RAFAEL DE ALMEIDA DOS REIS

Efeito do inibidor de proteinase de origem vegetal *BbCI*, sobre a lesão pulmonar induzida pela elastase em camundongos C57Bl6

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

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos)
Orientadora: Profa. Dra. Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Reis, Rafael de Almeida dos

Efeito inibidor de proteinase de origem vegetal *BbCI*, sobre a lesão pulmonar induzida pela elastase em camundongos C57Bl6 / Rafael de Almeida dos Reis. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientadora: Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério.

Coorientadora: Maria Luiza Vilela Oliva.

Descritores: 1.Doença pulmonar obstrutiva crônica 2.Lesão pulmonar/induzido quimicamente
3.Elastase 4.Inibidores de serino proteinase 5.Inibidores de cisteína proteinase 6.Bauhinia
7.Camundongos

USP/FM/DBD-453/13

“ Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes ”

Isaac Newton

Dedicatória

Primeiramente dedico esta tese a Deus, que me guia sob seus caminhos e me permite viver sonhos que somente Ele poderia realizar.

Aos meus pais, que se sacrificaram para me proporcionar uma boa educação, e sempre apoiaram as minhas decisões.

Aos meus avós, por ajudar meus pais na minha educação, e ao meu irmão por compartilhar bons momentos. A FAMÍLIA é a base de tudo!

A professora Iolanda Tibério que me orientou nesse trabalho e me ajudou no meu amadurecimento como aluno e como pessoa.

As professoras Maria Luiza e Caroline Owen, por também me orientarem e me mostrarem o verdadeiro papel de um pesquisador.

Agradecimentos

A Faculdade de Medicina da USP, à Universidade Federal de São Paulo e à Harvard Medical School, por me darem condições de realizar este trabalho.

Pessoas muito importantes no desenvolvimento deste projeto:

Aos meus companheiros de experimentos: Osmar, Leandro, Bruno, Tales e Daniel, que botaram a “mão na massa” para que este projeto acontecesse.

As meninas do LIM-20 que também ajudaram nos experimentos e que tem participação importante neste trabalho: Edna Leick, Alessandra Choqueta, Carla Prado, Fernanda Lopes, Nathália Pinheiro e Clarice Olivo.

O pessoal do LIM-20 que ajudaram de alguma forma para o projeto: Fernanda Arantes, Bia, Rosana, Fran e Bárbara.

Ao Marlon e ao Bruno do Infar da UNIFESP-EPM que cederam os inibidores e ajudaram na parte bioquímica do projeto.

Ao pessoal do Owen's Lab do BWH/HMS pelo apoio nos experimentos: Takahiro Nakajima, Susanne Fyfe, Vanessa Craig, Emere, Kush Gupta, Nick Zannota e Hailey Busse.

Ao pessoal do Levi's Lab do BWH/HMS pelo ajuda no manuseio dos equipamentos: Cindy Hana, Alexandre Rogério, Jack Timons, Emiko Ono, Hiroyuki Seiki, Jenifer Colby, Guangli Zhu e Cindy Barnig.

A Raquel que esteve ao meu lado, tanto perto quanto longe.

E aos animais de experimentação que se sacrificam para o progresso da ciência.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Bolsa Doutorado Pleno: 2009/15910-7

Bolsa Estágio Pesquisa no Exterior: 2011/21070-1

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)	2
1.1.1 Definição	2
1.1.2 Dados epidemiológicos	2
1.1.3 Fatores de risco	5
1.1.4 Diagnóstico	7
1.1.5 Fisiopatologia	10
1.1.6 Tratamento	16
1.1.7 Modelos experimentais	20
1.2 Inibidores de Proteinases	21
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. MÉTODOS	33
3.1 Animais	32
3.2 Material Vegetal	32
3.3 Indução do Enfisema por Elastase	33
3.4 Grupos Experimentais	33
3.5 Avaliação da Mecânica Respiratória	34
3.6 Determinação de Óxido Nítrico (NO) Exalado	36
3.7 Lavado Broncoalveolar (LBA)	37
3.8 Descarte de carcaças	38
3.9 Estudo Histopatológico	38
3.9.1 Colorações	39
3.9.2 Análise Morfométrica	41
3.9.3 Análise do diâmetro alveolar médio (Lm)	43
3.10 Análise estatística	43
4. RESULTADOS	45

4.1	Elastância do sistema respiratório (Ers)	45
4.2	Resistência do Sistema Respiratório (Rrs)	46
4.3	Resistência de Vias Aéreas (Raw)	47
4.4	Resistência de Tecido Pulmonar (Gtis)	48
4.5	Elastância de Tecidos (Htis)	49
4.6	Intercepto Linear Médio (Lm)	50
4.7	Óxido Nítrico Exalado	51
4.8	Lavado Broncoalveolar: Células Totais	52
4.9	Lavado Broncoalveolar: Macrófagos	53
4.10	Lavado Broncoalveolar: Neutrófilos	54
4.11	Lavado Broncoalveolar: Linfócitos	55
4.12	Macrófagos nos septos alveolares	56
4.13	Neutrófilos nos septos alveolares	57
4.14	Neutrófilos na vias aéreas	58
4.15	Células TNF α positivas nos septos alveolares	59
4.16	Células TNF α positivas nas vias aéreas	60
4.17	Fibras Elásticas nos septos alveolares	61
4.18	Fibras Elásticas nas Vias Aéreas	62
4.19	Fibras Colágenas nos septos alveolares	63
4.20	Fibras Colágenas nas vias aéreas	64
4.21	Células MMP-9 positivas nos septos alveolares	65
4.22	Células MMP-9 positivas nas vias aéreas	66
4.23	Células MMP-12 positivas nos septos alveolares	67
4.24	Células MMP-12 positivas nas vias aéreas	68
4.25	Células TIMP-1 positivas nos septos alveolares	69
4.26	Células TIMP-1 positivas nas vias aéreas	70
4.27	Células iNOS positivas nos septos alveolares	71
4.28	Células iNOS positivas nas vias aéreas	72

4.29	Células eNOS positivas nos septos alveolares	73
4.30	Células eNOS positivas nas vias aéreas	74
4.31	Expressão de 8-iso-PGF2α nos septos alveolares.....	75
4.32	Expressão de 8-iso-PGF2α nas vias aéreas.....	76
4.33	Células MUC5ac positivas nas vias aéreas.....	77
4.34	Fotomicrografias	78
5.	DISCUSSÃO	83
6.	CONCLUSÕES	95
7.	REFERÊNCIAS	97

Lista de Abreviaturas

ADAM	Família de Proteinases de Membrana
BbCi	<i>Bauhinia bauhinioides</i> Cruzipain Inhibitor
CAT	Teste de Avaliação de DPOC
CVF	Capacidade Vital Forçada
DAB	
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epitelial
ENA₇₈	Peptídeo Epitelial Ativador de Neutrófilos
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
Ers	Elastância de Sistema Respiratório
	Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease
GOLD	
GPI	Glicosil Fosfatidil Inositol
GROα	Oncogene Relacionado ao Crescimento α
Gtis	Tissue Damping
HAT	Proteinase Trypsin-Like de Via Aérea de Humanos
Htis	Tissue Elastance
IL-8	Interleucina 8
INFγ	Interferon γ
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
KGF	Fator de Crescimento de Queratinócitos
LBA	Lavado Broncoalveolar
Lm	Intercepto Linear Médio
LTB₄	Leucotrieno B ₄
MCP1	Peptídeo Quimiotático para Monócitos
MMP	Metaloproteinase de Matriz
mMRC	Conselho Britânico de Pesquisa modificado
NANC	Não Adrenérgico Não Colinérgico
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PAR2	Receptor Protease-Ativado 2
PMN	Polimorfonucleares
Raw	Resistência de Vias Aéreas
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Rrs	Resistência de Sistema Respiratório
SaO₂	Saturação Periférica de Oxigênio
TIMP	Inibidor Tecidual da Metaloproteinase
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
VEF1	Volume Expiratório ao final do primeiro segundo

RESUMO

REIS, RA. EFEITO DO INIBIDOR DE PROTEINASE DE ORIGEM VEGETAL *BbCI*, SOBRE A LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA ELASTASE EM CAMUNDONGOS C57Bl6. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: As proteinases tem um papel importante no desenvolvimento, na destruição tecidual e na produção de muco causada pela DPOC. O inibidor de proteinase de origem vegetal *Bauhinia bauhinoides* Cruzipain Inhibitor (BbCI) inibe tanto as proteinases da classe serina quanto da classe cisteína.

Objetivos: Deste modo consideramos relevante estudar os efeitos do tratamento com BbCI nas alterações pulmonares induzidas pela elastase em camundongos. **Métodos:** Camundongos C57Bl6 receberam elastase via intratraqueal (50 µL/animal, grupo ELA) ou salina (grupo SAL). Os camundongos foram tratados com BbCI (2mg/kg) nos dias 1, 15 e 21 após a instilação de elastase (grupo ELABC) ou salina (grupo SALBC). No dia 28 do protocolo, os animais foram anestesiados, a mecânica pulmonar foi medida e o óxido nítrico exalado coletado. Posteriormente, foi realizado o lavado broncoalveolar e os pulmões foram removidos para a preparação de lâminas de histoquímica e imunohistoquímica. Por meio de morfometria analisamos o número de células positivas para neutrófilos, TNF- α , MMP-9, MMP-12, TIMP-1, iNOS, eNOS assim como a fração de volume de 8-iso-PGF2 α , fibras colágenas e elásticas, nos septos alveolares e nas vias aéreas. Também foram avaliados o número de células positivas para macrófagos nos septos alveolares e MUC5ac nas vias aéreas. **Resultados:** O inibidor de proteinase

BbCI reduziu as alterações de mecânica pulmonar (Ers, Htis e Raw), destruição do septo alveolar (Lm) e o número de células no lavado broncoalveolar (células totais, macrófagos e neutrófilos) induzidos pela elastase. Em relação a resposta inflamatória, o BbCI reduziu o número de neutrófilos e de células TNF α positivas no septo alveolar e nas vias aéreas além de reduzir o número de macrófagos no septo alveolar. Considerando o remodelamento de matriz extracelular, o inibidor de proteinase atenuou a fração de volume de fibras elásticas e colágenas e o número de células MMP-9 e MMP-12 positivas nos septos alveolares e nas vias aéreas. Em relação a resposta de estresse oxidativo, o BbCI reduziu a fração de volume de isoprostano nas vias aéreas e o número de células iNOS positivas tanto nos septos alveolares quanto nas vias aéreas. O BbCI também reduziu o número de células MUC5ac positivas nas vias aéreas. **Conclusões:** O tratamento como inibidor BbCI modulou a mecânica pulmonar e reduziu as alterações inflamatórias, de remodelamento e de estresse oxidativo induzidas pela elastase intratraqueal. Embora sejam necessários mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos neste processo, o inibidor de proteinase BbCI pode ser considerado como um potencial instrumento terapêutico para o tratamento da DPOC.

Descritores: DPOC, Lesão Pulmonar/induzido quimicamente, Elastase, Inibidores de serino proteinase, Inibidores de cisteíno proteinase, Bauhinia, Camundongos

ABSTRACT

REIS, RA. EFFECTS OF PROTEINASE INHIBITOR FROM PLANT BBCI ON ELASTASE-INDUCED LUNG ALTERATIONS IN MICE. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013

Background: Proteinases play a key role on emphysema development, tissue destruction and mucus production. Bauhinia bauhinioides Cruzipain Inhibitor (BbCI) is a proteinase inhibitor from plant that neutralizes serine and cysteine proteinases. The present study evaluated the effects of the BbCI treatment in pulmonary alterations induced by elastase in mice. **Methods:** C57Bl6 mice received elastase intratracheally (50 µL/animal, ELA group) or saline (SAL group). Afterwards, mice were treated with BbCI (2 mg/kg) at days 1, 15 and 21 after elastase instillation (ELABC group). Control group received saline and BbCI using the same protocol (SALBC group). At day 28, mice were anesthetized, respiratory mechanics were collected, and exhaled nitric oxide were analyzed. Afterwards, broncoalveolar lavage fluid was obtained and lungs were removed to perform histochemistry and immunohistochemistry stains. By morphometry, the number of neutrophils, TNF- α , MMP-9, MMP-12, TIMP-1, iNOS, eNOS positive cells as well as the volume proportion of 8-iso-PGF 2α , collagen and elastic fibers content in alveolar septum and airways walls were performed. In airways walls, we also analyzed the number of MUC-5 positive cells and the number of macrophages. **Results:** The proteinase inhibitor BbCI was able to reduce the pulmonary mechanical alterations (Ers, Htis and Raw), alveolar septum disruption (Lm) and the BAL cell count (total cells, macrophages and neutrophils) induced by elastase. Regarding the

inflammatory response, BbCI also reduced the number of neutrophils and TNF α positive cells in both alveolar septum and airway walls, and also reduced the number of macrophages in alveolar septum. Considering the extracellular matrix remodeling, the proteinase inhibitor attenuated the volume fraction of elastic and collagen fibers, MMP-9 and MMP-12 positive cells in both alveolar septum and airway walls. Regarding the oxidative stress response, BbCI reduced the volume fraction of isoprostane in airways and the number of iNOS positive cells in both airways walls and alveolar septum. Finally, BbCI reduced the number of MUC5ac positive cells in airway walls. **Conclusions:** The treatment with BbCI modulated lung mechanics and reduced inflammatory, remodeling and oxidative stress alterations induced by elastase. Although more studies need to be performed to elucidate the mechanisms involved in this process, but we may considerate BbCI as a potential therapeutic tool for COPD management.

Descriptors: COPD, Lung Injury/ chemically induced, Elastase, Serine proteinase inhibitor, Cysteine proteinase inhibitor, Bauhinia, Mice

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

1.1.1 Definição

Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma doença que pode ser prevenida e tratada, com alguns efeitos extra pulmonares que contribuem significativamente para a gravidade da doença. O componente pulmonar da DPOC é caracterizado por limitação do fluxo aéreo, não totalmente reversível, geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal às partículas ou gases tóxicos (1).

A limitação do fluxo aéreo característica da DPOC é causada por uma mistura entre alterações nas pequenas vias aéreas (bronquite crônica) e destruição de parênquima (enfisema), que em proporções variadas, contribuem para a gravidade da doença. A inflamação crônica causa mudanças estruturais e diminuição da luz brônquica. A destruição do parênquima pulmonar leva a uma perda do acoplamento alveolar nas pequenas vias aéreas e diminui o recolhimento elástico do pulmão. Estas alterações diminuem a habilidade das vias aéreas de se manterem abertas durante a expiração (2).

1.1.2 Dados epidemiológicos

A DPOC é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo, e resulta em uma grande e crescente carga econômica e social. A prevalência da DPOC está diretamente relacionada com a prevalência de fumantes. Entretanto, em muitos países a prevalência de DPOC ocupacional e a DPOC relacionada a poluição atmosférica, resultante da queima de

madeira/carvão e da queima de combustíveis de biomassa, são os maiores fatores de risco para a DPOC (3). A projeção da prevalência da DPOC é alarmante, devido à grande exposição aos fatores de risco, e com a nova estimativa de vida da população, que levam a população a um enorme tempo e uma intensa exposição aos fatores de risco (4).

Uma revisão sistemática e meta-análise de estudos realizados entre 1990 e 2004, apontaram que a prevalência de DPOC é maior em fumantes do que em não fumantes. Os autores também mostraram que a DPOC é mais prevalente em indivíduos maiores de 40 anos do que os menores de 40 anos, e também é mais prevalente em homens do que em mulheres (5).

Em adultos com mais de 40 anos, a prevalência mundial da DPOC é cerca de 9-10%, quando esta é definida pela limitação do fluxo aéreo. Porém existe uma grande variação desta medida dependendo da região, que pode ser causada por diferenças na exposição das populações aos fatores de risco, ou por diferenças nas definições de DPOC usadas nos muitos estudos epidemiológicos (5).

O fardo econômico da DPOC também é grande. Existe uma relação direta entre os custos do cuidado do paciente portador de DPOC com a gravidade da doença e das exacerbações. Isto se deve ao fato de pacientes em que a DPOC se encontra mais grave, necessitam de maiores recursos terapêuticos com oxigênio, além de maior tempo de internação (6).

Na União Europeia, o total direto dos custos relacionados a doenças respiratórias é de 6% do orçamento total de cuidados com saúde, e a DPOC corresponde a 56% deste custo (aproximadamente 38,6 bilhões de euros) (7).

Nos Estados Unidos, os custos diretos com a DPOC são 29,5 bilhões de dólares e os custos indiretos 20,4 bilhões de dólares (8).

A morbidade da DPOC pode ser acessada por visitas ao médico ou ao pronto socorro e internações. Entretanto, existem poucos trabalhos que mediram estes dados. A morbidade da DPOC pode ser afetada por outras comorbidades (doença cardiovascular, diabetes, déficit musculoesquelético) que são ligadas a DPOC e podem ter um impacto na saúde do paciente assim como pode interferir no tratamento da DPOC.

