OSMAR APARECIDO THEODORO JÚNIOR

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

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a 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
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Theodoro Júnior, Osmar Aparecido

Efeito do inibidor de proteinase de origem vegetal *EcTI*, sobre a lesão
pulmonar induzida pela elastase em camundongos C57Bl6 / Osmar Aparecido
Theodoro Júnior. -- São Paulo, 2014.

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

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos.

Orientadora: Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério.

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

USP/FM/DBD-080/14

“Algumas pessoas entram e saem de nossa vida silenciosamente; outras em pouco tempo deixam marcas em nossos corações; daí em diante, jamais seremos os mesmos”

Autor desconhecido

Dedicatória

Em primeiro lugar, dedico esta obra a Deus, que sempre me protegeu e iluminou os meus caminhos para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus pais, Osmar e Vera, que colaboraram demais com minha formação e sempre acreditaram em mim.

Aos meus filhos, Lucas e Pedro, que me mostraram o verdadeiro sentido da vida, e que me fizeram perceber que praticamente todos os meus passos serão dedicados a eles.

A professora Iolanda Tibério, minha orientadora, que com muita calma e paciência soube, sempre na hora certa, me nortear no rumo certo, e me fazer crescer profissionalmente e cientificamente.

Agradecimentos

A Faculdade de Medicina da USP, por me proporcionar condições de realizar este trabalho.

Ao meu amigo e parceiro, Ricardo Marques, que me ajudou com conselhos, e que foi o grande responsável por eu estar nesta empreitada.

Aos meus companheiros de experimentos: Rafael, Leandro, Bruno, Tales e Daniel, que entre “tapas e beijos” colaboraram para este projeto acontecer.

Ao pessoal do LIM-20 que, direta ou indiretamente, ajudou e teve participação importante neste trabalho. Em especial, Edna Leick, Renato Righetti, Carla Prado, Fernanda Lopes, Clarice Olivo, Nathália Pinheiro e Rosana.

A professora Maria Luiza, do Laboratório de Bioquímica da UNIFESP-EPM, que muito colaborou com a realização deste projeto, e aos demais pesquisadores do Infar da UNIFESP-EPM que cederam os inibidores e ajudaram na parte bioquímica do projeto.

A Maria Fernanda, minha esposa, que esteve presente tanto nos bons momentos quanto naqueles de aperto, e que presenciou toda a minha dificuldade e me ajudou para a realização desta dissertação.

Sumário

1.0 Introdução.....	2
1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	2
1.1.1 Definição	2
1.1.2 Aspectos Epidemiológicos	3
1.1.3 Fatores de Risco	5
1.1.4 Diagnóstico.....	7
1.1.5 Fisiopatologia	9
1.2 Inibidores de Proteinases.....	19
1.2.1 EcTI.....	21
1.3 Modelos experimentais	24
2.0 Justificativas para o Estudo.....	27
3.0 Objetivos	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4.0 Materiais e Métodos	32
4.1 Animais	32
4.2 Material Vegetal	32
4.3 Lesão Pulmonar Induzida pela Elastase Intratraqueal.....	33
4.4 Grupos Experimentais.....	33
4.5 Avaliação da Mecânica Pulmonar	36
4.6 Determinação do Óxido Nítrico Exalado (E _{NO}).....	38
4.7 Lavado Broncoalveolar	38
4.8 Descarte de Carcaças.....	39
4.9 Estudo Histopatológico	39
4.9.1 Colorações	40
4.9.2 Análise Morfométrica.....	42
4.9.3 Análise do Diâmetro Alveolar Médio (Lm)	44
4.10 Análise Estatística.....	44
5.0 Resultados	46
5.1 Elastância do sistema respiratório (Ers)	46
5.2 Resistência do sistema respiratório (Rrs)	47
5.3 Resistência de vias aéreas (Raw)	48

5.4 Resistência de tecido pulmonar (Gtis).....	49
5.5 Elastância do tecido pulmonar (Htis).....	50
5.6 Óxido nítrico exalado (NOex)	51
5.7 Lavado broncoalveolar: células totais.....	52
5.8 Lavado broncoalveolar: macrófagos	53
5.9 Lavado broncoalveolar: neutrófilos.....	54
5.10 Lavado broncoalveolar: linfócitos	55
5.11 Lavado broncoalveolar: eosinófilos	56
5.12 Intercepto linear médio (Lm)	57
5.13 Avaliação do número de macrófagos no septo alveolar	58
5.14 Avaliação da infiltração neutrofílica nos septos alveolares	59
5.15 Avaliação da infiltração neutrofílica nas vias aéreas	60
5.16 Avaliação do número de células positivas para TNF- α no septo alveolar	61
5.17 Avaliação do número de células positivas para TNF- α nas vias aéreas	62
5.18 Fração de volume de fibras colágenas no septo alveolar	63
5.19 Fração de volume de fibras colágenas nas vias aéreas	64
5.20 Fração de volume de fibras elásticas no septo alveolar	65
5.21 Fração de volume de fibras elásticas nas vias aéreas	66
5.22 Avaliação de células MMP-9 positivas no septo alveolar.....	67
5.23 Avaliação de células MMP-9 positivas nas vias aéreas.....	68
5.24 Avaliações de células MMP-12 positivas no septo alveolar.....	69
5.25 Avaliações de células MMP-12 positivas nas vias aéreas.....	70
5.26 Avaliação do número de células TIMP-1 positivas no septo alveolar.....	71
5.27 Avaliação do número de células TIMP-1 positivas nas vias aéreas.....	72
5.28 Avaliação do número de células eNOS positivas no septo alveolar	73
5.29 Avaliação do número de células eNOS positivas nas vias aéreas.....	74
5.30 Avaliação do número de células iNOS positivas no septo alveolar.....	75
5.31 Avaliação do número de células iNOS positivas nas vias aéreas.....	76
5.32 Avaliação da fração de volume de 8-iso-PGF2 α no septo alveolar.....	77
5.33 Avaliação da fração de volume de 8-iso-PGF2 α nas vias aéreas.....	78
5.34 Avaliação de MUC-5ac nas vias aéreas	79
5.35 Fotomicrografias.....	80
6.0 Discussão	87
7.0 Conclusão	98
8.0 Referências Bibliográficas	101

Lista de abreviaturas

ADAM	Familia de Proteinases de Membrana
BbCI	<i>Bauhinia bauhinioides</i> Cruzipain Inhibitor
CVF	Capacidade Vital Forçada
DAB	Diaminobenzidina
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EcTI	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> Trypsin Inhibitor
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epitelial
ENA₇₈	Peptídeo Epitelial Ativador de Neutrófilo
ENO	Óxido Nítrico Exalado
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
Ers	Elastância do Sistema Respiratório
FLBA	Fluido do Lavado Broncoalveolar
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GRO α	Oncogene Relacionado ao Crescimento α
Gtis	Resistência do Tecido Pulmonar (Tissue Damping)
Htis	Elastância de Tecido Pulmonar (Tissue Elastance)
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon γ
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
kDa	Kilodalton
KGF	Fator de Crescimento de Queratinócitos
LBA	Lavado Broncoalveolar
Lm	Intercepto Linear Médio
LTB₄	Leucotrieno B ₄
MCP1	Peptídeo Quimiotático para Monócitos
MMP	Metaloproteinase de Matriz
NANC	Sistema Nervoso Autônomo não Adrenérgico não Colinérgico
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOA	Nitric Oxide Analyzer
NOex	Óxido Nítrico Exalado
NOS	Óxido Nítrico Sintases
PGF₂-L	Prostaglandinas Bioativas F ₂ -Like
PLATINO	Projeto Latino Americano de Investigação de Doenças Pulmonares Obstrutivas
PPB	Partes por Bilhão
Raw	Resistência de Vias Aéreas

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Rrs	Resistência do Sistema Respiratório
SBPT	Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia
SpO2	Saturação Periférica de Oxigênio
TIMP`s	Inibidores Tecidual da Metaloproteinase
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
TP	Tempo de Protrombina
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
VEF₁	Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo
8-iso-PGF2α	Classe de Isoprostano

RESUMO

Theodoro-Júnior OA. Efeito do inibidor de proteinase de origem vegetal *EcTI*, sobre a lesão pulmonar induzida pela elastase em camundongos C57Bl6. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: As proteinases tem um papel importante no desenvolvimento, na destruição tecidual e na produção de muco causada pela DPOC. O inibidor de proteinase de origem vegetal *Enterolobium contortisiliquum* *Trypsin Inhibitor* (EcTI) inibe tanto as proteinases da classe serina quanto da classe cisteína. **Objetivos:** Avaliar os efeitos do tratamento com EcTI nas alterações pulmonares induzidas pela elastase em camundongos. **Métodos:** Camundongos C57Bl6 receberam elastase via intratraqueal (50 µL/animal, grupo ELA) ou salina (grupo SAL). Os camundongos foram tratados com EcTI (2mg/kg) nos dias 1, 15 e 21 após a instilação de elastase (grupo ELA-EcTI) ou salina (grupo SAL-EcTI). No dia 28 do protocolo, os animais foram anestesiados, a mecânica pulmonar foi medida e o óxido nítrico exalado coletado. Posteriormente, foi realizado o lavado broncoalveolar e os pulmões foram removidos para a preparação de lâminas de histoquímica e imunohistoquímica. Por meio de morfometria analisamos o número de células positivas para neutrófilos, TNF- α , MMP-9, MMP-12, TIMP-1, iNOS, eNOS assim como a fração de volume de 8-iso-PGF2 α , fibras colágenas e elásticas, nos septos alveolares e nas vias aéreas. Também foram avaliados o número de células positivas para macrófagos nos septos alveolares e MUC5ac nas vias aéreas. **Resultados:** O inibidor de proteinase EcTI reduziu as alterações

