à cada grupo experimental.

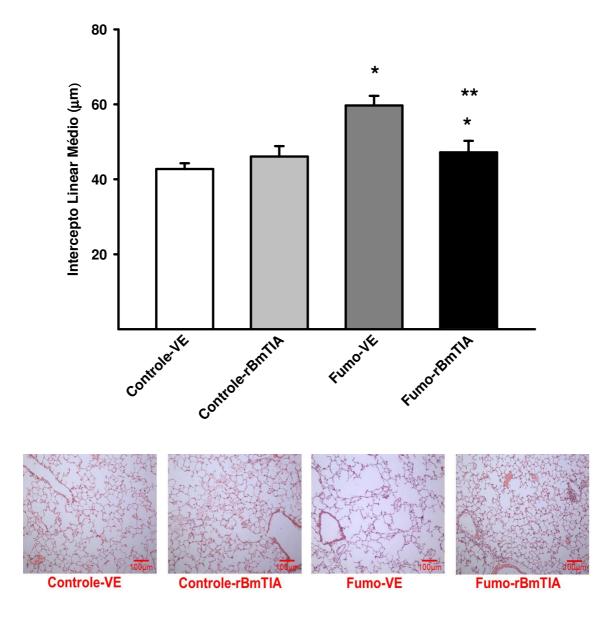
# 5.2 Segundo Protocolo

Ao analisarmos as medidas de mecânica respiratória, não observamos diferença estatística entre os grupos para as medidas de Htis, Gtis e Raw (Figura 8A, 8B e 8C).



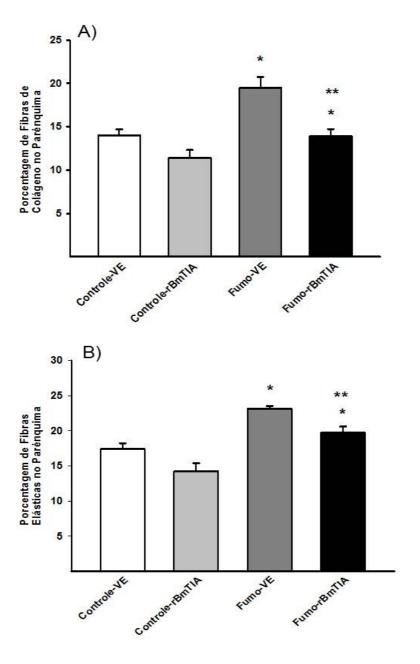
**Figura 8.** Parâmetros de Raw (A), Gtis (B) e Htis (C) no segundo protocolo do estudo. Não houve diferença estatística entre os grupos para as três medidas.

Pudemos observar também aumento de Lm nos grupos Fumo (Fumo-VE e Fumo-rBmTIA) comparados aos grupos Controle (Controle-VE e Controle-rBmTIA) (p=0,005), e uma diminuição do grupo Fumo-rBmTIA comparado ao grupo Fumo-VE (p=0,003), demonstrando que o tratamento com o inibidor rBmTI-A preveniu a lesão. (Figura 9).



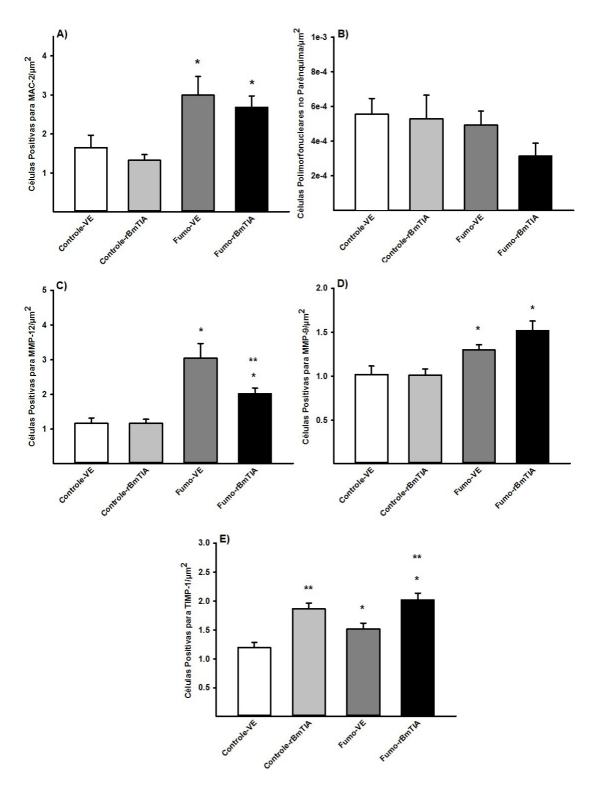
**Figura 9.** Valores do Intercepto Linear Médio (Lm) e fotomicrografias no segundo protocolo do estudo. \*p=0,005 comparado aos grupos Controle-VE e Controle-rBmTIA; \*\* p=0,003 comparado ao grupo Fumo-VE. Abaixo as fotos demonstram a lesão tecidual referente à cada grupo experimental.