Em um estudo mostrando as estatísticas brasileiras, a DPOC se encontra em primeiro lugar considerando a mortalidade por doenças respiratórias, sendo responsável por um quarto do total de óbitos da população adulta hospitalizada com problemas respiratórios (9). Na cidade de São Paulo, a prevalência de DPOC, definida por espirometria em indivíduos com mais de 40 anos, foi de 15,8% (10). Embora a prevalência paulistana seja maior que os dados mundiais supracitados, estes valores são compatíveis com dados encontrados no Brasil, onde a cidade de Pelotas no Rio Grande do Sul, apresenta uma prevalência de 15,2% (11). Dados do DATASUS* mostram que bronquite crônica e enfisema pulmonar foram responsáveis por cerca de 170.000 internações em 2007 no sistema público de saúde brasileiro, representando 1,5% do total de internações em hospitais públicos *(Fonte: Ministério da Saúde, Brasil).

Em relação a mortalidade, embora a DPOC seja frequentemente a primeira causa de morte, algumas vezes é subestimada e omitida da certidão de óbito, causando uma falta de acurácia nos dados de mortalidade (12). O

“Global Burden Disease Study” projetou que a DPOC, que em 1990 foi a sexta causa de morte, será a terceira causa de morte em 2020 no mundo inteiro. Uma nova projeção estimou que em 2030, a DPOC será a quarta maior taxa de mortalidade (13).

1.1.3 Fatores de risco

Embora o fator de risco relacionado a DPOC mais estudado seja a exposição a fumaça de cigarro, existem fortes evidências de estudos epidemiológicos que não fumantes também podem desenvolver a limitação do fluxo aéreo. Existem alguns estudos longitudinais que acompanham há mais de 20 anos pacientes com DPOC procurando encontrar relações de causa-efeito, entretanto nenhum deles incluiu o período pré e perinatal, que podem ter um papel importante na identificação dos fatores de risco desde que a DPOC resulta da interação gene-ambiente (14-17).

Um dos fatores de risco relacionado a genética que está bem documentado, é a deficiência hereditária na produção de α -1 antitripsina, que é o inibidor de serino proteinase mais abundante nos humanos (18). Outros genes, tal como o gene que codifica a metaloproteinases de matriz 12 que já foi relacionado com um declínio na função pulmonar, já foram descritos como possíveis influenciadores da fisiopatologia da DPOC, entretanto ainda existem discrepâncias entre os achados de estudos genéticos e os achados de qualidade de vida e função pulmonar (19).

A idade é um outro importante fator de risco relacionado a DPOC (8). Porém ainda não é claro se a idade por si só leva ao desenvolvimento da

DPOC ou se é soma da frequente exposição aos fatores ambientais durante a vida. O nível socioeconômico também é frequentemente relacionada como fator de risco para DPOC, existem evidências que o risco de desenvolver a doença é inversamente proporcional ao nível socioeconômico (20, 21). Porém os componentes da pobreza que influenciam não são claros, pois a exposição a poluentes, nutrição inadequada ou insuficiente e infecções recorrentes são frequentemente relacionadas à pobreza (21).

O fator de risco mais importante e mais descrito na literatura é a exposição a partículas suspensas no ar (18). Os fumantes de cigarro de tabaco tem uma maior prevalência de sintomas respiratórios e anormalidades na função pulmonar, uma alta taxa de declínio no VEF1 e uma maior taxa de mortalidade que os não fumantes (22). Outras formas de fumo, tais como cachimbo, charuto além de cigarro de maconha, também são fatores de risco para DPOC (23, 24). Exposição passiva à fumaça de cigarro também pode contribuir para os sintomas respiratórios e DPOC, pois aumenta a carga de partículas inaladas (25). Fumar durante a gravidez, pode causar um risco para o feto, por atrapalhar o desenvolvimento do pulmão e o desenvolvimento in útero, além de possivelmente afetar o progresso da maturação do sistema imunológico (26).

As exposições ocupacionais, onde podem ser incluídos poeiras orgânicas e inorgânicas, agentes químicos e fumaças são fatores de risco subestimados (27). Nos Estados Unidos, em uma população entre 30 e 75 anos, a estimativa de DPOC atribuída ao trabalho é de 19,2%, e quando separados somente os que nunca fumaram esta estimativa sobe para 31,1%

(28). De acordo com a *American Thoracic Society*, a exposição ocupacional é responsável por 10-20% dos sintomas e do declínio funcional da DPOC (29).

Outro fator de risco importante é a poluição do ar nos centros urbanos (18). O papel da poluição na fisiopatologia da DPOC está sendo estudado e ainda não está claro, porém sabe-se que a poluição do ar resultante da queima de combustíveis fósseis emitidas por motores de veículos é associada com declínio da função respiratória (30).

1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da DPOC é realizado com base na história clínica, no exame clínico e nos dados dos exames laboratoriais. Em relação a história clínica, o diagnóstico de DPOC deve ser considerado em todo paciente que apresente dispneia, tosse crônica, produção de catarro e a exposição de fatores de risco. A dispneia presente na DPOC é persistente, progressiva (piora com o tempo) e piora com a prática de exercícios físicos. A tosse crônica característica da DPOC é intermitente, e às vezes improdutiva. A produção de catarro na DPOC é um fator chave no diagnóstico da DPOC, porém o fato de ter sido fumante e a exposição à fumaça (de fogões a lenha e combustão de motores), assim como o histórico de DPOC na família são os fatores mais importantes no diagnóstico da doença (18).

Embora seja uma parte importante no cuidado com o paciente, o diagnóstico de DPOC raramente é detectado no exame clínico. Os sinais clínicos que poderiam indicar a doença, como a limitação do fluxo aéreo, só podem ser percebidos quando existe um dano significativo na função pulmonar.

A espirometria é o exame complementar reprodutível e objetivo para a avaliação da limitação do fluxo aéreo, e é obrigatório na suspeita clínica de DPOC. As medidas de espirometria são avaliadas antes e depois da administração de broncodilatador, se possível durante uma fase estável da doença. Os parâmetros clínicos mais importantes são a CVF (Capacidade Vital Forçada) e o VEF_1 (Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo), e a relação VEF_1/CVF . A permanência da limitação do fluxo aéreo após a broncodilatação, definida pela relação VEF_1/CVF abaixo de 0,70 é indicativo de DPOC (18). Além disto, não se observa resposta significativa ao broncodilatador, ou seja, variação de volume pré para pós menor que 12%, sendo menor que 200 ml de volume.

Além da espirometria, a radiografia simples de tórax pode ajudar não na definição da doença, mas para rechaçar outros diagnósticos e até para identificar regiões com possível indicação cirúrgica. A avaliação gasométrica e da oxigenação (Saturação Periférica de Oxigênio, SaO_2) são outros exames laboratoriais que auxiliam no diagnóstico da DPOC.

Os resultados do exame de espirometria balizam a classificação da gravidade da DPOC. Pacientes que apresentam VEF_1/CVF inferior a 0,7 após o broncodilatador são classificados como:

- **Estágio Leve (GOLD I):** $VEF_1 \geq 80\%$ do previsto
- **Estágio Moderado (GOLD II):** $VEF_1 < 80\%$ e $> 50\%$ do previsto
- **Estágio Grave (GOLD III):** $VEF_1 < 50\%$ e $\geq 30\%$ do previsto
- **Estágio Muito Grave (GOLD IV):** $VEF_1 < 30\%$ do previsto

Recentemente foi adicionado ao diagnóstico da DPOC, uma relação que combina o perfil sintomático com a classificação espirométrica dos pacientes. O perfil sintomático pode ser avaliado por dois questionários já validados mundialmente, o CAT (*COPD Assessment Test*) e o mMRC (*Modified British Medical Research Council*). O questionário mais comum é o mMRC que acessa as deficiências relacionadas à dispneia, entretanto o CAT é um teste que cobre a DPOC de um modo mais amplo e acessa a vida diária e o bem estar do paciente(18).

De acordo com esta classificação combinada, os pacientes são classificados em grupos que relacionam os valores dos questionários e o estágio espirométrico de acordo com o GOLD, como descrito a seguir:

- **Grupo A: Risco Baixo, Menos Sintomas;** Tipicamente GOLD 1 ou 2 e/ou 0-1 exacerbações por ano e mMRC 0-1 ou CAT <10
- **Grupo B: Risco Baixo, Mais Sintomas;** Tipicamente GOLD 1 ou 2 e/ou 0-1 exacerbações por ano e mMRC ≥ 2 ou CAT ≥ 10
- **Grupo C: Alto Risco, Menos Sintomas;** Tipicamente GOLD 3 ou 4 e/ou ≥ 2 exacerbações por ano e mMRC 0-1 ou CAT <10
- **Grupo D: Alto Risco, Mais Sintomas;** Tipicamente GOLD 3 ou 4 e/ou ≥ 2 exacerbações por ano e mMRC ≥ 2 ou CAT ≥ 10

Muitos portadores de DPOC são diagnosticados como portadores de enfisema pulmonar ou bronquite crônica devido às diferentes apresentações clínicas da doença. Enfisema pulmonar, ou destruição das superfícies de troca gasosa do pulmão (alvéolo), é um termo anatomopatológico que é frequentemente (porém incorretamente) usado na clínica médica, porém

descreve somente uma de várias anormalidades estruturais presentes na DPOC. Bronquite crônica, ou presença de tosse e produção de catarro por pelo menos 3 meses por 2 anos consecutivos, também é um termo bastante utilizado tanto clínica como do ponto de vista epidemiológico (18).

1.1.5 Fisiopatologia

O processo de inflamação crônica das vias aéreas é uma característica muito relevante na fisiopatologia da DPOC. As células mais comuns encontradas nesta doença são os neutrófilos, os macrófagos e os linfócitos T CD8+ (31-33). Porém, a cinética de aparecimento destas células, seu papel no desenvolvimento da doença e suas inter-relações não são suficientemente conhecidos (34).

Os neutrófilos são células liberadoras de mediadores e enzimas elastolíticas, como a elastase, responsáveis por coordenar a destruição tecidual e a inflamação crônica. Estas células estão presentes em pacientes com DPOC em fases mais avançadas e podem estar relacionados à produção de muco, que é potencialmente estimulada por muitas proteinases neutrofílicas (35-37)

Nos pulmões de indivíduos expostos ao cigarro são detectados vários fatores quimiotáticos para neutrófilos tais como: leucotrieno B₄ (LTB₄), interleucina 8 (IL-8), oncogene relacionado ao crescimento α (GRO α) e Peptídeo epitelial ativador de neutrófilo (ENA₇₈). O aumento do número de neutrófilos na biópsia brônquica e escarro induzido está associado à gravidade da doença (38). Em

modelos animais, a presença de neutrófilos e da elastase neutrofílica parece ser importante para o desenvolvimento do enfisema (39, 40).

Os macrófagos são células centrais para o desenvolvimento da doença. São ativados por substâncias do cigarro, podem secretar IL-8, LTB₄ fator de necrose tumoral α (TNF α), peptídeo quimiotático para monócitos (MCP1). Também podem secretar elastase, catepsinas K, L e S, além de metaloproteinases de matriz (MMP) 2, 9 e 12. Desta forma, estas células podem atuar como mediadores do processo lesivo iniciado pelas toxinas do cigarro, bem como efetores da lesão pulmonar, produzindo destruição do parênquima (2). Aparentemente a cooperação entre macrófagos e neutrófilos é necessária para produzir a quebra do tecido conectivo em um modelo agudo de exposição ao cigarro (40).

Os linfócitos T CD4 e CD8 são frequentemente encontrados nos pulmões dos pacientes com DPOC (2). Aparentemente, há predomínio do padrão Th1 que produzem interferon (INF)- γ . Algumas análises feitas em infiltrados de linfócitos B mostram que esta população de células pode ser mono ou oligoclonal (32, 35, 38, 40-43).

Ainda não está completamente esclarecido o papel dos linfócitos na fisiopatologia da DPOC (2). Estas células podem ser ativadas em resposta a agentes microbiológicos, que frequentemente infectam as vias aéreas destes pacientes. Também podem ser estimuladas por alguns antígenos presentes na fumaça do cigarro, ou ainda que o processo de lesão pulmonar exponha alguns auto-antígenos, desencadeando uma resposta linfocitária local contra estes (44)

As proteinases da classe serino, cisteíno e metalo são substâncias mais relacionadas na patogênese da DPOC (45-47). As serinoproteinases elastase neutrofílica, catepsina G e proteinase 3 são liberadas quando mediadores pró-inflamatórios induzem a desgranulação de células polimorfonucleares e monócitos, podendo causar a destruição do parênquima pulmonar e a produção de muco (46). As proteinases da classe cisteíno, catepsinas S, B e L contribuem para a degradação da matriz extracelular mediada por macrófagos. Já as metaloproteinases (MMP), que promovem a degradação de colágeno e elastina, e também aumentam a expressão epitelial de MUC5, são representadas pela MMP-1, 2, 9, 14 e ADAM (48, 49).

A liberação destas proteinases, não totalmente inibida pelas antiproteinases, leva a proteólise do tecido conectivo pulmonar (elastina) e ao enfisema (45, 50, 51). A destruição do parênquima pulmonar leva a perda do acoplamento alveolar nas pequenas vias aéreas e diminui o recolhimento elástico do pulmão, sendo que estas alterações diminuem a possibilidade das vias aéreas de se manterem abertas durante a expiração (47).

Corroborando esta teoria, os pacientes com deficiência de α 1-antitripsina (um inibidor da proteinase neutrofílica) podem evoluir com grande destruição do parênquima pulmonar (52). Evidências em modelos animais mostram que camundongos geneticamente modificados, deficientes em elastase neutrofílica, não desenvolveram enfisema após submissão a um modelo crônico de exposição à fumaça de cigarro (40).

As elastases são definidas como enzimas que tem a capacidade para degradar a elastina, que é uma proteína insolúvel, que após a ação enzimática

transforma-se em peptídeos solúveis (53). Neste grupo de proteinases estão incluídas a elastase pancreática e a elastase de leucócitos. A elastase humana de leucócitos apresenta 43% de homologia com a elastase pancreática de porco, 39% de homologia com a calicreína pancreática de porco e 37% de homologia com a catepsina G, além de apresentar homologia em menor proporção com a elastase de outros animais (53, 54).

A elastina apresenta um papel mecânico e estrutural muito importante em tecidos elásticos como o pulmão, vasos sanguíneos e pele. Apresenta-se como uma macromolécula altamente hidrofóbica, pois é rica em prolina e glicina, sendo secretada no espaço extracelular, e que se agrupa em fibras elásticas próximas a membrana plasmática (55).

As metaloproteinases de matriz extracelular são endopeptidases cujo ataque nucleofílico é mediado por uma molécula de água ativada por um metal (56). São fundamentalmente enzimas extracelulares, cuja expressão geralmente é regulada durante a transcrição de fatores de crescimento, hormônios, citocinas e transformação celular. A atividade das MMPs é controlada pela transcrição, ativação dos precursores e inibida por inibidores endógenos, tais como α -macroglobulina e pelos inibidores teciduais específicos de metaloproteinases (TIMP). As MMPs de vertebrados foram divididas em grupos baseando-se na sequência, na especificidade do substrato, similaridade, organização do domínio. Estes grupos são: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinases e MMPs tipo-membrana (57).

O aumento da deposição de proteínas de matriz extracelular nos pulmões caracteriza o remodelamento pulmonar. Este aumento na deposição

pode ocasionar a fibrose subepitelial, à hipertrofia e hiperplasia de músculo liso assim como a hiperplasia das glândulas submucosas, levando ao espessamento da parede brônquica e um menor calibre para a passagem do ar. Estudos experimentais e clínicos sugerem que o remodelamento brônquico é devido à liberação de diversos fatores inflamatórios, de crescimento celular e de liberação de citocinas (58).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula que atua como neurotransmissor no sistema nervoso autônomo não adrenérgico não colinérgico (NANC), e tem papel importante na modulação do tônus bronquial, tônus vascular e exsudação plasmática tanto em animais como em humanos (59). O NO é produzido a partir da L-arginina com ação das óxido nítrico sintases (NOS), que são divididas em três isoformas, sendo duas constitutivas e uma induzida. Uma das formas constitutiva da NOS, denominada eNOS, pode ser expressa nas células endoteliais, a outra forma constitutiva, denominada nNOS, pode ser expressa nos neurônios (60, 61). Já a forma induzida, denominada iNOS, pode ser expressa por vários tecidos e órgãos além do endotélio vascular. Sua produção é estimulada por algumas citocinas como o $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 e IFN- γ (62, 63), além do polissacarídeo bacteriano. A iNOS é a maior responsável pela produção de NO e parece estar presente principalmente em condições patológicas (64).

O potente oxidante peroxinitrito, é formado pela interação do NO e do superóxido, por uma reação iso-estequiométrica rápida (65). A formação do peroxinitrito leva a peroxidação e a geração de isoprostano, onde o é

considerado a forma mais predominante gerada durante a ativação da via do estresse oxidativo (66).

Os isoprostanos são produzidos independentemente das enzimas ciclooxigenases, pela peroxidação do ácido araquidônico, que são catalisadas pelos radicais livres. Esta via pode formar 64 estruturas isoméricas, das quais o 8-iso-PGF₂ α é bem caracterizado. Estudos apontam os isoprostanos, particularmente o PGF₂ α , como marcadores da injúria oxidante *in vivo* (67, 68) e a sua produção está associada a potencialização da obstrução brônquica e alteração da formação de edema em cobaias (69). Em pacientes portadores de DPOC, foi observado um aumento dos níveis de 8 isoprostano na urina (70).

1.1.6 Tratamento

O tratamento dos pacientes portadores de DPOC pode ser feito de várias formas, dependendo do estágio da doença. Os objetivos do tratamento podem ser em reduzir os riscos de progressão e exacerbação, ou reduzir os sintomas e melhorar a qualidade de vida (71).