de mecânica pulmonar (Ers, Htis e Raw), destruição do septo alveolar (Lm) e o número de células no lavado broncoalveolar (células totais, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos) induzidos pela elastase. Em relação a resposta inflamatória, o EcTI reduziu o número de neutrófilos e de células TNF α positivas no septo alveolar e nas vias aéreas além de reduzir o número de macrófagos no septo alveolar. Considerando o remodelamento de matriz extracelular, o inibidor de proteinase atenuou a fração de volume de fibras colágenas e o número de células MMP-9 e MMP-12 positivas nos septos alveolares e nas vias aéreas. Além disso, nas vias aéreas ocorreu uma atenuação da fração de volume de fibras elásticas, e nos septos alveolares uma atenuação da quantidade de células que expressam TIMP-1. Em relação a resposta de estresse oxidativo, o EcTI reduziu a fração de volume de isoprostano e o número de células iNOS e eNOS positivas tanto nos septos alveolares quanto nas vias aéreas. O EcTI também reduziu o número de células MUC5ac positivas nas vias aéreas. **Conclusões:** O tratamento como inibidor EcTI modulou a mecânica pulmonar e reduziu as alterações inflamatórias, de remodelamento e de estresse oxidativo induzidas pela elastase intratraqueal. Embora sejam necessários mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos neste processo, o inibidor de proteinase EcTI pode ser considerado como um potencial instrumento terapêutico para o tratamento da DPOC.

Descritores: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, Lesão pulmonar/induzido quimicamente, Elastase de leucócito, Inibidores de serino proteinase, Inibidores de cisteína proteinase, Inibidores de tripsina/farmacologia, Camundongos.

ABSTRACT

Theodoro-Júnior OA. Effects of proteinase inhibitor from plant *EcTI* on elastase-induced lung alterations in mice. [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Background: Proteinases play a key role on emphysema development, tissue destruction and mucus production. *Enterolobium contortisiliquum* *Tripsin Inhibitor* (EcTI) is a proteinase inhibitor from plant that neutralizes serine and cysteine proteinases. **Aims:** To evaluated the effects of the EcTI treatment in pulmonary alterations induced by elastase in mice. **Methods:** C57Bl6 mice received elastase intratracheally (50 µL/animal, ELA group) or saline (SAL group). Afterwards, mice were treated with EcTI (2 mg/kg) at days 1, 15 and 21 after elastase instillation (ELA-EcTI group). Control group received saline and EcTI using the same protocol (SAL-EcTI group). At day 28, mice were anesthetized, respiratory mechanics were collected, and exhaled nitric oxide were analyzed. Afterwards, bronchoalveolar lavage fluid was obtained and lungs were removed to perform histochemistry and immunohistochemistry stains. By morphometry, the number of neutrophils, TNF- α , MMP-9, MMP-12, TIMP-1, iNOS, eNOS positive cells as well as the volume proportion of 8-iso-PGF2 α , collagen and elastic fibers content in alveolar septum and airways walls were performed. In airways walls, we also analyzed the number of MUC-5 positive cells and the number of macrophages. **Results:** The proteinase inhibitor EcTI was able to reduce the pulmonary mechanical alterations (Ers, Htis and Raw), alveolar septum disruption (Lm) and the BAL cell count (total cells, macrophages, neutrophils, lymphocytes and eosinophils) induced by elastase. Regarding the inflammatory response, EcTI also reduced the number of

neutrophils and TNF α positive cells in both alveolar septum and airway walls, and also reduced the number of macrophages in alveolar septum. Considering the extracellular matrix remodeling, the proteinase inhibitor attenuated the volume fraction of collagen fibers, MMP-9 and MMP-12 positive cells in both alveolar septum and airway walls. Besides, in airway there were attenuation in the volume fraction of elastic fibers, and in the alveolar septa a decrease of the amount of the cells expressing TIMP-1. Regarding the oxidative stress response, EcTI reduced the volume fraction of isoprostane and the number of iNOS and eNOS positive cells in both airways walls and alveolar septa, Finally, EcTI reduced the number of MUC5ac positive cells in airway walls. **Conclusions:** The treatment with EcTI modulated lung mechanics and reduced inflammatory, remodeling and oxidative stress alterations induced by elastase. Although more studies need to be performed to elucidate the mechanisms involved in this process, we may considerate EcTI as a potential therapeutic tool for COPD management.

Descriptors: Chronic obstructive pulmonary disease, Lung Injury/ chemically induced, Leukocyte Elastase, Serine proteinase inhibitor, Cysteine proteinase inhibitor, Trypsin inhibitors/pharmacology, Mice.

INTRODUÇÃO

1.0 Introdução

1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

1.1.1 Definição

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma enfermidade respiratória prevenível e tratável, caracterizada pela presença de obstrução crônica do fluxo aéreo, que não é totalmente reversível, após uso de broncodilatador. Esta obstrução é, geralmente, progressiva e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões e à inalação de partículas e gases tóxicos, causada primeiramente pelo tabagismo. Embora a DPOC comprometa os pulmões, também produz consequências sistêmicas significativas (GOLD, 2013).

O mecanismo fisiopatológico que causa a limitação ao fluxo aéreo está relacionado a uma combinação de alterações do sistema respiratório: uma alteração nas pequenas vias aéreas com conseqüente diminuição luminal (bronquite crônica), e uma destruição do parênquima pulmonar (enfisema), caracterizado por um alargamento dos espaços aéreos distais, diminuindo assim o recolhimento elástico dos pulmões. Assim, estas alterações diminuem a habilidade das vias aéreas de se manterem abertas durante a expiração, colaborando com um possível aprisionamento aéreo e hiperinsuflação (Barnes *et al*, 2003).

Muitas definições anteriores da DPOC têm enfatizado os termos “enfisema” e “bronquite crônica”. Enfisema, ou destruição da superfície de troca gasosa nos pulmões (alvéolos), é um termo patológico que é clinicamente (mas

incorretamente) usado com frequência e que descreve apenas uma das muitas anormalidades estruturais presentes em pacientes com DPOC. Bronquite crônica, ou a presença de tosse e produção de muco por no mínimo 3 meses por ano, considerando dois anos consecutivos, permanece como um termo útil do ponto de vista clínico e epidemiológico. Entretanto, ele não reflete o grande impacto da limitação na morbidade e mortalidade nos pacientes com DPOC. É também importante reconhecer que a tosse e a produção de muco podem preceder o desenvolvimento da limitação do fluxo aéreo. De modo inverso, alguns pacientes desenvolvem limitação significativa ao fluxo aéreo, com ausência de tosse e produção de muco (GOLD, 2013).

1.1.2 Aspectos Epidemiológicos

A DPOC é uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Afeta em média 18 milhões de americanos e é a quarta causa de morte nos Estados Unidos (Cheng *et al*, 2009). Além disso, a doença é frequentemente subdiagnosticada, subestimando as taxas de prevalência existentes. Existe uma grande variação desta prevalência dependendo da região, que pode ser causada por diferenças na exposição das populações aos fatores de risco, ou por diferenças nas definições de DPOC usadas nos muitos estudos epidemiológicos. Adicionalmente, a coleta equivocada dos dados espirométricos pode colaborar para erros nas taxas de prevalência da doença (Halbert *et al*, 2006).

As taxas de prevalência da doença vêm aumentando nos últimos anos, e é esperado que ocorra um aumento maior nas próximas décadas (Steiling *et al*,

2009). De acordo com a revisão sistemática realizada por Viegi *et al*, em 2007, o número de estudos epidemiológicos sobre a prevalência de DPOC tem aumentado, e os dados apurados nestes estudos mostram valores que variam de 7,7 a 24,5%, em vários países do mundo como Itália, Irlanda, Suécia, Noruega, e em outros países europeus.

Outra revisão sistemática e meta-análise de estudos realizados entre 1990 e 2004, apontou que a prevalência de DPOC é maior em fumantes do que em não fumantes. Os autores também mostraram que a DPOC é mais prevalente em indivíduos maiores de 40 anos do que os menores de 40 anos, e também é mais prevalente em homens do que em mulheres. Em adultos com mais de 40 anos, a prevalência mundial da DPOC é cerca de 9-10%, quando esta é definida pela limitação do fluxo aéreo (Halbert *et al*, 2006).

O projeto “PLATINO” (Projeto Latino Americano de Investigação de Doenças Pulmonares Obstrutivas) realizou um estudo multicêntrico de prevalência em cinco capitais da América Latina: São Paulo (Brasil), Santiago (Chile), Cidade do México (México), Montevideu (Uruguai) e Caracas (Venezuela). Os resultados encontrados demonstraram uma variação de 7,8% no México, até quase 20% em Montevideu. Além disso, a alta prevalência da doença em todas as capitais esteve intimamente relacionada com o sexo masculino, idade avançada, baixo índice de massa corpórea e grande exposição à inalação de fumaça de cigarro (Menezes *et al*, 2005). No Brasil, estima-se que entre 3 e 7 milhões de brasileiros tenham DPOC. Segundo dados do DATASUS, a DPOC gerou no ano de 2010, no Sistema Nacional de Saúde Pública, 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. Segundo a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT), a prevalência de DPOC no Brasil é de 15,8% em adultos acima de 40 anos. (www.datasus.com.br – 30/11/2012, 15:00 horas). Na cidade de São Paulo, a prevalência de DPOC, definida por espirometria em indivíduos com mais de 40 anos, foi de 15,8% (Menezes *et al*, 2005). Estes valores são compatíveis com outros dados encontrados no Brasil, onde a cidade de Pelotas no Rio Grande do Sul a prevalência foi de 15,2%.