Ao analisarmos a porcentagem de fibras colágenas e elásticas (Figura 10A e 10B) no parênquima pulmonar, observamos que houve aumento dessas fibras nos grupos expostos à fumaça de cigarro comparado aos grupos Controle (p<0,001), e que o tratamento com rBmTI-A foi capaz de diminuir a quantidade dessas fibras no grupo Fumo-rBmTIA quando comparado ao grupo Fumo-VE (p<0,001) em ambos os casos.



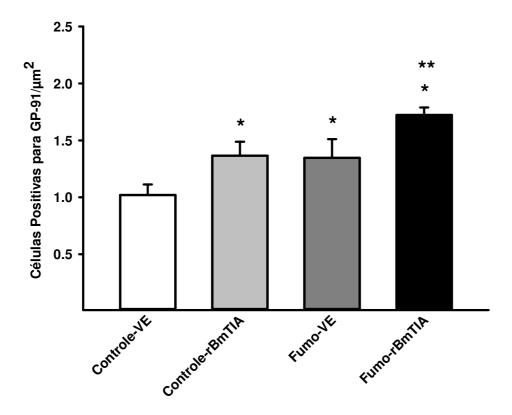
**Figura 10.** Proporção de fibras de colágeno (A) e elástica (B) no parênquima pulmonar. A) \*<0,001 comparado aos grupos Controle; \*\*p<0,001 comparado ao grupo Fumo-VE. B) \*<0,001 comparado aos grupos Controle; \*\*p<0,001 comparado ao grupo Fumo-VE.

A quantificação de macrófagos (MAC-2) (Figura 11A) e de células positivas para MMP-12 (Figura 11C) e MMP-9 (Figura 11D) no parênquima, demonstrou um aumento na densidade dessas células nos grupos Fumo (Fumo-VE e Fumo-rBmTIA), comparado aos grupos Controle (Controle-VE e Controle-rBmTIA) (p<0,001; p=0,040 e p=0,023 respectivamente). No entanto, o tratamento com rBmTI-A foi capaz apenas de diminuir o número de células positivas para MMP-12 no grupo Fumo-rBmTIA comparado ao grupo Fumo-VE (p=0,006). Não observamos diferença entre os grupos experimentais ao avaliarmos a quantidade de células polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) no parênquima (Figura 11B). Ao avaliarmos a quantidade de células positivas para TIMP-1 (Figura 11E), observamos que os grupos Controle-rBmTIA, Fumo-VE e Fumo-rBmTIA apresentam aumento desse inibidor tecidual de metaloprotease quando comparado ao grupo Controle-VE (p=0,032), e que os grupos tratados com rBmTI-A aumentam a quantidade de TIMP-1 quando comparados aos grupos tratados com veículo (p<0,001).



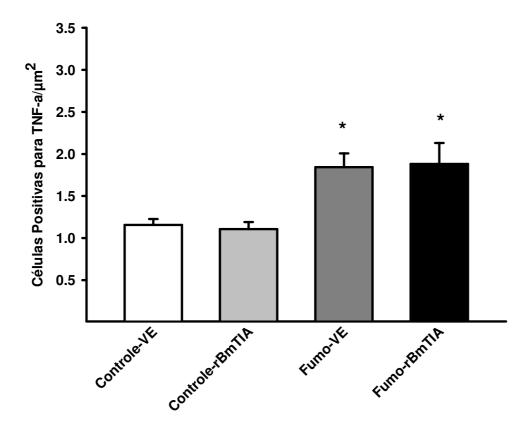
**Figura 11.** Células positivas no parênquima pulmonar para MAC-2 (A), MMP-12 (C), MMP-9 (D), TIMP-1 (E) e contagem de células polimorfonucleares (B). A) \* p<0,001 comparado aos grupos Controle-VE e Controle-rBmTIA. B) Sem diferença estatística entre os grupos experimentais. C) \* p=0,040 comparado aos grupos Controle-VE e Controle-rBmTIA; \*\* p=0,006 comparado ao grupo Fumo-VE. D) \* p=0,023 comparado aos grupos Controle-VE e Controle-rBmTIA. E) \* p=0,032 comparado aos grupos Controle; \*\* p<0,001 comparado aos grupos VE.