Parar de fumar é a intervenção com a maior capacidade de mudar a história natural da DPOC. O uso de reposição de nicotina de qualquer via de administração (goma de mascar, inalatória, spray nasal e patch adesivo) podem aumentar significativamente as taxas de abstinência de cigarro (72). Alguns fármacos como vareniciclina, bupropion e nortriptilina, tem mostrado um aumento na proporção de ex-fumantes, mas devem ser usados como mais um elemento no combate ao tabagismo (73).

O tratamento farmacológico dos pacientes estáveis da DPOC, é utilizado para reduzir os sintomas além de reduzir a frequência e a gravidade das exacerbações. O tratamento deve ser específico para cada paciente, visto que os sintomas e sua gravidade no momento, são individuais. As classes de medicações comumente utilizada no tratamento da DPOC são: broncodilatadores, corticosteroides inalatórios, combinação de corticosteroides inalatórios e broncodilatadores, inibidores de fosfodiesterase-4, corticosteroides sistêmicos e n-acetilcisteína (18).

Os broncodilatadores são a base do tratamento sintomático da DPOC, são divididos em curta e longa duração e são administrados preferencialmente por via inalatória, pois desta forma tem uma ação mais direta e apresentam menor incidência de efeitos colaterais. Os β_2 -agonistas são seguros e potentes broncodilatadores e frequentemente prescritos. Os β_2 -agonistas de longa duração (formoterol e salmeterol) são mais eficazes que os β_2 -agonistas de curta duração (fenoterol, salbutamol e terbutalino) quando acessamos a redução da dispneia e a melhora funcional mais acentuada e duradora (74-76).

Em pacientes com $VEF_1 < 60\%$ do predito, o tratamento regular com corticosteroides inalatórios está indicado. Este tratamento melhora os sintomas, a função pulmonar e a qualidade de vida, além de diminuir a frequência das exacerbações dos pacientes. O uso dos corticosteroides inalatórios está associado com um maior risco de pneumonia, e a interrupção do tratamento pode levar a exacerbações em alguns pacientes. Embora seja um tratamento eficaz, a monoterapia prolongada não é recomendada (77-79).

A combinação de corticosteroides inalatórios e broncodilatadores de longa duração, é mais efetiva que a utilização destes medicamentos separadamente. Esta combinação melhora a função pulmonar e o estado de saúde, dos pacientes portadores de DPOC, além de reduzir as exacerbações de pacientes nos estágios de moderado a grave (79-81).

Em pacientes classificados como GOLD III ou IV com histórico de exacerbações, o uso dos inibidores de fosfodiesterase-4 (roflumilast) diminuem o número das exacerbações de pacientes tratados concomitantemente com corticosteroides inalatórios. Este efeito também se observa quando usado concomitantemente com broncodilatadores de longa duração (82, 83).

Drogas anticolinérgicas como o brometo de tiotrópio, são relacionadas com redução nas exacerbações e nas hospitalizações, além de melhorar os sintomas e o estado geral (84). Estes agem bloqueando o efeito da acetilcolina nos receptores muscarínicos e atuam seletivamente nos receptores M3 e M1 (85). Em um estudo clínico, o brometo de tiotrópio foi superior ao salmeterol em reduzir exacerbações, porém a diferença entre eles foi pequena (86).

O tratamento com corticosteroide sistêmico está indicado nas exacerbações infecciosas e não infecciosas, onde sua administração por 14 dias reduz os sintomas, melhora o VEF₁ e a PaO₂ em menor tempo (87). Uma revisão sistemática observando o efeito da n-acetilcisteína, que é um modulador do estresse oxidativo, mostrou diminuição das exacerbações e dias de internação em pacientes portadores de DPOC. Entretanto neste estudo haviam trabalhos que não eram controlados e randomizados, levantando algumas dúvidas sobre a efetividade do tratamento (88).

O tratamento, não farmacológico, da DPOC mais estimulado é a reabilitação pulmonar. Como benefícios aos pacientes, a reabilitação pulmonar, apresenta uma melhora na capacidade física, na qualidade de vida e a recuperação após a internação decorrente a exacerbação. Também apresenta uma diminuição no número de internações e de dias internados, além da diminuição dos níveis de ansiedade/depressão dos pacientes portadores de DPOC (89). Basicamente o programa de reabilitação pulmonar é um programa de exercícios, divididos em aeróbicos e treinamento de força muscular, utilizando uma intensidade de 60-80% da carga máxima, além de um componente educacional, abordando vários aspectos relacionados a DPOC. Entretanto um dos pontos mais favoráveis ao programa de reabilitação pulmonar é o seu baixo custo relativos aos benefícios conseguidos (90).

A oxigenoterapia é outro tratamento não farmacológico da DPOC, indicado para melhorar a sobrevida de pacientes hipoxêmicos ($\text{SaO}_2 < 88\%$). Tem o objetivo de manter a saturação arterial de oxiemoglobina acima de 90%. Existem diversos sistemas de oxigenoterapia, dentre eles estão os cilindros de oxigênio, os concentradores de oxigênio, o oxigênio líquido e o oxigênio portátil (que permite o uso fora do domicílio) (91).

O tratamento cirúrgico de redução de volume pulmonar é indicado em pacientes com DPOC grave e localizadas na parte superior dos lobos pulmonares, e com capacidade de exercícios baixa. O objetivo deste tratamento é diminuir a hiperinsuflação, fazendo os músculos respiratórios mais efetivos (92).

1.1.7 Modelos experimentais

Os modelos experimentais de enfisema em animais são vastamente utilizados para elucidar mecanismos fisiopatológicos e também para testar novas modalidades terapêuticas (51). As formas de indução do enfisema são divididas entre os modelos de indução por cigarro e indução por elastase. Existem modelos de enfisema induzidos pela elastase que se diferenciam na dose, na quantidade de aplicações, no tempo do protocolo e na forma de aplicação (93).

Primeiramente optamos por fazer o protocolo de administração de elastase por via intranasal, menos invasivo, baseado em trabalhos prévios realizados no nosso laboratório, e em trabalhos da literatura que utilizam esta técnica em imunoterapia, administração de drogas e alérgenos (15, 55, 56, 57, 60). Porém, como pretendíamos utilizar um modelo com alterações expressivas de parênquima e também de vias aéreas, optamos por utilizar a instilação intratraqueal.

Utilizando o modelo de instilação nasal, a dose de elastase que efetivamente chega ao parênquima distal do animal, é variável parte do volume pode ficar retida no nariz do animal ou ser deglutida (1).

Vários foram os autores que avaliaram este modelo de instilação intranasal (94) (95, 96). Tsuyuki et. al. (1997), testaram a efetividade da via nasal utilizando Azul de Evans em camundongos. Os autores observaram que 75% do total instilado encontrava-se na via aérea, e não havia corante no trato digestório (97). Eyles et. al. (1999), também testaram a efetividade da instilação nasal, utilizando esferas marcadas com material radioativo e observaram 48%

do volume total no pulmão após 15 minutos da instilação (98). Porém, Takafuji et.al. (1987) encontraram apenas 19% do total de ovoalbumina misturada com partículas de diesel, mostrando que o modelo de instilação nasal pode variar (7).

Por outro lado, Tanaka et. al. (2011) utilizaram a técnica de instilação intratraqueal para induzir o enfisema. Os resultados do trabalho mostraram que a técnica foi efetiva, pois os animais que receberam elastase apresentaram um aumento no intercepto linear médio (Lm) e nas células inflamatórias do lavado broncoalveolar(13).

Takahashi et. al. (2008), avaliando o efeito da sinvastatina no modelo de indução de enfisema pela elastase, também realizaram a técnica de instilação intratraqueal. Os resultados mostraram um aumento no intercepto linear médio e no lavado broncoalveolar. O tratamento com a sinvastatina diminuiu em 21% a alteração causada pela elastase no intercepto linear médio e também diminuiu o número total de células do lavado broncoalveolar (8).

Plantier et al. (2007) avaliaram o lavado broncoalveolar de camundongos que foram induzidos ao enfisema pela elastase e foram tratados pelo fator de crescimento de queratinócitos (KGF). Os autores mostraram que o KGF diminui de forma significativa o número total de células, o número de macrófagos e de neutrófilos (99).

1.2 Inibidores de Proteinases

Os inibidores são compostos que bloqueiam a hidrólise por uma enzima de um determinado substrato. Estes inibidores, em geral, atuam em um grupo

específico de enzimas, e são conhecidos os inibidores de cisteínoproteinases, serinoproteinases, metaloproteinases, asparticoproteinases e os multifuncionais que tem a capacidade de inibir diferentes classes de enzimas ao mesmo tempo. Estes inibidores podem ser de origem animal ou vegetal (100).

Os inibidores vegetais têm sido estudados em leguminosas, gramíneas e solanáceas, em grande parte pelo fato dessas famílias apresentarem numerosas espécies utilizadas como alimentos. As sementes de leguminosas são reconhecidamente uma excelente fonte de proteína, e os inibidores de proteinases nelas presentes são os mais estudados nessa classe de compostos (100).

A inibição das serinoproteinases por inibidores proteicos ocorre por uma ligação específica que está restrita ao sítio reativo. Esta inibição pode ser de dois tipos: reversível, quando ocorre diluição da concentração do inibidor e este recupera a atividade enzimática; ou irreversível, quando a ligação entre a enzima e o inibidor torna a recuperação da atividade enzimática impossível (101).

As elastases são definidas como enzimas que tem a capacidade para degradar a elastina, que é uma proteína insolúvel, que após a ação enzimática transforma-se em peptídeos solúveis. Neste grupo de proteinases estão incluídas a elastase pancreática e a elastase de leucócitos. A elastase humana de leucócitos apresenta 43% de homologia com a elastase pancreática de porco, 39% de homologia com a calicreína pancreática de porco e 37% de

homologia com a catepsina G, além de apresentar homologia em menor proporção com a elastase de outros animais (53, 54).

A elastase neutrofílica, proteinase 3 e catepsina G são serinoproteinases armazenadas por células polimorfonucleares (PMN) e monócitos, e liberadas quando mediadores pró-inflamatórios induzem a desgranulação, podendo causar destruição do parênquima pulmonar e a produção de muco (49). As cisteínoproteinases representadas pelas catepsinas S e L, que são potentes elastases, contribuem para a degradação da matriz extracelular mediada por macrófagos. As metaloproteinases são representadas pelas MMP1, 2, 9, 14 e ADAM. Além de promover a degradação de colágeno e elastina, as metaloproteinases também aumentam a expressão epitelial de Muc5ac (48, 49).

As proteinases também são expressas na superfície dos leucócitos, e estas proteinases ligadas a membrana participam de funções importantes como na inflamação, remodelamento de matriz extracelular, fibrinólise e coagulação. São ancoradas na membrana por um domínio transmembrana, ou por uma ancora glicosil fosfatidil inositol (GPI). A ligação das proteinases com os leucócitos atua em várias funções, tais como: concentrar a atividade das proteinases para a região pericelular; facilitar a ativação pro enzima; aumentar a estabilidade e a retenção da proteinase no espaço extracelular; regular a função leucocitária, pois as proteinases sinalizam através dos sítios de ligação celular ou outras proteínas de superfície celular; proteger as proteinases dos inibidores de proteinase no meio extracelular (102).

A elastase neutrofílica e a catepsina G ligadas a membrana, tem eficiência e atividade similares comparadas com as formas solúveis destas proteinases, partindo do princípio que ambas degradam os componentes da matriz extracelular (103) Entretanto, estas proteinases ligadas a membrana vêm se mostrando resistentes aos inibidores de proteinases fisiológicos, α 1-inibidor de proteinase e α 1-antiquimotripsina (103, 104).

O gênero *Bauhinia* pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinoideae*. São encontradas principalmente em áreas tropicais. Aproximadamente 570 espécies são conhecidas, sendo algumas popularmente chamadas de pata da vaca, pela forma das suas folhas e como orquídeas pela aparência e beleza de suas flores e usadas como remédio na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo a África, Ásia e América Central e do Sul. Os estudos fitoquímicos e farmacológicos demonstram que essas plantas são constituídas principalmente de glicosídeos, esteroídicos, tri terpenos, lactonas e flavonóides (105).

O gênero *Bauhinia*, apresenta inibidores do tipo Kunitz em algumas espécies, inclusive na espécie *bauhinoides* (106). Os inibidores da família Kunitz apresentam massa molecular aproximada de 20 kDa. O inibidor mais estudado deste grupo é o SBTI, um inibidor de tripsina extraído de feijão de soja (Laskowski and Kato 1980). A inibição por proteínas desta família é do tipo competitiva, onde encontramos no complexo 1:1 toda a atividade enzimática nula. Nesta família predominam inibidores de cadeia polipeptídica única, porém alguns inibidores isolados das sementes de leguminosas da subfamília

Mimosoideae, tais como *Acassia*, *Adenathera* e *Albizzia*, apresentaram duas cadeias, ambas ligadas por pontes de dissulfeto (100, 107).

Figura 2. Foto ilustrativa da planta *Bauhinia bauhinioides*, conhecida popularmente como pata de vaca.

O inibidor isolado de sementes de *Bauhinia* denominado *Bauhinia bauhinioides* Cruzipain Inhibitor (*BbCI*), mostrou-se efetivo em inibir a liberação de elastase de neutrófilos ativados, em um modelo de injúria pulmonar aguda. Entretanto, o inibidor altamente homólogo chamado *Bauhinia rufa* Proteinase Inhibitor (*BrPI*) não obteve o mesmo efeito. Estes autores indicaram o *BbCI* como um instrumento importante no estudo do papel da elastase de neutrófilos nos mecanismos fisiopatológicos (105, 108).

<u>M R T T F L A L C L F L F A</u>	14
ACCAAAACCCAGACACAATGAGGACCCTTTCCTTGCACTGTGCTTGTCTTTTGGCCT	60
<u>Y K A T S S V I L D T K G E P V S N A A</u>	34
ACAAAGCCACATCTTCCGTCAATTCTCGACACCAAAGGCGAGCCGGTGAGCAATGCCGCCG	120
<u>D A Y Y L V P V S H G E G G L A L A K V G</u>	55
ACGCATATATCTCGTACCAGTCTCTCATGGTGAGGGTGGGTAGCACTCGCCAAGGTTGG	180
<u>N E A E P K A V V L D P H H R P G L T V</u>	75
AAACGAGGCAGAGCCAAAGCAGTTGTTTGGATCCTCACCACCGTCCCGGTTTAACGGTT	240
<u>R F E T P L A I A I I T E S F F L N I K</u>	95
AGATTTGAAACCCCACTTGCAATTGCTATAATCACAGAGTCTTTTTCCTCAATATCAAGT	300
<u>F V P S S S D S E V W D V S K Q Y P I G L</u>	116
TTGTACCATCTTCATCTGATTGCGAAGTCTGGGACGTTAGCAAACAATACCCAATCGGCTT	360
<u>A V K V T D T K S F V G P F R V E K E G</u>	138
GGCGTGAAAGTCACAGACACCAAATCTTTGTGCGGCCCATTTAGAGTTGAGAAAGAAGGT	420
<u>E G Y K I V Y Y P D R G Q T G L D I G L</u>	161
GAAGGGTACAAGATTGTATACTACCTGACCGGGGCCAGACCGGGCTCGATATCGGGCTTG	480
<u>V H R N D K Y Y L A A T E G E P F V F K I</u>	177
TTTCACAGAAACGATAAATACTATTGCTGCGACAGAAGGGGAGCCATTCGTATTCAAGAT	540
<u>R K A T Y E E S F P G I M S I V</u>	193
CAGGAAAGCAACTTATGAGGAAAGCTTTCCTGGAATAATGAGCATCGTTTGAAGATGCGAC	600
GTCGTTTCTCCTCTTAGTTTGTGGTTGACTATGTAATAACGTAAGAGGAACCCCTCACTTGT	660
GAGGATCTATCTATCTACTTTGAATATATCCCTACTTGTGTACCTTTCTTGAATGTCTTAA	720
TTATAAGTTTGTGTCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA	765

Figura 3. O nucleotídeo e a sequência deduzida do cDNA do inibidor BbCI. Os números acima e abaixo representam a sequência de posição de aminoácido e nucleotídeo respectivamente. O sinal N-terminal e o peptídeo C-terminal previstos estão sublinhados. Os códons de start e stop estão em negrito e o aminoácido na posição P1 está no quadrado. A sequência do nucleotídeo foi depositada no GenBank com o número de acesso AY293311.

Figura 4. A estrutura geral do BbCI. Este inibidor apresenta uma dobra β -trefoil formada por seis hairpins de cadeia dupla. Três destas formam uma estrutura de barreira (em verde) e as outras três, estão arranjadas em triângulo e cobrem a barreira (em vermelho).

O uso farmacológico dos inibidores de proteinase está associado as terapias antivirais no tratamento da AIDS e da hepatite. Nestes casos os inibidores de proteinase agem prevenindo a replicação viral por se ligar seletivamente as proteinases dos vírus e bloqueando a clivagem proteolítica de proteínas precursoras que são necessárias para a produção de partículas infecciosas dos vírus. Existem vários inibidores de proteinases aprovados e utilizados para o tratamento do HIV, sendo alguns deles: Saquinovir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Atazanavir, Fosamprenavir, Tipranavir e Darunavir. Sendo todos eles comercializados por grandes companhias farmacêuticas (109).

