SILVIA FUKUZAKI

**Efeito preventivo e terapêutico do anti IL-17 em
modelo experimental de lesão pulmonar induzida
pela elastase em camundongos C57B16**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientadora: Profa. Dra. Iolanda de Fátima
Lopes Calvo Tibério

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Fukuzaki, Silvia

Efeito preventivo e terapêutico do anti IL-17 em
modelo experimental de lesão pulmonar induzida pela
elastase em camundongos C57Bl6 / Silvia Fukuzaki. --
São Paulo, 2019.

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

Programa de Ciências Médicas.Área de
Concentração: Processos Imunes e Infecciosos.

Orientadora: Iolanda de Fátima Lopes Calvo
Tibério.

Descritores: 1.Doença pulmonar obstrutiva crônica
2.Enfisema pulmonar 3.Interleucina-17 4.Elastase
pancreática 5.Remodelação de vias aéreas 6.Inflamação

USP/FM/DBD-062/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Renato (*in memoriam*) e Natsumi, que com esforço e dedicação me deram oportunidade de realizar muitos sonhos, e me ensinaram que o amor é a base de tudo.

Ao meu marido Ricardo e meus filhos Eduardo e Fernanda, pelo amor, compreensão e paciência que tiveram comigo durante a elaboração desse trabalho, e por serem meu estímulo para seguir em frente.

Amo muito vocês!!

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas,
que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos
caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o
tempo da travessia: e, se não ousamos fazê-la, teremos
ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Teixeira de Andrade

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Iolanda de Fátima L.C. Tibério, por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho, confiando, me ensinando e corrigindo, sempre com atenção e carinho. Não é à toa que é chamada de “mãe” pelos seus alunos.

Ao meu marido Ricardo, pelo amor, companheirismo e dedicação à essa família linda que formamos nesses 25 anos juntos.

Aos meus filhos Eduardo e Fernanda, melhor parte de mim. Amor infinito.

À amiga Luciana Aristóteles, por me apresentar à nossa orientadora, e me ajudar a iniciar num novo caminho.

Aos colegas que me auxiliaram muito, com bastante paciência, no decorrer desses anos, seja na prática ou na teoria, e que sem eles esse trabalho não seria concluído. Obrigada de coração, Renato Righetti, Tabata Maruyama, Leandro N. Camargo, Flavia Ribas e Edna Leick, pelos ensinamentos, pela companhia, pelas conversas.

Ao querido aluno Aurelio C. Garrido, pela grande colaboração na leitura das lâminas, e preparação e apresentação de pôsteres.

Aos colegas do laboratório que em várias ocasiões me “socorreram”:
Beatriz Saraiva-Romanholo, Fernanda Lopes, Tiyaiki Ito, Clarice Olivo, Sara Hamaguchi, Suellen Karoline, Fernanda Roncon, Rosana Reis e ao querido Davi, sempre disposto a fazer qualquer coisa!

Às colegas da imunohistoquímica, Esmeralda Eher e Sandra M. Fernezlían, pela grande ajuda no preparo das lâminas. Vocês foram essenciais!

Aos colegas do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, pela disponibilidade em trocar horários e plantões quando precisei. Agradecimento especial aos meus chefes/supervisores Carlos Alberto M. Costa, Sandra Vitti Santos e Eduardo Baptista de Almeida, por me ajudarem na escala mensal e de férias, tornando possível a realização desse trabalho. E às amigas Eliane Zacarias e Rosana Banzato, por todos esses anos de apoio profissional e pessoal mútuo.

Por fim, porém não menos importante, agradeço aos amigos que a vida me presenteou, e que sem ter qualquer ligação profissional ou acadêmica, foram fundamentais na elaboração e conclusão da minha dissertação. Ofereceram seu tempo, e isso não tem preço! Muito obrigada, Letícia F. Serpa, Mario Uehara e Giovanna Uehara!

Gratidão eterna a todos vocês!!

NORMALIZAÇÃO

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 Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Doença pulmonar obstrutiva crônica	2
1.1.1. Definição.....	2
1.1.1.1. Apresentação clínica.....	3
1.1.1.2. Fatores de risco	5
1.1.2. Epidemiologia	5
1.1.3. Fisiopatogênese	7
1.1.3.1. Resposta inflamatória	10
1.1.3.2. Remodelamento.....	17
1.1.3.3. Óxido nítrico e DPOC.....	20
1.1.3.4. Fator de transcrição NF-kb	23
2. JUSTIFICATIVAS PARA O ESTUDO.....	26
3. OBJETIVOS.....	29
4. MÉTODOS.....	32
4.1. Animais	33
4.2. Lesão pulmonar induzida pela elastase intra-traqueal	34
4.3. Grupos experimentais	35
4.4. Avaliação da mecânica pulmonar.....	37
4.5. Determinação do óxido nítrico exalado (NOex).....	39
4.6. Fluido do lavado broncoalveolar (FLBA)	40
4.7. Estudo histopatológico	41
4.8. Descarte de carcaças.....	41
4.9. Colorações	42

4.10. Estudo morfométrico	45
4.11. Medidas do intercepto linear médio (Lm)	46
4.12. Análise da fração de volume de fibras colágenas e elásticas	47
4.13. Análise estatística	48
5. RESULTADOS	50
5.1. Avaliação da mecânica pulmonar	51
5.1.1. Resistência do sistema respiratório (Rrs)	51
5.1.2. Elastância do sistema respiratório (Ers)	52
5.1.3. Resistência das vias aéreas (Raw)	53
5.1.4. Elastância do tecido pulmonar (Htis)	54
5.1.5. Resistência do parênquima pulmonar (Gtis)	55
5.2. Avaliação do óxido nítrico exalado (NOex)	57
5.3. Contagem de células do fluido do lavado bronco alveolar (FLBA)	58
5.4. Intercepto linear médio (Lm)	60
5.5. Efeitos do anti IL-17 sobre o fator de transcrição NF-kb em vias aéreas e septos alveolares	62
5.6. Efeitos do anti IL-17 na inflamação pulmonar	65
5.6.1. IL-17 em vias aéreas e septos alveolares	65
5.6.2. IL-1 β em vias aéreas e septos alveolares	68
5.6.3. IL-8 em vias aéreas e septos alveolares	71
5.6.4. TNF- α em vias aéreas e septos alveolares	74
5.6.5. Neutrófilos em vias aéreas e septos alveolares	77
5.7. Efeitos do anti IL-17 sobre o remodelamento da matriz extracelular em vias aéreas e septos alveolares	82
5.7.1. Fibras colágenas em vias aéreas e septos alveolares	82
5.7.2. Fibras elásticas em vias aéreas e septos alveolares	85
5.7.3. Fibronectina em vias aéreas e septos alveolares	88
5.7.4. Decorina em vias aéreas e septos alveolares	91
5.7.5. Lumican em vias aéreas e septos alveolares	94
5.7.6. Biglicano em vias aéreas e septos alveolares	97
5.7.7. MMP9 em vias aéreas e septos alveolares	100
5.7.8. MMP12 em vias aéreas e septos alveolares	103
5.7.9. TIMP-1 em vias aéreas e septos alveolares	106

5.7.10. TGF- β em vias aéreas e septos alveolares	109
5.8. Efeitos do anti IL-17 sobre o estresse oxidativo	114
5.8.1. iNOS em vias aéreas e septos alveolares	114
5.8.2. eNOS em vias aéreas e septos alveolares	117
5.8.3. Isoprostano 8-iso-PGF-2 α em vias aéreas e septos alveolares	120
6. DISCUSSÃO	125
7. CONCLUSÃO	137
8. REFERÊNCIAS	140

LISTA DE ABREVIATURAS

AATD	Deficiência de α -1 antitripsina
Anova	Análise de variância
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Célula dendrítica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CXCR2	Receptor de quimiocina inflamatória
DAB	Diabinobenzidina
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EGF	Fator de crescimento epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
Ers	Elastância do Sistema Respiratório
EUA	Estados Unidos da América
FLBA	Fluido do lavado broncoalveolar
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FPI	Fibrose pulmonar intersticial
Grupo EC	Animais que receberam elastase e solução salina
Grupo EP	Animais que receberam elastase e anti IL-17 preventivo
Grupo ET	Animais que receberam elastase e anti IL-17 terapêutico
Grupo SAL	Animais que receberam solução salina
Gtis	Resistência do parênquima pulmonar
H ₂ O ₂	Água oxigenada
Htis	Elastância do tecido pulmonar
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IP	Intra-peritoneal
IT	Intra-traqueal

Lm	Intercepto linear médio
LPA	Lesão pulmonar aguda
MCP1	Peptídeo quimiotático de monócitos
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
NF-kb	Fator de transcrição nuclear kappa b
NIH	National Institute of Health
NLS	Sinal de localização celular
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOex	Óxido nítrico exalado
NOS	Óxido nítrico sintase
ONOO	Peroxinitrito
PBS	Solução tampão salina
PPE	Elastase pancreática porcina
Raw	Resistência das vias aéreas
Rrs	Resistência do sistema respiratório
SARA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
TAD	Domínio de transativação
Tc17	Células CD8+ produtoras de IL-17
TFG- β	Fator de crescimento transformador β
Th	Células T helper
TIMP-1	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
Treg	Células T reguladoras
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
VEF ₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismos da inflamação na DPOC	16
Figura 2 -	Fisiopatogênese do estresse oxidativo no enfisema pulmonar	23
Figura 3 -	Foto da aplicação intra-peritoneal de solução salina	35
Figura 4 -	Cronograma do protocolo	36
Figura 5 -	Descrição do protocolo experimental	37
Figura 6 -	Aparelho de ventilação mecânica <i>FlexiVent</i>	39
Figura 7 -	Foto do 280 NOA – <i>Nitric Oxide Analyzer</i>	40
Figura 8 -	Foto do retículo utilizado para realização da técnica de contagem de pontos em vias aéreas e septos alveolares.....	46
Figura 9 -	Efeito do anti IL-17 no intercepto linear médio	61
Figura 10 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para NF-kb em vias aéreas	63
Figura 11 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para NF-kb nos septos alveolares	64
Figura 12 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para IL-17 em vias aéreas	66
Figura 13 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para IL-17 nos septos alveolares	67
Figura 14 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para IL-1 β em vias aéreas	69
Figura 15 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para IL-1 β nos septos alveolares	70
Figura 16 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para IL-8 em vias aéreas	72
Figura 17 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para IL-8 nos septos alveolares	73
Figura 18 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para TNF- α em vias aéreas	75
Figura 19 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para TNF- α nos septos alveolares	76
Figura 20 -	Fotomicrografias com a marcação de neutrófilos em vias aéreas	78

Figura 21 -	Fotomicrografias com a marcação de neutrófilos nos septos alveolares	79
Figura 22 -	Fotomicrografias com a fração de volume de fibras colágenas em vias aéreas	83
Figura 23 -	Fotomicrografias com a fração de volume de fibras colágenas nos septos alveolares	84
Figura 24 -	Fotomicrografias com a fração de volume de fibras elásticas em vias aéreas.....	86
Figura 25 -	Fotomicrografias com a fração de volume de fibras elásticas nos septos alveolares	87
Figura 26 -	Fotomicrografias com a fração de volume de fibronectina em vias aéreas.....	89
Figura 27 -	Fotomicrografias com a fração de volume de fibronectina nos septos alveolares	90
Figura 28 -	Fotomicrografias com a fração de volume de decorina em vias aéreas.....	92
Figura 29 -	Fotomicrografias com a fração de volume de decorina nos septos alveolares	93
Figura 30 -	Fotomicrografias com a fração de volume de lumican em vias aéreas.....	95
Figura 31 -	Fotomicrografias com a fração de volume de lumican nos septos alveolares	96
Figura 32 -	Fotomicrografias com a fração de volume de biglicano em vias aéreas.....	98
Figura 33 -	Fotomicrografias com a fração de volume de biglicano nos septos alveolares	99
Figura 34 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para MMP9 em vias aéreas	101
Figura 35 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para MMP9 nos septos alveolares	102
Figura 36 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para MMP12 em vias aéreas	104
Figura 37 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para MMP12 nos septos alveolares.....	105
Figura 38 -	Fotomicrografias com a marcação das células positivas para TIMP-1 em vias aéreas.....	107

Figura 39 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para TIMP-1 nos septos alveolares	108
Figura 40 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para TGF- β em vias aéreas	110
Figura 41 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para TGF- β nos septos alveolares.....	111
Figura 42 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para iNOS em vias aéreas.....	115
Figura 43 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para iNOS nos septos alveolares.....	116
Figura 44 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para eNOS em vias aéreas.....	118
Figura 45 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para eNOS nos septos alveolares	119
Figura 46 - Fotomicrografias com a fração de volume de isoprostano 8-iso-PGF-2 α em vias aéreas	121
Figura 47 - Fotomicrografias com a fração de volume de isoprostano 8-iso-PGF-2 α nos septos alveolares.....	122

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resistência do sistema respiratório (Rrs)	51
Gráfico 2 - Elastância do sistema respiratório (Ers).....	52
Gráfico 3 - Resistência das vias aéreas (Raw).....	53
Gráfico 4 - Elastância do tecido pulmonar (Htis)	54
Gráfico 5 - Resistência do parênquima pulmonar (Gtis).....	55
Gráfico 6 - Óxido nítrico exalado (NOex).....	57
Gráfico 7 - Fluido do lavado broncoalveolar (FLBA).....	59
Gráfico 8 - Macrófagos	59
Gráfico 9 - Neutrófilos.....	59
Gráfico 10 - Linfócitos.....	59
Gráfico 11 - Intercepto linear médio (Lm)	60
Gráfico 12 - NF-kb em vias aéreas	62
Gráfico 13 - NF-kb nos septos alveolares.....	64
Gráfico 14 - IL-17 em vias aéreas.....	65
Gráfico 15 - IL-17 nos septos alveolares	67
Gráfico 16 - IL-1 β em vias aéreas	68
Gráfico 17 - IL-1 β nos septos alveolares	70
Gráfico 18 - IL-8 em vias aéreas.....	71
Gráfico 19 - IL-8 nos septos alveolares	73
Gráfico 20 - TNF- α em vias aéreas	74
Gráfico 21 - TNF- α nos septos alveolares	76
Gráfico 22 - Neutrófilos em vias aéreas.....	77
Gráfico 23 - Neutrófilos nos septos alveolares	79
Gráfico 24 - Fibras colágenas em vias aéreas	82
Gráfico 25 - Fibras colágenas nos septos alveolares	84
Gráfico 26 - Fibras elásticas em vias aéreas.....	85
Gráfico 27 - Fibras elásticas nos septos alveolares.....	87
Gráfico 28 - Fibronectina em vias aéreas	88
Gráfico 29 - Fibronectina nos septos alveolares.....	90

Gráfico 30 - Decorina em vias aéreas	91
Gráfico 31 - Decorina nos septos alveolares	93
Gráfico 32 - Lumican em vias aéreas	94
Gráfico 33 - Lumican nos septos alveolares	96
Gráfico 34 - Biglicano em vias aéreas	97
Gráfico 35 - Biglicano nos septos alveolares	99
Gráfico 36 - MMP9 em vias aéreas	100
Gráfico 37 - MMP9 nos septos alveolares	102
Gráfico 38 - MMP12 em vias aéreas	103
Gráfico 39 - MMP12 nos septos alveolares	105
Gráfico 40 - TIMP-1 em vias aéreas	106
Gráfico 41 - TIMP-1 nos septos alveolares	108
Gráfico 42 - TGF- β em vias aéreas	109
Gráfico 43 - TGF- β nos septos alveolares	111
Gráfico 44 - iNOS em vias aéreas	114
Gráfico 45 - iNOS nos septos alveolares	116
Gráfico 46 - eNOS em vias aéreas	117
Gráfico 47 - eNOS nos septos alveolares	119
Gráfico 48 - Isoprostano 8-iso-PGF-2 α em vias aéreas	120
Gráfico 49 - Isoprostano 8-iso-PGF-2 α nos septos alveolares	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Anticorpos utilizados, diluições e marcas.....	44
Tabela 2 -	Efeitos do anti IL-17 na mecânica pulmonar	56
Tabela 3 -	Efeitos do anti IL-17 na inflamação pulmonar - vias aéreas....	80
Tabela 4 -	Efeitos do anti IL-17 na inflamação pulmonar - septos alveolares.....	81
Tabela 5 -	Efeitos do anti IL-17 sobre o remodelamento - vias aéreas..	112
Tabela 6 -	Efeitos do anti IL-17 sobre o remodelamento - septos alveolares.....	113
Tabela 7 -	Efeitos do anti IL-17 sobre o estresse oxidativo - vias aéreas.....	123
Tabela 8 -	Efeitos do anti IL-17 sobre o estresse oxidativo - septos alveolares.....	123
Tabela 9 -	Resultados dos marcadores no tratamento preventivo e terapêutico com anti IL-17.....	124

RESUMO

Fukuzaki S. *Efeito preventivo e terapêutico do anti IL-17 em modelo experimental de lesão pulmonar induzida pela elastase em camundongos C57Bl/6* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: As citocinas desenvolvem papel importante na fisiopatologia da DPOC. Estudos sugerem que a IL-17 modula respostas inflamatórias e infecciosas, podendo ser alvo para o tratamento da inflamação pulmonar.

Objetivos: Avaliar os efeitos preventivos e terapêuticos do anti IL-17 num modelo de lesão pulmonar induzida pela elastase em camundongos C57Bl/6.

Métodos: Foram utilizados 32 camundongos C57Bl/6, machos, com idade entre 6 e 8 semanas e peso médio de 20-28 gramas, divididos em 4 grupos: 1. GRUPO SAL: os animais receberam solução salina intra-peritoneal (IP) 3 horas antes de serem submetidos à instilação intra-traqueal (IT) de salina, e salina IP nos dias 25, 26, 27 e 28 pós instilação IT de salina; 2. GRUPO ELASTASE CONTROLE (EC): receberam salina IP 3 horas antes de receberem elastase IT, e salina IP nos dias 25, 26, 27 e 28 pós instilação de elastase; 3. GRUPO ELASTASE + ANTI IL-17 PREVENTIVO (EP): receberam anti IL-17 IP 3 horas antes de receberem elastase IT, e salina IP nos dias 25, 26, 27 e 28 pós instilação de elastase; 4. GRUPO ELASTASE + ANTI IL-17 TERAPÊUTICO (ET): receberam salina IP 3 horas antes de receberem elastase IT, e anti IL-17 IP nos dias 25, 26, 27 e 28 pós instilação de elastase. No 29º dia, os animais foram anestesiados, traqueostomizados, conectados ao aparelho *FlexiVent* (Scireq, Montreal, Canadá), e foram avaliados: resistência do sistema respiratório (Rrs), elastância do sistema respiratório (Ers), resistência de vias aéreas (Raw), resistência do parênquima pulmonar (Gtis), elastância do parênquima pulmonar (Htis), óxido nítrico exalado (NOex), e obtida a contagem das células totais do fluido do lavado broncoalveolar (FLBA). Depois, os animais foram exsanguinados, coração e pulmão foram retirados em bloco. Os pulmões foram fixados com formaldeído 4% a uma pressão constante de 20 cmH₂O, por 24 horas. Após esse período, os pulmões foram mantidos em álcool 70% por até 36 horas, e em seguida foram preparados para o processamento histológico para avaliação de MMP9, MMP12, TIMP-1, TGF- β , lumican, biglicano, decorina, fibronectina, iNOS, eNOS, isoprostano 8-iso-PGF-2 α , NF-Kb, IL-17, IL-1 β , IL-8, TNF- α , neutrófilos, e fibras colágenas e elásticas em vias aéreas e septos alveolares. Foi analisado também o intercepto linear médio (Lm). **Resultados:** Em relação aos parâmetros Rrs, Ers, Raw, Htis, NOex e número de células totais no FLBA houve aumento no grupo EC em comparação ao grupo SAL ($p < 0,05$). O tratamento preventivo e terapêutico com anti IL-17 diminuiu os valores de Rrs, Ers, Raw e Htis ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos em relação ao Gtis. Em

ambos os tratamentos houve redução do NOex comparados ao grupo EC ($p<0,05$). Quanto ao número de células totais no FLBA, houve redução no grupo ET em relação ao EC e EP ($p<0,05$), porém não houve diferença entre os grupos EC e EP. Ao realizar a contagem do diferencial de células do FLBA, houve redução apenas no número de macrófagos no grupo ET ($p<0,05$). O tratamento preventivo e terapêutico com anti IL-17 também diminuiu o número de células positivas para NF-kb, iNOS, MMP9, MMP12, TGF- β , isoprostano 8-iso-PGF-2 α , TNF- α , IL-8, IL-1 β e IL-17, e contagem de neutrófilos em vias aéreas e nos septos alveolares quando comparados do grupo EC ($p<0,05$), assim como a fração de volume de fibras colágenas, decorina e lumican em vias aéreas, e fibras elásticas e fibronectina no parênquima pulmonar ($p<0,05$). Houve aumento do intercepto linear médio no grupo EC comparado ao SAL, e o tratamento com anti IL-17 diminuiu esses valores nos grupos EP e ET ($p<0,05$). Houve redução de fibras colágenas em septos alveolares e biglicano em vias aéreas no grupo EP, e redução de células positivas para eNOS em vias aéreas somente no grupo ET em relação ao grupo EC ($p<0,05$). Não houve diferença entre os grupos EC, EP e ET nos resultados de TIMP-1, fibronectina em vias aéreas e lumican nos septos alveolares. **Conclusão:** O anticorpo monoclonal anti IL-17 neste modelo de tratamento, tanto administrado de forma preventiva (atuando no bloqueio imediato da ação da elastase) quanto de forma terapêutica (depois das alterações estabelecidas pelas lesões iniciais), contribuiu para melhora da maioria dos parâmetros funcionais avaliados na mecânica pulmonar, inflamação, remodelamento da matriz extracelular e a resposta ao estresse oxidativo nos septos alveolares e nas paredes das vias aéreas neste modelo de lesão pulmonar induzida pela elastase administrada por via intra-traqueal.