Na União Europeia, o total direto dos custos relacionados a doenças respiratórias é de 6% do orçamento total de cuidados com saúde, e a DPOC corresponde a 56% deste custo (aproximadamente 38,6 bilhões de euros) (Society ER, 2003). Nos Estados Unidos, os custos diretos com a DPOC são 29,5 bilhões de dólares e os custos indiretos 20,4 bilhões de dólares (NHLaB, 2009).

Com relação à taxa de mortalidade, embora a DPOC seja frequentemente a primeira causa de morte, em muitos casos seu diagnóstico é subestimado e omitido da certidão de óbito, gerando assim uma imprecisão nos dados de mortalidade (Jensen *et al*, 2003). O “*Global Burden Disease Study*” projetou que a DPOC, que em 1990 foi a sexta causa de morte, será a terceira causa de morte em 2020 no mundo inteiro (Mathers e Loncar, 2006).

1.1.3 Fatores de Risco

O fator de risco associado à DPOC mais encontrado na literatura é a exposição à fumaça de cigarro (GOLD, 2013). A contribuição do tabagismo para o

desenvolvimento de DPOC foi estimada de 70% a 80% para os homens e 70% para as mulheres (Torres e Godoy, 2004). A interrupção do tabagismo é a única intervenção hábil para evitar a progressão da doença. No entanto, as evidências ainda são insuficientes que a cessação da inalação da fumaça do cigarro seria capaz de reduzir a inflamação (Laperre *et al*, 2006).

Outras formas de fumo, tais como cachimbo, charuto além de cigarro de maconha, também são consideradas fatores de risco para DPOC (Raad *et al*, 2011; Tan *et al*, 2009). A exposição passiva à fumaça de cigarro também pode contribuir para os sintomas respiratórios e DPOC, pois aumenta a carga de partículas inaladas (Eisner *et al*, 2005). Fumar durante a gravidez pode causar um risco para o feto, por atrapalhar o desenvolvimento do pulmão e o desenvolvimento intrauterino, além de possivelmente afetar o progresso da maturação do sistema imunológico (Tagher *et al*, 1995).

Outras exposições ambientais quando são suficientemente intensas ou prolongadas, como poeiras ocupacionais e produtos químicos, podem causar DPOC independentemente do tabagismo (Bakke *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1999). 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 (GOLD, 2013; Amoli, 1998; Dennis *et al.*, 1996).

Outro fator de risco freqüentemente documentado é a deficiência de α 1-antitripsina, um inibidor de serino proteinase extremamente abundante nos humanos (GOLD, 2013). Outros genes, tal como o gene que codifica as

metaloproteinases de matriz 12 que já foi relacionado com um declínio na função pulmonar, já foram descritos como possíveis influenciadores da fisiopatologia da DPOC. Contudo, ainda existem divergências entre os achados de estudos genéticos e os achados de qualidade de vida e função pulmonar (Hunninghake *et al*, 2009).

O nível socioeconômico também é frequentemente relacionado como fator de risco para DPOC. Existem evidências que o risco de desenvolver a doença é inversamente proporcional ao nível socioeconômico. Porém os componentes da pobreza que influenciam não são claros, pois a exposição a poluentes, nutrição inadequada ou insuficiente e infecções recorrentes são frequentemente relacionadas à pobreza (Prescott *et al*, 1999).

Por fim, um outro fator de risco relevante é a poluição do ar nos centros urbanos. O papel da poluição na fisiopatologia da DPOC está sendo estudado e ainda não está claro, porém sabe-se que a poluição do ar resultante da queima de combustíveis fósseis emitidas por motores de veículos é associada com declínio da função respiratória (Abbey, 1998).

1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da DPOC é multifatorial e deve ser baseado na história clínica, no exame clínico e nos dados dos exames laboratoriais. Em relação à história clínica, o diagnóstico de DPOC deve ser considerado em todo paciente que apresente tosse crônica, produção aumentada de muco, dispneia, sibilância e a exposição aos fatores de risco. A dispneia presente na DPOC é persistente,

progressiva e piora com a prática de exercícios físicos. A tosse crônica característica da DPOC é intermitente, e às vezes improdutiva. A produção de catarro na DPOC é um fator chave no diagnóstico da DPOC, porém o fato de ter sido fumante e a exposição à fumaça (de fogões a lenha e combustão de motores), assim como o histórico de DPOC na família são os fatores mais importantes no diagnóstico da doença (GOLD, 2013).

Embora seja uma parte importante no cuidado com o paciente, o diagnóstico de DPOC raramente é detectado no exame clínico. Os sinais clínicos que poderiam indicar a doença, como a limitação do fluxo aéreo, só podem ser percebidos quando existe um dano significativo na função pulmonar. A espirometria é o exame complementar reprodutível e objetivo e é obrigatório na suspeita clínica de DPOC, para a avaliação da limitação do fluxo aéreo, e possível aprisionamento aéreo (Rabe, 2007).

As medidas de espirometria são avaliadas antes e depois da administração de broncodilatador, se possível durante uma fase estável da doença. Os parâmetros clínicos mais importantes são a CVF (Capacidade Vital Forçada) e o VEF₁ (Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo), e a relação VEF₁/CVF. A permanência da limitação do fluxo aéreo após a broncodilatação, definida pela relação VEF₁/CVF abaixo de 0,70 é indicativo de DPOC. Além disto, não se observa resposta significativa ao broncodilatador, obtida através de uma variação de volume pré para pós broncodilatador menor que 12%, sendo menor que 200 ml de volume (Rabe, 2007).

Além da espirometria, a radiografia simples de tórax pode ajudar não na definição da doença, mas para rechaçar outros diagnósticos e até para identificar regiões com possível indicação cirúrgica. A avaliação gasométrica e da oxigenação (Saturação Periférica de Oxigênio, SPO_2) são outros exames laboratoriais que auxiliam no diagnóstico da DPOC (GOLD, 2013; Rabe, 2007).

1.1.5 Fisiopatologia

O processo inflamatório crônico das vias aéreas é uma característica muito relevante na fisiopatologia da DPOC. A inflamação crônica causa mudanças estruturais com diminuição da luz brônquica, e a destruição do parênquima pulmonar leva à perda do acoplamento alveolar nas pequenas vias aéreas (Barnes *et al.*, 2003, GOLD, 2013). A inflamação acomete vias aéreas de pequeno e grande calibre, onde encontramos hiperplasia de células caliciformes e aumento de glândulas mucosas, além de ocorrer infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos CD8+ nas vias aéreas de grande calibre, principalmente nas fases mais avançadas da DPOC.

O enfisema caracteriza-se pela infiltração na parede alveolar de um grupo variado de células inflamatórias, incluindo neutrófilos, macrófagos alveolares e linfócitos CD4+ e CD8+. Além disso, o desequilíbrio entre proteases e antiproteases no espaço alveolar colabora com a destruição e o alargamento permanente dos espaços aéreos pulmonares, distais ao bronquíolo terminal. Estudos experimentais prévios evidenciam o conceito de que proteases leucocitárias (oriundas de macrófagos e neutrófilos) degradam a elastina e outras

estruturas protéicas, contribuindo assim para as lesões alveolares (Cheng *et al*, 2009; Saetta *et al*, 1993; Saetta, 1999).

Os neutrófilos são células capazes de liberar uma série de mediadores e enzimas elastolíticas, como a elastase, responsáveis por coordenar a destruição tecidual e a inflamação crônica. Estas células estão presentes em pacientes com DPOC em fases mais avançadas e podem estar relacionados à produção de muco, que é potencialmente estimulada por muitas proteinases neutrofílicas (Churg e Wright, 2005).

Nos pulmões de indivíduos expostos ao cigarro, são detectados vários fatores quimiotáticos para neutrófilos tais como: leucotrieno B₄ (LTB₄), interleucina 8 (IL-8), oncogene relacionado ao crescimento α (GRO α) e peptídeo epitelial ativador de neutrófilo (ENA₇₈). O aumento do número de neutrófilos na biópsia brônquica e escarro induzido correlaciona-se diretamente com a gravidade da doença (Di stefano *et al*, 1998).

Os macrófagos são células muito frequentemente encontradas em estudos histopatológicos de pulmões de pacientes com DPOC, sugerindo que podem ser uma célula central no desenvolvimento da doença. Estes podem ser ativados por substâncias do cigarro, podem secretar IL-8, LTB₄ fator de necrose tumoral α (TNF α), peptídeo quimiotático para monócitos (MCP1). Também podem secretar elastase, catepsinas K, L e S, além de metaloproteinases de matriz (MMP) 2, 9 e 12. Desta forma estas células podem atuar como moduladoras do processo lesivo iniciado pelas toxinas do cigarro, bem como efetores da lesão pulmonar, produzindo a destruição do parênquima (Hogg *et al*, 2009; Barnes *et al*, 2003). Aparentemente, a cooperação entre macrófagos e neutrófilos é necessária para

produzir a quebra do tecido conjuntivo em um modelo agudo de exposição ao cigarro.(Lee e Downey, 2001).

Os linfócitos T CD4+ e CD8+ são frequentemente encontrados nos pulmões dos pacientes com DPOC, embora seu papel é pouco esclarecido na fisiopatologia da doença. Aparentemente, há predomínio do padrão Th1 que produzem interferon (INF)- γ . Algumas análises feitas em infiltrados de linfócitos B mostram que esta população de células pode ser mono ou oligoclonal (Saetta *et al*, 1999; Bosken *et al.*, 1992).

Estas células podem ser ativadas em resposta a agentes microbiológicos, que frequentemente infectam as vias aéreas destes pacientes. Também podem ser estimuladas por alguns antígenos presentes na fumaça do cigarro, ou ainda que o processo de lesão pulmonar exponha alguns auto-antígenos, desencadeando uma resposta linfocitária (van der Strate *et al.*, 2006).