Recentemente, novas estratégias terapêuticas visando o controle da produção e/ou inativação das proteinases estão sendo discutidas para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (18). Desde que as proteinases deixaram de ser consideradas apenas como proteínas de degradação enzimas e tornaram-se importantes moléculas sinalizadoras envolvidas em vários processos biológicos vitais, os inibidores da proteinase estão sendo intensamente investigados (109-111). Algumas moléculas sintéticas foram desenvolvidas para testar o papel terapêutico dos inibidores de proteinases na DPOC, tais como CP-471,474 (112); ZD0892 (113); SP-B (114); MR889 (115); FR901277 (116).

Frente às evidências da crescente morbidade e mortalidade de pacientes portadores de DPOC, que são frequentemente associados ao desequilíbrio proteinase-antiproteinase, torna-se fundamental estabelecer modelos experimentais onde ocorra a inflamação e a destruição de tecido pulmonar para que possam ser utilizadas para a busca de novas drogas que

representem uma nova abordagem terapêutica para estes. É importante ressaltar que os mecanismos fisiopatológicos da DPOC ainda não estão completamente elucidados, e que a teoria mais defendida na comunidade científica é a proteinase-antiproteinase. Como descrito anteriormente o extrato de BbCl pode efetuar um papel importante na liberação de proteinases, podendo alterar o desenvolvimento das lesões pulmonares causadas pela elastase.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Deste modo, nossos objetivos foram avaliar o efeito do inibidor de proteinase BbCl no modelo experimental de lesão pulmonar induzida pela elastase intratraqueal em camundongos, analisando os aspectos funcionais e histopatológicos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar as alterações de mecânica pulmonar.
2. Avaliar o óxido nítrico exalado.
3. Avaliar nos septos alveolares os seguintes parâmetros:
 - Diâmetro alveolar médio;
 - A resposta inflamatória macrofágica e neutrofílica;
 - O número de células TNF- α positivas;
 - A fração de volume de fibras elásticas e colágenas;
 - O número de células MMP-9, MMP-12 e TIMP-1 positivas;
 - O número de células iNOS, eNOS e a fração de volume de iso-PGF2- α ;
4. Avaliar nas vias aéreas não cartilaginosas os seguintes parâmetros:
 - A resposta inflamatória neutrofílica;
 - O número de células TNF- α positivas;
 - A fração de volume de fibras elásticas e colágenas;
 - O número de células MMP-9, MMP-12 e TIMP-1 positivas;
 - O número de células iNOS, eNOS e a fração de volume de iso-PGF2- α ;
 - O número de células MUC5ac positivas.

3. MÉTODOS

3.1 Animais

O estudo foi aprovado pela a Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo número 1164/09). Os animais serão manejados de acordo com as orientações para cuidados com animais de laboratório (NIH 1996).

Utilizaremos camundongos C57/Bl6, machos, adultos jovens, obtidos do biotério central da Faculdade de Medicina da USP. Os animais deverão ter entre 6 a 8 semanas de vida ao saírem do biotério central e passarão por um período de ambientação no biotério do laboratório por 2 semanas. Utilizaremos camundongos C57Bl/6 por terem sido usados em outros modelos de enfisema e apresentarem maior susceptibilidade a indução do enfisema (117).

3.2 Material Vegetal

As sementes de *Bauhinia bauhinioides* foram coletadas na região do Pantanal do Mato Grosso do Sul, e identificadas pela Profa. Dra. Vali Joana Pott, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). As exsiccatas foram depositadas no herbário do Centro Universitário de Corumbá (Universidade Federal do Mato Grosso do Sul).

As etapas da purificação dos inibidores isolados das sementes de *Bauhinia Bauhinioides* que serão utilizados neste estudo seguiram os procedimentos descritos anteriormente (118, 119).

3.3 Indução do Enfisema por Elastase

Os animais foram submetidos a anestesia inalatória utilizando o isoflurano, e a região anterior do pescoço foi depilada e desinfetada com povidine. Foi realizada uma incisão de aproximadamente 0,5 cm para expor a traqueia, e foi injetado única dose de 0,667 UI de Elastase Porcina Pancreática (E- 1250 – Type 1, Sigma, Califórnia, EUA), volume de 50 µL diretamente na traqueia através de uma seringa 1 mL entre os anéis cartilagosos. Após a instilação foi realizada uma massagem no tórax do animal, para espalhar melhor a elastase, e posteriormente a este procedimento o animal foi suturado na incisão e novamente foi aplicado o povidine para desinfetar os pontos.

3.4 Grupos Experimentais

Os animais serão divididos aleatoriamente em 4 grupos, de acordo com o protocolo de exposição a que seriam submetidos:

Grupo Salina (SAL) – Receberá injeção intraperitoneal de solução salina (0,2mL) uma hora antes da instilação intratraqueal de solução salina (50 µL). Após 14 dias deste procedimento, os animais foram tratados mais duas vezes a cada 7 dias (n=8).

Grupo Elastase (ELA) – Receberá injeção intraperitoneal de solução salina (0,2mL) uma hora antes da instilação intratraqueal elastase (50 µL). Após 14 dias deste procedimento, os animais foram tratados mais duas vezes a cada 7 dias (n=8).

Grupo Salina BbCI (SALBC) – Receberá injeção intraperitoneal do extrato de *BbCI* (2 mg/kg, 0,2mL de volume) uma hora antes da instilação intratraqueal de solução salina (50 μ L). Após 14 dias deste procedimento, os animais foram tratados mais duas vezes a cada 7 dias (n=8).

Grupo Elastase BbCI (ELABC)– Receberá injeção intraperitoneal do extrato de *BbCI* (2 mg/kg, 0,2mL de volume) uma hora depois da instilação intratraqueal de elastase (50 μ L). Após 14 dias deste procedimento, os animais foram tratados mais duas vezes a cada 7 dias (n=8).

Figura 5. Timeline do protocolo experimental.

3.5 Avaliação da Mecânica Respiratória

Após os 28 dias dos procedimentos iniciais, os animais serão anestesiados com tiopental (250 mg/kg i.p.) e traqueostomizados. Uma cânula de plástico (20 gauge, BD, MG, Brasil) será inserida pelo orifício da traqueostomia, que foi fixada com fio de algodão ao redor da traquéia. Os

animais serão, conectados a um aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (FlexiVent, Scireq, Montreal, Canadá) e ventilados com volume corrente de 10 ml/kg, frequência respiratória de 120 ciclos/min e curva de fluxo inspiratório senoidal. Para abolir seu esforço respiratório, os animais receberam pancurônio (0,2 mg/kg intraperitoneal). Quando não havia mais movimentação do animal, os dados para o cálculo da mecânica oscilatória serão obtidos. Para tanto, utilizaremos um sinal que produzia oscilações do fluxo aéreo com diferentes frequências primas (0,25 a 19,625) por 16 segundos, mantendo-se a válvula expiratória fechada. Os valores de pressão gerados serão obtidos e a impedância de via aérea (Pressão/Fluxo) será calculada como função das diferentes frequências produzidas.

Usando uma janela de sobreposição de 75% no sinal de 16 segundos, 3 blocos de 8 segundos serão usados para o cálculo dos parâmetros da mecânica oscilatória (i), segundo a equação:

$$Z(f) = R_{aw} + i(2\pi f)I_{aw} + \frac{[G_{tis} - iH_{tis}]}{(2\pi f)^\alpha}$$

Neste modelo, $Z(f)$ é a impedância de via aérea em função da frequência, i é a unidade imaginária ($-1^{1/2}$), f é frequência, I_{aw} é a inertância de vias aéreas e $\alpha = (2/\pi) \cdot \arctan(H_{tis}/G_{tis})$. Os parâmetros que buscamos para descrever o modelo pulmonar são **R_{aw}** (resistência de vias aéreas maiores), **G_{tis}** (resistência de vias aéreas menores ou tecidos) e **H_{tis}** (elastância de tecidos pulmonares).

Figura 6. Aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (FlexiVent, Scireq, Canadá)

3.6 Determinação de Óxido Nítrico (NO) Exalado

Durante a ventilação mecânica, o gás será coletado na porção expiratória do ventilador através de um balão impermeável ao NO (*Mylar Bag*, Sievers, Instruments Inc., Boulder, CO, USA) durante 5 minutos. Após o término do período de coleta, os LBAões serão selados para posterior análise.

O óxido nítrico será mensurado por quimioluminescência através de um analisador de resposta rápida (280 NOA – Nitric Oxide Analyzer – Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, EUA). A concentração média de NO será registrada em partes por bilhão (ppb), como um índice da concentração de NO no ar exalado.

Figura 7. Aparelho que analisa o NO exalado (280 NOA – Nitric Oxide Analyzer – Sievers Instruments Inc., EUA).

3.7 Lavado Broncoalveolar (LBA)

Foi realizado por intermédio da infusão de 0,5 ml de salina por três vezes consecutivas (total volume 1,5mL), pela cânula traqueal, com o uso de uma seringa. O volume recuperado foi centrifugado a 1000 rpm, a 5°C, por 10 minutos, e média de recuperação foi de 80%. O botão celular foi ressuspendido em 200 μ L de salina. A contagem total de células foi realizado por microscopia ótica com o hemocitômetro de *Neubauer* (400x).

Figura 8. Câmara de Neubauer

Para a contagem diferencial, 100 μ L do LBA foram citocentrifugados a 450 rpm por 6 minutos e após seca a lâmina foi corada pela técnica de *Diff-Quick*. A contagem diferencial das células foi determinada a partir do achado de 300 leucócitos/lâmina e a diferenciação seguiu os critérios hemocitológicos para diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos com o auxílio de um microscópio ótico com objetiva de imersão (1000X).

3.8 Descarte de carcaças

As carcaças dos animais foram colocadas em sacos de lixo branco, próprios para descarte de material biológico, e identificadas com etiqueta padrão. As carcaças foram condicionadas no freezer (-20°C) até a equipe de limpeza técnica hospitalar coletasse os resíduos e transportasse para o abrigo de resíduos, onde receberam o devido tratamento e descartados, após a emissão (pelo veterinário responsável) do laudo e documento de movimentação.

3.9 Estudo Histopatológico

Imediatamente após o processamento do LBA, os animais foram sacrificados por exsanguinação, à caixa torácica foi aberta e o sistema cardiopulmonar foi retirado em bloco. Os pulmões foram fixados com formalina tamponada 4% a uma pressão constante de 20 cmH₂O por 48 h para homogeneizar a distensão do parênquima pulmonar. Os pulmões foram guardados em formalina 10% por até 36 horas, e em seguida foram cortados no seu maior eixo, e também cortados no eixo transversal, onde é possível

amostrar de melhor forma a árvore respiratória, para o posterior processamento histológico de rotina.

3.9.1 Colorações

As lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina, Resorcina-fucsina (para análise de fibras elásticas), Picrossírius (para a análise de fibras colágenas) e também foram preparadas sem corantes para a realização posterior de imuno-histoquímica.

Para as colorações de imunohistoquímica as lâminas dos pulmões foram desparafinizadas e hidratadas e a técnica utilizada foi a biotina-estreptavidina peroxidase. Após a hidratação, foi realizada a recuperação antigênica, através da proteinase K que por 20 minutos a 37°C, seguida de descanso de 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, as lâminas foram lavadas com PBS. Seguiu-se com o bloqueio da peroxidase endógena que foi realizado com água oxigenada (H₂O₂) 10V 3% (3 x 10 minutos), seguidos de incubação com anticorpos primários, os quais foram aplicados sobre os cortes relativos ao experimento e também aos controles (positivo e negativo) de tecido, e as lâminas foram incubadas “overnight”.

Utilizaremos os seguintes anticorpos para as marcações específicas:

- 1. Macrófagos:** anti-Mac2 de camundongos, 1:60000 (Cedarlane Lab, Ontário, Canadá);
- 2. Neutrófilos:** anti-neutrófilos de camundongos, 1:400 (AbD serotec, Kidlington, Reino Unido);

3. **MMP9:** anti MMP9 de camundongos, 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA);
4. **MMP12:** anti MMP12 de camundongos, 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA);
5. **TIMP1:** anti-TIMP1, 1:400 (LabVision, NeoMarkers, Califórnia, EUA);
6. **iNOS:** anti iNOS 1:500 (LabVision, NeoMarkers, Califórnia EUA);
7. **eNOS:** anti eNOS 1:100 (LabVision, NeoMarkers, Califórnia, EUA);
8. **TNF α :** anti TNF α (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA);
9. **Isoprostano-8 PGF2 α :** anti 8-Isoprostano, 1:10000 (Oxford Biomedical Research, Oxford, Reino Unido);
10. **MUC5ac:** anti-MUC-5, 1:400 (LabVision, NeoMarkers, Califórnia, EUA).

Depois da incubação com anticorpo primário, procedeu-se a incubação com anticorpo secundário, as lâminas foram lavadas em PBS incubadas pelo ABCKit Vectastain (Vector Elite- PK-6105 (*anti-goat*) / PK-6101 (*anti-rabbit*)). As lâminas foram lavadas em PBS e reveladas pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co, Saint Louis, Missouri, EUA). Após a revelação, as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com *Hematoxilina de Harris* (Merck, etc). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia *Entellan* (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.9.2 Análise Morfométrica

A análise morfométrica foi realizada com um microscópio óptico e com auxílio de um retículo de retas e pontos, com 50 retas e 100 pontos, com área conhecida ($62500 \mu\text{m}^2$ no aumento de 400x) usando a técnica de contagem de pontos (120, 121).

Para a realização da contagem referentes ao septos alveolares, o retículo foi sobreposto ao parênquima pulmonar nas regiões mais periféricas. Foi contado o número de pontos que incidiam nas células positivas sobre o número de pontos que incidiam nos septos alveolares para cada campo escolhido. Foram avaliados 20 campos por animal no aumento de 400x. Para a contagem referente as vias aéreas, foram selecionadas de 3 a 5 vias aéreas de tamanhos equivalentes. O retículo foi posicionado adjacente a parede da via aérea, a partir da base do epitélio. Foi contado o número de pontos que incidiam nas células positivas sobre o número de pontos que incidiam na parede das vias aéreas para cada campo escolhido. Foram avaliados 3 campos por via aérea no aumento de 400x. Esta medida foi usada para quantificar as células positivas para macrófagos, neutrófilos, $\text{TNF}\alpha$, MMP-9, MMP-12, TIMP-1, iNOS, eNOS e MUC5ac.

A análise da fração de volume das fibras colágenas, elásticas e de isoprostano também foi realizada com o auxílio do microscópio e do retículo. Foi contado o número de pontos que incidiam nas áreas positivas sobre o número de pontos totais que incidiam nos septos alveolares ou na parede das vias aéreas para cada campo escolhido. Analisamos 20 campos para análise

dos septos alveolares e de 3 a 5 campos para análise das vias aéreas. Os resultados foram expressos em % de área positiva (fração de volume).

Figura 9. Posicionamento do reticulo nos septos alveolares para a realização da técnica de contagem de pontos

Figura 10. Posicionamento do reticulo na parede da via aérea para a realização da técnica de contagem de pontos.

3.9.3 Análise do diâmetro alveolar médio (Lm)

Para o cálculo do diâmetro alveolar médio, determinamos inicialmente a área de parênquima pulmonar, excluindo vasos e vias aéreas. Estabelecemos sobre a área de parênquima pulmonar um retículo com 50 retas e contamos as intersecções das retas na parede alveolar. Deste modo, calculamos o diâmetro alveolar médio pela relação entre a área do parênquima pulmonar e o número de intersecções das retas e o parênquima pulmonar. Realizamos este procedimento para regiões próximas à pleura e regiões próximas à pequenas vias aéreas e contamos 20 campos por lâmina.

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa *SigmaStat* (SPSS Inc, Chicago, IL). As comparações múltiplas foram feitas por *One Way Anova*. Para as comparações entre os grupos foi utilizado o teste de *Holm-Sidak*. Os dados foram apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão. Os gráficos foram feitos na forma de barra e erro. Foi considerado significativo um $p < 0,05$

4. RESULTADOS

4.1 Elastância do sistema respiratório (Ers)

Na Figura 11 observamos os valores de elastância do sistema respiratório dos animais dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento na Ers dos animais que receberam elastase quando comparados aos controles (SAL: $36,99 \pm 3,4$ cmH₂O.mL.⁻¹; ELA: $51,17 \pm 5,8$ cmH₂O.mL.⁻¹.s; SALBC: $36,07 \pm 1,6$ cmH₂O.mL.⁻¹) Os animais que receberam o inibidor de proteinase e elastase intratraqueal apresentaram uma redução a níveis basais (ELABC: $37,08 \pm 1,6$ cmH₂O.mL.⁻¹) em relação ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 11. Média e erro padrão dos valores de elastância do sistema respiratório de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

4.2 Resistência do Sistema Respiratório (Rrs)

Na Figura 12 observamos os valores de resistência do sistema respiratório (Rrs) dos quatro grupos experimentais. Observamos uma redução da Rrs nos animais que receberam o inibidor (SALBC: $0,79 \pm 0,1$ cmH₂O/mL.⁻¹.s; ELABC: $0,76 \pm 0,1$ cmH₂O/mL.⁻¹.s) quando comparados aos grupos controles (SAL: $1,16 \pm 0,1$ cmH₂O/mL.⁻¹.s; ELA: $0,95 \pm 0,1$ cmH₂O/mL.⁻¹.s, $p < 0,05$).