Quando avaliamos a densidade de células positivas para GP91phox no parênquima, observamos que os grupos Controle-rBmTIA, Fumo-VE e Fumo-rBmTIA possuem mais GP91phox quando comparado ao Grupo Controle-VE (p<0,05) e que o grupo Fumo-rBmTIA apresenta maior quantidade desse oxidante quando comparado aos grupos Controle-rBmTIA e Fumo-VE (p≤0,031) (Figura 12).



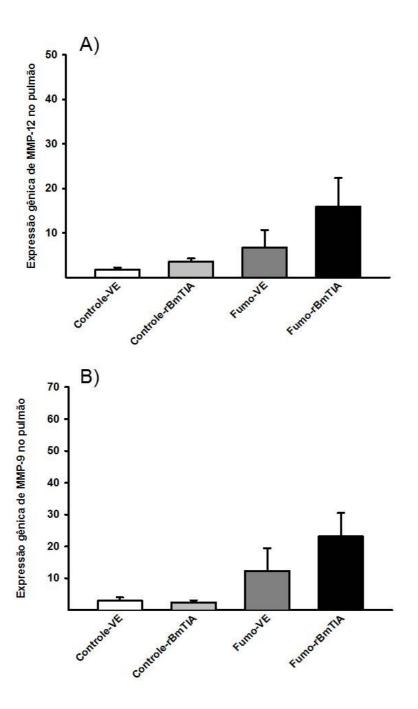
**Figura 12.** Células positivas para GP91phox no parênquima pulmonar. \* p<0,05 comparado aos grupos Controle-VE; \*\* p≤0,031 comparado aos grupos Controle-rBmTIA e Fumo-VE.

Ao medirmos o fator de necrose tumoral TNF-α, encontramos aumento das células positivas para esse marcador nos grupos expostos à fumaça de cigarro (Fumo-VE e Fumo-rBmTIA) (p<0,001) quando comparado aos grupos Controle, sem interferência do tratamento com o inibidor rBmTI-A (Figura 13).



**Figura 13.** Células positivas para TNF- $\alpha$  no parênquima pulmonar. \*p<0,001 comparado aos grupos Controle.

No entanto, ao analisarmos a expressão gênica de MMP-12 (Figura 14A) e MMP-9 (Figura 14B) no pulmão, através da técnica de RT-qPCR, não observamos diferença estatística significante entre os grupos experimentais.



**Figura 14.** Expressão gênica para as metaloproteases 12 (A) e 9 (B) no parênquima pulmonar, sem diferença estatística entre os grupos experimentais.

## 6. DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, podemos observar que o tratamento com o inibidor para serinoprotease rBmTI-A foi responsável por atenuar o desenvolvimento do enfisema pulmonar, quando administrado em camundongos durante o protocolo de exposição à fumaça de cigarro. Entretanto não revelou um efeito de tratamento contra a lesão tecidual quando administrado somente após o término do protocolo de exposição, com a doença já instalada.

Apesar de demonstrarmos presença de enfisema através da análise de Lm, os parâmetros obtidos com a avaliação da mecânica respiratória não revelaram diferença entre os grupos experimentais nos dois protocolos adotados. Toledo et al. <sup>56</sup> demonstraram diminuição de Htis seguindo o mesmo protocolo experimental utilizado em nosso estudo, no entanto as análises foram feitas somente após 6 meses de exposição à fumaça de cigarro. Acreditamos que o grau de lesão do parênquima encontrado após 3 meses de exposição em nosso estudo seja menor do que o encontrado após os 6 meses de exposição. Por este motivo, embora as análises morfométricas tenham revelado diferença entre os grupos, a avaliação da mecânica respiratória não foi suficientemente sensível para detectar possíveis diferenças.

As análises referentes ao intercepto linear médio no primeiro protocolo demonstraram um aumento deste índice nos dois grupos expostos à fumaça de cigarro e o tratamento com o rBmTl-A não promoveu redução deste índice, demonstrando não haver um efeito de tratamento para a lesão tecidual. Uma vez que o tratamento com rBmTl-A não foi capaz de diminuir a lesão já estabelecida, decidimos repetir o procedimento de indução ao enfisema e modificar a administração do inibidor para 3 doses ao longo da exposição, para avaliarmos se dessa forma, o tratamento iria atenuar ou impedir o desenvolvimento do enfisema.

Ao mudarmos a forma de administração, observamos que o grupo Fumo-rBmTIA apresentou menor destruição do tecido quando comparado ao

grupo Fumo-VE, mostrando que o tratamento com rBmTI-A atenuou a destruição tecidual, avaliada pelo Lm. Entretanto, mais uma vez não detectamos alterações funcionais na mecânica pulmonar com a utilização deste modelo experimental, no tempo proposto.