Descritores: Doença pulmonar obstrutiva crônica; Enfisema pulmonar; Interleucina-17; Elastase pancreática; Inflamação; Remodelação das Vias Aéreas.

SUMMARY

Fukuzaki S. *Preventive and therapeutic effect of anti IL-17 in experimental model of pulmonary lesion induced by elastase in C57Bl6 mice* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Introduction: Cytokines play an important role in the pathophysiology of COPD. Studies suggest that IL-17 modulates inflammatory and infectious responses and may be targeted for treatment of pulmonary inflammation.

Objectives: To evaluate preventive and therapeutic effects of antiIL-17 in a

model of lung injury induced by elastase in C57Bl6 mice. **Methods:** Thirty-

two male C57Bl6 mice, aged 6 to 8 weeks and mean weight of 20-28 grams,

were divided into 4 groups: 1. SAL GROUP: animals received intra-peritoneal

saline (IP) 3 hours before being submitted to intra tracheal (IT) instillation of

saline, and IP saline on days 25, 26, 27 and 28 after saline IT instillation; 2.

ELASTASE CONTROL (EC) GROUP: received IP saline 3 hours prior to IT

elastase, and IP saline on days 25, 26, 27 and 28 post elastase instillation; 3.

ELASTASE + PREVENTIVE ANTI IL-17 (EP) GROUP: received anti IL-17 IP

3 hours before receiving IT elastase, and IP saline on days 25, 26, 27 and 28

post elastase instillation; 4. ELASTASE + THERAPEUTIC ANTI IL-17 (ET)

GROUP: received IP saline 3 hours before receiving elastase IT, and anti IL-

17 IP on days 25, 26, 27 and 28 post elastase instillation. On 29th day, the

animals were anesthetized, tracheostomized, connected to *FlexiVent*

apparatus (*Scireq*, Montreal, Canada), and evaluated: respiratory system

resistance (Rrs), respiratory system elastance (Ers), airway resistance

(Raw), pulmonary parenchyma resistance (Gtis), pulmonary parenchyma

elastance (Htis), exhaled nitric oxide (NOex), and total bronchoalveolar

lavage fluid (FLBA) cell count. Afterwards, the animals were exsanguinated,

heart and lung were removed in block. The lungs were fixed with 4%

formaldehyde at a constant pressure of 20 cmH₂O for 24 hours, maintained

in 70% alcohol for up to 36 hours and then prepared for histological

processing for MMP9, MMP12, TIMP-1, TGF- β , lumican, biglycan, decorin,

fibronectin, iNOS, eNOS, isoprostane 8-iso-PGF-2 α , NF-kb, IL-17, IL-1 β , IL-

8, TNF- α , neutrophils, and collagen and elastic fibers in airways and alveolar

septa. The mean linear intercept (Lm) was also analyzed. **Results:** In

relation to the parameters Rrs, Ers, Raw, Htis, NOex and number of total

cells in FLBA, there was an increase in EC group compared to SAL group

($p < 0.05$). Preventive and therapeutic treatment with anti IL-17 decreased the

values of Rrs, Ers, Raw and Htis ($p < 0.05$). There was no difference between

groups regarding to Gtis. In both treatments there was NOex reduction

compared to EC group ($p < 0.05$). Regarding the number of total cells in

FLBA, there was reduction in ET group in relation to EC and EP ($p < 0.05$), but

there was no difference between EC and EP groups. When counting the

FLBA cell differential, there was reduction only in number of macrophages in

ET group ($p < 0.05$). Preventive and therapeutic treatment with anti IL-17 also decreased the number of positive cells for NF-kb, iNOS, MMP9, MMP12, TGF- β , isoprostane 8-iso-PGF-2 α , TNF- α , IL-8, IL-1 β and IL-17, and number of neutrophils, in airways and alveolar septa when compared to EC group ($p < 0.05$), as well as the volume fraction of collagen fibers, decorin and lumican in airways, and elastic fibers and fibronectin in alveolar septa ($p < 0.05$). There was increase in mean linear intercept in EC group compared to SAL, and treatment with anti IL-17 decreased the values of Lm in EP and ET groups ($p < 0.05$). There was reduction of collagen fibers in alveolar septa and biglycan in airways in EP group, and reduction of positive cells for eNOS in airways only in ET group in relation to EC group ($p < 0.05$). There was no difference between EC, EP and ET groups in results of TIMP-1, fibronectin in airways and lumican in alveolar septa. **Conclusion:** Anti IL-17 monoclonal antibody in this treatment model, both administered as a preventive way (acting on the immediate block of elastase action) and therapeutically (after changes established by the initial lesions), contributed to improvement of most functional parameters evaluated in pulmonary mechanics, inflammation, remodeling of extracellular matrix and response to oxidative stress in alveolar septa and airways in this model of lung injury induced by intratracheal elastase.

Keywords: Pulmonary disease, chronic obstructive; Pulmonary emphysema; Interleukin-17; Pancreatic elastase; Inflammation; Airway Remodeling

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1,1 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA

1.1.1 Definição

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma enfermidade respiratória prevenível e tratável. Caracteriza-se pela presença de obstrução crônica do fluxo aéreo, geralmente progressiva, e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas ou gases tóxicos, causada principalmente pelo tabagismo, provocando variadas alterações estruturais pulmonares, com importantes comorbidades que contribuem significativamente para a gravidade da doença ⁽¹⁾.

O processo inflamatório crônico pode produzir alterações nas vias aéreas (bronquite) e no parênquima pulmonar (enfisema). Indivíduos diagnosticados como portadores de DPOC comumente apresentam associações em proporções variáveis de bronquite crônica e enfisema pulmonar. A definição da predominância de uma ou de outra é extremamente variável e difícil de quantificar *in vivo*.

A bronquite crônica é caracterizada pela presença de tosse produtiva com duração de pelo menos 3 meses, por 2 anos consecutivos, não necessariamente associada a limitação ao fluxo aéreo ⁽²⁾.

O enfisema pulmonar é um distúrbio caracterizado por destruição das estruturas pulmonares, e é definido anatomicamente como um alargamento

anormal e permanente dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, acompanhado de destruição das suas paredes, sem fibrose óbvia. Apesar disso, o exame clínico frequentemente pode ser normal ⁽¹⁾.

1.1.1.1 Apresentação Clínica

Embora a DPOC esteja definida com base na limitação ao fluxo aéreo (detectada pela espirometria, com redução do volume expiratório no primeiro segundo- VEF₁), nem todos os indivíduos apresentam o mesmo quadro. Assim, a DPOC pode ser diagnosticada em qualquer fase da doença ⁽¹⁾. A avaliação da DPOC baseia-se em sinais e sintomas do paciente, risco futuro de exacerbações, gravidade da anormalidade da espirometria, e a identificação de comorbidades. As determinações de características clínicas presentes em um indivíduo ajudam a definir condutas apropriadas.

Dentre os sinais e sintomas do enfisema temos: dispneia, tosse, expiração prolongada, inatividade física, uso dos músculos respiratórios acessórios e hiperinsuflação pulmonar, que acarreta em diminuição dos sons respiratórios, porém os ruídos adventícios com sibilos e estertores não são frequentes. O paciente frequentemente assume uma postura sentada, fletida e sobre os braços para possibilitar maior vantagem mecânica para os músculos inspiratórios acessórios ⁽³⁾.

Os pacientes com enfisema mais pronunciado tendem a ser magros, taquipneicos, com tórax em barril, apresentam timpanismo, utilizando os músculos acessórios da respiração. Aqueles em que predomina a bronquite

crônica, por outro lado, tendem a ser obesos, são dispneicos, cianóticos, com sinais de insuficiência cardíaca direita ⁽³⁾.

A classificação de DPOC é feita de acordo com a espirometria, sendo dividida em quatro estágios: leve, moderada, grave e muito grave ⁽¹⁾:

- DPOC leve (GOLD I): caracterizada por limitação leve ao fluxo aéreo ($VEF_1/CVF < 0,70$; $VEF_1 \geq 80\%$ do previsto). Tosse crônica e produção aumentada de secreção podem estar presentes.
- DPOC moderada (GOLD II): $VEF_1/CVF < 0,70$; $50\% \leq VEF_1 < 80\%$ do previsto. Nesta fase os pacientes costumam procurar ajuda médica, devido à sintomatologia respiratória (dispneia aos esforços e tosse produtiva) e surgimento de exacerbações.
- DPOC grave (GOLD III): $VEF_1/CVF < 0,70$; $30\% \leq VEF_1 < 50\%$ do previsto. Ocorre aumento da dispneia, fadiga e exacerbações mais frequentes. Quase sempre ocorre impacto na qualidade de vida dos pacientes.
- DPOC muito grave (GOLD IV): limitação grave ao fluxo aéreo ($VEF_1/CVF < 0,70$; $VEF_1 < 30\%$ do previsto + falência respiratória crônica). Tal falência é caracterizada pela pressão arterial parcial de O_2 (PaO_2) < 60 mmHg e/ou pressão arterial de CO_2 ($PaCO_2$) > 50 mmHg, e dispneia aos mínimos esforços. A qualidade de vida desses pacientes já está bastante ruim e são observados sinais de *Cor pulmonale*.

1.1.1.2 Fatores de Risco

Os fatores de risco para DPOC compreendem tanto fatores individuais quanto fatores ambientais. O tabagismo (acima de 20 anos/maço) é o agente etiológico mais comum. Outras exposições ambientais, quando são suficientemente intensas ou prolongadas, como poeiras ocupacionais e produtos químicos, podem causar DPOC independentemente do tabagismo. Em muitos países, a poluição do ar interno (em ambiente fechado) proveniente da queima de combustíveis de biomassa para o aquecimento ou cozimento em ambientes mal ventilados também tem sido apontada como fator de risco para o desenvolvimento de DPOC ⁽⁴⁻⁶⁾.

Outro fator de risco frequentemente documentado é a deficiência de α 1- antitripsina (AATD). A AATD é um fator de risco genético bem conhecido para doença pulmonar e é a doença hereditária mais frequentemente diagnosticada em adultos. A prevalência é de menos de 5 casos a cada 10.000 habitantes, sendo responsável por 1-2% dos pacientes com enfisema ^(7, 8). A apresentação clínica é variável, e a exposição ao tabaco é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de enfisema na AATD ⁽⁹⁾.

1.1.2 Epidemiologia

O número de óbitos devido à DPOC cresce vertiginosamente ⁽¹⁰⁾. Foi classificada como a sexta maior causa de morte em 1990 e está projetada para ser a terceira principal causa de morte no mundo em 2020 ⁽¹¹⁾. Com o envelhecimento da população mundial e o aumento do tabagismo nos

países em desenvolvimento, espera-se que sua prevalência aumente, e o número de mortes atinja mais de 4,5 milhões ao ano até 2030 ⁽¹⁾. O tabagismo responde por 75% das mortes por DPOC entre homens de 35 a 69 anos de idade nos países desenvolvidos ⁽¹²⁾.

Evidentemente, pelo alto ônus econômico, devido aos custos dos cuidados de saúde e perda de produtividade, essa doença tem sido bastante estudada, sendo importante a busca de medicamentos ou biomarcadores para o diagnóstico precoce ⁽¹³⁾.

No Brasil, estima-se que aproximadamente 12% da população de adultos maiores de 40 anos, ou seja, 5.500.000 indivíduos, tenham DPOC (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia – SBPT, 2004). Segundo dados do DATASUS (2014), no país ocorrem cerca de 40.000 mortes a cada ano em decorrência da DPOC, 141.994 hospitalizações que levaram a 778.428 dias de internação. O custo total dessas internações foi de R\$ 92.434.415,51 e 7.937 mortes diretamente relacionadas com a DPOC.

A DPOC está associada com custos elevados. Na União Europeia, os custos diretos totais com as doenças respiratórias são estimados em 6% dos custos totais com saúde, sendo que a DPOC representa 56% destes gastos (38,6 bilhões de euros). Nos Estados Unidos, os custos diretos com a DPOC são de 29,5 bilhões e os custos indiretos da ordem de 20,4 bilhões. A exacerbação é responsável por grande parte destes custos, desta forma, existe uma relação forte entre a gravidade do DPOC e os custos do atendimento ⁽¹⁰⁾.

Nos países em desenvolvimento, os custos médicos diretos podem ser menos importantes que o impacto da doença na produtividade do indivíduo em trabalhos profissionais e domésticos, pois o sistema de saúde pode não fornecer os cuidados necessários para os pacientes, desta forma, economizando recursos públicos diretos, o que, no entanto, ocasiona a interrupção prolongada das atividades diárias dos indivíduos (profissionais e domésticas), bem como do familiar que terá que cuidar deste ⁽¹⁰⁾.

No Projeto Latino-americano de Investigação de Enfermidade Obstrutiva Crônica, chamado de Projeto Platino, coordenado pela Associação Latino-Americana de Tórax no Brasil, no ano de 2003, São Paulo foi a cidade escolhida com uma prevalência de 15,8% de DPOC, segundo os dados espirométricos. Em 2014, após estudo de seguimento de 9 anos sobre DPOC concluiu-se que a taxa de subdiagnóstico nos novos casos da doença na fase de seguimento em São Paulo foi de 70,0%. A taxa de subdiagnóstico da DPOC identificada no presente estudo epidemiológico de base populacional foi alta, reforçando a necessidade de maior divulgação e ampliação do uso da espirometria em unidades de atenção primária à saúde.

1.1.3 Fisiopatogênese

A DPOC é caracterizada pelo lento e progressivo desenvolvimento de limitação ao fluxo aéreo pode ser pouco reversível tanto espontaneamente como por meio de medicamentos ⁽¹⁴⁾. As partículas geradas pelo fumo do

tabaco são as fontes mais frequentes de estabelecimento da doença, potencializando as alterações ao longo dos anos ^(10, 15).

O processo inflamatório crônico das vias aéreas é uma característica muito relevante na fisiopatologia da DPOC ^(10, 16). A inflamação crônica causa mudanças estruturais e diminuição da luz brônquica. A destruição do parênquima pulmonar leva à perda do acoplamento alveolar nas pequenas vias aéreas e diminui o recolhimento elástico do pulmão. Estas alterações diminuem a possibilidade das vias aéreas de se manterem abertas durante a expiração ^(10, 16).

Os espaços aéreos formados têm uma área reduzida para a troca gasosa e a sua distensão pode ter um efeito negativo na perfusão pulmonar. Com a destruição do tecido elástico nas paredes alveolares e entre os bronquíolos respiratórios, a retração elástica é perdida resultando em retenção de ar e, juntamente, perde-se a tração radial que causa colapso precoce das vias aéreas na expiração, contribuindo para a retenção de ar.

A destruição do tecido pulmonar é decorrente do desequilíbrio entre os sistemas de proteinases e antiproteinases. Evidências apoiam a hipótese que a inalação da fumaça de cigarro induz um aumento no número de neutrófilos e macrófagos, os quais liberam enzimas como as catepsinas B, K, L e S, elastase neutrofílica, proteinase 3, metaloproteinase de matriz (MMP) 9 e 12. Estas enzimas não são totalmente inibidas pelas antiproteinases, levando à destruição do tecido conectivo pulmonar ^(10, 17).

Embora a DPOC comprometa os pulmões, também produz consequências sistêmicas significativas. A limitação ao fluxo aéreo e

particularmente a hiperinsuflação afeta a função cardíaca e a troca gasosa. Mediadores inflamatórios na circulação podem contribuir para perda de massa muscular e caquexia, e podem iniciar ou piorar comorbidades como isquemia e outras doenças cardíacas, osteoporose, diabetes e síndrome metabólica ⁽¹⁰⁾.

As estratégias de manejo importantes são a cessação do tabagismo, reabilitação e terapia com drogas (fundamentalmente por inalação). Alguns pacientes, no entanto, passam a exigir terapia de longo prazo com oxigênio ou mesmo o transplante de pulmão ^(10, 18).

É importante ressaltar que o processo inflamatório crônico pulmonar nos portadores de DPOC por tabagismo não cessa após a interrupção do fumo ⁽¹⁹⁾.

A abordagem de tratamento da DPOC é dividida nas seguintes etapas: redução de fatores de risco, manejo terapêutico de doença estável e manejo terapêutico de exacerbações de doenças ⁽¹⁰⁾. Notavelmente, nenhum tratamento atualmente disponível reduz a progressão da doença ou suprime a inflamação em pequenas vias aéreas e parênquima pulmonar.

Os objetivos atuais do tratamento da DPOC são reduzir os sintomas, prevenir e reduzir o número de exacerbações, melhorar a tolerância ao exercício e o estado de saúde. Até o momento, não há evidência clínica conclusiva de que exista algum medicamento que altere a longo prazo a função pulmonar ⁽¹⁰⁾.

1.1.3.1 Resposta inflamatória

Os leucócitos, incluindo macrófagos, neutrófilos e linfócitos, estão aumentados nas vias aéreas de pacientes com DPOC. Apesar da presença de células imunes inatas aumentadas, as vias aéreas da DPOC são frequentemente colonizadas por bactérias que sugerem um defeito subjacente. Macrófagos de pacientes com DPOC têm capacidade fagocitária reduzida, podendo levar à persistência da inflamação. Fenótipos diferentes de macrófagos têm sido associados à doença, sugerindo que o ambiente pulmonar circundante na DPOC pode gerar um fenótipo específico que é permanentemente pró-inflamatório. Os neutrófilos da DPOC também são aberrantes, com aumento da sobrevivência e da motilidade, mas falta direção que poderia levar a uma destruição mais disseminada durante a migração. Finalmente, um elemento de autoimunidade, impulsionado por células Th17, e alterações nas proporções de subgrupos de linfócitos também podem estar envolvidos na progressão da doença ⁽²⁰⁾.

Quando as células inflamatórias são ativadas, liberam mediadores químicos, tais como proteases, citocinas e espécies reativas de oxigênio, que contribuem para a destruição pulmonar e para a permanência da inflamação. Destacam-se entre tais mediadores as interleucinas 8 (IL-8), 1 β (IL-1 β) e 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α), fator de crescimento transformador (TGF- β), e fator de crescimento epidérmico (EGF) ⁽¹⁶⁾.

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de

proteinoquinasas ativadas por mitógenos. Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas preformadas e atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras) ⁽²¹⁾.

Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, fenômeno denominado pleiotropia. As citocinas são redundantes em suas atividades, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas. Com frequência, são formadas em cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas ⁽²²⁾.

Essas substâncias se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar ou atenuar a resposta inflamatória, de acordo com o microambiente no qual estão localizadas ⁽²³⁾.