A figura 1 ilustra a ativação das células inflamatórias que iniciam o mecanismo fisiopatológico da DPOC.

Figura 1. Resumo da interação celular e inflamatória ligando a exposição à fumaça de cigarro na DPOC. Ativação de neutrófilos, macrófagos, células epiteliais, células dendríticas, células T, células B, fibroblastos e células de músculo liso que levam a liberação de citocinas, quimiocinas e proteinases. Adaptado de Chung, KF, Adcock LM, Multifaceted mechanisms in COPD: Inflammation immunity and tissue repair and destruction. Eur Resp J 2008; 31: 1334-26.

De acordo com D'armiento *et al* (2009), a presença de marcadores de linfócitos T e eosinófilos em biópsias podem ser considerados fatores preditivos para progressão da DPOC. A Interleucina 2 (IL-2) é uma citocina que induz a proliferação e ativação de linfócitos CD4+ e CD8+. A eotaxina-1 é um tipo de quimiocina que induz a ativação e migração eosinofílica. A eosinofilia pulmonar

está ligada com hiperresposividade brônquica nos pacientes com DPOC. Alguns autores consideram que estes mediadores químicos possam servir como índices preditivos de progressão da doença, já que seus níveis aumentados no plasma e no lavado broncopulmonar estão associados com deterioração do quadro e aumento da gravidade da lesão pulmonar. No entanto, mais estudos são necessários para a investigação do papel destas células no processo inflamatório da DPOC.

O desequilíbrio entre os sistemas de proteinases e antiproteinases é a teoria fisiopatológica dominante na literatura, que explica a destruição pulmonar (Shapiro, 2000). Evidências apoiam a hipótese que a inalação da fumaça de cigarro induz um aumento no número de neutrófilos e macrófagos, e como dito anteriormente, estas células liberam enzimas como as catepsinas B, K, L e S, elastase neutrofílica, proteinase 3, metaloproteinase de matriz (MMP) 9 e 12. Na doença, estas enzimas não são totalmente inibidas pelas antiproteinases, levando à destruição do tecido conectivo pulmonar e consequentemente ao enfisema (Macnee *et al.*, 2005; Churg e Wright, 2005; GOLD, 2013).

As proteinases das classes serino, cisteíno e metalo são substâncias bem relacionadas na patogênese da DPOC (Churg e Wright, 2005; Shapiro, 2003). As serinoproteinases elastase neutrofílica, catepsina G e proteinase 3 são liberadas quando mediadores pró-inflamatórios induzem a desgranulação de células polimorfonucleares e monócitos, podendo causar a destruição do parênquima pulmonar e a produção de muco (Owen, 2008).

Já as proteinases da classe cisteíno, catepsinas S, B e L contribuem para a degradação da matriz extracelular mediada por macrófagos. As metaloproteinases

(MMP), que promovem a degradação de colágeno e elastina, e também aumentam a expressão epitelial de MUC5, são representadas pela MMP-1, 2, 9, 14 e ADAM (Deshmukh *et al*, 2005; Owen e Campbell, 1999).

De acordo com esta teoria, os pacientes com deficiência de α 1-antitripsina podem evoluir com grande destruição do parênquima pulmonar, sendo que esta deficiência é uma doença caracterizada por baixos níveis séricos e alveolares de α 1-antitripsina, cuja função é a inibição das proteases neutrofílicas (Kaplan e Cosentino, 2010).

As elastases são definidas como enzimas que tem a capacidade para degradar a elastina, que é uma proteína insolúvel, que após a ação enzimática transforma-se em peptídeos solúveis. Neste grupo de proteinases estão incluídas a elastase pancreática e a elastase de leucócitos. A elastase humana de leucócitos apresenta 43% de homologia com a elastase pancreática de porco, 39% de homologia com a calicreína pancreática de porco e 37% de homologia com a catepsina G, além de apresentar homologia em menor proporção com a elastase de outros animais (Lee e Downey, 2001; Shapiro, 2002).

A elastina apresenta um papel mecânico e estrutural muito importante em tecidos elástico como o pulmão, vasos sanguíneos e pele. Apresenta-se como uma macromolécula altamente hidrofóbica, pois é rica em prolina e glicina, sendo secretada no espaço extracelular, e se agrupa em fibras elásticas próximas a membrana plasmática (Morrison *et al*, 1999).

Como citado acima, a elastase é uma serinoprotease. As serinoproteases representam o grupo de enzimas melhor estudado e caracterizado, em comparação às cisteinoproteases, asparticoproteases e metaloproteases. As

massas moleculares das serinoproteases variam de 19 a 110 kDa, mas a maioria possui massa entre 60 a 80 kDa. Em geral, a atividade destas enzimas é otimizada em pH alcalino (de 7,0 a 11,0), e em temperaturas de 20 a 50°C. Além da elastase, a tripsina, a quimotripsina, a calicreína pancreática, a trombina e a subtilisina são serinoproteases (Antão e Malcata, 2005).

As metaloproteinases de matriz extracelular são endopeptidases cujo ataque nucleofílico é mediado por uma molécula de água ativada por um metal (Barret, 2004). São fundamentalmente enzimas extracelulares, cuja expressão geralmente é regulada durante a transcrição de fatores de crescimento, hormônios, citocinas e transformação celular. A atividade das MMPs é controlada pela transcrição, ativação dos precursores e inibida por inibidores endógenos, tais como α -macroglobulina e pelos inibidores teciduais específicos de metaloproteinases (TIMP's). As MMPs de vertebrados foram divididas em grupos baseando-se na sequência, na especificidade do substrato, similaridade, organização do domínio. Estes grupos são: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas e MMPs tipo-membrana (Amalinei, 2010).

Há pelo menos 23 tipos de metaloproteinases implicadas em muitos processos fisiológicos e patológicos, sendo que na asma as MMPs 2, 8, 9, 12 e o inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz (TIMP-1) são os principais envolvidos. O excesso de TIMP-1 sobre a MMP-9 pode interferir com o tráfego celular e reparo tecidual, e também pode contribuir para aumento na deposição de matriz extracelular e fibrose pela inibição da MMP-9 (Cataldo *et al.*, 2003).

O remodelamento pulmonar é caracterizado pelo aumento da deposição de proteínas de matriz extracelular nos pulmões. Este aumento na deposição pode ocasionar a fibrose subepitelial, à hipertrofia e hiperplasia de músculo liso assim como a hiperplasia das glândulas submucosas, levando ao espessamento da parede brônquica e um menor calibre para a passagem do ar. Estudos experimentais e clínicos sugerem que o remodelamento brônquico é devido à liberação de diversos fatores inflamatórios, de crescimento celular e de liberação de citocinas (Johnson e Knox, 1997).

A molécula de óxido nítrico (NO) durante muitos anos foi conhecida como um nocivo poluente ambiental proveniente da fumaça de cigarros, (Norman *et al.*, 2000) bem como gerada pela exaustão de combustíveis de veículos automotores, destruindo a camada de ozônio e causando chuva ácida. No entanto, a partir dos anos 80 pesquisadores demonstraram que o NO é uma molécula essencial na fisiologia do corpo humano (Prado *et al.*, 2009).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula que atua como neurotransmissor no sistema nervoso autônomo não adrenérgico não colinérgico (NANC), e tem papel importante na modulação do tônus bronquial, tônus vascular e exsudação plasmática tanto em animais como em humanos (Ramnarine *et al.*, 1996). O NO é produzido a partir da L-arginina com ação das óxido nítrico sintases (NOS), que são divididas em três isoformas, sendo duas constitutivas e uma induzida. Uma das formas constitutiva da NOS, denominada eNOS, pode ser expressa nas células endoteliais, a outra forma constitutiva, denominada nNOS, pode ser expressa nos neurônios (Bredt *et al.*, 1990; Lamas *et al.*, 1992). Já a forma

induzida, denominada iNOS, pode ser expressa por vários tecidos e órgãos além do endotélio vascular. Sua produção é estimulada por algumas citocinas como o TNF- α , IL-1 e IFN- γ (Moncada, 1993; Moncada *et al.*, 1991), além do polissacarídeo bacteriano. A iNOS é a maior responsável pela produção de NO e parece estar presente principalmente em condições patológicas (Prado *et al.*, 2005).

O NO parece atuar em vários mecanismos fisiopatológicos sendo que a sua contribuição depende principalmente da enzima pela qual foi produzido. Barnes *et al.*, (1996) sugere que o NO derivado da enzima nNOS apresenta efeito benéfico na asma ou no DPOC por causar relaxamento na musculatura lisa brônquica, sendo presente nos nervos do sistema NANC. No entanto, o NO derivado da enzima eNOS pode levar a vasodilatação nas arteríolas, com consequente extravasamento de plasma e edema. A grande quantidade de NO oriundo da enzima iNOS pode resultar em vasodilatação, extravasamento de plasma, aumento da secreção do muco e ativação indireta de células Th2 (Prado *et al.*, 2009).

Resultados de nosso grupo de pesquisa demonstraram uma importante participação do óxido nítrico em modelo experimental de asma (Prado *et al.*, 2005, 2010). Prado *et al.*, (2005) demonstraram que existe um aumento da expressão de iNOS em células linfomononucleares e eosinófilos presente nas vias aéreas distais de animais sensibilizados. Além disso, ainda observaram que a isoforma nNOS, embora constitutiva, encontra-se presente em células inflamatórias

(linfomononucleares e eosinófilos) e o número de células que expressam esta isoforma é maior nos animais sensibilizados com ovoalbumina (Prado *et al.*, 2003).