Considerando que o desenvolvimento e progressão do enfisema pulmonar promove um constante processo de destruição e reparo das fibras constituintes do parênquima pulmonar (elásticas e colágenas)<sup>57</sup>, decidimos avaliar as proporções destas fibras no parênquima pulmonar e o efeito do tratamento com o inibidor sobre estas.

O processo de reparo tecidual é caracterizado por um aumento da deposição das fibras de colágeno e elástica, na tentativa de reparar a destruição por ação das metaloproteases. No entanto este processo ocorre de forma desordenada, comprometendo o comportamento funcional das fibras do parênquima<sup>57</sup>. Em pulmões enfisematosos, as fibras de colágeno se rompem com maior facilidade sob forças mecânicas quando comparadas às fibras de pulmões normais, mesmo quando estas estão aumentadas no tecido pulmonar<sup>58</sup>.

Neste estudo, observamos que as proporções em volume de fibras de colágeno e elástica no parênquima estão aumentadas nos grupos que foram expostos à fumaça de cigarro, caracterizando o processo de remodelamento destas fibras. E que o tratamento com o inibidor rBmTI-A diminuiu a quantidade desses dois tipos fibrilares, possivelmente devido à diminuição do processo de destruição. Desta forma, o remodelamento não foi tão intenso como no grupo Fumo-VE.

A teoria protease-antiprotease ainda é considerada como a mais importante para explicar o desenvolvimento do enfisema<sup>9,18</sup>. Por este motivo, muitos estudos experimentais têm verificado o papel das metaloproteases no desenvolvimento da doença pulmonar, bem como o papel de inibidores destas MMPs na prevenção e tratamento do desenvolvimento da doença <sup>13, 14, 15, 17</sup>.

A inibição ou deleção de MMPs pode diminuir significativamente ou totalmente o desenvolvimento do enfisema, evidenciando o importante papel das MMPs nesse processo<sup>18</sup>.

Hautamaki e colaboradores<sup>17</sup> demonstraram que animais deficientes para expressão de MMP-12 ("knockout"), metaloprotease produzida predominantemente por macrófagos, foram completamente protegidos do desenvolvimento do enfisema ao serem expostos à fumaça de cigarro, reforçando a importância desta MMP no desenvolvimento da doença além de ser um possível futuro alvo terapêutico.

Para aprofundarmos nosso entendimento no que se refere aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesta doença, decidimos avaliar a densidade de macrófagos, células polimorfonucleares e de células positivas para MMP-12 e 9 no parênquima.

As análises da quantificação de macrófagos, através da imunomarcação para células positivas para MAC-2, revelaram um aumento deste tipo celular nos dois grupos que foram expostos à fumaça de cigarro, independente do tratamento. Entretanto ao avaliarmos as células positivas para MMP-12, observamos que embora tenha havido aumento destas células nos dois grupos expostos à fumaça do cigarro comparados aos grupos Controles, o tratamento com rBmTI-A atenuou a densidade dessas células no grupo Fumo-rBmTIA comparado ao grupo Fumo-VE.

A metaloprotease 9, produzida por células epiteliais dos brônquios e células inflamatórias como os neutrófilos e macrófagos alveolares, também está ligada ao desenvolvimento e progressão da DPOC. Essa observação provém principalmente de estudos em humanos, em que a MMP-9 é encontrada em maior quantidade no escarro e lavado broncoalveolar de pacientes com enfisema pulmonar<sup>59,60</sup>. No entanto, o papel dessa metaloprotease em modelo animal de exposição à fumaça de cigarro, permanece inconclusivo.

Selmam et al.<sup>61</sup> expôs cobaias à fumaça de cigarro por 1, 2 e 4 meses e tratou esses animais com um inibidor de largo espectro para MMPs, o CP-

471,474. Eles observaram uma redução da lesão tecidual e da quantidade de MMP-9 total (pró-enzima e forma ativa) nos animais tratados com o inibidor, nos tempos de 2 e 4 meses. Foronjy et al.<sup>62</sup> demonstrou que camundongos modificados geneticamente para expressarem maior quantidade de MMP-9 humana nos macrófagos alveolares, desenvolviam enfisema. No entanto, Atkinson et al.<sup>63</sup> observou que camundongos *knockout* para MMP-9 (-/-) expostos à fumaça de cigarro por 6 meses, desenvolvem o mesmo grau de enfisema que os animais selvagens expostos às mesmas condições, e que portanto, a MMP-9 não está relacionada ao desenvolvimento da doença nesse modelo.