As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo uma cicatrização apropriada. No entanto, a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos. Após lesões ou infecções graves, a resposta exacerbada e persistente de citocinas Th1 pode contribuir para lesões em órgão-alvo, levando à insuficiência de múltiplos órgãos e à morte. As citocinas Th2 podem minimizar alguns desses efeitos indesejáveis ^(21, 23).

Como não é possível classificar as citocinas quanto à célula de origem ou quanto à função biológica, elas foram agrupadas em interleucinas (IL, numerada sequencialmente de IL-1 a IL-35), fator de necrose tumoral (TNF), quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de transformação do crescimento (TGF) ⁽²⁴⁾.

As citocinas desenvolvem um papel importante em muitos processos patológicos da DPOC. As citocinas pro-inflamatórias de maior importância incluem o TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-8, IL-22, IL-23, e fatores de crescimento tais como TGF- β ⁽²⁵⁾.

Níveis aumentados de TNF- α têm sido associados a várias doenças inflamatórias pulmonares, incluindo asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), lesão pulmonar aguda (LPA), síndrome do desconforto respiratório agudo (SARA), sarcoidose e fibrose pulmonar intersticial (FPI). O TNF- α desempenha múltiplos papéis na patologia da doença, induzindo um acúmulo de células inflamatórias, estimulando a geração de mediadores inflamatórios e causando estresse oxidativo, hiperresponsividade das vias aéreas e remodelamento tecidual ⁽²⁶⁾.

Uma linhagem distinta de células T, chamadas células T-helper (Th)17 tem sido estudada e caracterizada pela produção de IL-17A, IL-17F e IL-22. Além do subtipo Th17, as citocinas IL-17A e IL-17F podem ser liberadas por neutrófilos, eosinófilos, células T CD8+, basófilos e mastócitos ⁽²⁷⁾. Estudos recentes têm fornecido evidências de que a IL-17A, o principal produto das células Th17, exerce importante função na regulação

da expressão de mediadores inflamatórios e recrutamento de células inflamatórias em várias doenças inflamatórias ⁽²⁸⁾.

Recentes evidências sugerem que os linfócitos Th17 expressam a interleucina IL-17A e IL-17F e contribuem para a produção destas citocinas em doenças imunologicamente mediadas. Os linfócitos B são conhecidos por serem uma importante fonte de citocinas em doenças inflamatórias crônicas. Sendo assim, foi investigado o potencial de linfócitos B humanos para produzirem IL-17A e IL-17F. Estudos fornecem evidências de que os linfócitos B estimulados com citocinas podem ser uma fonte significativa de IL-17A e IL-17F e sustentam a noção de que estas células participam ativamente em respostas imunológicas através de mecanismos alternativos, juntamente com a clássica liberação de anticorpos ⁽²⁹⁾.

Em 2016, Fujii et al. ⁽³⁰⁾ relataram que a IL-17A desempenha um papel crítico no desenvolvimento de enfisema induzido por elastase pancreática porcina (PPE). A instilação intra-traqueal de PPE induziu alterações enfisematosas nos pulmões e foi associada a níveis aumentados de IL-23 em homogenatos de pulmão.

A assinatura de IL-17 foi associada a um perfil inflamatório característico, incluindo aumento de neutrófilos e macrófagos das vias aéreas. Estudos sugerem que a resposta epitelial da via aérea pela IL-17 distingue um subgrupo de DPOC biologicamente, radiograficamente e clinicamente distinto que pode se beneficiar de terapia personalizada ⁽³¹⁾.

Em estudo de Yanagisawa et al., foi visto que células inflamatórias crônicas se acumulam ao redor de pequenas vias aéreas na DPOC e

acredita-se que desempenhem um papel importante na fibrose das pequenas vias aéreas. Nos modelos utilizados (camundongos deficientes no receptor de IL-17A), resultados sugerem que a IL-17 pode ser direcionada para prevenir a progressão da fibrose das vias aéreas na DPOC ⁽³²⁾.

Estudo de Ito et al. ⁽³³⁾ mostrou que o desequilíbrio Th17 / Treg desempenha um papel fundamental na progressão da DPOC e reforça a importância dos estímulos microambientais produzidos pelas citocinas pró e anti-inflamatórias liberadas nessa resposta.

Estudo de Duan et al. ⁽³⁴⁾ sugere a contribuição das células Th17, Tc17 (células T CD8+ produtoras de IL-17) e Treg na patogênese da DPOC. O número de Tregs foi negativamente correlacionado com células Th17 e com células Tc17. Curiosamente, uma porção significativa das células que se infiltram nos pulmões foi inclinada para um fenótipo Tc17, concluindo que o reequilíbrio dessas células seria útil para desenvolver e refinar as novas terapias imunológicas para a DPOC.

Sabe-se que nas doenças pulmonares, a IL-17A e IL-17F são altamente pró-inflamatórias, agravando a resposta neutrofílica ⁽³⁵⁾.

Entretanto, ainda existem muitas controvérsias relacionadas às funções da IL-17 nos pulmões. Hellings et al. ⁽³⁶⁾ demonstraram que a IL-17 orchestra o influxo de granulócitos dependente das células T para as vias aéreas na inflamação alérgica crônica. Os dados mostraram que a administração de anticorpo monoclonal anti IL-17 antes do desafio antigênico reduz fortemente o influxo de neutrófilos para as vias aéreas nesse modelo de inflamação. Por outro lado, o uso de anti IL-17 aumenta o

influxo de eosinófilos para os pulmões, provavelmente por aumentar a produção de IL-5.

Além disso, algumas evidências apontam para o fato de que qualquer tratamento envolvendo bloqueio de células Th17 ou IL-17 pode aumentar a vulnerabilidade a infecções, uma vez que esta linhagem de células participa da defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares e extracelulares ⁽³⁷⁾. Além de participar da defesa do organismo contra vírus, fungos e bactérias através de efeitos diretos sobre a estrutura das células pulmonares, a IL-17 também atua indiretamente nesta defesa, através do recrutamento de neutrófilos ⁽³⁸⁾.

O processo fisiopatológico anormal da DPOC pode contribuir para as características fundamentais da doença, e por esse motivo direcionar as citocinas envolvidas pode ser bastante útil. Embora existam trabalhos que implicam várias citocinas como sendo potencialmente importantes na DPOC, há ainda poucos estudos que observam o efeito do bloqueio de citocinas específicas na doença, sendo necessário descobrir biomarcadores eficazes para cada alvo da DPOC ⁽³⁹⁾.

A Figura 1 mostra o possível mecanismo de ação inflamatória da DPOC.

Silvia Fukuzaki

Brodalumabe é um novo anticorpo monoclonal humano antagonista do receptor de IL-17, que se liga com elevada afinidade ao receptor de IL-17 humana, e inibe a reação inflamatória através do bloqueio da ação da IL-17A, da IL-17E e da IL-17F. A via de IL-17 desempenha um papel central na indução e promoção de processos inflamatórios. Além da artrite psoriática, o brodalumabe está atualmente sendo estudado para o tratamento de psoríase em placas e asma ^(40, 41).

1.1.3.2 Remodelamento

O processo de remodelamento de pequenas vias aéreas de pacientes com DPOC está relacionado ao grau de obstrução ao fluxo aéreo e à gravidade da doença ⁽⁴²⁾, e é um dos principais problemas da DPOC, pois leva à perda irreversível da função pulmonar ⁽⁴³⁾.

A matriz extracelular (MEC) é composta por ampla e complexa rede de macromoléculas, e desempenha um papel fundamental na estrutura, desenvolvimento e reparo pulmonar. Porém, o papel estrutural difere nas zonas fisiológicas do pulmão. Nas vias aéreas de condução, a MEC é composta por colágenos e proteoglicanos, e de tecido intersticial que sustenta as células do epitélio e a musculatura lisa adjacente. Nesta área, a MEC é um importante estabilizador da via aérea, impedindo o seu colapso durante a expiração. Na zona respiratória (área de troca gasosa) e na zona de transição (bronquíolos), a MEC exerce um papel mais dinâmico, visando a adequação de oscilações constantes no volume pulmonar ⁽⁴⁴⁾.

O desequilíbrio proteinase-antiproteinase tem sido relacionada com patogênese do enfisema, causando a destruição da parede alveolar e degradação da MEC, devido à ação de enzimas proteolíticas, tais como as metaloproteinases (MMPs) e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) ⁽⁴⁴⁾. As metaloproteinases degradam seletivamente os componentes da matriz extracelular e desempenham um papel essencial na condução das células inflamatórias. O desequilíbrio nessas enzimas e seus inibidores contribui de forma significativa para a fisiopatologia da DPOC ^(10, 45).

O resultado de meta-análise feita por Li et al. ⁽⁴⁶⁾ indica que níveis elevados de proteínas MMP9 e TIMP-1 podem estar correlacionados com a patogênese da DPOC, e as duas proteínas podem representar importantes marcadores biológicos para o diagnóstico precoce da DPOC.

Os principais componentes da MEC são: fibras elásticas, colágenos, proteoglicanos (versican, decorina, lumican e biglicano), e glicoproteínas (fibronectina e tenascina) ⁽⁴⁷⁾.

TGF- β é uma citocina pró-fibrótica e tem sido implicada nas alterações da MEC ⁽⁴⁸⁾, estimulando a produção de fibroblasto, colágeno, fibronectina e proteoglicanos.

Há hipóteses que a deposição da fibronectina na camada subepitelial do brônquio na asma esteja relacionada à alteração das propriedades biomecânicas e geométricas das vias aéreas ⁽⁴⁹⁾, porém sabe-se muito menos sobre o papel da fibronectina no remodelamento das vias aéreas em pacientes com DPOC.

É fato que a cooperação entre macrófagos e neutrófilos é necessária para a destruição do tecido conectivo em modelo agudo de exposição ao cigarro ⁽⁵⁰⁾. Pacientes com deficiência de α 1-antitripsina (AATD) podem evoluir com destruição do parênquima pulmonar ⁽¹⁶⁾. Esta correlação foi evidenciada há 50 anos, quando cientistas relataram que pacientes AATD desenvolveram enfisema de início precoce ⁽⁵¹⁾.

Pesquisadores foram capazes de induzir enfisema por instilação de enzimas nas vias respiratórias de animais experimentais, incluindo a elastase de neutrófilos humanos. Observou-se que a ação da elastase é a causa mais provável da destruição do tecido no enfisema ⁽⁵²⁾.

Para estudar melhor a patogênese do enfisema, o modelo animal induzido por elastase foi desenvolvido há 30 anos. É um modelo animal de enfisema simples e amplamente aceito, e é usado para elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia do enfisema e para examinar novas abordagens farmacológicas ^(50, 53).

Evidências em modelos animais mostram que camundongos geneticamente modificados, deficientes em elastase neutrofílica, não desenvolveram enfisema após exposição à fumaça do cigarro ⁽⁵⁰⁾.

A elastase é uma enzima com capacidade de degradação da elastina. Esta apresenta um papel mecânico e estrutural muito importante em tecidos elásticos como o pulmão, vasos sanguíneos e pele ^(54, 55). Ela é muito similar com outras serino-proteinases, por exemplo, a elastase de leucócitos apresenta 43% de similaridade da estrutura primária com a elastase pancreática de porco, 39% com a calicreína pancreática de porco e 37%

com a catepsina G, além de apresentar similaridade, em menor proporção, com a elastase de outros animais ⁽⁵⁶⁾.

Há vários estudos relacionados a utilização de inibidores de proteases em modelo de elastase. Theodoro et al. utilizaram inibidor de tripsina de *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) ⁽⁵⁷⁾, Martins-Olivera et al. utilizaram inibidor de proteinase Kallikrein derivado de *Bauhinia bauhinoides* ⁽⁵⁸⁾, Oliva et al. estudaram o inibidor de *Crataeva tapia* (CrataBL) ⁽⁵⁹⁾, e Almeida-Reis et al. utilizaram o inibidor *Bauhinia bauhinoides cruzipain* (BbCI) ⁽⁶⁰⁾. Todos os estudos mostraram eficácia na redução das alterações da mecânica pulmonar, destruição do tecido pulmonar, alterações inflamatórias, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo nos animais tratados, em comparação aos animais que receberam somente elastase intra-traqueal, podendo ser considerado como ferramentas terapêuticas potenciais no gerenciamento da DPOC.

1.1.3.3 Óxido nítrico e DPOC

O estresse oxidativo exerce papel importante na fisiopatogênese da DPOC, pois pode agravar a doença através da ativação de NF-kb, que por sua vez está ligado aos genes do fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-8 e outras células inflamatórias ⁽⁶¹⁾.

O 8-isoprostano é um isômero da prostaglandina-F-2 alfa (isoprostano 8-iso-PGF-2 α), que é formado *in vivo* pela peroxidação catalisada por radicais livres do ácido araquidônico. Estudo de Montuschi et al. ⁽⁶²⁾ mostrou que o fumo causou um aumento agudo no isoprostano 8-iso-PGF-2 α

exalado em cerca de 50%, sendo um importante marcador do estresse oxidativo.

O óxido nítrico endógeno (NO) é uma molécula de sinalização gasosa produzida por células não inflamatórias e inflamatórias em vias aéreas e alvéolos grandes e periféricos, e desempenha um papel importante na regulação da via aérea e na função vascular. É gerada por três isoformas de NO sintases: NOS neuronal (nNOS, NOS1), NOS endotelial (eNOS, NOS3) e NOS induzida (iNOS, NOS2), com diferentes expressões e papéis fisiopatológicos em várias doenças ⁽⁶³⁾. Em particular, a iNOS não é constitutivamente expressa, mas é induzida por vários estímulos, incluindo mediadores endógenos (quimiocinas e citocinas) e fatores exógenos (toxinas bacterianas, infecção viral, alérgenos, poluentes ambientais, etc.) ⁽⁶⁴⁾. O NO é gerado pela conversão de L-arginina em L-citrulina e durante a inflamação, devido à indução de iNOS, são produzidas grandes quantidades de NO que podem exercer efeitos pró-inflamatórios ⁽⁶⁵⁾.

Os corticosteróides reprimem diretamente iNOS em células de roedores, mas não inibem diretamente a expressão de iNOS nas células epiteliais das vias aéreas humanas ⁽⁶⁶⁾. A síntese do óxido nítrico ocorre a partir do substrato L-arginina, por intermédio da ação das isoformas óxido nítrico sintases (NOS). Quando um grupo molecular guanidino de aminoácido L-arginina é quebrado, a L-arginina é convertida em NO+ L-citrulina ⁽⁶⁷⁾.

A IL-13 aumenta a expressão de iNOS e a produção de NO é avaliada pela NOex (fração exalada de óxido nítrico) ⁽⁶⁸⁾. Sabe-se que NOex

é um bom índice da inflamação Th2 e se associa ao aumento de IL-13 na mucosa brônquica. Além disso, o NOex também pode ser utilizado como um indicador da capacidade de resposta aos esteróides de forma mais consistente do que outros parâmetros. Tem sido mostrado que pacientes com níveis elevados de NOex respondem melhor a terapia com esteróides, em comparação com aqueles com níveis mais baixos de Noex ⁽⁶⁹⁾.

O estresse oxidativo gera ânions superóxido e em combinação com NO pode resultar na formação de espécies altamente reativas de peroxinitrito, que está aumentada na mucosa das vias aéreas dos pacientes com DPOC ^(70, 71). Os níveis de NOex na DPOC são conflitantes, mas parece que os hábitos de tabagismo e a gravidade da doença são os fatores mais importantes que influenciam os níveis de NOex nesses pacientes ⁽⁶⁴⁾.

Estudos de Jiang et al. mostram que a expressão de iNOS aumentou significativamente em fumantes com DPOC em comparação com fumantes sem DPOC, sugerindo que a iNOS pode estar envolvida na patogênese da DPOC e pode ser um marcador em potencial para identificar os fumantes que têm maior risco de sofrer DPOC ⁽⁷²⁾.

A Figura 2 mostra a fisiopatogênese do estresse oxidativo no enfisema pulmonar.

Figura 2 - Fisiopatogênese do estresse oxidativo no enfisema pulmonar. As espécies reativas de oxigênio decorrentes da fumaça de cigarro (e outros irritantes) podem causar diferentes efeitos prejudiciais ao pulmão, tais como: diminuição de antiproteínases, ativação do NF- κ b, levando ao aumento de IL-8 e TNF- α . O aumento de isoprostano leva a broncoconstrição e extravasamento de plasma. Além disso, o estresse oxidativo induz ao aumento de muco (modificado de Barnes PJ, 2004).

1.1.3.4 Fator de transcrição NF- κ b

O fator de transcrição nuclear kappa b (NF- κ b) desempenha um papel fundamental na indução da expressão gênica pró-inflamatória, levando à síntese de citocinas, moléculas de adesão, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas ⁽⁷³⁾. Os resultados de estudos em modelos *in vitro* e *in vivo* de inflamação e malignidade também sugeriram papéis importantes para NF- κ b na morte celular programada ou apoptose.

NF-kb desempenha um papel essencial em uma variedade de doenças inflamatórias agudas e crônicas. Nas doenças pulmonares comuns associadas a um componente inflamatório significativo, como sepsis grave, lesão pulmonar aguda, síndrome de dificuldade respiratória aguda, fibrose cística e asma, os papéis patogênicos do NF-kb foram amplamente investigados ⁽⁷⁴⁾. Na DPOC, a ativação do NF-kb tem sido implicada na patogênese da doença, e o principal fator de risco para DPOC, tabagismo, está fortemente associado à ativação do NF-kb. Sua ativação foi demonstrada em doenças de poeira mineral e provavelmente desempenha um papel na patogênese dessas doenças crônicas. NF-kb também desempenha uma variedade de papéis no câncer de pulmão, incluindo resistência à quimioterapia, inibição da carcinogênese e indução de expressão de genes antiapoptóticos ⁽⁷⁵⁾.

O caminho complexo de NF-kb oferece uma variedade de potenciais alvos moleculares para intervenção quimioterapêutica. Uma variedade de agentes voltados para a modulação da atividade de NF-kb estão em vários estágios de investigação ⁽⁷⁶⁾.

NF-kb é um fator nuclear que, uma vez ativado por agentes como lipopolissacarídeos, possui a capacidade de ligar-se a uma sequência de dez pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve k das moléculas de anticorpo das células B ⁽⁷⁷⁾.

O NF-kb age como um fator de transcrição, com ação descrita em várias células que compõem os organismos, apresentando uma série de ações superiores a todos os outros fatores de transcrição até então

caracterizados ⁽⁷⁸⁾. Essa superioridade deve-se aos vários estímulos que o ativam, como neurotransmissores, neurotrofinas, proteínas neurotóxicas, citocinas, lipocorticóides, peptídeo natriurético atrial, ceramidas, vírus, bactérias e a óxido nítrico sintase induzida ⁽⁷⁹⁾.

A família NF-kb consiste de cinco subunidades, caracterizada por conter uma porção N – terminal bem conservada com cerca de 300 aminoácidos (RHD – *Rel homology domain*) – que se subdivide em uma região que se liga ao DNA e uma outra denominada de domínio de dimerização. Nesta última, encontra-se um sinal de localização nuclear (NLS). A região C-terminal difere entre cada subunidade, sendo que as subunidades p65, c-Rel e RelB contêm um domínio de transativação (TAD), necessária para iniciar a atividade transcricional ⁽⁷⁹⁾. Quando não estimulado, o fator NF-kb encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória (Ikb). Esse complexo impede a translocação do NF-kb para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do Ikb são necessárias para que ocorra a translocação.

Cabe ressaltar que a expressão de iNOS e as citocinas de perfil Th2 e Th17 são dependentes da transcrição do NF-kb ^(80, 81).

2 Justificativas

2 JUSTIFICATIVAS PARA O ESTUDO

A DPOC é hoje uma doença de grande importância em termos de saúde da população mundial. Dados epidemiológicos comprovam a ascendência do número de óbitos causados pela DPOC. Atualmente ocorrem aproximadamente 3 milhões de óbitos ao ano no mundo, sendo esperado que até 2030 esse número chegue a 4,5 milhões ao ano ⁽¹⁰⁾. As causas da DPOC ainda não estão completamente elucidadas, mas as evidências apontam para a importância da teoria da proteinase-antiproteinase como um dos principais mecanismos fisiopatológicos.