A peroxidação da membrana lipídica leva a produção de isoprostanos, uma série recentemente descoberta de prostaglandinas bioativas (PG)F₂- like. Os isoprostanos são produzidos independentemente das enzimas ciclooxigenases, via a peroxidação do ácido araquidônico, catalizada por radicais livres. Esta via tem a capacidade de formar 64 estruturas isoméricas, das quais o 8-iso-PGF₂α é o melhor caracterizado. Há evidências que sugerem que o 8-iso-PGF₂α pode atuar, em parte, por meio da ligação ao receptor vascular de tromboxane A₂/PGH₂ (TP) receptor (Takahashi *et al.*, 1992).

O potente oxidante peroxinitrito é formado por meio da interação do óxido nítrico e superóxido por uma rápida reação iso-estequiométrica (Muijers *et al.*, 1997; Pryor e Squadrito, 1995). A formação de peroxinitrito leva a peroxidação e a geração de isoprostanos e, dentre eles o PGF₂α (Wood *et al.*, 2003). Embora estudos prévios avaliassem os efeitos do PGE₂, outro representante da família dos isoprostanos, e demonstrassem um efeito mais potente como constritor do que um PGF₂α. Este último isoprostanos é considerado a forma predominantemente gerada durante a ativação da via do estresse oxidativo (Montuschi *et al.*, 1999a). Jourdan *et al.*, em 1997 mostraram que o tratamento com L-NAME é capaz de quase abolir a produção de PGF₂α.

Recentemente, os isoprostanos, particularmente o PGF₂α, têm sido considerados como marcadores viáveis da injúria oxidante *in vivo* (Mehrabi *et al.*,

2001; Mallat *et al.*, 1998) e a sua produção está associada à potencialização da obstrução brônquica e alteração de permeabilidade vascular e formação de edema em cobaias (Collins *et al.*, 1999).

Os isoprostanos são produzidos pela ativação da via fosfolipase. Após liberação na membrana passam para a circulação e são rapidamente metabolizados e atuam como potentes constritores do músculo liso (Fukunaga *et al.*, 1993; Kawikova *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2003). Um aumento dos níveis de 8 isoprostano tem sido demonstrado na urina de pacientes com DPOC (Praticò *et al.*, 1998). Os isoprostanos são considerados constritores vasculares (Kromer e Tippins, 1996; Mobert *et al.*, 1997), particularmente das artérias pulmonares. São responsáveis pelo aumento da hiperresponsividade das vias aéreas (Held e Ulhig, 2000) e na musculatura lisa das vias aéreas atuam como constritores (Okazawa *et al.*, 1997). Além disto, aumentam a quantidade de exsudação plasmática (Held e Ulhig, 2000).

1.2 Inibidores de Proteinases

Os inibidores são substâncias que bloqueiam a hidrólise por uma enzima de um determinado substrato. Estes inibidores, em geral, atuam em um grupo específico de enzimas, e são conhecidos os inibidores de cisteínoproteinases, serinoproteinases, metaloproteinases, asparticoproteinases e os multifuncionais que tem a capacidade de inibir diferentes classes de enzimas ao mesmo tempo. Estes inibidores podem ser de origem animal ou vegetal (Richardson, 1991).

A inibição das serinoproteinases por inibidores proteicos ocorre por uma ligação específica que está restrita ao sítio reativo. Esta inibição pode ser de dois tipos: reversível, quando ocorre diluição da concentração do inibidor e este recupera a atividade enzimática; ou irreversível, quando a ligação entre a enzima e o inibidor torna a recuperação da atividade enzimática impossível (Bode e Huber, 2000).

Os inibidores vegetais têm sido estudados em leguminosas, gramíneas e solanáceas, em grande parte pelo fato dessas famílias apresentarem numerosas espécies utilizadas como alimentos. As sementes de leguminosas são reconhecidamente uma excelente fonte de proteína, e os inibidores de proteinases nelas presentes são os mais estudados nessa classe de compostos (Richardson, 1991).

Inibidores de proteinases estão distribuídos em larga escala nos materiais biológicos, mas são especialmente comuns em sementes de plantas, e têm sido estudados em detalhes em decorrência de sua aplicação como ferramentas importantes na investigação do mecanismo enzimático de desenvolvimento de drogas para tratamento de várias doenças (Batista *et al*, 2001). As serinoproteinases são provavelmente as proteínas mais intensamente investigadas nas sementes vegetais e são divididas de acordo com suas propriedades, desde as famílias *Kunitz*, *Bowman-Birk*, da batata, polpa e famílias de cereais (Batista *et al*, 1996).

Os inibidores *Kunitz* purificados das sementes de leguminosas (encontrados nas subfamílias *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae*, *Papilionoideae* e

Solanaceae) são proteínas caracterizadas por um peso molecular de aproximadamente 20 kDa e são compostos aproximadamente por 180 aminoácidos, incluindo quatro cisteínas, que formam duas pontes disulfato. Entretanto, os inibidores de tripsina purificados da subfamília *Mimosoideae* consistem em dois polipeptídeos ligados a uma ponte disulfato (Oliva *et al.*, 2010; Batista *et al.*, 2001).

1.2.1 EcTI

O *Enterolobium contortisiliquum*, pertencente à subfamília *Mimosoideae* é largamente encontrado no Brasil, sendo oriundo de uma grande árvore de mais de 20 metros de altura, e seus frutos são ricos em taninos e saponinas, sendo altamente tóxicos e têm propriedades abortivas (Riet-Correa *et al.*, 2012). Apresentam coloração marrom e forma arredondada. É popularmente conhecida como orelha-preta, orelha-de-macaco, timbaúba, ximbó, tamburé, entre outros (Batista *et al.*, 1996). As Figuras 2 e 3 demonstram a árvore, frutos e sementes da *Enterolobium contortisiliquum*.

As sementes de *Enterolobium contortisiliquum* contêm o inibidor de tripsina denominado *Enterolobium contortisiliquum Trypsin Inhibitor* – EcTI, cuja concentração é de 5,6 mg de inibidor de tripsina por grama, indicando que essa espécie apresenta uma quantidade superior a média encontrada em espécies tropicais. Esses dados indicam que essa planta possa talvez ser uma alternativa para a preparação comercial de inibidor para ser utilizada como uma ferramenta bioquímica (Batista, 1996).

Figura 2 – Árvore que contém o *Enterolobium contortisiliquum*.

Figura 3 – Frutos e sementes que contém o *Enterolobium contortisiliquum*.

O EcTI possui alta afinidade pela tripsina, quimotripsina, elastase neutrofílica, calicreína humana plasmática, plasmina e pelo fator XIIa, da cascata de coagulação. Dessa maneira, tem a capacidade de inibição da coagulação sanguínea, e de inibição da atividade de enzimas fibrinolíticas. O EcTI pode aumentar o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), que está relacionado à via intrínseca da cascata de coagulação, não tendo efeito sobre o tempo de

protrombina (TP), que relaciona-se com a via extrínseca da cascata (Batista *et al*, 2001; Zhou *et al*, 2013).

Uma investigação sobre as propriedades biológicas do EcTI concluiu que este inibidor de proteinase não demonstrou nenhum efeito sobre a proliferação de células cancerígenas no estômago ou fibroblastos, mas foi capaz de inibir a adesão, migração e invasão destas células cancerígenas no estômago, sem efeito sobre a adesão de fibroblastos (Nakahata *et al*, 2011; De Paula *et al*, 2012).

A estrutura primária (Figura 4) do EcTI foi determinada recentemente (2013), bem como sua estrutura terciária (Figura 5). Ambas confirmaram a similaridade estrutural com membros da família Kunitz de inibidores de proteinases, apresentado os mesmos resíduos de aminoácidos em posição conservadas, inclusive as pontes dissulfetos (Zhou *et al*, 2013).

Figura 4. Estrutura primária, e comparação da sequência de aminoácidos do EcTI com outros inibidores de serino proteinases: Acacia, DE5, Bauhinia. Fonte: Zhou *et al*, 2013.

Figura 5. Estrutura terciária do *Enterolobium contortisiliquum* Trypsin Inhibitor. (EcTI). Fonte: Zhou *et al*, 2013.

1.3 Modelos experimentais

Os modelos experimentais de enfisema em animais são vastamente utilizados para elucidar mecanismos fisiopatológicos e também para testar novas modalidades terapêuticas (Shapiro, 2000). As formas de indução do enfisema são divididas entre os modelos de indução por cigarro e indução por elastase. Existem modelos de enfisema induzidos pela elastase que se diferenciam na dose, na quantidade de aplicações, no tempo do protocolo e na forma de aplicação (Antunes e Rocco, 2011).

Tsuyuki *et al.*, (1997) testaram a efetividade da via nasal instilando azul de Evans em camundongos, e observaram que 75% do total instilado encontrava-se

na via aérea e não havia corante no trato digestório. Eyles *et al.*, (1999), também testaram a efetividade da instilação nasal, utilizando esferas marcadas com material radioativo e observaram 48% do volume total no pulmão após 15 minutos da instilação. Porém, Takafuji *et.al.* (2009) encontraram apenas 19% do total de ovoalbumina misturada com partículas de diesel, mostrando que o modelo de instilação nasal pode ter grande variação.

Tanaka *et al.*, (2011) utilizaram a técnica de instilação intratraqueal para induzir o enfisema (0,01mg de elastase diluído em 50µL de salina). Os resultados do trabalho mostraram que a técnica foi efetiva, pois os animais que receberam elastase apresentaram um aumento no intercepto linear médio (Lm) e nas células inflamatórias do lavado broncoalveolar.