Figura 12. Média e erro padrão dos valores de resistência do sistema respiratório de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e ELA.

4.3 Resistência de Vias Aéreas (Raw)

Na Figura 13 observamos os valores de resistência de vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo de Raw nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $0,35 \pm 0,1$ cmH₂O/mL/s; ELA: $0,63 \pm 0,1$ cmH₂O/mL/s; SALBC: $0,32 \pm 0,1$ cmH₂O/mL/s). Houve atenuação significativa no grupo que recebeu elastase intratraqueal e foi tratado com o inibidor (ELABC: $0,27 \pm 0,1$ cmH₂O/mL/s) comparativamente ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 13. Média e erro padrão dos valores de resistência de vias aéreas de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

4.4 Resistência de Tecido Pulmonar (Gtis)

Na Figura 14 observamos os valores de resistência de tecido pulmonar (Gtis) dos quatro grupos experimentais. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. (SAL: $7,50 \pm 0,3 \text{ cmH}_2\text{O/mL/s}^{(1-\alpha)}$; ELA: $7,39 \pm 0,9 \text{ cmH}_2\text{O/mL/s}^{(1-\alpha)}$; SALBC: $7,46 \pm 0,5 \text{ cmH}_2\text{O/mL/s}^{(1-\alpha) \cdot -1}$; ELABC: $7,67 \pm 0,5 \text{ cmH}_2\text{O/mL/s}^{(1-\alpha) \cdot -1}$).

Figura 14. Média e erro padrão dos valores de resistência de tecido pulmonar de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl.

4.5 Elastância de Tecidos (Htis)

Na Figura 15 observamos os valores de elastância de tecido pulmonar dos quatro grupos experimentais. Os animais que receberam apenas elastase apresentaram um aumento nos valores do Htis (ELA: $67,59 \pm 12,6$ cmH₂O/mL/s^(1-α);) comparativamente aos controles (SAL: $39,50 \pm 3,1$ cmH₂O/mL/s^(1-α); SALBC: $38,86 \pm 2,5$ cmH₂O/mL/s^(1-α), $p < 0,05$). Houve atenuação do Htis no grupo que recebeu elastase intratraqueal e foi tratado com BbCl (ELABC: $39,47 \pm 1,7$ cmH₂O/mL/s^(1-α)) comparativamente ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 15. Média e erro padrão dos valores de elastância de tecido pulmonar de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

4.6 Intercepto Linear Médio (Lm)

Na Figura 16 observamos os valores do intercepto linear médio dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo de Lm nos animais do grupo elastase quando comparado aos grupos que receberam salina (SAL: $45,91 \pm 1,8 \mu\text{m}$; ELA: $69,01 \pm 2,7 \mu\text{m}$; SALBC: $48,50 \pm 2,8 \mu\text{m}$, $p < 0,05$). Houve atenuação significativa do grupo tratado com BbCI que recebeu elastase (ELABC: $58,2 \pm 2,7 \mu\text{m}$, $p < 0,05$) intratraqueal comparativamente aos animais do grupo ELA.

Figura 16. Média e erro padrão dos valores de intercepto linear médio dos animais que receberam somente salina e elastase, e também os animais que receberam salina e elastase e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCI. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos; ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.7 Óxido Nítrico Exalado

Na Figura 17 observamos os valores do óxido nítrico exalado dos animais que receberam BbCl. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (SAL: $45,95 \pm 5,2$ ppb; ELA: $58,46 \pm 4,0$ ppb; SALBC: $53,42 \pm 5,4$ ppb; ELABC: $58,54 \pm 6,3$ ppb).

Figura 17. Média e erro padrão dos valores de óxido nítrico exalado de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl.

4.8 Lavado Broncoalveolar: Células Totais

Na Figura 18 observamos os valores do número total de células no lavado broncoalveolar (LBA) dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo no número total de células nos animais dos grupos que receberam elastase (ELA: $1,48 \pm 0,2 \cdot 10^4$ células/mL; ELABC: $1,17 \pm 0,1 \cdot 10^4$ células/mL) quando comparados aos controles (SAL: $0,79 \pm 0,1 \cdot 10^4$ células/mL; SALBC: $0,60 \pm 0,1 \cdot 10^4$ células/mL; $p < 0,05$). O tratamento com o BbCl nos animais que receberam elastase (ELABC) atenuou este aumento comparativamente ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 18. Média e erro padrão dos valores de macrófagos no LBA de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos; ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.9 Lavado Broncoalveolar: Macrófagos

Na Figura 19 observamos os valores do número de macrófagos no lavado broncoalveolar (LBA) dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo de macrófagos nos animais dos grupos que receberam elastase (ELA: $1,48 \pm 0,2 \cdot 10^4$ células/mL; ELABC: $1,38 \pm 0,2 \cdot 10^4$ células/mL) quando comparados aos controles (SAL: $0,63 \pm 0,01 \cdot 10^4$ células/mL; SALBC: $0,60 \pm 0,1 \cdot 10^4$ células/mL, * $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos ELA e ELABC.

Figura 19. Média e erro padrão dos valores de macrófagos no LBA de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.10 Lavado Broncoalveolar: Neutrófilos

Na Figura 20 observamos os valores do número de neutrófilos no lavado dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo de neutrófilos nos animais do grupo que recebeu elastase (ELA: $0,87 \pm 0,3 \cdot 10^4$ células/mL) quando comparados aos controles (SAL: $0,00 \pm 0,0 \cdot 10^4$ células/mL; SALBC: $0,11 \pm 0,0 \cdot 10^4$ células/mL, $*p < 0,05$). Houve atenuação no grupo ELABC (ELABC: $0,00 \pm 0,0 \cdot 10^4$ células/mL) em relação ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 20. Média e erro padrão dos valores de neutrófilos no LBA de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. $*p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

4.11 Lavado Broncoalveolar: Linfócitos

Na Figura 21 observamos os valores do número de linfócitos no lavado broncoalveolar (LBA) dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo de linfócitos nos animais dos grupos que receberam elastase (ELA: $0,05 \pm 0,0 \cdot 10^4$ células/mL; ELABC: $0,05 \pm 0,0 \cdot 10^4$ células/mL) quando comparados aos controles (SAL: $0,00 \pm 0,0 \cdot 10^4$ células/mL; SALBC: $0,02 \pm 0,0 \cdot 10^4$ células/mL, $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos ELA e ELABC.

Figura 21. Média e erro padrão dos valores de neutrófilos no LBA de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.12 Macrófagos nos septos alveolares

Na Figura 22 observamos os valores referentes ao número de macrófagos (células positivas para MAC-2) nos septos alveolares dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo do número de macrófagos nos animais do grupo elastase (ELA: $17,50 \pm 2,3$ células/ $10^4 \mu^2$; ELABC: $9,48 \pm 1,1$ células/ $10^4 \mu^2$) quando comparado aos demais grupos salina (SAL: $3,55 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu^2$; SALBC: $5,0 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu^2$, $p < 0,05$). O tratamento com o inibidor nos animais que receberam elastase atenuou essa resposta comparativamente aos animais do grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 22. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de macrófagos positivos no septo alveolares de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos; ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.13 Neutrófilos nos septos alveolares

Na Figura 23 observamos os valores referentes ao número de neutrófilos nos septos alveolares dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo no número de neutrófilos nos animais dos grupos elastase (ELA: $20,03 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELABC: $13,01 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado aos grupos salina (SAL: $5,87 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $9,33 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). O tratamento com o inibidor nos animais que receberam elastase atenuou esta resposta em relação ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 23. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de neutrófilos positivos no septo alveolar de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos; ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.14 Neutrófilos na vias aéreas

Na Figura 24 observamos os valores referentes ao número de neutrófilos nas paredes das vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo no número de neutrófilos nos animais dos grupos elastase (ELA: $11,36 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELABC: $6,23 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado aos grupos salina (SAL: $2,77 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $5,03 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). O tratamento com o inibidor nos animais que receberam elastase atenuou esta resposta em relação ao grupo ELA ($p < 0,001$).

Figura 24. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de neutrófilos positivos nas vias aéreas de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos; ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.15 Células TNF α positivas nos septos alveolares

Na Figura 25 observamos os valores referentes ao número de células TNF α positivas nos septos alveolares dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo das células TNF α positivas nos animais do grupo elastase (ELA: $13,17 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado aos demais grupos (SAL: $3,33 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $3,04 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). O tratamento com o inibidor nos animais que receberam elastase (ELABC: $8,89 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou esta resposta comparativamente ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 25. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de células TNF α positivas no septo alveolar de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos; ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.16 Células TNF α positivas nas vias aéreas

Na Figura 26 observamos os valores referentes ao número de células TNF α positivas nas paredes das vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo das células TNF α positivas nos animais do grupo elastase (ELA: $10,62 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado aos demais grupos (SAL: $2,58 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $2,92 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $p < 0,001$). O tratamento com o inibidor nos animais que receberam elastase (ELABC: $5,27 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou esta resposta comparativamente ao grupo ELA ($**p < 0,001$).

Figura 26. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de células TNF α positivas nas vias aéreas de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos; ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.17 Fibras Elásticas nos septos alveolares

Na Figura 27 observamos a fração de volume de fibras elásticas no parênquima dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo dos animais que receberam apenas elastase quando comparados aos controles (SAL: $0,32 \pm 0,03$ %; ELA: $0,43 \pm 0,03$ %; SALBC: $0,37 \pm 0,02$ %) nos animais que foram tratados com o inibidor de proteinase e que receberam elastase intratraqueal houve uma atenuação significativa do conteúdo de fibras elásticas (ELABC: $0,34 \pm 0,02$ %) em relação ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 27. Média e erro padrão dos valores referentes a fração de volume de fibras elásticas dos animais que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

4.18 Fibras Elásticas nas Vias Aéreas

Na Figura 28 observamos os valores da fração de volume de fibras elásticas nas paredes das vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo nos animais dos grupos elastase (ELA: $2,23 \pm 0,5\%$;) quando comparado aos grupos controle (SAL: $0,81 \pm 0,06\%$; SALBC: $1,08 \pm 0,02\%$, ELABC: $1,12 \pm 0,4\%$, $p < 0,05$). Houve atenuação no grupo ELABC em relação ao grupo ELA.

Figura 28. Média e erro padrão dos valores referentes fração de volume de fibras elásticas nas vias aéreas de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

4.19 Fibras Colágenas nos septos alveolares

Na Figura 29 observamos os valores da fração de volume de fibras colágenas nos septos alveolares dos animais que receberam o inibidor. Observamos um aumento significativo nos animais dos grupo elastase (ELA: $12,12 \pm 0,13\%$) quando comparado ao grupo salina (SAL: $8,80 \pm 0,13\%$; SALBC: $8,96 \pm 0,1\%$, $p < 0,05$ comparado aos animais dos grupos que receberam elastase). O tratamento com o inibidor de proteinase atenuou esta redução (ELABC: $9,98 \pm 0,15\%$) $p < 0,05$ comparativamente ao grupo ELA.

Figura 29. Média e erro padrão dos valores referentes fração de volume de fibras colágenas dos animais que receberam somente salina e elastase, e também os animais que receberam salina e elastase e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos; ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.20 Fibras Colágenas nas vias aéreas

Na Figura 30 observamos os valores da fração de volume de fibras colágenas nas paredes das vias aéreas dos animais que receberam o inibidor. Observamos um aumento significativo nos animais do grupo elastase (ELA: $8,83 \pm 0,1$ %, $p < 0,05$) quando comparado aos grupos controle (SAL: $5,55 \pm 0,1$ %; SALBC: $5,61 \pm 0,08$ %; ELABC: $6,02 \pm 0,2$ %). Houve redução no grupo ELABC comparativamente ao grupo ELA.

Figura 30. Média e erro padrão dos valores referentes fração de volume de fibras colágenas dos animais que receberam somente salina e elastase, e também os animais que receberam salina e elastase e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

4.21 Células MMP-9 positivas nos septos alveolares

Na Figura 31 observamos os valores referentes ao número de células MMP-9 positivas para nos septos alveolares dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo das células MMP-9 positivas nos animais do grupo elastase (ELA: $20,69 \pm 1,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $*p < 0,05$) quando comparado aos grupos que receberam salina (SAL: $8,63 \pm 1,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $9,89 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $*p < 0,05$). O tratamento com o inibidor, nos animais que receberam elastase (ELABC: $11,92 \pm 0,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), atenuou essa resposta comparativamente ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 31. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de células MMP-9 positivas no septo alveolar de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. $*p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

4.22 Células MMP-9 positivas nas vias aéreas

Na Figura 32 observamos os valores referentes ao número de células MMP-9 positivas nas paredes das vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo das células MMP-9 positivas nos animais do grupo elastase (ELA: $12,82 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$) quando comparado aos grupos que receberam salina (SAL: $2,07 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $4,63 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$). O tratamento com o inibidor, nos animais que receberam elastase (ELABC: $65,59 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), atenuou essa resposta comparativamente ao grupo ELA ($p < 0,001$).

Figura 32. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de células MMP-9 positivas no septo alveolar de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos; ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.23 Células MMP-12 positivas nos septos alveolares

Na Figura 33 observamos os valores referentes ao número de células MMP-12 positivas para nos septos alveolares dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo de células MMP-12 positivas nos animais do grupo elastase (ELA: $26,17 \pm 2,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$) quando comparado aos grupos que receberam salina (SAL: $10,88 \pm 1,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $11,22 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$). O tratamento com o inibidor nos animais que receberam elastase (ELABC: $12,20 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou esta resposta comparativamente ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 33. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de células MMP-12 positivas no septo alveolar de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCI. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

4.24 Células MMP-12 positivas nas vias aéreas

Na Figura 34 observamos os valores referentes ao número de células MMP-12 positivas nas paredes das vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo de células MMP-12 positivas nos animais do grupo elastase (ELA: $13,69 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$) quando comparado aos grupos que receberam salina (SAL: $3,14 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $4,13 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$). O tratamento com o inibidor, nos animais que receberam elastase (ELABC: $8,50 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), atenuou essa resposta comparativamente ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 34. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de células MMP-12 positivas nas vias aéreas de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos; ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.25 Células TIMP-1 positivas nos septos alveolares

Na Figura 35 observamos os valores referentes ao número de células TIMP-1 positivas nos septos alveolares dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo das células TIMP-1 positivas nos animais dos grupos elastase (ELA: $10,41 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELABC: $10,01 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado aos grupos que receberam salina (SAL: $2,21 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $2,41 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos ELA e ELABC.

Figura 35. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de células TIMP-1 positivas no septo alveolar de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.26 Células TIMP-1 positivas nas vias aéreas

Na Figura 36 observamos os valores referentes ao número de células TIMP-1 positivas nas vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo das células TIMP-1 positivas nos animais dos grupos elastase (ELA: $8,69 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELABC: $8,08 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado aos grupos que receberam salina (SAL: $2,96 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $2,85 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos ELA e ELABC.

Figura 36. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de células TIMP-1 positivas nas vias aéreas de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.27 Células iNOS positivas nos septos alveolares

Na Figura 37 observamos os valores referentes a número de células iNOS positivas nos septos alveolares dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo das células iNOS positivas nos animais do grupo elastase (ELA: $20,55 \pm 1,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado aos animais dos grupos salina (SAL: $5,51 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $6,03 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). O tratamento com o inibidor nos animais com elastase (ELABC: $12,97 \pm 1,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou essa resposta comparativamente ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 37. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de células iNOS positivas no septo alveolar de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos; ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.28 Células iNOS positivas nas vias aéreas

Na Figura 38 observamos os valores referentes ao número de células iNOS positivas nas paredes das vias aéreas quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo das células iNOS positivas nos animais do grupo elastase (ELA: $20,42 \pm 1,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado aos animais dos grupos salina (SAL: $5,35 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $6,24 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). O tratamento com o inibidor nos animais com elastase (ELABC: $12,78 \pm 1,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou essa resposta comparativamente ao grupo ELA ($p < 0,001$).

Figura 38. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de células iNOS positivas nas vias aéreas de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos; ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.29 Células eNOS positivas nos septos alveolares

Na Figura 39 observamos os valores referentes ao número de células eNOS positivas nos septos alveolares dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo das células eNOS positivas nos animais dos grupos elastase (ELA: $8,93 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELABC: $8,13 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado aos grupos que receberam salina (SAL: $3,06 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $3,58 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos ELA e ELABC.

Figura 39. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de células eNOS positivas no septo alveolar de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.30 Células eNOS positivas nas vias aéreas

Na Figura 40 observamos os valores referentes ao número de células eNOS positivas nas paredes das vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo das células eNOS positivas nos animais dos grupos elastase (ELA: $8,86 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELABC: $7,96 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado aos grupos que receberam salina (SAL: $3,20 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $3,80 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos ELA e ELABC.

Figura 40. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de células eNOS positivas nas vias aéreas de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.31 Expressão de 8-iso-PGF2 α nos septos alveolares

Na Figura 41 observamos a fração de volume de 8-iso-PGF2 α nos septos alveolares dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo nos animais do grupo elastase (ELA: 16,52 $\pm$ 0,6 células/10⁴ μ m²) quando comparado aos grupos salina (SAL: 6,17 $\pm$ 0,6 células/10⁴ μ m²; SALBC: 6,74 $\pm$ 0,3 células/10⁴ μ m², p<0,05). O tratamento com o inibidor nos animais que receberam elastase (ELABC: 11,07 $\pm$ 1,1 células/10⁴ μ m²) atenuou esta resposta em relação ao grupo ELA (p<0,05).