Embora o tabagismo seja o principal fator etiológico da DPOC, apenas 20% de toda a população tabagista desenvolvem a doença, o que indica que fatores intrínsecos do hospedeiro interfiram em sua patogênese. Estudos propõem a importância da regulação imune no curso progressivo da DPOC e o papel do epitélio respiratório no controle e manutenção desta resposta ⁽⁸²⁾.

Embora existam trabalhos implicando várias citocinas como potencialmente desempenhando um papel importante na DPOC, há poucos estudos que examinaram o efeito do bloqueio específico de citocinas na DPOC. Os dois maiores estudos relatados na literatura envolvem o uso de anticorpos bloqueadores de TNF α e IL-8, e em nenhum dos dois houve benefícios. Bloquear as ações do IL-8 através do bloqueio do receptor CXCR2 também não foi bem-sucedido. Estudos de anticorpos contra IL-17,

IL-18 e IL-1 β estão atualmente sendo realizados ou planejados. Há uma necessidade de cuidadosamente fenotipar a DPOC e descobrir bons biomarcadores da eficácia da droga para cada alvo específico. Grupos específicos de pacientes com DPOC devem ser alvo de terapia com anticítocina específica se houver evidência de expressão dessa citocina ⁽³⁹⁾.

A natureza da resposta inflamatória observada em pacientes com DPOC levanta a possibilidade de que a IL-17 e citocinas relacionadas podem contribuir para esta doença. Estudos analisaram a expressão de IL-17A e IL-17F, bem como o fenótipo das células que as produzem em biópsias brônquicas de pacientes com DPOC, mostrando que a imunoreatividade do IL-17F foi maior nas biópsias brônquicas de pacientes com DPOC em comparação com indivíduos controle, sugerindo que as citocinas de perfil Th17 poderiam desempenhar papéis importantes na patogênese da DPOC, levantando a possibilidade de utilizar este mecanismo como base para novas abordagens terapêuticas ⁽⁸³⁾.

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as abordagens preventiva e terapêutica da administração do anticorpo monoclonal anti IL-17 na lesão pulmonar induzida pela elastase em camundongos C57Bl6.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar nesse modelo submetido às duas formas de tratamento os seguintes parâmetros:

1. Alterações da mecânica pulmonar: **Ers** (elastância do sistema respiratório), **Raw** (resistência de vias aéreas), **Gtis** (resistência do parênquima), **Htis** (elastância do tecido pulmonar) e **Rrs** (resistência do sistema respiratório);
2. Óxido nítrico exalado;
3. Número de células totais e o seu diferencial no lavado broncoalveolar;
4. Em vias aéreas e septos alveolares:
 - Conteúdo de fibras elásticas e colágenas;

- Expressão celular de metaloproteinases9 (MMP9), 12 (MMP12) e TIMP-1;
 - Expressão celular de iNOS e eNOS, e do conteúdo de isoprostano 8-iso-PGF-2 α ;
 - Expressão celular de NF-kb;
 - Expressão celular de IL-17, IL-1 β e IL-8;
 - Expressão celular de TNF- α e TGF- β ;
 - Avaliação do conteúdo de decorina, biglicano, fibronectina e lumican;
 - Avaliação da resposta neutrofílica.
5. Somente nos septos alveolares:
- Intercepto linear médio.

4 Métodos

4 MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA-FMUSP), sob o Protocolo nº006/16. Os animais foram manejados de acordo com o “Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório”, publicado pelo *National Institute of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985).

Foram utilizados 35 camundongos C57Bl6 machos, adultos jovens, obtidos do biotério central da Faculdade de Medicina da USP. Os animais tinham 6 a 8 semanas de vida ao saírem do biotério central e passaram por um período de ambientação no biotério do laboratório por 2 semanas. Foram utilizados camundongos C57Bl6 por terem sido usados em outros modelos de enfisema e são animais que apresentam maior susceptibilidade à indução do enfisema⁽⁸⁴⁾.

Houve perda de 3 animais no biotério, por briga entre os mesmos, 1 óbito de causa não esclarecida no biotério e 1 perda durante o protocolo.

4.2 LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA ELASTASE INTRA-TRAQUEAL

Os animais foram anestesiados com isoflurano, a região traqueal foi depilada e desinfetada com povidine. Foi realizada uma incisão de aproximadamente 0,5 cm na região do pescoço do animal para expor a traqueia, e nos animais do grupo elastase foi injetada uma única dose de 0,025 mg de Elastase Porcina Pancreática (PPE) (E- 1250 - 100 mg, Elastase, solução pancreática, tipo pâncreas de porco, 2x cristalizado solução aquosa, contém ~ 0,01% timol 14,29 ml, 7 mg proteína/ M 5,2 unidade/ mg proteína, Sigma, Califórnia, EUA), volume de 50 µL, diretamente na traqueia, através de uma seringa de 30 unidades entre os anéis cartilagosos. Os animais do grupo controle (SAL) foram submetidos ao mesmo procedimento, porém receberam 50 µL de solução salina ao invés da elastase. Após a instilação, foi realizada uma massagem no tórax do animal, para facilitar a distribuição desta para porções mais distais, e posterior a este procedimento o animal foi suturado na incisão e novamente aplicado o povidine para desinfetar os pontos.

Os camundongos do grupo anti IL-17 Preventivo (EP) receberam injeção intra-peritoneal (0,2 mL) do inibidor anti IL-17 (MAB421; R&D Systems, Minneapolis, MN) três horas antes da instilação intra-traqueal de elastase, como descrito previamente ⁽⁸⁵⁾.

Os animais do grupo anti IL-17 Terapêutico (ET) receberam injeção intra-peritoneal (0,2 mL) do inibidor anti IL-17 (MAB421; R&D Systems,

Minneapolis, MN) nos dias 25, 26, 27 e 28 após instilação intra-traqueal de elastase (Figura 3).

Figura 3 - Foto da aplicação intra-peritoneal de solução salina

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

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

1. **Grupo salina (SAL)** – Os animais receberam injeção intra-peritoneal (0,2 mL) de solução salina três horas antes da instilação intra-traqueal (50 μ L) de solução salina (n=8).
2. **Grupo elastase “controle” (EC)** – Os animais receberam injeção intra-peritoneal (0,2 mL) de solução salina três horas antes da instilação intra-traqueal (50 μ L) de elastase (n=8).

A Figura 5 mostra a descrição do protocolo experimental.

Figura 5 - Descrição do Protocolo Experimental

4.4 AVALIAÇÃO DA MECÂNICA PULMONAR

Após os 28 dias dos procedimentos iniciais, os animais foram anestesiados com injeção intra-peritoneal de Tiopental (250 mg/kg) e traqueostomizados. Uma cânula de plástico (20 gauge, BD, MG, Brasil) foi inserida pelo orifício da traqueostomia, e fixada com fio de algodão. Os animais foram 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 150 ciclos/min e curva de fluxo inspiratório senoidal (Figura 6). Para abolir seu esforço respiratório, os animais receberam pancurônio (0,2 mg/kg intra-peritoneal), e os dados para o cálculo da mecânica oscilatória foram registrados. Para tanto, foi utilizado um sinal que produz 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 foram obtidos e a impedância de via aérea (Pressão/Fluxo) calculada como função das diferentes frequências produzidas. Foi utilizada uma janela de sobreposição de 75% no sinal de 16 segundos e 3 blocos de 8 segundos foram usados para o cálculo dos parâmetros da mecânica oscilatória, segundo as equações:

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

onde $Z(f)$ é a impedância do sistema respiratório em função da frequência, R_{aw} é a resistência das vias aéreas, i é a unidade imaginária ($-1^{1/2}$), f é frequência, l_{aw} é a inertância de vias aéreas e $\alpha = (2/\pi) \cdot \arctan(H_{tis}/G_{tis})$, e:

$$P_{tr}(t) = E_{rs} \times V(t) + R_{rs} \times V'(t),$$

onde P_{tr} é a pressão traqueal, t é o tempo, E_{rs} é a elastância do sistema respiratório, V é o volume, R_{rs} é a resistência do sistema respiratório e V' é o fluxo.

Figura 6 - Aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (*FlexiVent*, Scireq, Montreal, Canadá)

4.5 DETERMINAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO EXALADO (NO_{ex})

Durante a ventilação mecânica, o gás foi coletado na porção expiratória do ventilador através de um balão impermeável ao NO (*Mylar Bag*, Sievers, Instruments Inc., Boulder, CO, USA) durante 10 minutos. Após o término do período de coleta, os balões foram selados para posterior análise.

O óxido nítrico foi mensurado por quimioluminescência através de um analisador de resposta rápida (280 NOA – *Nitric Oxide Analyzer* – Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, USA) (Figura 7). A concentração média de NO_{ex} foi registrada em partes por bilhão (ppb), como um índice da concentração de NO no ar exalado.

Figura 7 - Foto do 280 NOA – *Nitric Oxide Analyzer* – Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, USA

4.6 FLUIDO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (FLBA)

Logo após a mecânica respiratória foi realizada a coleta do fluido do lavado broncoalveolar (FLBA). Foi instilado com uma seringa 0,5 mL de soro fisiológico, por 3 vezes consecutivas, através da cânula de traqueostomia do animal, e a cada 0,5 mL instilado, foi recuperado em torno de 80% do volume (totalizando aproximadamente 1,2 mL). A amostra do FLBA foi centrifugada a 790x a gravidade, por 10 minutos, a 5°C.

O sobrenadante foi armazenado no freezer a -80°C para dosagem posterior de citocinas. O botão celular foi ressuspendido em 300 µL de salina. Em seguida, agitado no Vórtex, e retirado deste material 100 µL para preparo da lâmina, para contagem diferencial. O restante do FLBA foi citocentrifugado no *Cytospin* por 6 minutos, a 450 rpm, e em seguida a lâmina foi corada com *DiffQuick*. A contagem total de células foi realizada por microscopia ótica com o hemocítômetro de Neubauer (400x).

A diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos foi feita com o auxílio de um microscópio óptico com objetiva de imersão (1000x). Foram contadas aproximadamente 200 células.

4.7 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Imediatamente após a avaliação da mecânica pulmonar e coleta do FLBA, os animais foram exsanguinados, a caixa torácica aberta e o coração e pulmões foram retirados em bloco. Os pulmões foram fixados com formaldeído 4% a uma pressão constante de 20 cmH₂O, por 24 horas, para homogeneizar a distensão do parênquima pulmonar. Após esse período, os pulmões foram mantidos em álcool 70% por até 36 horas, e em seguida foram cortados em seu maior eixo, e também cortados no eixo transversal, onde foi possível amostrar a árvore respiratória da melhor forma, para o processamento histológico de rotina.

4.8 DESCARTE DE CARCAÇAS

As carcaças dos animais foram colocadas em sacos de lixo branco e identificadas com etiqueta padrão. A coleta foi realizada por funcionários da empresa de limpeza técnica hospitalar e os resíduos transportados para o abrigo de resíduos, para coleta diária noturna para tratamento e disposição

final, após a emissão (pelo veterinário responsável) do laudo e documento de movimentação.

4.9 COLORAÇÕES

As lâminas foram coradas com *Resorcina-Fucsina* (para análise de fibras elásticas), *Picro-sírius* (para a análise de fibras colágenas), e também foram preparadas em lâminas silanizadas para realização posterior de imunohistoquímica para a avaliação da expressão de MMP9, MMP12, iNOS, eNOS, NF-kb, IL-17, IL-8, IL-1 β , TGF- β , TIMP-1, TNF- α , isoprostano 8-iso-PGF-2 α , biglicano, decorina, fibronectina, lumican e neutrófilos. Para a imunohistoquímica, as lâminas foram previamente preparadas com 3-aminopropil-trietoxissilano Silano (Sigma) contendo os cortes histológicos dos pulmões que foram inicialmente desparafinizados e hidratados (Xilol 60°C, Xilol 1, 2 e 3; Etanol Absoluto 1 e 2, Etanol 96% e Etanol 70%). Posteriormente foram lavados com água corrente e água destilada, sendo então submetidos aos seguintes procedimentos:

Etapa 1 - Recuperação antigênica: Para a detecção da expressão de iNOS, NF-kb, MMP9, MMP12, TNF- α , TGF- β , lumican, biglicano, fibronectina, decorina, eNOS, isoprostano, TIMP-1 e neutrófilos, a recuperação antigênica se deu pela exposição ao vapor em panela de pressão (Dako Cytomation, California, Inc.) por 1 minuto a 125°C com as lâminas imersas em solução de Citrato com pH6 (Target Retrieval Solution,

Dako, California, EUA). Para a detecção da expressão de IL-17, IL-1 β e IL-8, a recuperação antigênica se deu pela exposição em panela a vapor por 40 minutos a 100°C com as lâminas imersas em solução de Citrato com pH9 (Target Retrieval Solution, Dako, California, EUA). Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas com água corrente e água destilada (3 minutos em ambas).

Etapa 2 - Bloqueio de peroxidase endógena e ligações inespecíficas: o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada (H₂O₂) 10V 3% (4 vezes de 5 minutos), seguida de lavagem com água corrente e água destilada (3 minutos em ambas). Depois, as lâminas foram imersas em solução de PBS. Assim, houve o bloqueio das ligações inespecíficas e novamente as lâminas foram lavadas em solução de PBS (2 vezes de 5 minutos). Para os anticorpos, o bloqueio foi realizado com água oxigenada (H₂O₂) 10V 3% e metanol (2 vezes de 10 minutos).

Etapa 3 - Incubação com anticorpo primário: os anticorpos primários foram diluídos em solução de BSA (do inglês Bovine Serum Albumin) e aplicados sobre cada lâmina. Os anticorpos utilizados, suas diluições e marcas estão descritas na Tabela 1.

Após, as lâminas foram incubadas *overnight* em uma câmara úmida em geladeira a 4°C.

Etapa 4 - Incubação com Anticorpo Secundário e Complexo: As lâminas foram lavadas em PBS (3 vezes de 5 minutos) e incubadas pelo ABC Kit Vectastain (Vector Elite PK-6101) de acordo com os respectivos anticorpos secundários.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados, diluições e marcas

MARCADOR	DILUIÇÃO	ANTICORPO PRIMÁRIO	ESPECIFICAÇÃO
Biglicano	1:200	Anti-cabra	SC-27936 Cabra Polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
Decorina	1:600	Anti-cabra	SC-22613 Cabra Polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
eNOS	1:50	Anti-coelho	Ab 5589 Coelho Polyclonal, Abcam Biotech Life Sci, MA, EUA
Fibronectina	1:600	Anti-cabra	SC-22613 Cabra Polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
IL-1 β	1:200	Anti-coelho	SC-7884 Coelho Polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
IL-17	1:800	Anti-coelho	SC-7927, Coelho Polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
IL-8	1:200	Anti-camundongo	SC-8427, Camundongo Monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
iNOS	1:200	Anti-camundongo	N-32020, Camundongo Monoclonal, BD transductionLab, CA, EUA
Isoprostano	1:1500	Anti-cabra	IS-20, Cabra Polyclonal, Oxford Biomed, Resear, MI, EUA
Lumican	1:600	Anti-coelho	Ab-158348, Coelho Monoclonal, Abcam Biotech Life Sci, MA, EUA
MMP9	1:50	Anti-coelho	SC-6840, Coelho Polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
MMP12	1:400	Anti-coelho	SC-30072, Coelho Polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
Neutrófilo	1:1200	Anti-coelho	Ab-21595, Coelho Polyclonal, Abcam Biotech Life Sci, MA, EUA
NF-kb	1:800	Anti-coelho	SC-109, Coelho Polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
TGF- β	1:200	Anti-coelho	SC-146, Coelho Polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
TIMP-1	1:400	Anti-camundongo	LS-C299465, Camundongo Polyclonal, LifeSpanBioScien, Inc, MA, EUA
TNF- α	1:100	Anti-camundongo	SC-52746, Camundongo Monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA

Etapa 5 - Revelação: Após lavagem das lâminas com PBS (3 vezes de 5 minutos), foi realizada a revelação pelo cromógeno Diaminobenzidina

(DAB) (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca). Em seguida, as lâminas foram lavadas com água corrente e água destilada (5 e 2 minutos, respectivamente).

Etapa 6 - Contra-Coloração e Montagem das Lâminas: As lâminas foram contra-coradas com *Hematoxilina de Harris* (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 20 a 30 segundos e lavadas com água corrente e água destilada (5 e 2 minutos, respectivamente). Após a limpeza, foram desidratadas, diafanizadas e montadas com as lamínulas para posterior análise morfométrica.

4.10 ESTUDO MORFOMÉTRICO

A análise morfométrica foi realizada com um microscópio óptico e com auxílio de um retículo com 50 retas e 100 pontos (Figura 8), com área conhecida ($62500 \mu\text{m}^2$ no aumento de 400x) usando a técnica de contagem de pontos ⁽⁸⁶⁾.

Para a realização da contagem referente aos 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 10 campos por animal, no aumento de 1000x.

Para a contagem referente às vias aéreas, foram selecionadas 3 vias aéreas. O retículo foi posicionado adjacente à 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 4 campos por via aérea no aumento de 1000x.

Figura 8 - Foto do retículo utilizado para realização da técnica de contagem de pontos em vias aéreas e septos alveolares.

4.11 MEDIDAS DO INTERCEPTO LINEAR MÉDIO (Lm)

O intercepto linear médio é um índice do diâmetro dos espaços aéreos distais. A análise foi feita em um microscópio com retículo apropriado, com 50 retas, em aumento de 200 vezes. Foram contados 15 campos de parênquima pulmonar nas regiões mais periféricas por cada lâmina.

O retículo foi utilizado sobreposto ao parênquima e foram contados o número de vezes que as intersecções das retas cruzavam a parede dos alvéolos. Deste modo, foi calculado o diâmetro alveolar médio pela relação entre a área do parênquima pulmonar e o número de intersecções das retas e o parênquima pulmonar⁽⁸⁷⁾. O Lm foi calculado utilizando a equação:

$Lm = 2500 \mu m / \text{média do número de vezes que os interceptos cruzaram as paredes dos alvéolos.}$

4.12 ANÁLISE DA FRAÇÃO DE VOLUME DE FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS

Para a obtenção das fibras colágenas, foi realizada a coloração para a contagem das fibras colágenas no parênquima pulmonar utilizando *Sirius-Red* (Direct Red 80, C>I 35780, Aldrich, EUA). Os cortes foram desparafinizados e lavados em água. Foram corados por 1 hora no *Picro-sírius* à temperatura ambiente e posteriormente lavada em água corrente por 5 minutos. Após essa etapa, os cortes foram corados com *Hematoxilina de Harris* por 6 minutos e posteriormente lavados em água corrente por 10 minutos, e, então, montadas⁽⁸⁸⁾.

Para a obtenção das medidas das fibras elásticas, foi utilizada a *Resorcina-Fucsina de Weigert Oxidada* para a sua coloração. Os cortes foram desparafinizados e hidratados em água. Sobre eles, foi gotejada uma solução aquosa de Oxona 10% e ficaram oxidando por 40 minutos. Foram

então lavados em água corrente por 5 minutos e então submersos em álcool 70° e 95° ⁽⁸⁹⁾.

O cálculo foi realizado através das medidas de fibras de colágeno e fibras elásticas, por meio de um microscópio óptico com auxílio de um analisador de imagens (*Image ProPlus* 4.5.029 for Windows 98/NT/2000), onde a medida de densidade óptica é o método empregado para detecção das fibras. As imagens foram capturadas (aumento de 400x) por uma câmera modelo DFC 420 (Leica, Wetzlar, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico trinocular DM2500 (Leica), e enviadas ao computador onde foram processadas pelo programa *Qwim Plus* (Leica). A análise de imagens foi realizada através do "software" *Image ProPlus* (NIH). Este "software" permite que lhe seja informado um "threshold" dos tons de cores que representam as áreas positivas e assim quantificá-las na área determinada previamente. Para todos os estudos foram analisados dez campos por lâmina dos septos alveolares e três vias aéreas em cada animal. Os resultados foram expressos em porcentagem de área positiva em relação à área total ^(90, 91).