Takahashi *et al.*, (2008) avaliaram o efeito da sinvastatina no modelo de indução de enfisema de 20µg de elastase diluído em 50µL de salina por via intratraqueal. Os resultados mostraram um aumento no intercepto linear médio e no lavado broncoalveolar. O tratamento com a sinvastatina diminuiu em 21% a alteração causada pela elastase no intercepto linear médio e também diminuiu o número total de células do lavado broncoalveolar.

Considerando estes dados optamos por utilizar a via intratraqueal para a administração de elastase e utilizamos camundongos C57Bl/6 por terem sido usados em outros modelos de enfisema e são animais que apresenta maior susceptibilidade à indução do enfisema (Dawkins, Stockley; 2001).

JUSTIFICATIVA

2.0 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, com um aumento de 340% no período de 20 anos (GOLD, 2013). 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. Neste sentido, torna-se necessário, a utilização de modelos experimentais de inflamação pulmonar para que possam ser utilizados na busca de novas drogas para o estudo da importância da inibição deste mecanismo no controle desta lesão pulmonar. Como descrito anteriormente, a utilização do extrato de EcTI na investigação fisiopatológica experimental da DPOC se apoia na teoria do controle de eventos desencadeados por proteinases, podendo alterar o desenvolvimento das lesões pulmonares causadas pela elastase. Ainda, a EcTI é capaz de inibir a atividade de algumas serino-proteinases e, por isso, procuramos investigar o seu efeito em modelo onde a atividade proteolítica tem importante função.

OBJETIVOS

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da proteína *EcTI* no modelo experimental de lesão pulmonar induzida por elastase intratraqueal em camundongos, avaliando os aspectos funcionais e histopatológicos.

3.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar as alterações de mecânica pulmonar.
2. Avaliar o óxido nítrico exalado.
3. Avaliar nas paredes alveolares os seguintes parâmetros:
 - Diâmetro alveolar médio;
 - Resposta inflamatória macrofágica e neutrofílica;
 - Expressão celular de TNF- α ;
 - Conteúdo de fibras elásticas e colágenas;
 - Expressão celular de metaloproteinases 9 e 12 e TIMP1;
 - Expressão celular de iNOS, eNOS e isoprostano PGF2- α ;
4. Avaliar nas vias aéreas não cartilaginosas os seguintes parâmetros:
 - Infiltrado neutrofílico;
 - Expressão celular de TNF- α ;

- Conteúdo de fibras elásticas e colágenas;
- Expressão celular de metaloproteinases 9 e 12 e TIMP1;
- Expressão celular de MUC-5;
- Expressão celular de iNOS, eNOS e isoprostano PGF2- α .

MÉTODOS

4.0 Métodos

4.1 Animais

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo CAPPesq número 243/10). Os animais foram manejados de acordo com as orientações para cuidados com animais de laboratório (NIH, 1996).

Foram utilizados 36 camundongos C57/Bl6, machos, adultos jovens, obtidos do biotério central da Faculdade de Medicina da USP. Houve 4 perdas durante os procedimentos de instilação intratraqueal. 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.

4.2 Material Vegetal

O EcTI foi purificado no laboratório de Bioquímica da UNIFESP, em colaboração com a Profa. Dra. Maria Luiza V. Oliva, de acordo com estudo descrito previamente, por Batista *et al.* (1996). A concentração do inibidor utilizada foi determinada através da dosagem de Lowry para quantificação de proteína e a dose utilizada (2mg/Kg) foi a mesma que a do inibidor de elastase BbCI, outro inibidor de proteinase que está sendo utilizado pelo grupo, para comparação da eficácia de ação.

4.3 Lesão Pulmonar Induzida pela Elastase Intratraqueal

Os animais foram anestesiados com isoflurano, a região 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 foi injetado única dose de 0,025mg de Elastase Porcina Pancreática (E- 1250 - 100 mg, Elastase, Solução pancreática, tipo pâncreas de porco, 2x cristalizado solução aquosa, contém ~ 0,01% timol 14,29mL, 7mg proteína/ 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. Após a instilação foi realizada um massagem no tórax do animal, para espalhar melhor a elastase, e posteriormente a este procedimento o animal foi suturado na incisão e novamente foi aplicado o povidine para desinfetar os pontos.

Os animais do grupo elastase receberam uma única dose de elastase pancreática porcina. Os animais do grupo controle receberam 50 µL de solução salina.

4.4 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, de acordo com o protocolo a que foram submetidos (figuras 6 e 7):

1. Grupo salina - grupo SAL – Os animais receberam injeção intraperitoneal (50 µL) de solução salina uma hora após a instilação intratraqueal de solução salina.

Após 14 dias deste procedimento, receberam mais duas doses de 50 µL de salina (2 mg/kg) a cada 7 dias (n=8).

2. Grupo Elastase - grupo ELA – Os animais receberam injeção intraperitoneal (0,025 mg em 50 µL) de solução salina uma hora após da instilação intratraqueal de elastase. Após 14 dias deste procedimento, receberam mais duas doses de 50 µL de salina (2 mg/kg) a cada 7 dias (n=8).

3. Grupo salina tratado com EcTI - grupo SAL-EcTI – Os animais receberam injeção intraperitoneal, (50 µL) de EcTI (2 mg/kg), uma hora após da instilação intratraqueal de solução salina (50 µL). Após 14 dias deste procedimento, receberam mais duas doses de 50 µL de EcTI (2 mg/kg) a cada 7 dias (n=8).

4. Grupo Elastase tratado com EcTI - grupo ELA-EcTI – Os animais receberam injeção intraperitoneal, (50 µL) de EcTI (2 mg/kg) uma hora após a instilação intratraqueal de elastase (0,025 mg em 50 µL). Após 14 dias deste procedimento, receberam mais duas doses de 50 µL de EcTI (2 mg/kg) a cada 7 dias (n=8).

Figura 6. Descrição do Protocolo Experimental.

Figura 7. Foto da aplicação intraperitoneal de *EcTI*.

4.5 Avaliação da Mecânica Pulmonar

Após os 28 dias dos procedimentos iniciais, os animais foram anestesiados com tiopental (250 mg/kg intraperitoneal) e traqueostomizados. Uma cânula de plástico (20 gauge, BD, MG, Brasil) foi inserida pelo orifício da traqueostomia, que foi fixada com fio de algodão ao redor da traqueia. 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 120 ciclos/min e curva de fluxo inspiratório senoidal (figura 8). Para abolir seu esforço respiratório, os animais receberam pancurônio (0,2 mg/kg intraperitoneal). Quando não havia mais movimentação do animal, os dados para o cálculo da mecânica pulmonar foram registrados. Para tanto, utilizamos um sinal que produzia oscilações do fluxo aéreo com diferentes frequências primas (0,25 a 19,625) por 16 segundos, mantendo-se a válvula expiratória fechada. Os valores

de pressão gerados foram obtidos e a impedância de via aérea (Pressão/Fluxo) foi 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 (i), segundo a equação:

$$Z(f) = \mathbf{Raw} + i(2\pi f)law + \frac{[\mathbf{Gtis} - i\mathbf{Htis}]}{(2\pi f)^\alpha}$$

Neste modelo, $Z(f)$ é a impedância de via aérea em função da frequência, i é a unidade imaginária ($-1^{1/2}$), f é frequência, law é a inertância de vias aéreas e $\alpha = (2/\pi) \cdot \arctan(\mathbf{Htis}/\mathbf{Gtis})$. Os parâmetros que buscamos para descrever o modelo pulmonar são **Raw** (resistência de vias aéreas), **Gtis** (resistência do tecido pulmonar) e **Htis** (elastância de tecido pulmonar).

Figura 8. Aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (*FlexiVent*, Scireq, Montreal, Canadá).

4.6 Determinação do Óxido Nítrico Exalado (E_{NO})

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 5 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 9). A concentração média de NO foi registrada em partes por bilhão (ppb), como um índice da concentração de NO no ar exalado.

Figura 9. 280 NOA – *Nitric Oxide Analyzer* – Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, USA

4.7 Lavado Broncoalveolar

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

de salina. A contagem total de células foi realizado por microscopia ótica com o hemocitômetro de *Neubauer* (400x).

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

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 Estudo Histopatológico

Após a realização do LBA os animais foram exsanguinados, a caixa torácica foi aberta e o coração e o pulmão foram retirados em bloco. Os pulmões foram fixados com formaldeído 4% a uma pressão constante de 20 cmH₂O, por 48 h, para homogeneizar a distensão do parênquima pulmonar. Os pulmões foram guardados em formalina 10% por até 7 dias, e em seguida, foram cortados no seu maior eixo e submetidos a processamento histológico de rotina.

4.9.1 Colorações

As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (avaliação do Lm), Resorcina-Fucsina (para análise de fibras elásticas), Picrossírius (para a análise de fibras colágenas) e também foram preparadas em lâminas em branco para a realização posterior de imuno-histoquímica para a avaliação da expressão celular de MMP-9, MMP-12, TIMP1, iNOS e eNOS, isoprostano, TNF- α e MUC-5.

Para a imunohistoquímica, cortes dos pulmões foram desparafinizados e hidratados.

Etapa 1- Recuperação antigênica: através de Proteinase K, por 20 minutos (37°C), seguida de descanso de 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, as lâminas foram lavadas em PBS.

Etapa 2- Bloqueio e incubação com anticorpo primário: o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada (H₂O₂) 10V 3% (3 x 10 minutos), seguidos de incubação com anticorpos primários, os quais foram aplicados sobre os cortes relativos ao experimento e também aos controles (positivo e negativo) de tecido, e as lâminas foram incubadas “overnight”.

Etapa 3- Incubação com Anticorpo Secundário e Complexo: As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas pelo ABCKit Vectastain (Vector Elite- PK-6105 / PK-6101).

Etapa 4- Revelação: As lâminas foram lavadas em PBS e reveladas pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co, Saint Louis, Missouri, EUA).