Figura 41. Média e erro padrão dos valores referentes fração de volume de 8-iso-PGF2 α positivas no septo alveolar de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. *p<0,05 comparativamente aos demais grupos; **p<0,05 comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.32 Expressão de 8-iso-PGF2 α nas vias aéreas

Na Figura 42 observamos a fração de volume de 8-iso-PGF2 α nas vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo nos animais do grupo elastase (ELA: 15,36 $\pm$ 1,9 células/10⁴ μ m²) quando comparado aos grupos salina (SAL: 5,91 $\pm$ 0,8 células/10⁴ μ m²; SALBC: 7,65 $\pm$ 0,5 células/10⁴ μ m², p<0,05). O tratamento com o inibidor nos animais que receberam elastase (ELABC: 15,30 $\pm$ 1,2 células/10⁴ μ m²), atenuou esta resposta em relação ao grupo ELA (p<0,05).

Figura 42. Média e erro padrão dos valores referentes fração de volume de 8-iso-PGF2 α positivas nas vias aéreas de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. **p<0,05 comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.33 Células MUC5ac positivas nas vias aéreas

Na Figura 43 observamos os valores referentes a número de células MUC5ac positivas nas paredes das vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Observamos um aumento significativo nas células MUC5ac nos animais do grupo elastase (ELA: $10,92 \pm 0,43$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado aos grupos que receberam salina (SAL: $2,06 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SALBC: $1,62 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). O tratamento com o inibidor nos animais que receberam elastase (ELABC: $5,11 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou esta resposta comparativamente aos animais ELA ($p < 0,001$).

Figura 43. Média e erro padrão dos valores referentes ao número de células MUC5ac positivas nas vias aéreas de camundongos que receberam somente salina (SAL) e elastase (ELA), e também os animais que receberam salina (SALBC) e elastase (ELABC) e foram tratados com o inibidor de proteinase BbCl. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos; ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SALBC.

4.34 Fotomicrografias

Figura 44. Fotomicrografias representativas de macrófagos nos septos alveolares.

Figura 45. Fotomicrografias representativas de neutrófilos nos septos alveolares.

Figura 46. Fotomicrografias representativas de neutrófilos nas paredes das vias aéreas..

Figura 47. Fotomicrografias representativas de células TNF α positivas nos septos alveolares.

Figura 48. Fotomicrografias representativas de células TNF α positivas nas paredes das vias aéreas.

Figura 49. Fotomicrografias representativas da fração de volume de fibras elásticas nos septos alveolares.

Figura 50. Fotomicrografias representativas da fração de volume de fibras elásticas nas paredes das vias aéreas.

Figura 51. Fotomicrografias representativas da fração de volume de fibras colágenas nos septos alveolares.

Figura 52. Fotomicrografias representativas da fração de volume de fibras colágenas nas paredes das vias aéreas.

Figura 53. Fotomicrografias representativas de células MMP-9 positivas nos septos alveolares.

Figura 54. Fotomicrografias representativas de células MMP-9 positivas nas paredes das vias aéreas.

Figura 55. Fotomicrografias representativas de células MMP-12 positivas nos septos alveolares.

Figura 56. Fotomicrografias representativas de células MMP-12 positivas nas paredes das vias aéreas.

Figura 57. Fotomicrografias representativas de células TIMP-1 positivas nas paredes das vias aéreas.

Figura 58. Fotomicrografias representativas de células iNOS positivas nos septos alveolares.

Figura 59. Fotomicrografias representativas de células iNOS positivas nas paredes das vias aéreas.

Figura 60. Fotomicrografias representativas de células eNOS positivas nos septos alveolares.

Figura 61. Fotomicrografias representativas de células eNOS positivas nas paredes das vias aéreas.

Figura 62. Fotomicrografias representativas da fração de volume de 8-iso-PGF2α nos septos alveolares.

Figura 63. Fotomicrografias representativas da fração de volume de 8-iso-PGF2 α nas paredes das vias aéreas.

Figura 64. Fotomicrografias representativas de células MUC5ac positivas nas paredes das vias aéreas.

5. DISCUSSÃO

Foi observado no presente trabalho, nos animais que foram induzidos ao enfisema pela elastase intratraqueal, um aumento nos parâmetros funcionais relativos às alterações da mecânica pulmonar de parênquima (Ers e Htis) e vias aéreas (Raw), além do intercepto alveolar médio. Notamos também um aumento nas células do lavado broncoalveolar (células totais, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos) e em macrófagos, neutrófilos e em células que expressam $TNF\alpha$ no parênquima pulmonar. Analisando as vias aéreas, observamos um aumento no número de neutrófilos e de células que expressam $TNF\alpha$. Em relação ao remodelamento pulmonar, observamos um aumento de fibras colágenas e elásticas além das células que expressam MMP-9, MMP-12 e TIMP-1 tanto no parênquima quanto nas vias aéreas. Considerando a avaliação do estresse oxidativo, observamos um aumento das células que expressam iNOS, eNOS e da fração de volume da expressão de isoprostano tanto na via aérea quanto nos septos alveolares. Além disto, avaliando as vias aéreas, observamos um aumento no número de células positivas para MUC5ac. Desta forma, consideramos que o atual modelo utilizado foi adequado para avaliar os efeitos de estratégias terapêuticas para a doença pulmonar obstrutiva crônica, uma vez que há alterações funcionais e histopatológicas semelhantes às encontradas em humanos.

Os animais que foram induzidos ao enfisema e receberam o tratamento com o inibidor de proteinase BbCl apresentaram uma redução nos parâmetros funcionais relativos às alterações da mecânica pulmonar de parênquima (Ers e Htis) e vias aéreas (Raw). O tratamento com BbCl também reduziu significativamente a destruição do tecido pulmonar medido pelo Lm. Em relação a resposta inflamatória, o inibidor de proteinase reduziu o número de

células no lavado broncoalveolar (células totais, macrófagos e neutrófilos) além de também reduzir o número de macrófagos, neutrófilos e células que expressam TNF- α no parênquima pulmonar e nas vias aéreas. Em relação à resposta de remodelamento pulmonar, o tratamento com BbCI diminuiu a fração de volume de fibras colágenas e elásticas e o número de células que expressam MMP-9 e MMP-12 tanto nos septos alveolares quanto na parede das vias aéreas. Já em relação à resposta de estresse oxidativo, o inibidor BbCI reduziu o número de células que expressam iNOS no parênquima pulmonar e nas vias aéreas, além de diminuir a fração de volume da expressão de isoprostano nos septos alveolares. Observamos também que o tratamento com BbCI diminuiu significativamente o número de células positivas MUC5ac na parede das vias aéreas. Assim, consideramos que o tratamento com o inibidor de proteinase BbCI mostrou-se eficiente em reduzir algumas alterações de mecânica pulmonar, de resposta inflamatória, de remodelamento pulmonar e de estresse oxidativo.

O papel das proteinases na fisiopatologia do enfisema é vastamente aceito. Porém ainda é foco de discussão quais seriam as principais células e quais as proteinases com funções importantes no desenvolvimento e na progressão do enfisema. Alguns autores sugerem que as proteinases das classes serino, cisteíno e metalo, são provavelmente as substâncias mais envolvidas na patogênese da DPOC (45-47).

O presente estudo mostrou que, em relação à elastância do sistema respiratório (Ers) observamos aumento nos animais que receberam elastase. Estes dados são corroborados pelos resultados obtidos nos valores de elastância (Htis) de tecido, que mantiveram o mesmo padrão de resposta.

Estes resultados demonstraram que este modelo alterou funcionalmente não apenas os septos alveolares, como também as vias aéreas distais, o que era o objetivo do modelo experimental, visto que os modelos experimentais tem como objetivo mimetizar a doença em humanos.

Os resultados de resistência de sistema respiratório (Rrs), mostraram que o tratamento com o inibidor de proteinase BbCI reduziu os valores de Rrs. Estes resultados demonstram uma ação broncodilatadora do BbCI, e que este efeito deve ser investigado em patologias que poderiam ser beneficiadas deste efeito, como a asma. Quando observamos somente a resistência da vias aéreas (Raw), notamos que os animais que receberam elastase apresentaram um aumento no Raw, e que o tratamento com o inibidor de proteinase atenuou este aumento.

Vários são os parâmetros funcionais avaliados nos estudos de modelos animais que receberam elastase (34). Neste sentido, Tibboel et.al. (2010), avaliaram a função pulmonar de camundongos que receberam elastase intranasal e mostraram um aumento na frequência respiratória e no volume corrente. Estes animais também mostraram uma diminuição na elastância de tecido e um alargamento dos espaços alveolares (122).

Hantos et al. (2008), avaliando a mecânica pulmonar de camundongos que receberam elastase intranasal (0,01 mg), mostraram um aumento no volume e uma diminuição na elastância de tecido do pulmão. Este estudo não mostrou alterações na resistência de vias aéreas e nem na resistência de tecidos. Estes autores, diferentemente dos outros, concluíram que a destruição tecidual não está associada à disfunção pulmonar (95).

Ito et al. (2004) avaliaram a mecânica pulmonar de camundongos que receberam elastase intranasal (0,016 mg) e mostraram uma diminuição da elastância do sistema respiratório. Os autores também sugerem que o remodelamento anormal de fibras colágenas, tem um papel importante na função pulmonar e nas forças mecânicas que determinam o enfisema (96).

Por outro lado, Scuri et. al. (2000), demonstraram que a elastase leva ao aumento de produção de bradicinina, que aumenta a elastância e resistência pulmonar ou seja, causando broncoconstrição. Entretanto, o tratamento com um antagonista de histamina não reverteu esta resposta, porém o antagonista do receptor β_2 de bradicinina bloqueou a resposta, confirmando o envolvimento do sistema calicreína-cinina neste processo (123).

Considerando os resultados do intercepto linear médio (Lm), que avalia o alargamento dos alvéolos, observamos que o modelo experimental utilizado foi efetivo em aumentar os espaços alveolares. Notamos que o inibidor de proteinase BbCl atenuou a destruição do parênquima pulmonar dos camundongos que receberam elastase, visto ter ocorrido uma redução do Lm em relação aos animais que receberam elastase e não foram tratados.

Embora a utilização do Lm não seja unânime para avaliar o diâmetro do alvéolo, pois não é uma medida direta, a utilização desta medida continua sendo amplamente utilizada pela comunidade científica (124).

Em relação ao encontrado na literatura, Guarnieri et al. (2010), utilizando um inibidor de elastase ligado ao Trifluoro (0,036 mg), usado em testes clínicos com fragmentos de aminoácidos de surfactante humano, mostraram que esta estratégia terapêutica preveniu o aumento das áreas de alargamento dos alvéolos dos camundongos com enfisema induzido por elastase (114).

Shapiro et al. (2003) utilizaram camundongos geneticamente modificados que não produziam elastase de neutrófilos e os expôs ao cigarro. Este estudo mostrou que os animais que não produziam elastase apresentaram uma redução da destruição tecidual (medida pelo Lm) em torno de 59% em relação aos animais sem alteração genética (40).

Com relação a avaliação da resposta inflamatória, observamos nas análises imunohistoquímica realizadas em nossos experimentos que, o enfisema induzido pela elastase aumentou o número de macrófagos positivos no septo alveolar. Os animais tratados com o inibidor de proteinase, que também receberam elastase, apresentaram uma redução quando comparados aos animais que não foram tratados com o BbCl. Estes dados corroboram os nossos resultado prévios, obtidos nas leituras de lavado broncoalveolar que demonstraram o mesmo padrão de resposta. Quando analisamos o número de neutrófilos no septo alveolar, observamos que nos animais que receberam elastase e foram tratados com o inibidor BbCl, houve uma redução quando comparados aos animais que receberam apenas elastase, porém esta redução não foi suficiente para alcançar o nível dos animais que receberam salina. Estes resultados diferem um pouco dos resultados que observamos nas leituras de lavado broncoalveolar. Em relação ao número de neutrófilos no lavado broncoalveolar, o efeito do tratamento com o inibidor mostrou-se mais efetivo do que os resultados obtidos por morfometria no septo alveolar. Além disto, observamos, nos septos alveolares, uma redução de células TNF α positivas, nos animais que receberam elastase e foram tratados com o inibidor.

A resposta inflamatória foi avaliada pela técnica do lavado broncoalveolar, que é uma das maneiras mais eficiente e comum de acessar a

inflamação pulmonar presente no septo alveolar (125). Esses achados, provavelmente, devem-se ao papel de elastase de neutrófilos sobre o deslocamento de leucócitos para o local da inflamação.

Com relação aos trabalhos prévios com este inibidor, Oliveira et. al. (2010) mostraram que o tratamento prévio com o BbCI efetivamente reduziu a migração de neutrófilos para a cavidade pleural, após inflamação induzida por carragenina. Os autores também mostraram que BbCI diminuiu o número de rolamento, leucócitos aderidos e migrados na microcirculação fásica espermiática, após a indução de uma resposta inflamatória (126).

Neuhof et al. (2003), em um modelo de edema pulmonar causado pela ativação de neutrófilos, mostraram que o inibidor de protease BbCI diminuiu do edema no mesmo grau que a substância utilizada como referência. Os autores concluem que BbCI é uma ferramenta útil para estudar o papel de elastase de neutrófilos em processos fisiopatológicos (108).

Com relação a outros inibidores de protease, Suzuki et. al. (2009) avaliaram o efeito do curcumim no enfisema induzido pela elastase (5 UI intratraqueal com auxílio de um microspray). Os autores observaram que o curcumim, que é uma raiz da família do gengibre, reduziu significativamente o número total de células, de macrófagos e de neutrófilos no lavado broncoalveolar em camundongos com enfisema induzido pela elastase (127).

Toledo et al. (2012) analisando o efeito terapêutico de um flavonóide em um modelo experimental de asma em camundongos, observaram que o tratamento com o flavonóide sakuranetin diminui a hiperresponsividade brônquica induzida pela metacolina, reduzindo os valores de resistência e

elastância do sistema respiratório, além de reduzir a resposta inflamatória (128).

O remodelamento tem início com a infiltração tecidual de células inflamatórias que podem envolver tanto o recrutamento de células maduras da corrente sanguínea quanto proliferação dos progenitores na submucosa e no septo alveolar. A sobrevivência destas células é influenciada em grande parte pelo microambiente dentro da parede das vias aéreas. As células danificadas são removidas por apoptose que tende a limitar a lesão inflamatória e promover resolução da inflamação (129). Entretanto, ao mesmo tempo, como citado anteriormente, estas células também podem persistir e promover a manutenção do infiltrado inflamatório, bem como induzir mudanças permanentes nas vias aéreas e nos septos alveolares. Estes processos de lesão e reconstituição podem ocorrer tanto nas vias aéreas proximais quanto no parênquima pulmonar (130).

Em relação ao remodelamento pulmonar, avaliamos o efeito do inibidor nessa resposta em vias aéreas e septos alveolares analisando a fração de volume de fibras colágenas, elásticas, além de células que expressam MMP-9, MMP-12. Observamos um aumento na fração de volume de fibras elásticas e colágenas nos septos alveolares nos animais que receberam elastase e o tratamento com o inibidor reverteu esta alteração. Consideramos que o inibidor de proteinase (BbCI) teve um efeito eficaz no bloqueio da elastase de neutrofílica e, conseqüentemente, na quebra de fibras elásticas situadas no parênquima pulmonar, como previamente demonstrado em outro estudo (105).

Hanaoka et. al. (2011) em um modelo animal de enfisema pulmonar, que utilizava extrato de cigarro, e tratavam estes animais com carbonocisteína

observaram um aumento na expressão da MMP-9, no tecido pulmonar. Os animais tratados com a carbonocisteína demonstraram uma redução significativa na expressão da MMP-9 quando comparados aos animais não tratados (15).

Observamos um aumento da expressão de MMP-12 no grupo que foi induzido ao enfisema, e o tratamento com o inibidor de proteinase BbCI bloqueou este aumento. Shapiro et. al. (2003) utilizando um modelo de enfisema induzido por cigarro em camundongos geneticamente sem MMP-12, mostraram que a MMP-12 têm um papel importante mediando a degradação de proteínas no pulmão (40).

Deslee et. al. (2009) mostraram que houve um aumento na expressão de elastina, porém não houve alteração no conteúdo de fibras elásticas (131). Além disso, é importante também considerar que outras ferramentas, como a microscopia eletrônica, poderiam ainda ser incorporadas para avaliar as alterações no colágeno e fibras elásticas conteúdo de uma maneira aprofundada do que a microscopia óptica.

Os níveis aumentados de MMP-9 levam a um aumento de seu inibidor TIMP-1 pois o organismo tenta reparar o dano e devolver a homeostase (132). O excesso de TIMP-1 em indivíduos com altos níveis de MMP-9 pode interferir no tráfego celular, no reparo tecidual e também pode ajudar a aumentar a deposição de matriz extracelular e fibrose agindo na inibição da MMP-9. Neste estudo, o modelo de indução de enfisema proporcionou um aumento nos níveis de TIMP-1, porém o inibidor de proteinase de origem vegetal BbCI não alterou estes níveis.

Com relação a resposta de estresse oxidativo, nossos resultados mostraram que o inibidor de proteinase de origem vegetal BbCI, apresenta um efeito antioxidante, visto que diminuiu a área marcada como positiva para o isoprostano PGF2a nos animais que receberam a elastase intranasal e foram tratados com o BbCI. Além disto, observamos nos septos alveolares uma redução das células iNOS positivas nos animais que receberam elastase e foram tratados com o inibidor.