4.13 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 $p < 0,05$.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA MECÂNICA PULMONAR

5.1.1 Resistência do Sistema Respiratório (Rrs)

Houve aumento no grupo EC ($0,81 \pm 0,06$ cmH₂O.mL⁻¹.s) comparativamente ao grupo SAL ($0,65 \pm 0,02$ cmH₂O.mL⁻¹.s), $p < 0,05$. O tratamento preventivo (EP: $0,63 \pm 0,02$ cmH₂O.mL⁻¹.s) e terapêutico (ET: $0,64 \pm 0,02$ cmH₂O.mL⁻¹.s) com anti IL-17 atenuou o aumento da Rrs comparativamente ao grupo EC, $p < 0,05$. (Gráfico 1).

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 1 - Média $\pm$ erro padrão das medidas de resistência do sistema respiratório nos quatro grupos experimentais

5.1.2 Elastância do sistema respiratório (Ers)

Houve aumento de Ers no grupo EC ($43,44 \pm 4,00 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$) comparado ao grupo SAL ($31,08 \pm 1,97 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$), $p < 0,05$. Nos grupos tratados EP e ET houve atenuação do aumento da Ers comparado ao grupo EC ($33,29 \pm 1,13$ e $32,81 \pm 1,43 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectivamente), $p < 0,05$. (Gráfico 2).

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 2 - Média $\pm$ erro padrão das medidas de elastância do sistema respiratório nos quatro grupos experimentais

5.1.3 Resistência das vias aéreas (Raw)

Houve aumento no grupo EC ($0,38 \pm 0,08$ cmH₂O/mL/s) comparativamente ao grupo SAL ($0,18 \pm 0,01$ cmH₂O/mL/s), $p < 0,05$. O tratamento preventivo (EP: $0,18 \pm 0,003$ cmH₂O/mL/s) e terapêutico (ET: $0,17 \pm 0,004$ cmH₂O/mL/s) com anti IL-17 atenuou o aumento da Raw comparativamente ao grupo EC, $p < 0,05$. (Gráfico 3).

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 3 - Média $\pm$ erro padrão das medidas de resistência das vias aéreas nos quatro grupos experimentais

5.1.4 Elastância do tecido pulmonar (Htis)

Houve aumento da Htis no grupo EC ($46,48 \pm 6,78 \text{ cmH}_2\text{O/mL/s}^{(1-\alpha)}$) comparativamente ao grupo SAL ($31,43 \pm 2,29 \text{ cmH}_2\text{O/mL/s}^{(1-\alpha)}$), $p < 0,05$. O tratamento preventivo (EP: $31,72 \pm 1,27 \text{ cmH}_2\text{O/mL/s}^{(1-\alpha)}$) e terapêutico (ET: $31,40 \pm 1,55 \text{ cmH}_2\text{O/mL/s}^{(1-\alpha)}$) com anti IL-17 atenuou o aumento da Htis comparativamente ao grupo EC, $p < 0,05$ (Gráfico 4).

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 4 - Média $\pm$ erro padrão das medidas de elastância do tecido pulmonar nos quatro grupos experimentais

5.1.5 Resistência do parênquima pulmonar (Gtis)

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao Gtis (SAL $6,79 \pm 0,28$, EC $6,43 \pm 0,48$, EP $5,98 \pm 0,19$ e ET $6,32 \pm 0,26$ cmH₂O/mL/s^(1-^a)) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Média $\pm$ erro padrão das medidas de resistência do parênquima pulmonar. Não houve diferença entre os grupos experimentais

A Tabela 2 mostra os efeitos do anti IL-17 sobre a mecânica pulmonar.

Tabela 2 - Efeitos do anti IL-17 na mecânica pulmonar

	SAL	EC	EP	ET
Resistência do sistema respiratório - Rrs (cm H ₂ O.mL ⁻¹ .s)	0,65±0,02	0,81±0,06 *	0,63±0,02 **	0,64±0,02 **
Elastância do sistema respiratório - Ers (cm H ₂ O.mL ⁻¹)	31,08±1,97	43,44±4,00 *	33,29±1,13 **	32,81±1,43 **
Resistência das vias aéreas - Raw (cm H ₂ O/mL/s)	0,18±0,01	0,38±0,08 *	0,18±0,003 **	0,17±0,004 **
Elastância do tecido pulmonar - Htis (cm H ₂ O/mL/s ^(1-α))	31,43±2,29	46,48±6,78 *	31,72±1,27 **	31,40±1,55 **
Resistência do tecido pulmonar - Gtis (cm H ₂ O/mL/s ^(1-α))	6,79±0,28	6,43±0,48	5,98±0,19	6,32±0,26

* p<0,05 comparado ao grupo SAL; ** p<0,05 comparado ao grupo EC

5.2 AVALIAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO EXALADO (NOex)

Houve aumento do NOex no grupo EC ($48,94 \pm 5,57$ ppb) comparativamente ao grupo SAL ($20,81 \pm 4,14$ ppb), $p < 0,05$. O tratamento preventivo (EP: $29,88 \pm 5,33$ ppb) e terapêutico (ET: $26,70 \pm 5,21$ ppb) com anti IL-17 atenuou o aumento do NOex comparativamente ao grupo EC, $p < 0,05$ (Gráfico 6).

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 6 - Média $\pm$ erro padrão das medidas de óxido nítrico exalado nos quatro grupos experimentais

5.3 CONTAGEM DE CÉLULAS DO FLUIDO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (FLBA)

Houve aumento do número de células totais no grupo que recebeu somente elastase (EC $3,57 \pm 0,33 \times 10^4$ céls/ μ L) comparativamente ao grupo SAL ($1,32 \pm 0,21 \times 10^4$ céls/ μ L), $p < 0,05$. O tratamento terapêutico (ET: $2,25 \pm 0,31 \times 10^4$ céls/ μ L) com anti IL-17 atenuou o aumento dessas células comparativamente ao grupo EC, $p < 0,05$. Não houve diferença entre o grupo preventivo (EP: $3,54 \pm 0,36 \times 10^4$ céls/ μ L) e EC (Gráfico7).

Do mesmo modo, ao fazer a contagem diferencial de células quantificadas do FLBA, foi observado um aumento no número de macrófagos no grupo EC ($3,45 \pm 0,44 \times 10^4$ céls/ μ L) comparado ao grupo SAL ($0,97 \pm 0,11 \times 10^4$ céls/ μ L), $p < 0,05$ (Gráfico 8). O tratamento terapêutico (ET: $2,20 \pm 0,33 \times 10^4$ céls/ μ L) atenuou o aumento dessas células comparativamente ao grupo EC, $p < 0,05$. Não houve diferença entre o grupo preventivo (EP: $3,30 \pm 0,27 \times 10^4$ céls/ μ L) e EC. Também não houve diferença quanto à contagem de neutrófilos e linfócitos (Gráficos 9 e 10), e não foram observados eosinófilos em nenhum dos quatro grupos.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL. ** $p < 0,05$ comparado aos grupos EC e EP.

Gráficos 7 e 8 - Média $\pm$ erro padrão quanto às células totais e macrófagos no FLBA.

Gráficos 9 e 10 - Média $\pm$ erro padrão com relação à quantificação de neutrófilos e linfócitos no FLBA. Não houve diferença significativa entre os grupos

5.4 INTERCEPTO LINEAR MÉDIO (Lm)

O Gráfico 11 mostra que o Lm está aumentado no grupo EC ($62,85 \pm 1,73 \mu\text{m}$) comparado ao grupo SAL ($50,95 \pm 1,10 \mu\text{m}$), $p < 0,05$. Houve diminuição do Lm nos grupos EP ($57,22 \pm 1,63 \mu\text{m}$) e ET ($57,76 \pm 1,28 \mu\text{m}$) comparativamente ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 9 mostra a diferença do Lm entre os quatro grupos experimentais através de fotomicrografias feitas em aumento de 400x.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 11 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao intercepto linear médio (Lm)

Figura 9 - Fotomicrografias mostrando o efeito do anti IL-17 no intercepto linear médio. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20 μ m

5.5 EFEITOS DO ANTI IL-17 SOBRE O FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF-kb EM VIAS AÉREAS E SEPTOS ALVEOLARES

O Gráfico 12 mostra o número de células positivas para NF-kb nas vias aéreas dos grupos experimentais. Houve um aumento no número células NF-kb positivas no grupo EC ($3,94 \pm 0,50$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($1,23 \pm 0,27$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Os grupos tratados apresentaram diminuição no número de células positivas para NF-kb comparados ao grupo EC (EP: $2,15 \pm 0,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e ET: $1,71 \pm 0,34$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. A Figura 10 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para NF-kb em vias aéreas nos grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 12 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para NF-kb em vias aéreas

Figura 10 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para NF-kb em vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20µm

O Gráfico13 mostra o número de células positivas para NF-kb nos septos alveolares dos grupos experimentais. Houve um aumento desse número no grupo EC ($7,79 \pm 0,34$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($3,58 \pm 0,28$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Os grupos tratados apresentaram diminuição no número de células positivas para NF-kb comparados ao grupo EC (EP: $4,12 \pm 0,32$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e ET: $3,29 \pm 0,26$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. A Figura 11 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para NF-kb nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 13 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para NF-kb nos septos alveolares

Figura 11 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para NF-kb nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20μm

5.6 EFEITOS DO ANTI IL-17 NA INFLAMAÇÃO PULMONAR

5.6.1 IL-17 em vias aéreas e septos alveolares

Os animais do grupo EC apresentaram aumento das células positivas para IL-17 nas vias aéreas comparado ao grupo SAL ($7,02 \pm 0,97$ e $3,28 \pm 0,54$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ respectivamente), $p < 0,05$. Houve atenuação nos grupos EP ($1,87 \pm 0,37$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ET ($1,90 \pm 0,37$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo EC, $p < 0,05$ (Gráfico 14). A Figura 12 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para IL-17 nas vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 14 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para IL-17 em vias aéreas

Figura 12 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para IL-17 em vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20µm

O Gráfico 15 mostra que os animais do grupo EC ($15,10 \pm 1,28$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentaram aumento das células positivas para IL-17 nos septos alveolares comparado ao grupo SAL ($6,76 \pm 0,29$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Houve atenuação nos grupos tratados EP ($6,39 \pm 0,33$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ET ($5,33 \pm 0,26$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 13 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para IL-17 nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 15 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para IL-17 nos septos alveolares

Figura 13 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para IL-17 nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20μm

5.6.2 IL-1 β em vias aéreas e septos alveolares

Os animais do grupo EC apresentaram aumento das células positivas para IL-1 β nas vias aéreas comparado ao grupo SAL ($5,87 \pm 0,35$ e $1,33 \pm 0,30$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ respectivamente), $p < 0,05$. Houve atenuação significativa nos grupos EP ($2,40 \pm 0,58$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ET ($1,40 \pm 0,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo EC, $p < 0,05$ (Gráfico 16). A Figura 14 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para IL-1 β nas vias aéreas nos quatro grupos experimentais

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 16 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para IL-1 β em vias aéreas

Figura 14 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para IL-1 β em vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20 μ m

O Gráfico 17 mostra que os animais do grupo EC ($6,22 \pm 0,29$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentaram aumento das células positivas para IL-1 β nos septos alveolares comparado ao grupo SAL ($3,06 \pm 0,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Houve atenuação em ambos os grupos tratados (EP: $3,76 \pm 0,45$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, e ET: $3,05 \pm 0,30$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 15 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para IL-1 β nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC

Gráfico 17 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para IL-1 β nos septos alveolares.

Figura 15 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para IL-1 β nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20 μ m

5.6.3 IL-8 em vias aéreas e septos alveolares

Os animais do grupo EC apresentaram aumento das células positivas para IL-8 nas vias aéreas comparado ao grupo SAL ($8,78 \pm 0,18$ e $5,09 \pm 0,18$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ respectivamente), $p < 0,05$. Houve diferença significativa em ambos os grupos tratados com anti IL-17 (EP: $6,35 \pm 0,22$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, e ET: $6,10 \pm 0,26$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo EC, $p < 0,05$ (Gráfico 18). A Figura 16 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para IL-8 nas vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC

Gráfico 18 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para IL-8 em vias aéreas

Figura 16 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para IL-8 em vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20µm

O Gráfico 19 mostra que os animais do grupo EC ($7,49 \pm 0,14$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentaram aumento das células positivas para IL-8 nos septos alveolares comparados ao grupo SAL ($5,23 \pm 0,14$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Houve atenuação significativa nos grupos EP ($5,93 \pm 0,20$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ET ($6,12 \pm 0,20$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 17 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para IL-8 nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC

Gráfico 19 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para IL-8 nos septos alveolares.

Figura 17 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para IL-8 nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20μm

5.6.4 TNF- α em vias aéreas e septos alveolares

Os animais do grupo EC apresentaram aumento das células positivas para TNF- α nas vias aéreas comparado ao grupo SAL ($3,53 \pm 0,38$ e $0,57 \pm 0,17$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ respectivamente), $p < 0,05$. Houve atenuação significativa nos grupos EP ($0,70 \pm 0,22$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ET ($1,20 \pm 0,26$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo EC, $p < 0,05$ (Gráfico 20). A Figura 18 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para TNF- α nas vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC

Gráfico 20 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para TNF- α em vias aéreas.

Figura 18 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para TNF- α em vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pela seta vermelha. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20 μ m

Os animais do grupo EC apresentaram aumento das células positivas para TNF- α nos septos alveolares comparado ao grupo SAL ($4,78 \pm 0,25$ e $1,81 \pm 0,17$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ respectivamente), $p < 0,05$. Houve atenuação significativa nos grupos EP ($1,72 \pm 0,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ET ($2,03 \pm 0,18$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo EC, $p < 0,05$ (Gráfico 21). A Figura 19 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para TNF- α nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC

Gráfico 21 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para TNF- α nos septos alveolares.

Figura 19 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para TNF- α nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20μm

5.6.5 Neutrófilos em vias aéreas e septos alveolares

Os animais do grupo EC apresentaram aumento dos neutrófilos nas vias aéreas comparado ao grupo SAL ($3,93 \pm 0,24$ e $2,33 \pm 0,24$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ respectivamente), $p < 0,05$. Houve atenuação significativa nos grupos EP ($2,68 \pm 0,23$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ET ($2,69 \pm 0,16$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo EC, $p < 0,05$ (Gráfico 22). A Figura 20 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação dos neutrófilos nas vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC

Gráfico 22 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de neutrófilos em vias aéreas.

Figura 20 - Fotomicrografias com a marcação de neutrófilos em vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As marcações estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20µm

Os animais do grupo EC apresentaram aumento dos neutrófilos nos septos alveolares comparado ao grupo SAL ($4,98 \pm 0,19$ e $2,93 \pm 0,12$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ respectivamente), $p < 0,05$. Houve atenuação significativa nos grupos EP ($3,46 \pm 0,11$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ET ($3,07 \pm 0,09$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo EC, $p < 0,05$ (Gráfico 23). A Figura 21 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação dos neutrófilos nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC

Gráfico 23 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de neutrófilos nos septos alveolares

Figura 21 - Fotomicrografias com a marcação de neutrófilos nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As marcações estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20μm

A Tabela 3 mostra os efeitos do anti IL-17 na inflamação em vias aéreas.

Tabela 3 - Efeitos do anti IL-17 na inflamação pulmonar – vias aéreas

MARCADOR	LOCAL	SAL	EC	EP	ET
IL-17 (células positivas/ $10^4\mu\text{m}^2$)	VA	3,28 $\pm$ 0,54	7,02 $\pm$ 0,97 *	1,87 $\pm$ 0,37 **	1,90 $\pm$ 0,37 **
IL-1 β (células positivas/ $10^4\mu\text{m}^2$)	VA	1,33 $\pm$ 0,30	5,87 $\pm$ 0,35 *	2,40 $\pm$ 0,58 **	1,40 $\pm$ 0,21 **
IL-8 (células positivas/ $10^4\mu\text{m}^2$)	VA	5,09 $\pm$ 0,18	8,78 $\pm$ 0,18 *	6,35 $\pm$ 0,22 * **	6,10 $\pm$ 0,26 8 * **
TNF- α (células positivas/ $10^4\mu\text{m}^2$)	VA	0,57 $\pm$ 0,17	3,33 $\pm$ 0,38 *	0,70 $\pm$ 0,22 **	1,20 $\pm$ 0,26 **
Neutrófilos ($\times 10^4\mu\text{m}^2$)	VA	2,33 $\pm$ 0,24	3,93 $\pm$ 0,24 *	2,68 $\pm$ 0,23 **	2,69 $\pm$ 0,16 **

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

A Tabela 4 mostra os efeitos do anti IL-17 na inflamação nos septos alveolares.

Tabela 4 - Efeitos do anti IL-17 na inflamação pulmonar – septos alveolares

MARCADOR	LOCAL	SAL	EC	EP	ET
IL-17 (células positivas/ $10^4\mu\text{m}^2$)	Septos Alveolares	6,76 $\pm$ 0,29	15,10 $\pm$ 1,28 *	6,39 $\pm$ 0,33 **	5,33 $\pm$ 0,26 **
IL-1 β (células positivas/ $10^4\mu\text{m}^2$)	Septos Alveolares	3,06 $\pm$ 0,39	6,22 $\pm$ 0,29 *	3,76 $\pm$ 0,45 **	3,05 $\pm$ 0,30 **
IL-8 (células positivas/ $10^4\mu\text{m}^2$)	Septos Alveolares	5,23 $\pm$ 0,14	7,49 $\pm$ 0,14 *	5,93 $\pm$ 0,20 * **	6,12 $\pm$ 0,20 * **
TNF- α (células positivas/ $10^4\mu\text{m}^2$)	Septos Alveolares	1,81 $\pm$ 0,17	4,78 $\pm$ 0,25 *	1,72 $\pm$ 0,21**	2,03 $\pm$ 0,18 **
Neutrófilos ($\times 10^4\mu\text{m}^2$)	Septos Alveolares	2,93 $\pm$ 0,12	4,98 $\pm$ 0,19 *	3,46 $\pm$ 0,11 * **	3,07 $\pm$ 0,09 **

* p<0,05 comparado ao grupo SAL; ** p<0,05 comparado ao grupo EC.

5.7 EFEITOS DO ANTI IL-17 SOBRE O REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR EM VIAS AÉREAS E SEPTOS ALVEOLARES

5.7.1 Fibras colágenas em vias aéreas e septos alveolares

A fração de volume de fibras colágenas nas vias aéreas está mostrada no Gráfico 24. Houve um aumento de fibras colágenas nas vias aéreas do grupo EC ($36,22 \pm 1,84\%$) comparativamente ao grupo SAL ($30,09 \pm 1,27\%$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais com anti IL-17 nos grupos EP ($30,58 \pm 1,00\%$) e ET ($30,93 \pm 1,48\%$) atenuou essa resposta nas vias aéreas quando comparado ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 22 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a porcentagem de fibras colágenas nas vias aéreas dos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 24 - Média $\pm$ erro padrão com relação à porcentagem de fibras colágenas em vias aéreas

Figura 22 - Fotomicrografias com a porcentagem de fibras colágenas em vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. A área aumentada está indicada pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20μm

A fração de volume de fibras colágenas nos septos alveolares está mostrada no Gráfico 25. Houve aumento nos septos alveolares no grupo EC ($16,12 \pm 0,67\%$) comparativamente ao grupo SAL ($13,77 \pm 0,72\%$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais com anti IL-17 no grupo EP ($13,53 \pm 0,43\%$) atenuou essa resposta quando comparado ao grupo EC, $p < 0,05$. Não houve diferença entre o grupo ET ($15,43 \pm 0,64\%$) comparado ao grupo EC. A Figura 23 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a porcentagem de fibras colágenas nos septos alveolares dos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 25 - Média $\pm$ erro padrão com relação à porcentagem de fibras colágenas nos septos alveolares

Figura 23 - Fotomicrografias com a porcentagem de fibras colágenas nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. A área aumentada está indicada pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20µm

5.7.2 Fibras elásticas em vias aéreas e septos alveolares

A fração de volume de fibras elásticas nas vias aéreas está mostrada no Gráfico 26. Houve aumento de fibras elásticas nas vias aéreas no grupo EC ($7,68 \pm 0,62\%$) comparativamente ao grupo SAL ($5,44 \pm 0,29\%$), $p < 0,05$. Não houve diferença no tratamento dos animais com anti IL-17 nos grupos EP ($6,55 \pm 0,35\%$) e ET ($7,22 \pm 0,42\%$) comparados ao grupo EC. A Figura 24 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a porcentagem de fibras elásticas em vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL.