Nossa análise de células positivas para MMP-9 no parênquima pulmonar revelou que apenas os animais expostos à fumaça de cigarro apresentam aumento desta metaloprotease no tecido, sem interferência do tratamento com o inibidor. No entanto, não observamos diferença entre os grupos experimentais quando avaliamos a quantidade de células polimorfonucleares no parênquima, sugerindo que embora o número de neutrófilos não tenha aumentado nos grupos expostos à fumaça de cigarro, eles expressam uma quantidade maior de MMP-9. Outra possibilidade é que o aumento de MMP-9, assim como a MMP-12, seja decorrente do aumento de macrófagos no tecido, que também produzem essa metaloprotease.

Ao avaliarmos a expressão gênica da MMP-12 e 9 no pulmão através da técnica de real time qPCR, não observamos diferença estatística significante entre os grupos, embora pareça haver uma tendência de aumento nos grupos expostos à fumaça de cigarro, sem interferência do tratamento com o rBmTl-A.

Segundo Gueders et al.<sup>64</sup>, a síntese e função das MMPs são reguladas por três principais mecanismos: ativação transcricional, ativação póstranscricional através da clivagem do domínio terminal das pró enzimas (forma em que a maioria das MMPs são secretadas pelas células que as produzem), e controle da atividade pelos inibidores endógenos, conhecidos como inibidores teciduais de metoloproteases (TIMPs).

Nossos dados reforçam essa ideia e a de Churg et al. <sup>15</sup>, ao dizer que a produção e secreção de MMP-12 é um processo complexo que pode acontecer por diversas vias, evidenciando o potencial das intervenções que inibem a liberação ou atividade dessa metaloprotease, e não de sua produção. Acreditamos portanto, que o inibidor rBmTI-A atue na ativação de outros mecanismos que diminuem a liberação ou causem inibição da MMP-12 no parênquima pulmonar.

Corroborando com essa ideia e os dados observados para a avaliação de MMP-12, observamos que os grupos expostos à fumaça de cigarro aumentam a quantidade de TIMP-1 no tecido, e ainda que os grupos tratados com rBmTI-A (Controle-rBmTIA e Fumo-rBmTIA) apresentam quantidades maiores desse inibidor tecidual de metaloprotease quando comparados aos grupos tratados com veículo (Controle-VE e Fumo-VE).

As TIMPs são expressas no tecido com a importante função de regular e manter o equilíbrio entre a quebra dos componentes da matriz pulmonar e sua inibição. Dessa forma, o desequilíbrio das MMPs ou das TIMPs, leva à destruição das fibras constituintes do parênquima pulmonar, comprometendo suas funções e estabilidade<sup>64</sup>.

São descritas 4 tipos de TIMPs (de -1 a -4), que possuem afinidade por diferentes MMPs e são produzidas por diversos tipos celulares no pulmão. Em indivíduos saudáveis, a TIMP-1 e TIMP-2, por exemplo, se ligam às formas ativas da MMP-2 ou MMP-9, e à forma latente da MMP-9 e 2, respectivamente<sup>64</sup>. A TIMP-1 parece ser o principal inibidor da MMP-9, e é produzida por fibroblastos, células epiteliais dos brônquios, neutrófilos e macrófagos alveolares<sup>64</sup>. No entanto, em nosso estudo ela parece estar ligada à diminuição da MMP-12 nos animais doentes, tratados com o inibidor rBmTI-A.

Já os resultados para a análise de GP91phox no parênquima, uma subunidade da NADPH oxidase responsável por produzir componentes oxidantes, também parece estar ligada à diminuição da MMP-12 em nosso estudo. Nós observamos que os grupos Controle-rBmTIA, Fumo-VE e Fumo-

rBmTIA apresentam maior quantidade de células positivas para GP91phox comparado ao grupo Controle-VE, e que os animais expostos à fumaça de cigarro e tratados com o inibidor rBmTI-A apresentam ainda mais GP91phox em comparação aos demais grupos.

Nagase<sup>65</sup> demonstrou em experimentos "in vitro", que a presença de radicais de oxigênio reativo em condições físicas como pH e temperatura, podem levar à ativação da forma latente das MMPs para sua forma ativa através de proteólise. Ainda em experimentos "in vitro", Fu et al.<sup>66,67</sup> demonstraram que oxidantes intermediários da NADPH são capazes de inativar a MMP-7 através da modificação de aminoácidos específicos. Kassim et al.<sup>68</sup> também mostrou "in vivo", que camundongos *knockout* para GP91phox desenvolvem enfisema pulmonar espontaneamente a partir dos 3 meses de idade, com caráter progressivo. Além disso, demonstrou que camundongos *knockout* para GP91phox e também para MMP-12, não desenvolvem enfisema, demonstrando a ligação entre os dois fatores, e que também pode ser observada nesse estudo.