As células inflamatórias e as células do epitélio respiratório após a exposição ao estresse oxidativo, geram superóxidos (O_2^-). Por intermédio da ativação da nicotaminada adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) oxidase são formadas altas quantidades de NO por aumento da expressão de iNOS. Portanto, na presença de radicais livres de oxigênio o NO reage com o superóxido levando a uma maior produção de peroxidonitrito ($ONOO^-$) (133).

O contato de agentes oxidantes com a membrana celular leva à peroxidação lipídica da membrana celular, responsável pela formação de uma série de compostos bioativos análogos às prostaglandinas, conhecidos como isoprostanos (134).

Os isoprostanos possuem uma potente atividade biológica e são responsáveis pela mediação de certos aspectos da lesão oxidativa (135). Os isoprostanos são produzidos via peroxidação do ácido araquidônico, em uma reação catalisada por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (136). Estes componentes são úteis biomarcadores para o estresse oxidativo, estando os isoprostanos aumentados nos níveis séricos, urina, ar exalado e fluido do lavado broncoalveolar (66).

A via de formação dos isoprostanos tem capacidade para produzir 64 estruturas isoméricas, das quais o 8-iso-PGF₂ α é o melhor caracterizado (136). O 8-iso-PGF₂ α é um isômero de PGF₂ α com efeitos contráteis por intermédio de ligação a receptores tromboxane A₂ no músculo liso das vias aéreas (137). Este agente causa aumento da resistência pulmonar, indicando que o 8-iso-PGF₂ α na via do estresse oxidativo pode ser um dos mediadores da limitação ao fluxo aéreo, embora outros mediadores também exerçam esta função (138).

Em nossos resultados observamos que os animais induzidos ao enfisema apresentaram um aumento de iNOS, e os animais que foram tratados com inibidor de proteinase BbCl mostraram uma atenuação deste aumento. Já em relação aos resultados de eNOS, nossos resultados mostram que o modelo de indução de enfisema pela instilação da elastase aumenta os níveis de eNOS quando comparados aos controles. Porém o tratamento com o inibidor de proteinase, BbCl, não alterou esta condição.

Em um estudo avaliando o efeito do cigarro na hipertensão pulmonar em camundongos geneticamente modificados eNOS^{-/-}, os autores associam que o dano vascular está relacionado com as espécies reativas de oxigênio e que a iNOS não aparenta ter um papel maior neste dano (139).

Por fim, observamos um aumento do número de células positivas para MUC5ac nas vias aéreas dos animais que receberam elastase, o que sugere uma alteração mais tardia no desenvolvimento da doença. Porém os animais que receberam tratamento com o inibidor de proteinase BbCl apresentaram uma atenuação desta resposta sugerindo uma ação do inibidor de proteinase neste processo.

A produção de muco na DPOC é um importante fator na fisiopatologia da doença e ainda não existem tratamentos específicos para este sintoma. A ativação de neutrófilos tem um papel importante na produção de muco dependente do receptor do fator de crescimento do epitélio (EGFR) pois: estimula a produção de TNF α pelas células do epitélio; libera espécies reativas de oxigênio (ROS), que ativam a EGFR; além de causar uma desgranulação potente das células caliciformes (140, 141).

Liu et. al. (2013) avaliando a secreção de MUC5ac induzido por uma proteinase trypsin-like de via aérea de humanos (HAT) via receptor protease-ativado 2 (PAR2), observaram que tanto o HAT quanto o PAR2 aumentam a exocitose da proteína MUC5ac. Eles concluíram que o PAR2 pode representar um novo alvo terapêutico para a hipersecreção de muco na DPOC (142).

Os resultados obtidos sugerem que o inibidor de proteinase vegetal BbCI pode diminuir a resposta inflamatória, modular a resposta de remodelamento e de estresse oxidativo neste modelo experimental. O tratamento com o inibidor também modula a resistência e a elastância do sistema respiratório. Estes efeitos sugerem que o BbCI pode ser considerado um potencial agente terapêutico para o tratamento da DPOC.

6. CONCLUSÕES

O modelo experimental de lesão pulmonar induzido pela elastase administrado via intratraqueal foi efetivo em alterar septos alveolares e vias aéreas provocando alterações nos parâmetros funcionais avaliados pela mecânica pulmonar, aumentando o número de células inflamatórias, induzindo o remodelamento de matriz extracelular e contribuindo para o aumento da resposta de estresse oxidativo.

O tratamento com o inibidor de proteinase de origem vegetal BbCl, atenuou as alterações induzidas pelo modelo experimental de lesão pulmonar induzido pela elastase intratraqueal nos seguintes parâmetros: mecânica pulmonar, no número de células inflamatórias, no remodelamento de matriz extracelular e no estresse oxidativo tanto no parênquima quanto em vias aéreas.

O inibidor de proteinase de proteinase BbCl, mostrou-se efetivo no tratamento da lesão pulmonar induzida pela elastase e, apesar de mais estudos serem necessários, pode ser considerado como um potencial instrumento terapêutico para o tratamento da DPOC.

7. REFERÊNCIAS

1. Viegi G, Pistelli F, Sherrill DL, Maio S, Baldacci S, Carrozzi L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur Respir J*. 2007 Nov;30(5):993-1013. PubMed PMID: 17978157. Epub 2007/11/06. eng.
2. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003 Oct;22(4):672-88. PubMed PMID: 14582923. Epub 2003/10/30. eng.
3. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Apr;163(5):1256-76. PubMed PMID: 11316667. Epub 2001/04/24. eng.
4. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet*. 2007 Sep 1;370(9589):741-50. PubMed PMID: 17765523.
5. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2006 Sep;28(3):523-32. PubMed PMID: 16611654. Epub 2006/04/14. eng.
6. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J*. 2006 Feb;27(2):397-412. PubMed PMID: 16452599.
7. Society ER. European Lung White Book. Huddersfield, editor2003.
8. Institute NHLaB. Morbidity and mortality chartbook on cardiovascular, lung and blood diseases. In: Services UDoHaH, editor. Bethesda, Maryland: National Institute of Health; 2009.
9. Menezes AMB, Jardim JR, Prez-Padilla R, Camelier A, Rosa F, Nascimento O, et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO study in São Paulo, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2005;21(5):1565-73.

10. Menezes AM, Perez-Padilla R, Jardim JR, Muino A, Lopez MV, Valdivia G, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*. 2005 Nov 26;366(9500):1875-81. PubMed PMID: 16310554. Epub 2005/11/29. eng.
11. Menezes A, Macedo SC, Gigante DP, da Costa JD, Olinto MT, Fiss E, et al. Prevalence and risk factors for chronic obstructive pulmonary disease according to symptoms and spirometry. *COPD*. 2004;1(2):173-9. PubMed PMID: 17136985. Epub 2006/12/02. eng.
12. Jensen HH, Godtfredsen NS, Lange P, Vestbo J. Potential misclassification of causes of death from COPD. *Eur Respir J*. 2006 Oct;28(4):781-5. PubMed PMID: 16807258.
13. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine*. 2006 Nov;3(11):e442. PubMed PMID: 17132052. Pubmed Central PMCID: 1664601.
14. Behrendt CE. Mild and moderate-to-severe COPD in nonsmokers: distinct demographic profiles. *Chest*. 2005 Sep;128(3):1239-44. PubMed PMID: 16162712.
15. Celli BR, Halbert RJ, Nordyke RJ, Schau B. Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *The American journal of medicine*. 2005 Dec;118(12):1364-72. PubMed PMID: 16378780.
16. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, et al. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Sep 1;182(5):693-718. PubMed PMID: 20802169.
17. Lamprecht B, McBurnie MA, Vollmer WM, Gudmundsson G, Welte T, Nizankowska-Mogilnicka E, et al. COPD in never smokers: results from the population-based burden of obstructive lung disease study. *Chest*. 2011 Apr;139(4):752-63. PubMed PMID: 20884729. Pubmed Central PMCID: 3168866.

18. Executive Summary: Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, (2013).
19. Hunninghake GM, Cho MH, Tesfaigzi Y, Soto-Quiros ME, Avila L, Lasky-Su J, et al. MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. *N Engl J Med*. 2009 Dec 31;361(27):2599-608. PubMed PMID: 20018959. Pubmed Central PMCID: 2904064.
20. Prescott E, Lange P, Vestbo J. Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from the Copenhagen City Heart Study. *Eur Respir J*. 1999 May;13(5):1109-14. PubMed PMID: 10414412.
21. Prescott E, Vestbo J. Socioeconomic status and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1999 Aug;54(8):737-41. PubMed PMID: 10413728. Pubmed Central PMCID: 1745556.
22. Kohansal R, Martinez-Camblor P, Agusti A, Buist AS, Mannino DM, Soriano JB. The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Jul 1;180(1):3-10. PubMed PMID: 19342411.
23. Raad D, Gaddam S, Schunemann HJ, Irani J, Abou Jaoude P, Honeine R, et al. Effects of water-pipe smoking on lung function: a systematic review and meta-analysis. *Chest*. 2011 Apr;139(4):764-74. PubMed PMID: 20671057.
24. Tan WC, Lo C, Jong A, Xing L, Fitzgerald MJ, Vollmer WM, et al. Marijuana and chronic obstructive lung disease: a population-based study. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2009 Apr 14;180(8):814-20. PubMed PMID: 19364790. Pubmed Central PMCID: 2665947.
25. Eisner MD, Balmes J, Katz PP, Trupin L, Yelin EH, Blanc PD. Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Environmental health : a global access science source*. 2005;4(1):7. PubMed PMID: 15890079. Pubmed Central PMCID: 1145187.
26. Tager IB, Ngo L, Hanrahan JP. Maternal smoking during pregnancy. Effects on lung function during the first 18 months of life. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Sep;152(3):977-83. PubMed PMID: 7663813.

27. Trupin L, Earnest G, San Pedro M, Balmes JR, Eisner MD, Yelin E, et al. The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003 Sep;22(3):462-9. PubMed PMID: 14516136.
28. Hnizdo E, Sullivan PA, Bang KM, Wagner G. Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: a study of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *American journal of epidemiology*. 2002 Oct 15;156(8):738-46. PubMed PMID: 12370162.
29. Balmes J, Becklake M, Blanc P, Henneberger P, Kreiss K, Mapp C, et al. American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Mar 1;167(5):787-97. PubMed PMID: 12598220.
30. Abbey DE, Burchette RJ, Knutsen SF, McDonnell WF, Lebowitz MD, Enright PL. Long-term particulate and other air pollutants and lung function in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Jul;158(1):289-98. PubMed PMID: 9655742.
31. Saetta M. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Nov;160(5 Pt 2):S17-20. PubMed PMID: 10556163. Epub 1999/11/11. eng.
32. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, et al. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Aug;160(2):711-7. PubMed PMID: 10430750. Epub 1999/08/03. eng.
33. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Ferraresso A, Drigo R, Potena A, et al. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Feb;147(2):301-6. PubMed PMID: 8430952. Epub 1993/02/01. eng.
34. Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J*. 2008 Jun;31(6):1334-56. PubMed PMID: 18515558. Epub 2008/06/03. eng.

35. Bosken CH, Hards J, Gatter K, Hogg JC. Characterization of the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Apr;145(4 Pt 1):911-7. PubMed PMID: 1554220. Epub 1992/04/01. eng.
36. Kuschner WG, D'Alessandro A, Wong H, Blanc PD. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Respir J*. 1996 Oct;9(10):1989-94. PubMed PMID: 8902455. Epub 1996/10/01. eng.
37. Thompson AB, Daughton D, Robbins RA, Ghafouri MA, Oehlerking M, Rennard SI. Intraluminal airway inflammation in chronic bronchitis. Characterization and correlation with clinical parameters. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Dec;140(6):1527-37. PubMed PMID: 2604284. Epub 1989/12/01. eng.
38. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, et al. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Oct;158(4):1277-85. PubMed PMID: 9769292. Epub 1998/10/14. eng.
39. Churg A, Zay K, Shay S, Xie C, Shapiro SD, Hendricks R, et al. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Sep;27(3):368-74. PubMed PMID: 12204900. Epub 2002/09/03. eng.
40. 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 Dec;163(6):2329-35. PubMed PMID: 14633606. Epub 2003/11/25. eng.
41. Di Stefano A, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Ruggieri MP, Roggeri A, et al. Airflow limitation in chronic bronchitis is associated with T-lymphocyte and macrophage infiltration of the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Feb;153(2):629-32. PubMed PMID: 8564109. Epub 1996/02/01. eng.
42. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004 Jun 24;350(26):2645-53. PubMed PMID: 15215480. Epub 2004/06/25. eng.

43. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Mar;155(3):852-7. PubMed PMID: 9117016. Epub 1997/03/01. eng.
44. van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, et al. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Apr 1;173(7):751-8. PubMed PMID: 16399994. Epub 2006/01/10. eng.
45. Churg A, Wright JL. Proteases and emphysema. *Curr Opin Pulm Med*. 2005 Mar;11(2):153-9. PubMed PMID: 15699789. Epub 2005/02/09. eng.
46. Owen CA. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2008;3(2):253-68. PubMed PMID: 18686734. Epub 2008/08/09. eng.
47. Shapiro SD. Proteolysis in the lung. *Eur Respir J Suppl*. 2003 Sep;44:30s-2s. PubMed PMID: 14582898. Epub 2003/10/30. eng.
48. Deshmukh HS, Case LM, Wesselkamper SC, Borchers MT, Martin LD, Shertzer HG, et al. Metalloproteinases mediate mucin 5AC expression by epidermal growth factor receptor activation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Feb 15;171(4):305-14. PubMed PMID: 15531749. Epub 2004/11/09. eng.
49. Owen CA, Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol*. 1999 Feb;65(2):137-50. PubMed PMID: 10088596. Epub 1999/03/24. eng.
50. Lapperre TS, Postma DS, Gosman MM, Snoeck-Stroband JB, ten Hacken NH, Hiemstra PS, et al. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. *Thorax*. 2006 Feb;61(2):115-21. PubMed PMID: 16055612. Epub 2005/08/02. eng.
51. Shapiro SD. Animal models for COPD. *Chest*. 2000 May;117(5 Suppl 1):223S-7S. PubMed PMID: 10843920. Epub 2000/06/10. eng.

52. Shapiro SD, Ingenito EP. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 May;32(5):367-72. PubMed PMID: 15837726. Epub 2005/04/20. eng.
53. Lee WL, Downey GP. Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Sep 1;164(5):896-904. PubMed PMID: 11549552. Epub 2001/09/11. eng.
54. Shapiro SD. Neutrophil elastase: path clearer, pathogen killer, or just pathologic? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Mar;26(3):266-8. PubMed PMID: 11867332. Epub 2002/02/28. eng.
55. Morrison HM, Welgus HG, Owen CA, Stockley RA, Campbell EJ. Interaction between leukocyte elastase and elastin: quantitative and catalytic analyses. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Mar 19;1430(2):179-90. PubMed PMID: 10082946. Epub 1999/03/20. eng.
56. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. *Handbook of proteolytic enzymes*: Academic Press; 2004.
57. Amalinei C, Caruntu ID, Giusca SE, Balan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2010;51(2):215-28. PubMed PMID: 20495735.
58. Johnson SR, Knox AJ. Synthetic functions of airway smooth muscle in asthma. *Trends in pharmacological sciences*. 1997 Aug;18(8):288-92. PubMed PMID: 9277132.
59. Ramnarine SI, Khawaja AM, Barnes PJ, Rogers DF. Nitric oxide inhibition of basal and neurogenic mucus secretion in ferret trachea in vitro. *Br J Pharmacol*. 1996 Jun;118(4):998-1002. PubMed PMID: 8799574. Pubmed Central PMCID: 1909519.
60. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 1990 Oct 25;347(6295):768-70. PubMed PMID: 1700301.

61. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jul 15;89(14):6348-52. PubMed PMID: 1378626. Pubmed Central PMCID: 49498.
62. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. *Advances in second messenger and phosphoprotein research*. 1993;28:97-9. PubMed PMID: 8398422.
63. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 Jun;43(2):109-42. PubMed PMID: 1852778.
64. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Arata V, Kasahara DI, Martins MA, Tiberio IF. Neurokinins and inflammatory cell iNOS expression in guinea pigs with chronic allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Apr;288(4):L741-8. PubMed PMID: 15579630.
65. Muijsers RB, Folkerts G, Henricks PA, Sadeghi-Hashjin G, Nijkamp FP. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life sciences*. 1997;60(21):1833-45. PubMed PMID: 9154993.
66. Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Jul;160(1):216-20. PubMed PMID: 10390403.
67. Mallat Z, Philip I, Lebreton M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation*. 1998 Apr 28;97(16):1536-9. PubMed PMID: 9593557.
68. Mehrabi MR, Serbecic N, Ekmekcioglu C, Tamaddon F, Ullrich R, Sinzinger H, et al. The isoprostane 8-epi-PGF(2alpha) is a valuable indicator of oxidative injury in human heart valves. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2001 Sep-Oct;10(5):241-5. PubMed PMID: 11673063.