Gráfico 26 - Média $\pm$ erro padrão com relação à fração de volume de fibras elásticas em vias aéreas

Figura 24 - Fotomicrografias com a porcentagem de fibras elásticas nas vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. A área aumentada está indicada pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20µm

A fração de volume de fibras elásticas nos septos alveolares está mostrada no Gráfico 27. Houve aumento de fibras elásticas nos septos alveolares no grupo EC ($34,73 \pm 0,69\%$) comparativamente ao grupo SAL ($31,11 \pm 1,01\%$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais com anti IL-17 nos grupos EP ($27,46 \pm 0,49\%$) e ET ($31,46 \pm 0,44\%$) atenuou essa resposta quando comparado ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 25 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a porcentagem de fibras elásticas nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 27 - Média $\pm$ erro padrão com relação à porcentagem de fibras elásticas nos septos alveolares

Figura 25 - Fotomicrografias com a porcentagem de fibras elásticas nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. A área aumentada está indicada pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20µm

5.7.3 Fibronectina em vias aéreas e septos alveolares

A fração de volume de fibronectina nas vias aéreas está mostrada no Gráfico 28. Não houve diferença significativa entre os grupos (SAL $0,36 \pm 0,11\%$, EC $0,54 \pm 0,21\%$, EP $1,48 \pm 0,44\%$, ET $1,33 \pm 0,47\%$). A Figura 26 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a porcentagem de fibronectina em vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

Gráfico 28 - Média $\pm$ erro padrão com relação à porcentagem de fibronectina nas vias aéreas. Não houve diferença entre os grupos experimentais

Figura 26 - Fotomicrografias com a porcentagem de fibronectina nas vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. Não houve diferença entre os grupos experimentais. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20µm

A fração de volume de fibronectina nos septos alveolares está mostrada no Gráfico 29. Houve aumento de fibronectina nos septos alveolares no grupo EC ($0,77 \pm 0,13\%$) comparativamente ao grupo SAL ($0,13 \pm 0,02\%$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais com anti IL-17 nos grupos EP ($0,07 \pm 0,01\%$) e ET ($0,08 \pm 0,01\%$) atenuou essa resposta quando comparado ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 27 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a porcentagem de fibronectina nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

* $p<0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p<0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 29 - Média $\pm$ erro padrão com relação à porcentagem de fibronectina nos septos alveolares

Figura 27 - Fotomicrografias com a porcentagem de fibronectina nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. A área aumentada está indicada pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20µm

5.7.4 Decorina em vias aéreas e septos alveolares

A fração de volume de decorina nas vias aéreas está mostrada no Gráfico 30. Houve aumento de decorina no grupo EC ($9,98 \pm 1,49\%$) comparativamente ao grupo SAL ($3,23 \pm 0,99\%$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais com anti IL-17 nos grupos EP ($4,25 \pm 1,54\%$) e ET ($3,20 \pm 0,46\%$) atenuou essa resposta quando comparado ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 28 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a fração de volume de decorina nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 30 - Média $\pm$ erro padrão com relação à porcentagem de decorina em vias aéreas

Figura 28 - Fotomicrografias com a porcentagem de decorina nas vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. A área aumentada está indicada pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20μm

A fração de volume de decorina nos septos alveolares está mostrada no Gráfico 31. Não houve diferença significativa entre os quatro grupos experimentais (SAL $2,83 \pm 0,49\%$, EC $5,16 \pm 1,40\%$, EP $3,59 \pm 1,03\%$, ET $3,54 \pm 0,47\%$). A Figura 29 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a fração de volume de decorina nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

Gráfico 31 - Média $\pm$ erro padrão com relação à porcentagem de decorina nos septos alveolares. Não houve diferença entre os grupos experimentais

Figura 29 - Fotomicrografias com a porcentagem de decorina nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. Não houve diferença entre os grupos experimentais. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20µm

5.7.5 Lumican em vias aéreas e septos alveolares

A fração de volume de lumican nas vias aéreas está mostrada no Gráfico 32. Houve aumento de lumican no grupo EC ($2,85 \pm 0,20\%$) comparativamente ao grupo SAL ($1,78 \pm 0,16\%$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais com anti IL-17 nos grupos EP ($2,10 \pm 0,21\%$) e ET ($2,02 \pm 0,16\%$) atenuou essa resposta quando comparado ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 30 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a fração de volume de lumican em vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 32 - Média $\pm$ erro padrão com relação à porcentagem de lumican em vias aéreas

Figura 30 - Fotomicrografias com a porcentagem de lumican nas vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. A área aumentada está indicada pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20µm

A fração de volume de lumican nos septos alveolares está mostrada no Gráfico 33. Houve aumento de lumican no grupo EC ($4,27 \pm 0,29\%$) comparativamente ao grupo SAL ($2,88 \pm 0,12\%$), $p < 0,05$. Não houve diferença significativa com o tratamento dos animais com anti IL-17 nos grupos EP ($3,93 \pm 0,12\%$) e ET ($3,62 \pm 0,16\%$). A Figura 31 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a fração de volume de lumican nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

Gráfico 33 - Média $\pm$ erro padrão com relação à porcentagem de lumican nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL

Figura 31 - Fotomicrografias com a porcentagem de lumican nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. A área aumentada está indicada pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20 μ m

5.7.6 Biglicano em vias aéreas e septos alveolares

A fração de volume de biglicano nas vias aéreas está mostrada no Gráfico 34. Houve um aumento na porcentagem de biglicano no grupo EC ($7,68 \pm 1,66\%$) comparativamente ao grupo SAL ($1,76 \pm 0,56\%$), $p < 0,05$. O tratamento com anti IL-17 atenuou essa resposta no grupo EP ($2,59 \pm 1,10\%$), $p < 0,05$. Não houve resposta significativa ao tratamento no grupo ET ($4,47 \pm 1,53\%$). A Figura 32 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a fração de volume para biglicano em vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 34 - Média $\pm$ erro padrão com relação à porcentagem de biglicano nas vias aéreas

Figura 32 - Fotomicrografias com a porcentagem de biglicano nas vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. A área aumentada está indicada pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20 µm

A fração de volume de biglicano nos septos alveolares está mostrada no Gráfico 35. Houve um aumento na porcentagem de biglicano no grupo EC ($8,51 \pm 0,86\%$) comparativamente ao grupo SAL ($3,98 \pm 0,91\%$), $p < 0,05$. Não houve resposta significativa ao tratamento com anti IL-17 nos grupos EP ($8,50 \pm 0,97\%$) e ET ($6,35 \pm 1,01\%$). A Figura 33 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a fração de volume de biglicano nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL.

Gráfico 35 - Média $\pm$ erro padrão com relação à porcentagem de biglicano nos septos alveolares

Figura 33 - Fotomicrografias com a porcentagem de biglicano nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. A área aumentada está indicada pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20 μ m

5.7.7 MMP9 em vias aéreas e septos alveolares

O número de células positivas para MMP9 nas vias aéreas está mostrado no Gráfico 36. Houve um aumento no número de células positivas para MMP9 no grupo EC ($13,66 \pm 1,03$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo SAL ($9,21 \pm 0,59$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento com anti IL-17 atenuou essa resposta em ambos os grupos (EP: $8,94 \pm 0,56$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, ET: $10,55 \pm 0,52$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. A Figura 34 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para MMP9 em vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 36 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para MMP9 em vias aéreas

Figura 34 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para MMP9 em vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20μm

O número de células positivas para MMP9 nos septos alveolares está mostrado no Gráfico 37. Houve um aumento no número de células positivas para MMP9 no grupo EC ($16,87 \pm 0,66$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo SAL ($10,63 \pm 0,33$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento com anti IL-17 atenuou essa resposta em ambos os grupos (EP: $10,54 \pm 0,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e ET: $14,26 \pm 0,43$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. A Figura 35 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para MMP9 nos septos alveolares dos quatro grupos experimentais.

*p<0,05 comparado com o grupo SAL; ** p<0,05 comparado ao grupo EC.

Gráfico 37 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para MMP9 nos septos alveolares

Figura 35 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para MMP9 nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20μm

5.7.8 MMP12 em vias aéreas e septos alveolares

O número de células positivas para MMP12 nas vias aéreas está mostrado no Gráfico 38. Houve um aumento no número de células positivas nas vias aéreas para MMP12 no grupo EC ($10,32 \pm 1,50$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo SAL ($2,86 \pm 0,70$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento com anti IL-17 atenuou essa resposta em ambos os grupos (EP: $5,94 \pm 0,92$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e ET: $5,42 \pm 0,92$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. A Figura 36 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para MMP12 em vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC

Gráfico 38 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para MMP12 em vias aéreas

Figura 36 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para MMP12 em vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20µm

O número de células positivas para MMP12 nos septos alveolares está mostrado no Gráfico 39. Houve um aumento no número de células positivas para MMP12 no grupo EC ($9,24 \pm 0,95$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo SAL ($5,45 \pm 0,74$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento com anti IL-17 atenuou essa resposta em ambos os grupos (EP: $6,25 \pm 0,55$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e ET: $5,83 \pm 0,80$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 37 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para MMP12 nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 39 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para MMP12 nos septos alveolares

Figura 37 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para MMP12 nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20μm

5.7.9 TIMP-1 em vias aéreas e septos alveolares

O número de células positivas para TIMP-1 em vias aéreas está mostrado no Gráfico 40. Não houve diferença significativa entre os grupos (SAL $1,45 \pm 0,51$, EC $3,03 \pm 1,31$, EP $3,16 \pm 0,25$, ET $2,45 \pm 1,05$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$). A Figura 38 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para TIMP-1 nas vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

Gráfico 40 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para TIMP-1 em vias aéreas. Não houve diferença entre os grupos

Figura 38 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para TIMP-1 em vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. Não houve diferença entre os grupos experimentais. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20μm

O número de células positivas para TIMP-1 nos septos alveolares está mostrado no Gráfico 41. Não houve diferença significativa entre os grupos (SAL $2,74 \pm 0,75$, EC $3,16 \pm 0,61$, EP $3,45 \pm 0,68$, ET $2,18 \pm 0,52$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$). A Figura 39 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para TIMP-1 nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

Gráfico 41 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para TIMP-1 nos septos alveolares. Não houve diferença entre os grupos

Figura 39 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para TIMP-1 nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. Não houve diferença entre os grupos experimentais. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20μm

5.7.10 TGF- β em vias aéreas e septos alveolares

O número de células positivas para TGF- β em vias aéreas está mostrado no Gráfico 42. Houve um aumento no número de células positivas para TGF- β no grupo EC ($6,79 \pm 0,70$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo SAL ($0,83 \pm 0,10$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento com anti IL-17 atenuou essa resposta em ambos os grupos (EP: $1,35 \pm 0,30$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e ET: $1,22 \pm 0,26$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 40 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para TGF- β em vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 42 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para TGF- β em vias aéreas

Figura 40 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para TGF- β em vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pela seta vermelha. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20 μ m

O número de células positivas para TGF- β nos septos alveolares está mostrado no Gráfico 43. Houve um aumento no número de células positivas para TGF- β no grupo EC ($6,83 \pm 0,59$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo SAL ($1,83 \pm 0,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento com anti IL-17 atenuou essa resposta em ambos os grupos (EP: $2,62 \pm 0,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e ET: $2,65 \pm 0,23$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 41 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para TGF- β nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 43 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para TGF- β nos septos alveolares

Figura 41 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para TGF- β nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20 μ m

A Tabela 5 mostra os efeitos do anti IL-17 sobre o remodelamento em vias aéreas.

Tabela 5 - Efeitos do anti IL-17 sobre o remodelamento – vias aéreas

MARCADOR	LOCAL	SAL	EC	EP	ET
Fibras elásticas (%)	VA	5,44±0,29	7,68±0,62 *	6,55±0,35	7,22±0,42 *
Fibras colágenas (%)	VA	30,09±1,27	36,22±1,84 *	30,58±1,00 **	30,93±1,48 **
Biglicano (%)	VA	1,76±0,56	7,68±1,66 *	2,59±1,10 **	4,47±1,53
Decorina (%)	VA	3,23±0,99	9,98±1,49 *	4,25±1,54 **	3,20±0,46 **
Fibronectina (%)	VA	0,36±0,11	0,54±0,21	1,48±0,44	1,33±0,47
Lumican (%)	VA	1,78±0,16	2,85±0,20 *	2,10±0,21 **	2,02±0,16 **
MMP9 (células positivas/10 ⁴ µm ²)	VA	9,21±0,59	13,66±1,03 *	8,94±0,56 **	10,55±0,52 **
MMP12 (células positivas/10 ⁴ µm ²)	VA	2,86±0,70	10,32±1,50 *	5,94±0,92 **	5,42±0,92 **
TGF-β (células positivas/10 ⁴ µm ²)	VA	0,83±0,10	6,79±0,70 *	1,35±0,30 **	1,22±0,26 **
TIMP-1 (células positivas/10 ⁴ µm ²)	VA	1,45±0,51	3,03±1,31	3,16±0,25	2,45±1,05

*p<0,05 comparado ao grupo SAL; ** p<0,05 comparado ao grupo EC

A Tabela 6 mostra os efeitos do anti IL-17 sobre o remodelamento nos septos alveolares.

Tabela 6 - Efeitos do anti IL-17 sobre o remodelamento pulmonar – septos alveolares

MARCADOR	LOCAL	SAL	EC	EP	ET
Fibras elásticas (%)	Septos alveolares	31,11±1,01	34,73±0,69 *	27,46±0,49 * **	31,46±0,44 **
Fibras colágenas (%)	Septos alveolares	13,77±0,72	16,12±0,67 *	13,53±0,43 **	15,43±0,64
Biglicano (%)	Septos alveolares	3,98±0,91	8,51±0,86 *	8,50±0,97 *	6,35±1,01
Decorina (%)	Septos alveolares	2,83±0,49	5,16±1,40	3,59±1,03	3,54±0,47
Fibronectina (%)	Septos alveolares	0,13±0,02	0,77±0,13 *	0,07±0,01 **	0,08±0,01 **
Lumican (%)	Septos alveolares	2,88±0,12	4,27±0,29 *	3,93±0,12 *	3,62±0,16 *
MMP9 (células positivas/10 ⁴ µm ²)	Septos alveolares	10,63±0,33	16,87±0,66 *	10,54±0,39 **	14,26±0,43 * **
MMP12 (células positivas/10 ⁴ µm ²)	Septos alveolares	5,45±0,74	9,24±0,95 *	6,25±0,55 **	5,83±0,80 **
TGF-β (células positivas/10 ⁴ µm ²)	Septos alveolares	1,83±0,21	6,83±0,59 *	2,62±0,21 **	2,65±0,23 **
TIMP-1 (células positivas/10 ⁴ µm ²)	Septos alveolares	2,74±0,75	3,16±0,61	3,45±0,68	2,18±0,52

* p<0,05 comparado ao grupo SAL; ** p<0,05 comparado ao grupo EC

5.8 EFEITOS DO ANTI IL- 17 SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO

5.8.1 iNOS em vias aéreas e septos alveolares

O número de células positivas para iNOS nas vias aéreas está mostrado no Gráfico 44. Houve um aumento no número de células positivas no grupo EC ($9,53 \pm 1,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo SAL ($2,46 \pm 0,56$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento preventivo e terapêutico com anti IL-17 atenuou essa resposta (EP: $5,17 \pm 0,73$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e ET: $4,49 \pm 0,75$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 42 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para iNOS em vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 44 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para iNOS em vias aéreas

Figura 42 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para iNOS em vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20µm

O número de células positivas para iNOS nos septos alveolares está mostrado no Gráfico 45. Houve um aumento no número de células positivas para iNOS no grupo EC ($12,89 \pm 1,14$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo SAL ($5,04 \pm 0,55$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento com anti IL-17 atenuou essa resposta nos dois grupos (EP: $9,86 \pm 0,61$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e ET: $8,21 \pm 0,67$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparados ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 43 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para iNOS nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 45 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para iNOS nos septos alveolares

Figura 43 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para iNOS nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20μm

5.8.2 eNOS em vias aéreas e septos alveolares

O número de células positivas para eNOS nas vias aéreas está mostrado no Gráfico 46. Houve um aumento no número de células positivas no grupo EC ($3,39 \pm 0,45$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo SAL ($1,32 \pm 1,19$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Houve melhora significativa no tratamento com anti IL-17 no grupo ET ($1,14 \pm 0,13$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo EC, $p < 0,05$. Não houve resposta significativa no grupo EP ($2,32 \pm 0,29$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$). A Figura 44 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para eNOS em vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EP

Gráfico 46 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para eNOS nas vias aéreas

Figura 44 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para eNOS em vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20µm

O número de células positivas para eNOS nos septos alveolares está mostrado no Gráfico 47. Houve um aumento no número de células positivas para eNOS no grupo EC ($3,35 \pm 0,35$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo SAL ($1,58 \pm 0,12$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Não houve diferença significativa com o tratamento com anti IL-17 em nenhum dos dois grupos terapêuticos (EP: $2,65 \pm 0,28$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, e ET: $2,56 \pm 0,23$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparados ao grupo EC. A Figura 45 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a marcação das células positivas para eNOS nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL

Gráfico 47 - Média $\pm$ erro padrão com relação ao número de células positivas para eNOS nos septos alveolares

Figura 45 - Fotomicrografias com a marcação das células positivas para eNOS nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. As áreas positivas estão indicadas pelas setas vermelhas (não houve diferença entre os grupos EP e ET comparados ao grupo EC). As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20μm

5.8.3 Isoprostano 8-iso-PGF-2 α em vias aéreas e septos alveolares

A fração de volume de isoprostano 8-iso-PGF-2 α nas vias aéreas está mostrado no Gráfico 48. Houve um aumento na fração de volume no grupo EC (15,82 $\pm$ 2,46%) comparativamente ao grupo SAL (9,44 $\pm$ 1,37%), $p < 0,05$. Houve melhora significativa no tratamento com anti IL-17 nos grupos EP (4,23 $\pm$ 0,71%) e ET (5,28 $\pm$ 1,51%) comparativamente ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 46 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a fração de volume de isoprostano 8-iso-PGF-2 α em vias aéreas nos quatro grupos experimentais.

. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo EC.

Gráfico 48 - Média $\pm$ erro padrão com relação à fração de volume de isoprostano 8-iso-PGF-2 α nas vias aéreas

Figura 46 - Fotomicrografias com a porcentagem de isoprostano 8-iso-PGF-2 α nas vias aéreas. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. A área aumentada está indicada pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20 μ m

A fração de volume de isoprostano 8-iso-PGF-2 α nos septos alveolares está mostrado no Gráfico 49. Houve um aumento na fração de volume no grupo EC ($4,97 \pm 0,63\%$) comparativamente ao grupo SAL ($2,49 \pm 0,22\%$), $p < 0,05$. Houve melhora significativa no tratamento com anti IL-17 nos grupos EP ($1,42 \pm 0,13\%$) e ET ($1,03 \pm 0,11\%$) comparativamente ao grupo EC, $p < 0,05$. A Figura 47 mostra fotomicrografias em aumento de 400x com a fração de volume de isoprostano 8-iso-PGF-2 α nos septos alveolares nos quatro grupos experimentais.

*p<0,05 comparado ao grupo SAL; ** p<0,05 comparado ao grupo EP

Gráfico 49 - Média $\pm$ erro padrão com relação à fração de volume de isoprostanos 8-iso-PGF-2 α nos septos alveolares

Figura 47 - Fotomicrografias com a porcentagem de isoprostanos 8-iso-PGF-2 α nos septos alveolares. A- grupo SAL; B- grupo EC; C- grupo EP; D- grupo ET. A área aumentada está indicada pelas setas vermelhas. As imagens são apresentadas em aumento de 400x, escala=20 μ m

A Tabela 7 mostra os efeitos do anti IL-17 sobre o estresse oxidativo em vias aéreas.