Etapa 5- Contra-Coloração e Montagem das Lâminas: As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com *Hematoxilina de Harris*. Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Foram utilizados os seguintes anticorpos para as marcações específicas:

- **Macrófagos**: anticorpo primário anti-macrófagos de camundongos, Mac2 (Cedarlane Lab, Ontário, Canadá) (1:60.000).
- **Neutrófilos**: anticorpo primário anti-neutrófilos de camundongos (AbD serotec, Kidlington, Reino Unido) (1:400).
- **MMP-9**: anticorpo primário anti MMP-9 de camundongos (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) (1:500).
- **MMP-12**: anticorpo primário anti-MMP-12 de camundongos (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) (1:100).
- **iNOS**: anticorpo primário anti-iNOS (LabVision, NeoMarkers, Califórnia EUA) (1:500).
- **eNOS**: anticorpo primário anti-eNOS (LabVision, NeoMarkers, Califórnia, EUA) (1:100).
- **TIMP1**: anticorpo primário anti-TIMP1 (LabVision, NeoMarkers, Califórnia, EUA) (1:400).
- **TNF α** : anticorpo primário anti-TNF α (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA).
- **Isoprostano 8 (PGF2 α)**: anticorpo primário anti-8-Isoprostano (Oxford Biomedical Research, Oxford, Reino Unido) (1:10.000).

- **MUC-5:** anticorpo primário anti-MUC-5 (LabVision, NeoMarkers, Califórnia, EUA) (1:400).

4.9.2 Análise Morfométrica

A análise morfométrica foi realizada com um microscópio óptico e com um retículo de retas e pontos, com 50 retas e 100 pontos, com área conhecida ($62500 \mu\text{m}^2$ no aumento de 400x) usando a técnica de contagem de pontos (Weibel, 2010). Para a realização da contagem, o retículo foi sobreposto ao parênquima pulmonar (figura 10), e nas vias aéreas (figura 11).

Figura 10. Posicionamento do retículo no parênquima pulmonar para realização da técnica de contagem de pontos.

Figura 11. Posicionamento do reticulo na parede da via aérea para a realização da técnica de contagem de pontos.

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

A análise da fração de volume das fibras colágenas, elásticas e de isoprostano também foi realizada com o auxílio do microscópio e do retículo. Foi contado o número de pontos que incidiam nas áreas positivas sobre o número de pontos totais que incidiam nos septos alveolares ou na parede das vias aéreas para cada campo escolhido. Analisamos 20 campos para análise dos septos alveolares e de 3 a 5 campos para análise das vias aéreas. Os resultados foram expressos em % de área positiva (fração de volume).

4.9.3 Análise do Diâmetro Alveolar Médio (Lm)

O Lm foi lido utilizando um microscópio com retículo apropriado. Para o cálculo do diâmetro alveolar médio foi determinada, inicialmente, a área de parênquima pulmonar, excluindo-se vasos e vias aéreas. Estabelecemos sobre a área de parênquima pulmonar um retículo com 50 retas e contamos as intersecções das retas na parede alveolar. Deste modo, calculamos o diâmetro alveolar médio pela relação entre a área do parênquima pulmonar e o número de intersecções das retas e o parênquima pulmonar (Prado *et al.*, 2010).

4.10 Análise Estatística

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

RESULTADOS

5.0 Resultados

5.1 Elastância do sistema respiratório (Ers)

Na figura 12 pode-se observar os valores de elastância do sistema respiratório dos animais dos quatro grupos experimentais. Ocorreu um aumento significativo de Ers nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $37,0 \pm 3,4$ cmH₂O.mL.⁻¹; ELA: $53,6 \pm 6,3$ cmH₂O.mL.⁻¹.s; SAL-EcTI: $32,3 \pm 1,3$ cmH₂O.mL.⁻¹, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI: $34,7 \pm 3,2$ cmH₂O.mL.⁻¹, $p < 0,05$).

Figura 12. Média e erro padrão dos valores de elastância do sistema respiratório dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.2 Resistência do sistema respiratório (Rrs)

A figura 13 mostra os valores de resistência do sistema respiratório dos quatro grupos experimentais. Ocorreu uma redução de Rrs nos animais que receberam o inibidor (SAL-EcTI: $0,7 \pm 0,04$ cmH₂O/mL.⁻¹.s; ELA-EcTI: $0,7 \pm 0,06$ cmH₂O/mL.⁻¹.s) quando comparados aos grupos SAL e ELA (SAL: $1,1 \pm 0,1$ cmH₂O/mL.⁻¹.s, ELA: $1,0 \pm 0,1$ cmH₂O/mL.⁻¹.s, $p < 0,05$).

Figura 13. Média e erro padrão dos valores de resistência do sistema respiratório dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos grupos ELA-EcTI e SAL-EcTI.

5.3 Resistência de vias aéreas (Raw)

A figura 14 mostra os valores de resistência de vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Ocorreu um aumento significativo de Raw nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $0,35 \pm 0,1$ cmH₂O/mL/s; ELA: $0,7 \pm 0,1$ cmH₂O/mL/s; SAL-EcTI: $0,27 \pm 0,03$ cmH₂O/mL/s, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI: $0,29 \pm 0,05$ cmH₂O/mL/s, $p < 0,05$).

Figura 14. Média e erro padrão dos valores de resistência de vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.4 Resistência de tecido pulmonar (Gtis)

A figura 15 mostra os valores de resistência de tecido pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. Não houve diferença significativa entre o grupo ELA e os grupos controle (SAL: $7,50 \pm 0,3$ cmH₂O/mL/s^(1-α); ELA: $8,6 \pm 0,7$ cmH₂O/mL/s^(1-α); SAL-EcTI: $6,9 \pm 0,4$ cmH₂O/mL/s^(1-α)). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA, sem diferença significativa (ELA-EcTI: $7,0 \pm 0,3$ cmH₂O/mL/s^(1-α)).

Figura 15. Média e erro padrão dos valores de resistência de tecido pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais.

5.5 Elastância do tecido pulmonar (Htis)

Os valores de elastância de tecido pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais são mostrados da figura 16. Observa-se um aumento significativo de Htis nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $40,0 \pm 3,1$ cmH₂O/mL/s^(1-α); ELA: $67,6 \pm 12,6$ cmH₂O/mL/s^(1-α); SAL-EcTI: $39,4 \pm 3,4$ cmH₂O/mL/s^(1-α), $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI: $36,3 \pm 4,4$ cmH₂O/mL/s^(1-α), $p < 0,05$).

Figura 16. Média e erro padrão dos valores de elastância de tecido pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.6 Óxido nítrico exalado (NOex)

A figura 17 mostra os valores do óxido nítrico exalado dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $46,0 \pm 5,2$ ppb; ELA: $58,5 \pm 4,0$ ppb; SAL-EcTI $28,0 \pm 4,1$ ppb, $p < 0,05$). Houve uma alteração significativa do NO exalado nos grupos tratados com EcTI comparativamente aos demais (ELA-EcTI $31,7 \pm 2,2$ ppb, $p < 0,05$).

Figura 17. Média e erro padrão dos valores de ONE dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos ELA e SAL.

5.7 Lavado broncoalveolar: células totais

A figura 18 mostra os valores do número total de células no fluido do lavado broncoalveolar (FLBA) dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo de células totais nos animais do grupo ELA comparativamente aos controles (SAL: $0,5 \pm 0,2 \times 10^4$ células/mL, ELA: $1,8 \pm 0,4 \times 10^4$ células/mL, SAL-EcTI: $0,6 \pm 0,1 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI: $0,9 \pm 0,1 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$).

Figura 18. Média e erro padrão dos valores do número total de células no FLBA dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.8 Lavado broncoalveolar: macrófagos

A figura 19 mostra os valores do número de macrófagos no fluido do lavado broncoalveolar (FLBA) dos animais dos quatro grupos experimentais. Ocorreu aumento significativo de macrófagos nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $0,63 \pm 0,04 \times 10^4$ células/mL; ELA: $1,47 \pm 0,2 \times 10^4$ células/mL; SAL-EcTI: $0,57 \pm 0,3 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI: $0,64 \pm 0,1 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$).

Figura 19. Média e erro padrão dos valores de macrófagos no FLBA dos animais dos quatro grupos experimentais * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.9 Lavado broncoalveolar: neutrófilos

A figura 20 mostra os valores do número de neutrófilos dos quatro grupos experimentais. Observa-se aumento significativo nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $0,0007 \pm 0,0007 \times 10^4$ células/mL; ELA: $0,50 \pm 0,17 \times 10^4$ células/mL; SAL-EcTI: $0,006 \pm 0,003 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$). Houve atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $0,024 \pm 0,02 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$).

Figura 20. Média e erro padrão dos valores de neutrófilos no FLBA dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.10 Lavado broncoalveolar: linfócitos

A figura 21 mostra os valores do número de linfócitos no fluido do lavado broncoalveolar (FLBA) dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $0,0011 \pm 0,0007 \times 10^4$ células/mL; ELA: $0,26 \pm 0,09 \times 10^4$ células/mL; SAL-EcTI: $0,005 \pm 0,001 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI: $0,02 \pm 0,004 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$).

Figura 21. Média e erro padrão dos valores de linfócitos no FLBA dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.11 Lavado broncoalveolar: eosinófilos

A figura 22 mostra os valores do número de eosinófilos no fluido do lavado broncoalveolar (FLBA) dos animais dos quatro grupos experimentais. Ocorreu um aumento significativo nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $0,000 \pm 0,00$ 10^4 células/mL; ELA: $0,05 \pm 0,01$ 10^4 células/mL; SAL-EcTI: $0,005 \pm 0,001$ 10^4 células/mL, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI: $0,0072 \pm 0,002$ 10^4 células/mL, $p < 0,05$).