Outras citocinas e fatores de transcrição estão envolvidos na indução do processo inflamatório na DPOC e no consequente desequilíbrio entre a produção e liberação de proteases e antiproteases. O fator de necrose tumoral TNF-α, por exemplo, é responsável por mediar o fluxo de células inflamatórias em fumantes<sup>18</sup>. Churg et al.<sup>15</sup> demonstrou que em comparação aos animais *knockout* para MMP-12, os animais selvagens possuem maior quantidade de TNF-α e neutrófilos nos pulmões após a exposição à fumaça de cigarro, e que "in vitro", os macrófagos desses animais selvagens também liberam mais TNF-α.

Em nosso estudo, observamos aumento de TNF-α nos grupos Fumo (Fumo-VE e Fumo-rBmTIA), e o tratamento não diminuiu a quantidade desse fator de transcrição.

Como mencionado anteriormente, o tratamento com rBmTI-A em modelo experimental de exposição à fumaça de cigarro atenuou o desenvolvimento do enfisema, mas não apresentou efeito de tratamento quando administrado após

a indução e instalação da doença. Em estudo anterior desenvolvido por nosso grupo<sup>42</sup>, avaliamos camundongos com enfisema pulmonar induzido por instilação de elastase pancreática de porco que receberam tratamento com este mesmo inibidor (rBmTI-A) 1 hora antes da indução do enfisema e também 21 dias depois, ou seja, com a doença já instalada. Em ambos os momentos, diferentemente do estudo atual, o rBmTI-A apresentou efeito positivo contra a instalação e progressão da doença.

Acreditamos que o inibidor tenha diferente efeito entre os dois modelos, pois embora a lesão tecidual tenha um grau mais avançado no modelo de PPE quando comparado ao de exposição à fumaça de cigarro<sup>30</sup>, o processo inflamatório parece ser menos intenso. No modelo de PPE, a instilação promove primeiro a destruição das fibras do parênquima, o que acarreta em um processo inflamatório posterior a este evento, enquanto que no modelo de exposição à fumaça de cigarro, ocorre primeiro um processo inflamatório com posterior destruição tecidual e, por se tratar de uma exposição prolongada, o processo inflamatório parece ser mais intenso do que o observado no modelo de PPE.

Desta forma, nossos resultados sugerem que em modelo experimental de exposição à fumaça de cigarro, a utilização do inibidor para serinoprotease rBmTl-A atenuou o desenvolvimento do enfisema através da diminuição da expressão de MMP-12, possivelmente devido ao aumento de TIMP-1 e GP91-Phox no parênquima.

## 7. CONCLUSÃO

A utilização do inibidor rBmTI-A durante a indução do enfisema por exposição à fumaça de cigarro promoveu a redução de MMP-12 com consequente diminuição da destruição tecidual e remodelamento, possivelmente via aumento de TIMP-1 e GP91Phox. Entretanto não observamos um efeito de tratamento com a utilização deste inibidor após a instalação da doença.

## 8. ANEXOS



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24/04/2013, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 119/13 intitulado: "AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM UM INIBIDOR PARA SERINOPROTEASE EM MODELO EXPERIMENTAL DE ENFISEMA INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO " que utilizará 40 animais da espécie Camundongos C57BL6, apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA

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

Pesquisador (a) Responsável: Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes

Pesquisador (a) Executante: Juliana Dias Lourenço

CEP-FMUSP, 29 de Abril de 2013.

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

> Prof. Dr. Roger Chammas Coordenador Comitê de Ética em Pesquisa

Elliamum.

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina e-mail: <u>cep.fm@usp.br</u>

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GOLD 2014 (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease).

  Executive Summary: Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Disponível em http://www.goldcopd.com
- 2 Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Eng J Med* 2000; 343(4).
- World Health Organization. Chronic Respiratory Diseases.Burden. Disponível em: www.who.int/respiratory/copd/burden/en
- 4 Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23: 932–46.
- Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 532–55.
- 6 Pessoa CLC, Pessoa RS. Pulmao RJ Epidemiologia da DPOC. Atualizações Tematicas 2009; 1(1): 7-12.
- 7 Campos HS, Lemos ACM. Asthma and COPD according to the pulmonologist. *J Bras Pneumol* 2009; 35(4): 301-9.
- 8 GOLD 2009 (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease).

  Executive Summary: global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Disponível em http://www.goldcopd.com
- 9 Eriksson, S. Studies in alfa1-antitripsin deficiency. *Acta med scand* 1965;

117(175).