Tabela 7 - Efeitos do anti IL-17 sobre o estresse oxidativo – vias aéreas

MARCADOR	LOCAL	SAL	EC	EP	ET
eNOS (células positivas/ $10^4\mu\text{m}^2$)	VA	1,32±1,19	3,39±0,45 *	2,32±0,29 *	1,14±0,13 **
iNOS (células positivas/ $10^4\mu\text{m}^2$)	VA	2,46±0,56	9,53±1,15 *	5,17±0,73 **	4,49±0,75 **
Isoprostano 8-iso- PGF-2 α (%)	VA	9,44±1,37	15,82±2,46 *	4,23±0,71 **	5,28±1,51 **

* p<0,05 comparado ao grupo SAL; ** p<0,05 comparado ao grupo EC

A Tabela 8 mostra os efeitos do anti IL-17 sobre o estresse oxidativo nos septos alveolares.

Tabela 8 - Efeitos do anti IL-17 sobre o estresse oxidativo – septos alveolares

MARCADOR	LOCAL	SAL	EC	EP	ET
eNOS (células positivas/ $10^4\mu\text{m}^2$)	Septos alveolares	1,58±0,12	3,35±0,35 *	2,65±0,28	2,56±0,23
iNOS (células positivas/ $10^4\mu\text{m}^2$)	Septos alveolares	5,04±0,55	12,89±1,14 *	9,86±0,61 * **	8,21±0,67 * **
Isoprostano 8-iso- PGF-2 α (%)	Septos alveolares	2,49±0,22	4,97±0,63 *	1,42±0,13 **	1,03±0,11 **

* p<0,05 comparado ao grupo SAL; ** p<0,05 comparado ao grupo EC.

A Tabela 9 mostra um resumo dos resultados do tratamento com anti IL-17.

Tabela 9 - Resultados dos marcadores no tratamento preventivo e terapêutico com anti IL-17

	VA	Septos Alveolares		VA	Septos Alveolares
Lm	x	x	MMP 9	x	x
NF-kb	x	x	MMP 12	x	x
IL-1 β	x	x	Fibras colágenas	x	o
IL-17	x	x	Fibras elásticas	-	x
IL-8	x	x	Lumican	x	-
TNF- α	x	x	Decorina	x	*
Neutrófilo	x	x	Fibronectina	*	x
iNOS	x	x	Biglicano	o	-
Isoprostano	x	x	eNOS	#	-
TGF- β	x	x	TIMP-1	*	*

x: preventivo e terapêutico; o: somente preventivo; #: somente terapêutico; *: sem alteração entre os grupos; - : sem melhora

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da abordagem preventiva e terapêutica da administração do anticorpo monoclonal anti IL-17 na lesão pulmonar induzida pela elastase em camundongos C57Bl6. Em relação ao modelo experimental, nos animais que receberam apenas elastase intra-traqueal houve aumento da resistência e elastância do sistema respiratório, da resistência das vias aéreas e elastância do tecido pulmonar, do NO exalado, das células totais e macrófagos do fluido do lavado broncoalveolar, aumento do intercepto linear médio, aumento do número de células positivas para NF-kb, IL-17, IL-1 β , IL-8, TNF- α , neutrófilo, MMP9, MMP12, TGF- β , eNOS, iNOS, e aumento da fração de volume de fibras colágenas e elásticas, lumican, biglicano e isoprostano 8-iso-PGF-2 α em vias aéreas e nos septos alveolares, aumento de decorina em vias aéreas e fibronectina em septos alveolares, comparativamente ao grupo salina.

Cabe ressaltar que neste modelo de elastase intra-traqueal encontramos resultados semelhantes aos anteriormente verificados ⁽⁵⁷⁻⁶⁰⁾. No entanto, estudos com elastase intranasal e doses diferentes de elastase mostraram resultados diferentes em relação à resposta de mecânica pulmonar ^(92, 93).

Nesse sentido, Ito et al. administraram elastase pancreática porcina em camundongos por nebulização e avaliaram a mecânica pulmonar. Os

autores mostraram diminuição na elastância do sistema respiratório e sugeriram que o remodelamento anormal do colágeno desempenha um papel importante na função pulmonar e nas forças mecânicas associadas ao enfisema ⁽⁹⁴⁾.

Taguchi et al. utilizaram elastase intranasal e obtiveram resultados semelhantes ao encontrados no nosso estudo, com relação ao aumento do diâmetro alveolar, deposição de fibras colágenas e elásticas e o número de células positivas para MMP 9 e MMP 12, níveis de TNF- α , IL-1 β , NF-kb e isoprostano 8-iso-PGF-2 α ⁽⁹²⁾, o que mostra que a diferença entre o método intranasal e intra-traqueal pode ocorrer principalmente na mecânica pulmonar.

A medida da mecânica pulmonar em camundongos que receberam elastase intra-traqueal em estudo de Hantos et al. ⁽⁹⁵⁾ mostrou aumento do volume e diminuição da elastância do tecido pulmonar, e nenhuma alteração na resistência das vias aéreas e dos tecidos. Assim, os autores concluíram que a destruição do tecido pulmonar não está associada a disfunção pulmonar.

Henriques et al. ⁽⁹⁶⁾ investigaram os efeitos do treinamento aeróbio na mecânica pulmonar, inflamação, morfometria e marcadores inflamatórios das células endoteliais e função cardíaca em modelo de enfisema induzido por elastase intra-traqueal. Nesse estudo houve diminuição da elastância do sistema respiratório (Ers) e aumento da elastância do tecido pulmonar (Htis) pela administração de elastase intra-traqueal comparado ao grupo salina, o

que difere do presente estudo, talvez pela dose e tempo utilizados (0,1 UI de elastase, uma vez por semana, durante 4 semanas).

Neste estudo foi demonstrado que os animais com lesão pulmonar induzida pela elastase intra-traqueal e submetidos a tratamento preventivo e terapêutico com anticorpo IL-17 apresentaram melhora significativa nos resultados da mecânica respiratória, NO exalado, intercepto linear médio, redução do número de neutrófilos e células positivas para NF- κ B, IL-17, IL-1 β , IL-8, TNF- α , MMP9, MMP12, TGF- β , iNOS e redução da fração de volume de isoprostano 8-iso-PGF-2 α em vias aéreas e septos alveolares, redução da fração de volume de fibras colágenas, lumican e decorina em vias aéreas, e de fibras elásticas e fibronectina nos septos alveolares. Houve também diminuição da quantidade de células totais e macrófagos do fluido do lavado broncoalveolar e no número de células positivas para eNOS em vias aéreas no grupo elastase terapêutico, e redução da fração de volume de fibras colágenas e biglicano nos septos alveolares no grupo preventivo. Não obtivemos resultados significativos no número de células positivas para eNOS em septos alveolares e na fração de volume de fibras elásticas em vias aéreas, e lumican e biglicano em septos alveolares. Não houve alteração significativa em nenhum dos grupos avaliados para TIMP-1 e fibronectina em vias aéreas, e TIMP-1 e decorina nos septos alveolares.

Passaremos agora a discutir cada um dos aspectos de resposta observados no estudo após as intervenções com anti IL-17. Gostaríamos de ressaltar que não há estudos em modelos de lesão pulmonar pela elastase

que avaliaram a importância do tratamento com anti IL-17. Existem evidências *in vitro* e *in vivo* detalhadamente discutidas na introdução que evidenciam a importância desta via na fisiopatogênese da DPOC, fatos que nos nortearam na elaboração deste estudo.

Em primeiro lugar, investigamos a modulação funcional do tratamento com anti IL-17 neste modelo de lesão pulmonar induzida por elastase administrada por via intra-traqueal. Nossos resultados mostraram que o tratamento com anti IL-17 reduziu a resistência (Rrs) e a elastância (Ers) do sistema respiratório nas duas abordagens. O anti IL-17 também reduziu a elastância do tecido pulmonar (Htis) e a resistência das vias aéreas (Raw).

Há algumas evidências na literatura e nos resultados que encontramos na resposta de estresse oxidativo que nos auxiliam no entendimento destas alterações funcionais pelo tratamento com anti-IL17.

No presente estudo, verificamos que a administração de elastase intra-traqueal causou um aumento no óxido nítrico exalado (NOex). O tratamento preventivo e terapêutico com anti IL-17 atenuou esta resposta, que também foi associada a uma redução no recrutamento de moléculas e células inflamatórias. Além disso, o anti IL-17 nas duas abordagens utilizadas diminuiu o número de células positivas para iNOS, uma medida da resposta ao estresse oxidativo, tanto nos septos alveolares quanto nas paredes das vias aéreas. Esse resultado explica o dado anterior relativo à quantificação do NOex que também foi reduzido pelas abordagens terapêuticas.

O aumento da expressão de iNOS foi encontrado nas pequenas vias aéreas centrais e no pulmão periférico de pacientes com DPOC ^(70, 97), o que corrobora com nosso estudo. Malerba et al. ⁽⁶³⁾ verificaram que os níveis de NO exalado na DPOC estão relacionados aos hábitos de tabagismo e à gravidade da doença. As medidas de NO exalado podem ser úteis em condições clínicas para identificar o nível de inflamação das vias aéreas, e em relação a possíveis comorbidades.

Donohue et al. ⁽⁹⁸⁾ observaram aumento de NO exalado em um subconjunto de pacientes com DPOC, particularmente naqueles previamente diagnosticados com DPOC e asma. Uma vez que o NO exalado é útil para identificar pacientes com inflamação das vias aéreas que terão uma resposta benéfica ao tratamento com um corticosteróide inalado, esses dados podem ter importantes implicações para o tratamento de pacientes com DPOC.

Encontramos um aumento efetivo do intercepto linear médio (Lm) no grupo elastase controle (EC). O Lm é uma medida do espaço médio entre paredes alveolares opostas ⁽⁹⁹⁾ e o enfisema é caracterizado pela destruição da parede alveolar ⁽¹⁰⁾. O aumento de Lm no grupo elastase sugere desenvolvimento de enfisema nesse modelo experimental e o tratamento preventivo e terapêutico com anti IL-17 diminuiu estas lesões em ambos os grupos.

Avaliar o fluido do lavado broncoalveolar (FLBA) é uma das metodologias mais comuns e eficientes para monitorar a inflamação pulmonar ⁽¹⁷⁾. O número de células inflamatórias no FLBA de camundongos no grupo que recebeu elastase aumentou provavelmente devido ao papel da

elastase no recrutamento neutrofílico. Houve uma redução significativa no número de células totais e macrófagos no grupo tratado terapeuticamente, o que não ocorreu com o grupo preventivo, talvez pelo fato desses animais terem recebido uma dose única de anti IL-17.

O número de células positivas para IL-17 aumentou no grupo elastase controle. O tratamento preventivo e terapêutico com anti IL-17 diminuiu esse número. Wei et al. ⁽¹⁰⁰⁾ demonstraram que o enfisema induzido pela exposição ao fumo aumentou a contagem de células inflamatórias e níveis inflamatórios de citocinas, especialmente IL-17, o que corrobora com os resultados de nosso estudo.

A inflamação afeta as grandes e pequenas vias aéreas, resultando em hiperplasia de células caliciais, aumento das glândulas mucosas e infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos CD8 positivos nas vias aéreas superiores, especialmente nos estágios mais avançados da DPOC. São encontrados infiltrados inflamatórios nas pequenas vias aéreas, com predominância de macrófagos nos estágios iniciais da doença ⁽¹⁰¹⁾. Os macrófagos ativados liberam IL-8, LTB₄, TNF- α , o peptídeo quimiotático de monócitos (MCP1) e as enzimas tais como elastase, catepsinas (B, K, L e S) e metaloproteinases de matriz (MMP2, 9 e 12), que atuam como mediadores e efetores de lesões pulmonares ⁽⁵⁰⁾.

Estudos de Jin et al. ⁽¹⁰²⁾ sugerem que em pacientes com DPOC, especialmente durante as exacerbações agudas, as reações pró-inflamatórias e anti-inflamatórias são fortalecidas, sendo as reações pró-inflamatórias dominantes. Embora as proporções de Treg / Th17 fossem

normais, as células T reguladoras ainda eram insuficientes para suprimir o estímulo inflamatório. Todas essas mudanças sugerem um complicado mecanismo de desequilíbrio pró e anti-inflamatório que ainda precisa ser investigado melhor.

Zou et al. ⁽¹⁰³⁾ demonstraram que os níveis séricos de IL-1 β e IL-17 na exacerbação aguda de indivíduos com DPOC foram significativamente maiores do que aqueles em DPOC estável ou indivíduos controle e foram correlacionados positivamente com níveis séricos de proteína C reativa, neutrófilos e tabagismo. Os autores também demonstraram que os níveis séricos de IL-1 β foram associados aos níveis séricos de IL-17 em pacientes com DPOC. Esses dados indicam que as medidas concomitantes de IL-1 β e IL-17 no soro podem ser valiosas como marcadores de inflamação neutrofílica, obstrução crônica do fluxo aéreo e exacerbação aguda. O bloqueio de IL-1 β ou IL-17 poderia ser uma estratégia válida para a prevenção e controle da DPOC, e no nosso estudo houve atenuação da resposta inflamatória com o uso de anti IL-17.

Ito et al. ⁽³³⁾, em estudo com animais expostos à fumaça de cigarro por 1, 3 e 6 meses, também encontraram aumento na expressão de NF-kb, TNF- α , IL-17 e outras respostas pró-inflamatórias, aumento do Lm, função pulmonar prejudicada.

Nosso estudo do remodelamento da matriz extracelular foi realizado pela avaliação das fibras colágenas e elásticas na parede de vias aéreas e septos alveolares, e células positivas para metaloproteinases (MMP9 e MMP12) nas mesmas estruturas pulmonares. O tratamento com anti IL-17

reduziu a fração de volume das fibras elásticas nas paredes alveolares e das fibras de colágeno nas vias aéreas.

As metaloproteinases degradam seletivamente os componentes da matriz extracelular e desempenham um papel essencial na condução das células inflamatórias. O desequilíbrio nessas enzimas e seus inibidores contribui de forma significativa para a fisiopatologia da DPOC ^(10, 45). Estudos com modelo experimental de lesão pulmonar induzida pela administração intra-traqueal de elastase e que utilizaram inibidores de proteinases de origem vegetal mostraram eficácia quanto à melhora da mecânica pulmonar de das respostas inflamatória, de remodelamento da matriz extracelular e de estresse oxidativo em vias aéreas em septos alveolares ^(57-59, 87).

Estudo de Zhou et al. ⁽¹⁰⁴⁾ mostrou que as concentrações de TIMP-1 foram diminuídas e a concentração de MMP9 e a razão de MMP9 / TIMP1 foi aumentada no escarro induzido de pacientes com DPOC, em comparação com os controles saudáveis. Entre os pacientes com DPOC, aqueles com pior função pulmonar ou pacientes com enfisema exibiram aumento da expressão de MMP9 com diminuição de TIMP-1. Em nosso estudo, não houve alteração significativa entre os grupos com relação ao TIMP-1, mas houve aumento de MMP9 no grupo elastase, sendo atenuado pelo tratamento tanto preventivo como terapêutico.

Em estudo realizado por Lopes et al. ⁽¹⁰⁵⁾ nota-se que os animais que receberam elastase intranasal apresentaram valores de Lm e elastina mais elevados do que os animais expostos à fumaça de cigarro por seis meses. Em ambos os modelos, houve um aumento no colágeno tipo III, sendo maior

nos camundongos expostos à fumaça de cigarro. Os autores concluíram que o remodelamento da matriz extracelular é diferente nos dois modelos experimentais mais utilizados de enfisema.

Shapiro et al. ⁽⁵⁰⁾, usando camundongos knock-out MMP12, mostraram que esta tem um papel importante no desenvolvimento de enfisema induzido por fumo de cigarro. Em nosso estudo, houve aumento de MMP12 nos animais do grupo elastase, e o tratamento preventivo e terapêutico atenuou essa resposta.

Relatos sobre o conteúdo de colágeno nos pulmões da DPOC são conflitantes. Alguns autores encontraram colágeno total aumentado nos pulmões de pacientes com enfisema ⁽¹⁰⁶⁾. Outros estudos mostram níveis de expressão de genes relacionados à produção de colágeno diminuídos nos pulmões de pacientes com DPOC ⁽¹⁰⁷⁾.

Black et al. ⁽¹⁰⁸⁾ viram uma menor expressão de fibras elásticas nas pequenas vias aéreas de pacientes com DPOC ao serem comparadas a fumantes sem DPOC.

Alguns autores estudaram a expressão de proteoglicanos no pulmão de pacientes com DPOC, mostrando aumento na deposição de versican no parênquima pulmonar ⁽¹⁰⁹⁾, e diminuição de decorina e biglicano na árvore peribrônquica ⁽¹¹⁰⁾.

Estudos de Annoni et al. ⁽¹¹¹⁾ mostram que a área fracional de fibras elásticas foi maior em fumantes sem DPOC comparados a controles não fumantes com DPOC, em todos os compartimentos pulmonares. A fração de volume de colágeno tipo I foi menor nas grandes e pequenas vias aéreas

dos pacientes com DPOC e nas pequenas vias aéreas dos fumantes sem DPOC comparados aos não fumantes. Ainda comparado aos não fumantes, pacientes com DPOC apresentaram maior área fracional de fibronectina em pequenas vias aéreas. Porém, o estudo foi realizado com pacientes submetidos a ressecção pulmonar por tumores primários ou metastáticos, o que difere de nosso estudo.

Em estudo de Duan et al. ⁽³⁴⁾, os níveis de IL-17, IL-6, IL-10 e TGF- β de camundongos expostos à fumaça de cigarro foram medidos por ensaio imunoenzimático. A fumaça do cigarro causou substancial aumento dos espaços aéreos acompanhados pela destruição da arquitetura alveolar normal e levou ao enfisema. As IL-6, IL-17 e TGF- β foram maiores nos pulmões de camundongos expostos à fumaça de cigarro, e as expressões de IL-10 foram menores em comparação ao grupo controle.

O fator de crescimento transformador (TGF- β) desempenha um papel central no desenvolvimento e progressão de doenças respiratórias crônicas. A superexpressão de TGF- β na inflamação crônica, remodelamento, processo fibrótico e suscetibilidade à infecção viral é estabelecida nas doenças respiratórias crônicas mais prevalentes, incluindo asma, DPOC, câncer de pulmão e fibrose pulmonar idiopática ⁽¹¹²⁾. Em nosso estudo, o tratamento preventivo e terapêutico com anti IL-17 atenuou o aumento da expressão de TGF- β encontrado no grupo elastase controle.

No nosso estudo, as células positivas para a expressão do fator de transcrição NF-kb aumentaram no grupo que recebeu elastase, o que corrobora estudos anteriores sobre o papel do NF-kb na patogênese da

DPOC. O tratamento preventivo e terapêutico com anti IL-17 atenuou essa resposta, podendo ser mais uma estratégia terapêutica.

Li et al. ⁽¹¹³⁾ mostraram em modelo de inflamação pulmonar induzida pelo fumo em camundongos que o NF-kb desempenha um papel importante no recrutamento de macrófagos. Liu et al. ⁽¹¹⁴⁾ sugeriram que a ativação de NF-kb regula a sobrevivência celular após o dano do DNA causado pela exposição ao fumo.

Nosso estudo tem algumas limitações visto que utilizamos apenas o modelo de elastase e não de fumo com duas estratégias de intervenção com doses semelhantes. Novas pesquisas merecem ser realizadas com o anticorpo monoclonal anti IL-17, visando uma melhor elucidação dos mecanismos envolvidos, incluindo outros modelos experimentais, outras doses e diferentes cronogramas de tratamento com anti IL-17. Além disso, trata-se de estudo experimental em animais e mais pesquisas são necessárias para que se possa transpor os resultados para aplicação em humanos.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que o tratamento preventivo e terapêutico com anticorpo IL-17 em animais com lesão pulmonar induzida pela elastase intra-traqueal em camundongos C57Bl6 contribuiu para:

- Melhora dos parâmetros avaliados na mecânica pulmonar, com redução dos valores de Rrs, Ers, Raw e Htis;
- Atenuação da resposta inflamatória, observada no fluido do lavado broncoalveolar e na redução do número de neutrófilos e células positivas para IL-17, IL-8, IL-1 β e TNF- α nos dois grupos de intervenção;
- Redução da formação de enfisema pelas duas intervenções com anti IL-17 demonstrada pela avaliação do intercepto linear médio;
- Atenuação dos marcadores de processo de remodelamento da matriz extracelular, avaliada pela redução da expressão celular de MMP 9, MMP 12 e TGF- β (responsáveis pela alteração da composição da MEC) em vias aéreas e septos alveolares. Houve também redução do conteúdo de fibras colágenas, lumican e decorina em vias aéreas, e fibras elásticas e fibronectina nos septos alveolares, bem como redução do conteúdo de biglicano em vias aéreas e fibras colágenas nos septos alveolares no grupo preventivo;

- Atenuação da resposta de estresse oxidativo, avaliada pela redução da expressão celular de iNOS, fração de volume de isoprostano 8-iso-PGF-2 α e NO exalado em ambos os grupos tratados, e eNOS em vias aéreas no grupo terapêutico;
- Redução da expressão do fator de transcrição NF-kb, reforçando a importância dessa via de sinalização no controle das alterações estudadas.