69. Collins CE, Quaggiotto P, Wood L, O'Loughlin EV, Henry RL, Garg ML. Elevated plasma levels of F2 alpha isoprostane in cystic fibrosis. *Lipids*. 1999 Jun;34(6):551-6. PubMed PMID: 10405967.
70. Pratico D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F2alpha-III, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Dec;158(6):1709-14. PubMed PMID: 9847257.
71. Fromer L, Cooper CB. A review of the GOLD guidelines for the diagnosis and treatment of patients with COPD. *Int J Clin Pract*. 2008 Aug;62(8):1219-36. PubMed PMID: 18547365. Epub 2008/06/13. eng.
72. Lancaster T, Stead L, Silagy C, Sowden A. Effectiveness of interventions to help people stop smoking: findings from the Cochrane Library. *Bmj*. 2000 Aug 5;321(7257):355-8. PubMed PMID: 10926597. Pubmed Central PMCID: 1118332.
73. Fiore MC, Bailey WC, Cohen SJ. Smoking cessation: information for specialists. In: Services UDoHaH, editor.: Agency for health care policy and research and centers for disease control and prevention; 1996.
74. Group S. In chronic obstructive pulmonary disease, a combination of ipratropium and albuterol is more effective than either agent alone. An 85-day multicenter trial. COMBIVENT Inhalation Aerosol Study Group. *Chest*. 1994 May;105(5):1411-9. PubMed PMID: 8181328.
75. Sestini P, Cappiello V, Aliani M, Martucci P, Sena A, Vaghi A, et al. Prescription bias and factors associated with improper use of inhalers. *Journal of aerosol medicine : the official journal of the International Society for Aerosols in Medicine*. 2006 Summer;19(2):127-36. PubMed PMID: 16796537.
76. van Schayck CP, Folgering H, Harbers H, Maas KL, van Weel C. Effects of allergy and age on responses to salbutamol and ipratropium bromide in moderate asthma and chronic bronchitis. *Thorax*. 1991 May;46(5):355-9. PubMed PMID: 1829865. Pubmed Central PMCID: 463136.
77. Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, et al. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic

obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2007 Feb 22;356(8):775-89. PubMed PMID: 17314337.

78. Jones PW, Willits LR, Burge PS, Calverley PM, Inhaled Steroids in Obstructive Lung Disease in Europe study i. Disease severity and the effect of fluticasone propionate on chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Eur Respir J*. 2003 Jan;21(1):68-73. PubMed PMID: 12570111.

79. Mahler DA, Wire P, Horstman D, Chang CN, Yates J, Fischer T, et al. Effectiveness of fluticasone propionate and salmeterol combination delivered via the Diskus device in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Oct 15;166(8):1084-91. PubMed PMID: 12379552.

80. Drummond MB, Dasenbrook EC, Pitz MW, Murphy DJ, Fan E. Inhaled corticosteroids in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2008 Nov 26;300(20):2407-16. PubMed PMID: 19033591.

81. Szafranski W, Cukier A, Ramirez A, Menga G, Sansores R, Nahabedian S, et al. Efficacy and safety of budesonide/formoterol in the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003 Jan;21(1):74-81. PubMed PMID: 12570112.

82. Calverley PM, Rabe KF, Goehring UM, Kristiansen S, Fabbri LM, Martinez FJ, et al. Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet*. 2009 Aug 29;374(9691):685-94. PubMed PMID: 19716960.

83. Fabbri LM, Calverley PM, Izquierdo-Alonso JL, Bundschuh DS, Brose M, Martinez FJ, et al. Roflumilast in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease treated with longacting bronchodilators: two randomised clinical trials. *Lancet*. 2009 Aug 29;374(9691):695-703. PubMed PMID: 19716961.

84. Tashkin DP. Long-acting anticholinergic use in chronic obstructive pulmonary disease: efficacy and safety. *Curr Opin Pulm Med*. 2010 Mar;16(2):97-105. PubMed PMID: 20019615.

85. Barr RG, Bourbeau J, Camargo CA, Ram FS. Inhaled tiotropium for stable chronic obstructive pulmonary disease. The Cochrane database of systematic reviews. 2005 (2):CD002876. PubMed PMID: 15846642.
86. Vogelmeier C, Hederer B, Glaab T, Schmidt H, Rutten-van Molken MP, Beeh KM, et al. Tiotropium versus salmeterol for the prevention of exacerbations of COPD. *N Engl J Med*. 2011 Mar 24;364(12):1093-103. PubMed PMID: 21428765.
87. Niewoehner DE, Erbland ML, Deupree RH, Collins D, Gross NJ, Light RW, et al. Effect of systemic glucocorticoids on exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group. *N Engl J Med*. 1999 Jun 24;340(25):1941-7. PubMed PMID: 10379017.
88. Poole PJ, Black PN. Oral mucolytic drugs for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: systematic review. *Bmj*. 2001 May 26;322(7297):1271-4. PubMed PMID: 11375228. Pubmed Central PMCID: 31920.
89. Nici L, Donner C, Wouters E, Zuwallack R, Ambrosino N, Bourbeau J, et al. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement on pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Jun 15;173(12):1390-413. PubMed PMID: 16760357.
90. Ries AL, Bauldoff GS, Carlin BW, Casaburi R, Emery CF, Mahler DA, et al. Pulmonary Rehabilitation: Joint ACCP/AACVPR Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2007 May;131(5 Suppl):4S-42S. PubMed PMID: 17494825.
91. Stoller JK, Panos RJ, Krachman S, Doherty DE, Make B, Long-term Oxygen Treatment Trial Research G. Oxygen therapy for patients with COPD: current evidence and the long-term oxygen treatment trial. *Chest*. 2010 Jul;138(1):179-87. PubMed PMID: 20605816. Pubmed Central PMCID: 2897694.

-
92. Ramsey SD, Shroyer AL, Sullivan SD, Wood DE. Updated evaluation of the cost-effectiveness of lung volume reduction surgery. *Chest*. 2007 Mar;131(3):823-32. PubMed PMID: 17356099.
93. Craig VJ, Quintero PA, Fyfe SE, Patel AS, Knolle MD, Kobzik L, et al. Profibrotic activities for matrix metalloproteinase-8 during bleomycin-mediated lung injury. *J Immunol*. 2013 Apr 15;190(8):4283-96. PubMed PMID: 23487425. Pubmed Central PMCID: 3639121.
94. Antunes MA, Rocco PR. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. *An Acad Bras Cienc*. 2011 Dec;83(4):1385-96. PubMed PMID: 22159348.
95. Hantos Z, Adamicza A, Janosi TZ, Szabari MV, Tolnai J, Suki B. Lung volumes and respiratory mechanics in elastase-induced emphysema in mice. *J Appl Physiol*. 2008 Dec;105(6):1864-72. PubMed PMID: 18845778. Epub 2008/10/11. eng.
96. Ito S, Ingenito EP, Arold SP, Parameswaran H, Tgavalekos NT, Lutchen KR, et al. Tissue heterogeneity in the mouse lung: effects of elastase treatment. *J Appl Physiol*. 2004 Jul;97(1):204-12. PubMed PMID: 15020580. Epub 2004/03/17. eng.
97. Tsuyuki S, Tsuyuki J, Einsle K, Kopf M, Coyle AJ. Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness. *J Exp Med*. 1997 May 5;185(9):1671-9. PubMed PMID: 9151904. Epub 1997/05/05. eng.
98. Eyles JE, Williamson ED, Alpar HO. Immunological responses to nasal delivery of free and encapsulated tetanus toxoid: studies on the effect of vehicle volume. *Int J Pharm*. 1999 Oct 28;189(1):75-9. PubMed PMID: 10518687. Epub 1999/10/16. eng.
99. Plantier L, Marchand-Adam S, Antico VG, Boyer L, De Coster C, Marchal J, et al. Keratinocyte growth factor protects against elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Nov;293(5):L1230-9. PubMed PMID: 17766584. Epub 2007/09/04. eng.

100. Richardson N. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods Plant Biochem.* 1991;5:259-305.
101. Bode W, Huber R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Mar 7;1477(1-2):241-52. PubMed PMID: 10708861. Epub 2000/03/10. eng.
102. Owen CA. Leukocyte cell surface proteinases: regulation of expression, functions, and mechanisms of surface localization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(6-7):1246-72. PubMed PMID: 18329945. Epub 2008/03/11. eng.
103. Owen CA, Campbell MA, Sannes PL, Boukedes SS, Campbell EJ. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J Cell Biol.* 1995 Nov;131(3):775-89. PubMed PMID: 7593196. Epub 1995/11/01. eng.
104. Campbell EJ, Campbell MA, Owen CA. Bioactive proteinase 3 on the cell surface of human neutrophils: quantification, catalytic activity, and susceptibility to inhibition. *J Immunol.* 2000 Sep 15;165(6):3366-74. PubMed PMID: 10975855. Epub 2000/09/07. eng.
105. Oliva ML, Sampaio UM. Bauhinia Kunitz-type proteinase inhibitors: structural characteristics and biological properties. *Biol Chem.* 2008 Aug;389(8):1007-13. PubMed PMID: 18754727. Epub 2008/08/30. eng.
106. Oliva ML, Mendes CR, Santomauro-Vaz EM, Juliano MA, Mentele R, Auerswald EA, et al. Bauhinia bauhinioides plasma kallikrein inhibitor: interaction with synthetic peptides and fluorogenic peptide substrates related to the reactive site sequence. *Curr Med Chem.* 2001 Jul;8(8):977-84. PubMed PMID: 11375765. Epub 2001/05/29. eng.
107. Oliva ML, Souza-Pinto JC, Batista IF, Araujo MS, Silveira VF, Auerswald EA, et al. Leucaena leucocephala serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Mar 7;1477(1-2):64-74. PubMed PMID: 10708849. Epub 2000/03/10. eng.

108. Neuhof C, Oliva ML, Maybauer D, Maybauer M, de Oliveira C, Sampaio MU, et al. Effect of plant Kunitz inhibitors from *Bauhinia bauhinioides* and *Bauhinia rufa* on pulmonary edema caused by activated neutrophils. *Biol Chem*. 2003 Jun;384(6):939-44. PubMed PMID: 12887061. Epub 2003/07/31. eng.
109. Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Sep;5(9):785-99. PubMed PMID: 16955069. Epub 2006/09/07. eng.
110. Drag M, Salvesen GS. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Sep;9(9):690-701. PubMed PMID: 20811381. Epub 2010/09/03. eng.
111. Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev*. 2010 Dec;62(4):726-59. PubMed PMID: 21079042. Epub 2010/11/17. eng.
112. Selman M, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Ramirez R, Kudlacz EM, Mitchell PG, et al. Matrix metalloproteinases inhibition attenuates tobacco smoke-induced emphysema in Guinea pigs. *Chest*. 2003 May;123(5):1633-41. PubMed PMID: 12740284. Epub 2003/05/13. eng.
113. Wright JL, Farmer SG, Churg A. A neutrophil elastase inhibitor reduces cigarette smoke-induced remodelling of lung vessels. *Eur Respir J*. 2003 Jul;22(1):77-81. PubMed PMID: 12882454. Epub 2003/07/29. eng.
114. Guarnieri F, Spencer JL, Lucey EC, Nugent MA, Stone PJ. A human surfactant peptide-elastase inhibitor construct as a treatment for emphysema. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 8;107(23):10661-6. PubMed PMID: 20534582. Epub 2010/06/11. eng.
115. Luisetti M, Sturani C, Sella D, Madonini E, Galavotti V, Bruno G, et al. MR889, a neutrophil elastase inhibitor, in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Eur Respir J*. 1996 Jul;9(7):1482-6. PubMed PMID: 8836663. Epub 1996/07/01. eng.

116. Fujie K, Shinguh Y, Yamazaki A, Hatanaka H, Okamoto M, Okuhara M. Inhibition of elastase-induced acute inflammation and pulmonary emphysema in hamsters by a novel neutrophil elastase inhibitor FR901277. *Inflamm Res*. 1999 Mar;48(3):160-7. PubMed PMID: 10219659. Epub 1999/04/29. eng.
117. Dawkins PA, Stockley RA. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2001 Dec;56(12):972-7. PubMed PMID: 11713362. Epub 2001/11/20. eng.
118. Mendes CR. Caracterização de inibidores tipo Kunitz das sementes de Bauhinia Bauhinioides e sua ação sobre tripsina, calicreínas e elastase / Characterization of Kunitz inhibitors from Bauhinia bauhinioides seeds and its action on trypsin, kallikrein and elastase. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1998.
119. Oliveira C. Inibidores do tipo Kunitz das sementes Bauhinia Bauhinioides e Bauhinia Rufa: ação sobre elastase e catepsina G. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2000.
120. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1963 Feb;12:131-55. PubMed PMID: 13999512.
121. Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER, Structure AEJTFoQAoL. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Feb 15;181(4):394-418. PubMed PMID: 20130146.
122. Tibboel J, Post M. Characterization of elastase-induced emphysema in mice: Lung function. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181:A5065.
123. Scuri M, Forteza R, Lauredo I, Sabater JR, Botvinnikova Y, Allegra L, et al. Inhaled porcine pancreatic elastase causes bronchoconstriction via a bradykinin-mediated mechanism. *Journal of applied physiology*. 2000 Oct;89(4):1397-402. PubMed PMID: 11007574.

124. Mitzner W. Use of mean airspace chord length to assess emphysema. *J Appl Physiol*. 2008 Dec;105(6):1980-1. PubMed PMID: 18719230. Epub 2008/08/23. eng.
125. Churg A, Cosio M, Wright JL. Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Apr;294(4):L612-31. PubMed PMID: 18223159. Epub 2008/01/29. eng.
126. Oliveira C, Navarro-Xavier RA, Anjos-Vallota EA, Martins JO, Silveira VL, Goncalves LR, et al. Effect of plant neutrophil elastase inhibitor on leucocyte migration, adhesion and cytokine release in inflammatory conditions. *Br J Pharmacol*. 2010 Oct;161(4):899-910. PubMed PMID: 20860667. Epub 2010/09/24. eng.
127. Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Odajima N, Moriyama C, et al. Curcumin attenuates elastase- and cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Apr;296(4):L614-23. PubMed PMID: 19168576. Epub 2009/01/27. eng.
128. Toledo AC, Sakoda CP, Perini A, Pinheiro NM, Magalhaes RM, Grecco S, et al. Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Br J Pharmacol*. 2013 Apr;168(7):1736-49. PubMed PMID: 23170811. Pubmed Central PMCID: 3605879.
129. Vignola AM, Kips J, Bousquet J. Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000 Jun;105(6 Pt 1):1041-53. PubMed PMID: 10856134.
130. Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Jun;298(6):L715-31. PubMed PMID: 20363851. Pubmed Central PMCID: 2886606.
131. Deslee G, Woods JC, Moore CM, Liu L, Conradi SH, Milne M, et al. Elastin expression in very severe human COPD. *Eur Respir J*. 2009 Aug;34(2):324-31. PubMed PMID: 19357152. Epub 2009/04/10. eng.
132. Tang LF, Du LZ, Chen ZM, Zou CC. Levels of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in bronchoalveolar lavage cells of asthmatic children. *Fetal and pediatric pathology*. 2006 Jan-Feb;25(1):1-7. PubMed PMID: 16754484.

133. Squadrito GL, Pryor WA. Mapping the reaction of peroxynitrite with CO₂: energetics, reactive species, and biological implications. *Chemical research in toxicology*. 2002 Jul;15(7):885-95. PubMed PMID: 12118998.
134. Morrow JD, Scruggs J, Chen Y, Zackert WE, Roberts LJ, 2nd. Evidence that the E2-isoprostane, 15-E2t-isoprostane (8-iso-prostaglandin E2) is formed in vivo. *Journal of lipid research*. 1998 Aug;39(8):1589-93. PubMed PMID: 9717718.
135. Milne GL, Yin H, Morrow JD. Human biochemistry of the isoprostane pathway. *J Biol Chem*. 2008 Jun 6;283(23):15533-7. PubMed PMID: 18285331. Pubmed Central PMCID: 2414280.
136. Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem*. 1999 Aug 27;274(35):24441-4. PubMed PMID: 10455102.
137. Janssen LJ, Premji M, Lu-Chao H, Cox G, Keshavjee S. NO(+) but not NO radical relaxes airway smooth muscle via cGMP-independent release of internal Ca(2+). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 May;278(5):L899-905. PubMed PMID: 10781419.
138. Shiraki A, Kume H, Oguma T, Makino Y, Ito S, Shimokata K, et al. Role of Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ sensitization in 8-iso-PGF₂ α -induced contraction in airway smooth muscle. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009 Feb;39(2):236-45. PubMed PMID: 19134015.
139. Wright JL, Zhou S, Churg A. Pulmonary hypertension and vascular oxidative damage in cigarette smoke exposed eNOS(-/-) mice and human smokers. *Inhalation toxicology*. 2012 Sep;24(11):732-40. PubMed PMID: 22954397.
140. Kim S, Nadel JA. Role of neutrophils in mucus hypersecretion in COPD and implications for therapy. *Treatments in respiratory medicine*. 2004;3(3):147-59. PubMed PMID: 15219174.

141. Zhou J, Perelman JM, Kolosov VP, Zhou X. Neutrophil elastase induces MUC5AC secretion via protease-activated receptor 2. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013 May;377(1-2):75-85. PubMed PMID: 23392769.
142. Liu C, Li Q, Zhou X, Kolosov VP, Perelman JM. Human airway trypsin-like protease induces mucin5AC hypersecretion via a protease-activated receptor 2-mediated pathway in human airway epithelial cells. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2013 Jul 15;535(2):234-40. PubMed PMID: 23602830.
-