- Bourdin A, Burgel PR, Chanez P, Garcia G, Perez T, Roche N. Recent advances in COPD: pathophysiology, respiratory physiology and clinical aspects, including comorbidities. *Eur Respir Rev.* 2009; 18: 114. 198-212.
- Abboud Rt, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008; 12(4): 361-7.
- Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol chem.* 1985; 260:2493-500.
- Belvisi MG, Bottomley KM. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs?. *Inflamm Res.* 2003; 52:95-100.
- 14 Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10:602-8.
- 15 Churg A, Zhou S, Wright JL. Matrix metalloproteinases in COPD. *Eur Resp J.* 2012; 39:197-209.
- Shipley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(9):3942-6.
- Haumataki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. Science 1997; 277(5334): 2002-4.

- 18 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: 612-31.
- 19 Churg A, Wang R, Wang X, Onnervik PO, Thim K, Wright JL. An MMP-9/-12 inhibitor prevents smoke-induced emphysema and small airway remodeling in guinea pigs. *Thorax* 2007; 62:706-13.
- Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, Belaaouaj A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol* 2003; 163: 2329–35.
- Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000; 117:684-94.
- Vlahos R1, Bozinovski S, Jones JE, Powell J, Gras J, Lilja A, Hansen MJ, Gualano RC, Irving L, Anderson GP. Differential protease, innate imunity, and NF-B induction profiles during lung inflammation induced by subchronic cigarette smoke exposure in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: L931-45.
- Lomas DA, Mahadeva R. Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: Pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest* 2002; 110:1585-90.
- Maitra A, Kumar V. The lung and the upper respiratory tract. In: Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Basic Pathology. 7th ed. *Philadelphia Saunders- Elsevier Science* 2002; 30:31.
- 25 Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax* 2002;

- 57:908-14.
- 26 Kostikas K, Papatheodorou G, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. Oxidative Stress in Expired Breath Condensate of Patients With COPD. Chest 2003; 124: 1373-80.
- Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 555-62.
- Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J* 2005; 25:250-8.
- Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 2004, 125: 626-32.
- Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295: L1-15.
- Valença SS, Hora KD, Castro P, Moraes VG, Carvalho L, Porto LCMS. Emphysema and metalloelastase Expression in Mouse Lung Induced by Cigarette Smoke. *Toxicologic Pathology* 2004; 32:351-6.
- Wright JL, Sun JP. The effect of smoking cessation on pulmonary and cardiovascular function and structure. *J Appl Physiol* 1994; 76: 2163–8.
- Lieberman J. Elastase collagenase emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. *Chest* 1976; 70: 62–7.
- Takamoto M, Miyazaki N, Ishibashi T, Sugiyama K. Protease-induced

- experimental emphysema: the relationship between elastolytic activity and emphysema induction. *Jpn J Exp Med* 1978; 48: 419–25.
- Janoff A. Elastases and emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 417–33.
- Janoff A, White R, Carp H, Harel S, Dearing R, Lee D. Lung injury induced by leukocytic proteases. *Am J Pathol* 1979; 97: 111–36.
- 37 Senior RO, Anderson NR. Chronic obstructive pulmonary disease. *A J Respir Crit Care Med* 1998; 157:139-47.
- Takayama M, Ishibashi M, Ishii H, Kuraki T, Nishida T, Yoshida M. Effect of neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol* 2001; 91:1800-7.
- 39 Stockley RA. Protease/antiproteases: pathogenesis and role in therapy. *Clin Pulm Med* 1998;5:203-10.
- Wright J, Farmer S, Churg A. Synthetic serine elastase inhibitor reduces cigarette smoke-induced emphysema in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:954-60.
- Kuraki T, Ishibashi M, Takayama M, Shiraishi M, Yoshida M. A novel oral neutrophil elastase inhibitor (ONO-6818) inhibits human neutrophil elastase-induced emphysema in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:496-500.
- Lourenço JD, Neves LP, Olivo CR, Duran A, Almeida FM, Arantes PMM, Prado CM, Leick EA, Tanaka AS, Martins MA, Sasaki SD, Lopes FDTQS. Treatment with a protease inhibitor recombinant from a Cattle Tick (*Rhipcephalus Boophilus microplus*) ameliorates emphysema in mice. *Plos One* 2014; 9(6): e98216.