Sendo assim, podemos concluir que o anti IL-17 pode ser um importante alvo para o tratamento das alterações pulmonares decorrentes da administração de elastase, que se assemelham aos quadros de enfisema em humanos.

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: GOLD; 2018 [Available from: <https://goldcopd.org>].
2. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease: New thinking, new treatment - Introduction. *Am J Med*. 2004;117:1S-2S.
3. Pisoni T. Prevalência da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e fatores de risco ambientais nos bairros mais populosos de Novo Hamburgo. Brasil [dissertação]. Movo Hamburgp: Centro Universitário Feevale; 2007.
4. Orozco-Levi M, Garcia-Aymerich J, Villar J, Ramirez-Sarmlento A, Anto JM, Gea J. Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2006;27(3):542-6.
5. Gan WQ, FitzGerald JM, Carlsten C, Sadatsafavi M, Brauer M. Associations of ambient air pollution with chronic obstructive pulmonary disease hospitalization and mortality. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(7):721-7.
6. Zhou YM, Zou YM, Li XC, Chen SY, Zhao ZX, He F, et al. Lung function and incidence of chronic obstructive pulmonary disease after improved cooking fuels and kitchen ventilation: A 9-year prospective cohort study. *PLoS Med*. 2014;11(3):11.

7. Casas F, Blanco I, Martinez MT, Bustamante A, Miravittles M, Cadenas S, et al. Indications for active case searches and intravenous alpha-1 antitrypsin treatment for patients with alpha-1 antitrypsin deficiency chronic pulmonary obstructive disease: an update. *Arch Bronconeumol*. 2015;51(4):185-92.
8. Blanco I, Bueno P, Diego I, Perez-Holanda S, Casas-Maldonado F, Esquinas C, et al. Alpha-1 antitrypsin Pi*Z gene frequency and Pi*ZZ genotype numbers worldwide. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017;12:1684-94.
9. Wu MC, Eriksson S. Lung function, smoking and survival in severe alpha 1-antitrypsin deficiency, PIZZ. *J Clin Epidemiol*. 1988;41(12):1157-65.
10. Mirza S, Clay RD, Koslow MA, Scanlon PD. COPD Guidelines: A Review of the 2018 GOLD Report. *Mayo Clin Proc*. 2018;93(10):1488-502.
11. Lopez AD, Murray C. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med*. 1998;4(11):1241-3.
12. dos Santos JDP, Silveira DV, de Oliveira DF, Caiaffa WT. Instruments used to evaluate smoking habits: a systematic review. *Ciencia & Saude Coletiva*. 2011;16(12):4707-20.
13. Kitaguchi Y, Fujimoto K, Kubo K, Honda T. Characteristics of COPD phenotypes classified according to the findings of HRCT. *Respir Med*. 2006;100(10):1742-52.
14. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3546-56.

15. Simpson CR, Hippisley-Cox J, Sheikh A. Trends in the epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease in England: a national study of 51 804 patients. *Br J Gen Pract.* 2010;60(576):277-84.
16. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Resp J.* 2003;22(4):672-88.
17. Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Resp J.* 2008;31(6):1334-56.
18. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease - GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(6):532-55.
19. Lapperre TS, Postma DS, Gosman MME, Snoeck-Stroband JB, ten Hacken NHT, Hiemstra PS, et al. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. *Thorax.* 2006;61(2):115-21.
20. Holloway RA, Donnelly LE. Immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med.* 2013;19(2):95-102.
21. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* 2000;127(2):117-26.
22. Zhang TY, Daynes RA. Macrophages from 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice exhibit an increased sensitivity to lipopolysaccharide stimulation due to TGF-beta-Mediated up-regulation of SHIP1 expression. *J Immunol.* 2007;179(9):6325-35.
23. Sommer C, White F. Cytokines, Chemokines, and Pain. 1st ed. Seattle: IASP Press; 2010. p. 279-302.

24. Raeburn CD, Sheppard F, Barsness KA, Arya J, Harken AH. Cytokines for surgeons. *Am J Surg*. 2002;183(3):268-73.
25. Ponce-Gallegos MA, Ramirez-Venegas A, Falfan-Valencia R. Th17 profile in COPD exacerbations. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017;12:1857-65.
26. Malaviya R, Laskin JD, Laskin DL. Anti-TNF alpha therapy in inflammatory lung diseases. *Pharmacol Ther*. 2017;180:90-98.
27. Doe C, Bafadhel M, Siddiqui S, Desai D, Mistry V, Rugman P, et al. Expression of the T Helper 17-Associated Cytokines IL-17A and IL-17F in Asthma and COPD. *Chest*. 2010;138(5):1140-7.
28. Park SJ, Lee YC. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma. *Respir Res*. 2010;11:78.
29. Vazquez-Tello A, Halwani R, Li R, Nadigel J, Bar-Or A, Mazer BD, et al. IL-17A and IL-17F Expression in B Lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;157(4):406-16.
30. Fujii U, Miyahara N, Taniguchi A, Waseda K, Morichika D, Kurimoto E, et al. IL-23 is essential for the development of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;55(5):697-707.
31. Christenson SA, van den Berge M, Faiz A, Inkamp K, Bhakta N, Bonser LR, et al. An airway epithelial IL-17A response signature identifies a steroid-unresponsive COPD patient subgroup. *J Clin Invest*. 2019;129(1):169-81.

32. Yanagisawa H, Hashimoto M, Minagawa S, Takasaka N, Ma R, Moermans C, et al. Role of IL-17A in murine models of COPD airway disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;312(1):L122-L30.
33. Ito JT, Cervilha DAD, Lourenco JD, Goncalves NG, Volpini RA, Caldini EG, et al. Th17/Treg imbalance in COPD progression: A temporal analysis using a CS-induced model. *PLoS One*. 2019;14(1):19.
34. Duan MC, Zhang JQ, Liang Y, Liu GN, Xiao J, Tang HJ. Infiltration of IL-17-producing t cells and treg cells in a mouse model of smoke-induced emphysema. *Inflammation*. 2016;39(4):1334-44.
35. Eustace A, Smyth LJC, Mitchell L, Williamson K, Plumb J, Singh D. Identification of cells expressing IL-17A and IL-17F in the lungs of patients with COPD. *Chest*. 2011;139(5):1089-100.
36. Hellings PW, Kasran A, Liu ZJ, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L, et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(1):42-50.
37. Aujla SJ, Alcorn JF. T(H)17 cells in asthma and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810(11):1066-79.
38. Alcorn JF, Crowe CR, Kolls JK. T(H)17 Cells in asthma and COPD. *Annu Rev Physiol*. 2010. p. 495-516.
39. Caramori G, Adcock IM, Di Stefano A, Chung KF. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:397-412.
40. McCracken JL, Tripple JW, Calhoun WJ. Biologic therapy in the management of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2016;16(4):375-82.

41. Nirula A, Nilsen J, Klekotka P, Kricorian G, Erondur N, Towne JE, et al. Effect of IL-17 receptor A blockade with brodalumab in inflammatory diseases. *Rheumatology*. 2016;55:43-55.
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;350(26):2645-53.
43. Hirota N, Martin JG. Mechanisms of airway remodeling. *Chest*. 2013;144(3):1026-32.
44. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev*. 2004;56(4):515-48.
45. Xie SP, Issa RA, Sukkar MB, Oltmanns U, Bhavsar PK, Papi A, et al. Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 in human airway smooth muscle cells. *Respir Res*. 2005;6:11.
46. Li YX, Lu Y, Zhao Z, Wang JN, Li JX, Wang WM, et al. Relationships of MMP9 and TIMP-1 proteins with chronic obstructive pulmonary disease risk: A systematic review and meta-analysis. *J Res Med Sci*. 2016;21:12.
47. Fernandes DJ, Bonacci JV, Stewart AG. Extracellular matrix, integrins, and mesenchymal cell function in the airways. *Curr Drug Targets*. 2006;7(5):567-77.
48. Hebel K, Rudolph M, Kosak B, Chang HD, Butzmann J, Brunner-Weinzierl MC. IL-1 beta and TGF-beta act antagonistically in induction and differentially in propagation of human proinflammatory precursor CD4(+) T Cells. *J Immunol*. 2011;187(11):5627-35.

49. Kicic A, Hallstrand TS, Sutanto EN, Stevens PT, Kobor MS, Taplin C, et al. Decreased fibronectin production significantly contributes to dysregulated repair of asthmatic epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(9):889-98.
50. Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, Belaaouaj A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol*. 2003;163(6):2329-35.
51. Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum in α 1- antitrypsin deficiency. 1963. *COPD*. 2013; Suppl1:3-8.
52. Gross P, Pfitzer EA, Tolker E, Babyak MA, Kaschak M. Experimental emphysema - its production with papain in normal and silicotic rats. *Arch Environ Health*. 1965;11(1):50-8.
53. Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease center dot 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax*. 2002;57(10):908-14.
54. Lee WL, Downey GP. Leukocyte elastase - Physiological functions and role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(5):896-904.
55. Shapiro SD. Neutrophil elastase - Path clearer, pathogen killer, or just pathologic? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26(3):266-8.
56. Morrison HM, Welgus HG, Owen CA, Stockley RA, Campbell EJ. Interaction between leukocyte elastase and elastin: quantitative and catalytic analyses. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1430(2):179-90.

57. Theodoro-Júnior OA, Righetti RF, Almeida-Reis R, Martins-Oliveira BT, Oliva LV, Prado CM, et al. A plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* attenuates pulmonary mechanics, inflammation and remodeling induced by elastase in mice. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2):piiE403.
58. Martins-Oliveira BT, Almeida-Reis R, Theodoro OA, Oliva LV, Nunes NND, Olivo CR, et al. The plant-derived *Bauhinia bauhinioides* kallikrein proteinase inhibitor (rBbKI) attenuates elastase-induced emphysema in mice. *Mediators Inflamm*. 2016:5346574.
59. Oliva LV, Almeida-Reis R, Theodoro O, Oliveira BM, Leick EA, Prado CM, et al. A plant proteinase inhibitor from *Crataeva tapia* (CrataBL) attenuates elastase-induced pulmonary inflammatory, remodeling, and mechanical alterations in mice. *Process Biochem*. 2015;50(11):1958-65.
60. Almeida-Reis R, Theodoro OA, Oliveira BTM, Oliva LV, Toledo-Arruda AC, Bonturi CR, et al. Plant proteinase inhibitor BbCI modulates lung inflammatory responses and mechanic and remodeling alterations induced by elastase in mice. *Biomed Res Int*. 2017; 2017:8287125.
61. Barnes PJ. Transcription factors in airway diseases. *Lab Invest*. 2006;86(9):867-72.
62. Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, et al. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(3):1175-7.
63. Malerba M, Radaeli A, Olivini A, Damiani G, Ragnoli B, Montuschi P, et al. Exhaled nitric oxide as a biomarker in COPD and related comorbidities. *Biomed Res Int*. 2014;2014:271918.

64. Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev.* 2004;84(3):731-65.
65. Ricciardolo FLM. cNOS-iNOS paradigm and arginase in asthma. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24(11):560-1.
66. Gelb AF, Barnes PJ, George SC, Ricciardolo FLM, DiMaria G, Zamel N. Review of exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *J Breath Res.* 2012;6(4):047101.
67. Kenyon NJ, Bratt JM, Linderholm AL, Last MS, Last JA. Arginases I and II in lungs of ovalbumin-sensitized mice exposed to ovalbumin: Sources and consequences. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;230(3):269-75.
68. Chibana K, Trudeau JB, Mustovitch AT, Hu H, Zhao J, Balzar S, et al. IL-13 induced increases in nitrite levels are primarily driven by increases in inducible nitric oxide synthase as compared with effects on arginases in human primary bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(6):936-46.
69. Bagnasco D, Ferrando M, Varricchi G, Passalacqua G, Canonica GW. A critical evaluation of anti-IL-13 and anti-IL-4 strategies in severe asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;170(2):122-31.
70. Ricciardolo FLM, Caramori G, Ito K, Capelli A, Brun P, Abatangelo G, et al. Nitrosative stress in the bronchial mucosa of severe chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116(5):1028-35.
71. Osoata GO, Hanazawa T, Brindicci C, Ito M, Barnes PJ, Kharitonov S, et al. Peroxynitrite elevation in exhaled breath condensate of COPD and its inhibition by fudosteine. *Chest.* 2009;135(6):1513-20.

72. Jiang WT, Liu XS, Xu YJ, Ni W, Chen SX. Expression of nitric oxide synthase isoenzyme in lung tissue of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Chin Med J*. 2015;128(12):1584-9.
73. Schuliga M. NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease. *Biomolecules*. 2015;5(3):1266-83.
74. Matsuda N, Hattori Y, Takahashi Y, Nishihira J, Jesmin S, Kobayashi M, et al. Therapeutic effect of in vivo transfection of transcription factor decoy to NF-kappa B on septic lung in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(6):L1248-55.
75. Escarcega RO, Fuentes-Alexandro S, Garcia-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clin Oncol*. 2007;19(2):154-61.
76. Batra S, Balamayooran G, Sahoo MK. Nuclear Factor-kappa B: a Key Regulator in health and disease of lungs. *Arch Immunol Ther Exp*. 2011;59(5):335-51.
77. Chen FE, Ghosh G. Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappa B transcription factors: structural views. *Oncogene*. 1999;18(49):6845-52.
78. Xiao WH. Advances in NF-kappa B Signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol*. 2004;1(6):425-35.
79. Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ, Chung KF. Activation and localization of transcription factor, nuclear Factor-kappa B, in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(5):1585-92.

80. Toledo AC, Sakoda CPP, 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;168(7):1736-49.
81. Li XM, Chen X, Gu W, Guo YJ, Cheng Y, Peng J, et al. Impaired TNF/TNFR2 signaling enhances Th2 and Th17 polarization and aggravates allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;313(3):L592-L601.
82. Liu T, Wang FP, Wang G, Mao H. Role of neutrophil extracellular traps in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Chin Med J*. 2017;130(6):730-736.
83. Chang Y, Nadigel J, Boulais N, Bourbeau J, Maltais F, Eidelman DH, et al. CD8 positive T cells express IL-17 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2011;12:43.
84. Dawkins PA, Stockley RA. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2001;56(12):972-7.
85. Sergejeva S, Ivanov S, Lotvall J, Linden A. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;33(3):248-53.
86. Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER, Quantitat AEJTF. 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;181(4):394-418.

87. Almeida-Reis R, Oliveira BTM, Theodoro OA, Oliva LV, Pinheiro N, Brito MV, et al. Treatment with proteinase inhibitor, BbCI, modulates inflammatory response, mechanic alterations, and remodeling on elastase-induced emphysema in mice. *Eur Respir J*. 2012;40:1.
88. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, et al. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35(4):457-65.
89. Angeli P, Prado CM, Xisto DG, Silva PL, Passaro CP, Nakazato HD, et al. Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(6):L1197-205.
90. Anciaes AM, Olivo CR, Prado CM, Kagohara KH, Pinto TD, Moriya HT, et al. Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema. *Clinics*. 2011;66(10):1797-803.
91. Lopes F, Pinto TS, Arantes-Costa FM, Moriya HT, Biselli PJC, Ferraz LFS, et al. Exposure to ambient levels of particles emitted by traffic worsens emphysema in mice. *Environ Res*. 2009;109(5):544-51.
92. Taguchi L, Pinheiro NM, Olivo CR, Choqueta-Toledo A, Grecco SS, Lopes F, et al. A flavanone from *Baccharis retusa* (Asteraceae) prevents elastase-induced emphysema in mice by regulating NF-kappa B, oxidative stress and metalloproteinases. *Respir Res*. 2015;16:113.
93. 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. *J Appl Physiol*. 2000;89(4):1397-402.

94. 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;97(1):204-12.
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;105(6):1864-72.
96. Henriques I, Lopes-Pacheco M, Padilha GA, Marques PS, Magalhaes RF, Antunes MA, et al. Moderate aerobic training improves cardiorespiratory parameters in elastase-induced emphysema. *Front Physiol*. 2016;7:329.
97. Brindicci C, Kharitonov SA, Ito M, Elliott MW, Hogg JC, Barnes PJ, et al. Nitric oxide synthase isoenzyme expression and activity in peripheral lung tissue of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(1):21-30.
98. Donohue JF, Herje N, Crater G, Rickard K. Characterization of airway inflammation in patients with COPD using fractional exhaled nitric oxide levels: a pilot study. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:745-51.
99. Margraf LR, Tomashefski JF, Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis*. 1991;143(2):391-400.
100. Wei JJ, Fan GQ, Zhao H, Li JQ. Heme oxygenase-1 attenuates inflammation and oxidative damage in a rat model of smoke-induced emphysema. *Int J Mol Med*. 2015;36(5):1384-92.
101. Shapiro SD, Ingenito EP. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease - Advances in the past 100 years. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;32(5):367-72.

102. Jin Y, Wan Y, Chen G, Chen L, Zhang MQ, Deng L, et al. Treg/IL-17 ratio and treg differentiation in patients with COPD. *PLoS One*. 2014;9(10):e111044.
103. Zou Y, Chen X, Liu J, Zhou DB, Kuang X, Xiao J, et al. Serum IL-1 beta and IL-17 levels in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017;12:1247-1254.
104. Zhou XM, Hou G, Gu DX, Wang QY, Zhao L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in induced sputum is correlated with MMP9/TIMP-1 imbalance and formation of emphysema in COPD patients. *J Thorac Dis*. 2017;9(10):3703-3710.
105. Lopes F, Toledo AC, Olivo CR, Prado CM, Leick EA, Medeiros MC, et al. A comparative study of extracellular matrix remodeling in two murine models of emphysema. *Histol Histopathol*. 2013;28(2):269-76.
106. Vlahovic G, Russell ML, Mercer RR, Crapo JD. Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(6):2086-92.
107. Gosselink JV, Hayashi S, Elliott WM, Xing L, Chan B, Yang LJ, et al. Differential expression of tissue repair genes in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(12):1329-35.
108. Black PN, Ching PST, Beaumont B, Ranasinghe S, Taylor G, Merrilees MJ. Changes in elastic fibres in the small airways and alveoli in COPD. *Eur Respir J*. 2008;31(5):998-1004.
109. Merrilees MJ, Ching PST, Beaumont B, Hinek A, Wight TN, Black PN. Changes in elastin, elastin binding protein and versican in alveoli in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2008;9:41.

110. van Straaten JFM, Coers W, Noordhoek JA, Huitema S, Flipsen JTM, Kauffman HF, et al. Proteoglycan changes in the extracellular matrix of lung tissue from patients with pulmonary emphysema. *Mod Pathol*. 1999;12(7):697-705.
111. Annoni R, Lancas T, Tanigawa RY, Matsushita MD, Fernezlian SD, Bruno A, et al. Extracellular matrix composition in COPD. *Eur Respir J*. 2012;40(6):1362-73.
112. Lachapelle P, Li MN, Douglass J, Stewart A. Safer approaches to therapeutic modulation of TGF-beta signaling for respiratory disease. *Pharmacol Ther*. 2018;187:98-113.
113. Li YT, He B, Wang YZ, Wang J. Effects of intratracheal administration of nuclear factor-kappaB decoy oligodeoxynucleotides on long-term cigarette smoke-induced lung inflammation and pathology in mice. *Respir Res*. 2009;10:79.
114. Liu XD, Togo S, Al-Mugotir M, Kim H, Fang QH, Kobayashi T, et al. NF-kappaB mediates the survival of human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke extract. *Respir Res*. 2008;9:66.