- Sasaki SD, Azzolini SS, Hirata IY, Andreotti R, Tanaka AS. Boophilus microplus tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors. *Biochimie* 2004; 86(9-10):643-9.
- Azzolini SS, Sasaki SD, Torquato RJ, Andreotti R, Andreotti E, Tanaka AS. Evaluation of phage display system and leech-derived tryptase inhibitor as a tool for understanding the serine proteinase specificities. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 417(2): 176-82.
- 45 Guerrero FD, Miller RJ, Rousseau ME, Sunkara S, Quackenbush J, Lee Y, Nene V. Characterization of proteinases from the midgut of Rhipicephalus (Boophilus) microplus involved in the generation of antimicrobial peptides. *Insect Biochem Mol Biol.* 2005; 35:585-95.
- Wiladsen P, Jongejan F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol Today* 1999; 15: 258-62.
- 47 Kanost MR. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev Comp Immunol* 1999; 23: 291-301.
- Biselli PJ, Lopes FD, Moriya HT, Rivero DH, Toledo AC, Saldiva PH, Mauad T, Martins MA. Short-term exposure of mice to cigarette smoke and/or residual oil fly ash produces proximal airspace enlargements and airway epithelium remodeling. *Braz J Med Biol Res.* 2011; 44(5): 460-8.
- Hantos Z, Daróczy B, Suki B, Nagy S, and Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J. Appl. Physiol* 1992; 72(1): 168-78.
- Dolhnikoff M, Mauad T, Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. *Am J*

- Respir Crit Care Med 1999; 160:1750-7.
- Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 1966; 30(1):23-38.
- Margraf LR, Tomashefski JF, Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:391-400.
- Lanças T, Kasahara DI, Prado CM, Tiberio IF, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparision of early and late responses to antigen os sensitized guinea pig parenchymal lung strips. *J Appl Physiol* 2006; 100(5):1610-6
- Anciães AM, Olivo CR, Prado CM, Kagohara KH, Pinto Tda S, Moriya HT, Mauad T, Martins Mde A, Lopes FDTQS. Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema. *Clinics* 2011; 66(10): 1797-803.
- Ramos DS, Olivo CR, Lopes FDTQS, Toledo AC, Martins MA, Osório RAL, Dolhnikoff M, Ribeiro W, Vieira RP. Low-intensity swimming training partially Inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Med Sci Sports Exerc.* 2010; 42(1):113-9.
- Toledo AC, Magalhães RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PIC, Moriya HT, Mauad T, Lopes FDTQS, Martins MA. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J* 2012; 39:254:64.
- 57 Shifren A, Mecham R. The Stumbling block in lung repair of emphysema: elastic fiber assembly. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 428-33.

- 58 Shifren A, Mecham RP. The stumbling block in lung repair of emphysema: Elastic Fiber Assembly. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 428-33.
- Finlay GA, Russel KJ, McMahon KJ, Darcy EM, Masterson JB, FitzGerald MZ, OConnor CM. Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax* 1997; 52:502-6.
- Vornooy JHJ, Lindeman JHN, Jacobs JA, Hanemaaijer R, Wouters EF. Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced sputum from patients with COPD. *Chest* 2004; 126(6): 1802-10.
- Selman M, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Ramírez R, Kudlacz EM, Mitchell PG, Pardo A. Matrix metalloproteinases inhibition attenuates tobacco smoke-induced emphysema in Guinea pigs. *Chest* 2003; 123(5): 1633-41.
- Foronjy R, Nkyimbeng T, Wallace A, Thankachen J, Okada Y, Lemaitre V, D'Armiento J. Transgenic expression of matrix metalloproteinase-9 causes adult-onset emphysema in mice associated with the loss of alveolar elastin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294(6):1149-57.
- Atkinson JJ, Lutey BA, Suzuki Y, Toennies HM, Kelley DG, Kobayashi DK, Ijem WG, Deslee G, Moore CH, Jacobs ME, Conradi SH, Gierada DS, Pierce RA, Betsuyaku T, Senior RM. The role of matrix metalloproteinase-9 in cigarette smoke-induced emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(7):876-84.

- Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: Potencial implications in asthma and other lung diseases. *Eur J of Pharmac* 2006; 533: 133-44.
- Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378: 151-60.
- 66 Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *J Biol Chem* 2003; 278(31):28403-9.
- Fu X, Kao JL, Bergt C, Kassim SY, Huq NP, d'Avignon A, Parks WC, Mecham RP, Heinecke JW. Oxidative cross-linking of tryptophan to glycine restrains matrix metalloproteinase activity: specific structural motifs control protein oxidation. *J Biol Chem* 2004; 279(8):6209-12.
- 68 Kassim SY, Fu X, Liles WC, Shapiro SD, Parks WC, Heinecke JW. NADPH oxidase restrains the matrix metalloproteinase activity of macrophages. *J Biol Chem* 2005; 280(34):30201-5.