Figura 22. Média e erro padrão dos valores de eosinófilos no FLBA dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.12 Intercepto linear médio (Lm)

A figura 23 mostra os valores do intercepto linear médio (Lm) dos animais dos quatro grupos experimentais. Ocorreu aumento significativo de Lm nos animais do grupo ELA quando comparados aos demais grupos (SAL: $44,7 \pm 1,6 \mu\text{m}$; ELA: $69,0 \pm 2,7 \mu\text{m}$; SAL-EcTI: $42,5 \pm 2,4 \mu\text{m}$, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI: $57,6 \pm 5,2 \mu\text{m}$, $p < 0,05$).

Figura 23. Média e erro padrão dos valores de intercepto linear médio dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-EcTI.

5.13 Avaliação do número de macrófagos no septo alveolar

A figura 24 mostra os valores do número de macrófagos no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $0,29 \pm 0,10$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $1,27 \pm 0,16$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $0,74 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $0,87 \pm 0,12$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 24. Média e erro padrão dos valores do número de macrófagos no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos.

5.14 Avaliação da infiltração neutrofílica nos septos alveolares

A figura 25 mostra os valores de neutrófilos no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $0,12 \pm 0,05$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $0,50 \pm 0,05$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $0,20 \pm 0,06$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $0,21 \pm 0,03$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 25. Média e erro padrão dos valores de neutrófilos no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos.

5.15 Avaliação da infiltração neutrofílica nas vias aéreas

A figura 26 mostra os valores de neutrófilos nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $0,89 \pm 0,27$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $4,01 \pm 0,37$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $0,87 \pm 0,25$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $2,35 \pm 0,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 26. Média e erro padrão dos valores de neutrófilos nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-EcTI.

5.16 Avaliação do número de células positivas para TNF- α no septo alveolar

A figura 27 mostra os números de células positivas para TNF- α no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $0,97 \pm 0,19$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $3,92 \pm 0,43$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $1,13 \pm 0,22$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $2,10 \pm 0,31$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 27. Média e erro padrão dos valores de células TNF- α positivas no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos.

5.17 Avaliação do número de células positivas para TNF- α nas vias aéreas

A figura 28 mostra os números de células positivas para TNF- α nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $0,84 \pm 0,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $4,01 \pm 0,54$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $1,16 \pm 0,22$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $2,45 \pm 0,45$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 28. Média e erro padrão dos valores de células TNF- α positivas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos.

5.18 Fração de volume de fibras colágenas no septo alveolar

A figura 29 mostra os valores da fração de volume de fibras colágenas no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $9,69 \pm 0,07$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $11,62 \pm 0,37$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $9,28 \pm 0,89$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $9,05 \pm 0,69$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$).

Figura 29. Média e erro padrão dos valores da fração de volume de fibras colágenas no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais, * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.19 Fração de volume de fibras colágenas nas vias aéreas

A figura 30 mostra os valores fração de volume de fibras colágenas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $4,46 \pm 0,50$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $8,83 \pm 0,44$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $3,15 \pm 0,28$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $6,10 \pm 0,70$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$).

Figura 30. Média e erro padrão dos valores da fração de volume de fibras colágenas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais, * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,05$ comparativamente ao grupo SAL-EcTI.

5.20 Fração de volume de fibras elásticas no septo alveolar

A fração de volume de fibras elásticas no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais esta mostrada na figura 31. Observa-se um aumento significativo de fibras elásticas nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $0,29 \pm 0,02\%$; ELA: $0,47 \pm 0,03\%$; SAL-EcTI: $0,33 \pm 0,02\%$, $p < 0,05$). Não houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI: $0,3 \pm 0,03\%$).

Figura 31. Média e erro padrão da fração de volume de fibras elásticas no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente entre os grupos SAL e SAL-EcTI.

5.21 Fração de volume de fibras elásticas nas vias aéreas

A fração de volume de fibras elásticas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais esta mostrada na figura 32. Observa-se um aumento significativo de fibras elásticas nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $0,29 \pm 0,02\%$; ELA: $0,47 \pm 0,03\%$; SAL-EcTI: $0,33 \pm 0,02\%$ $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI: $1,4 \pm 0,13\%$, $p < 0,05$).

Figura 32. Média e erro padrão da fração de volume do conteúdo de fibras elásticas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais, * $p < 0,05$ comparativamente aos demais.

5.22 Avaliação de células MMP-9 positivas no septo alveolar

A figura 33 mostra os valores do número de células MMP-9 positivas no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $3,17 \pm 0,49$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $12,48 \pm 0,86$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $4,69 \pm 0,47$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $8,70 \pm 1,41$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 33. Média e erro padrão dos valores de células positivas para MMP-9 no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-EcTI

5.23 Avaliação de células MMP-9 positivas nas vias aéreas

A figura 34 mostra os valores do número de células MMP-9 positivas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $4,61 \pm 0,77$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $13,84 \pm 1,66$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $4,4 \pm 0,52$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $9,85 \pm 0,82$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 34. Média e erro padrão dos valores de células positivas para MMP-9 nas vias aéreas na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-EcTI.

5.24 Avaliações de células MMP-12 positivas no septo alveolar

A figura 35 mostra os valores do número de células MMP-12 positivas no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $5,03 \pm 0,63$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $16,28 \pm 1,07$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $5,93 \pm 0,69$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $9,49 \pm 0,36$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 35. Média e erro padrão dos valores de células positivas para MMP-12 no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-EcTI.

5.25 Avaliações de células MMP-12 positivas nas vias aéreas

A figura 36 mostra os valores do número de células MMP-12 positivas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $5,25 \pm 0,48$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $15,93 \pm 0,95$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $6,04 \pm 0,45$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $9,59 \pm 0,48$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 36. Média e erro padrão dos valores de células positivas para MMP-12 nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-EcTI.

5.26 Avaliação do número de células TIMP-1 positivas no septo alveolar

A figura 37 mostra os valores do número de células TIMP-1 positivas no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $3,39 \pm 0,32$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $14,04 \pm 0,74$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $4,43 \pm 0,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $11,29 \pm 1,07$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 37. Média e erro padrão dos valores de células positivas para TIMP-1 no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-EcTI.

5.27 Avaliação do número de células TIMP-1 positivas nas vias aéreas

A figura 38 mostra os valores do número de células TIMP-1 positivas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $3,49 \pm 0,64$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $13,12 \pm 0,98$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $3,64 \pm 0,78$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Não houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $11,82 \pm 0,87$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 38. Média e erro padrão dos valores de células positivas para TIMP-1 nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-EcTI. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-EcTI.

5.28 Avaliação do número de células eNOS positivas no septo alveolar

A figura 39 mostra os valores do número de células eNOS positivas no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $0,63 \pm 0,17$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $3,01 \pm 0,45$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $0,58 \pm 0,12$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $1,51 \pm 0,26$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 39. Média e erro padrão dos valores de células positivas para eNOS no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos.

5.29 Avaliação do número de células eNOS positivas nas vias aéreas

A figura 40 mostra os valores do número de células eNOS positivas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $0,86 \pm 0,28$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $3,09 \pm 0,43$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $1,12 \pm 0,20$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $1,98 \pm 0,37$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 40. Média e erro padrão dos valores de células positivas para eNOS nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos.

5.30 Avaliação do número de células iNOS positivas no septo alveolar

A figura 41 mostra os valores do número de células iNOS positivas no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $0,70 \pm 0,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $3,33 \pm 0,37$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $1,08 \pm 0,22$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $1,94 \pm 0,29$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 41. Média e erro padrão dos valores de células positivas para iNOS no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos.

5.31 Avaliação do número de células iNOS positivas nas vias aéreas

A figura 42 mostra os valores do número de células iNOS positivas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $0,84 \pm 0,37$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $5,13 \pm 0,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $1,34 \pm 0,27$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $2,39 \pm 0,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 42. Média e erro padrão dos valores de células positivas para iNOS nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos.

5.32 Avaliação da fração de volume de 8-iso-PGF2 α no septo alveolar

A figura 43 mostra os valores da fração do volume de isoprostano-8 no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $5,92 \pm 0,58$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $13,89 \pm 1,07$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $7,15 \pm 0,89$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $11,08 \pm 0,63$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 43. Média e erro padrão dos valores da fração do volume de isoprostano-8 no septo alveolar dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-EcTI.

5.33 Avaliação da fração de volume de 8-iso-PGF2 α nas vias aéreas

A figura 44 mostra os valores da fração de volume de isoprostano nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $6,75 \pm 0,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $16,12 \pm 1,17$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $6,67 \pm 0,88$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $12,04 \pm 1,14$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 44. Média e erro padrão dos valores da fração do volume de isoprostano-8 nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-EcTI.

5.34 Avaliação de MUC-5ac nas vias aéreas

A figura 45 mostra os valores do número de células MUC-5ac positivas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $1,31 \pm 0,47$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $7,09 \pm 0,60$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-EcTI $1,19 \pm 0,27$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-EcTI em relação ao grupo ELA (ELA-EcTI $3,50 \pm 0,54$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 45. Média e erro padrão dos valores de células positivas para MUC-5ac nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-EcTI.

5.35 Fotomicrografias

As figuras 46 a 66 demonstram as fotomicrografias dos quatro grupos de pesquisa: grupos SAL, ELA, SAL-EcTI e ELA-EcTI.

Figura 46. Fotomicrografias representativas de macrófagos nos septos alveolares.

Figura 47. Fotomicrografias representativas de neutrófilos nos septos alveolares.

Figura 48. Fotomicrografias representativas de neutrófilos nas vias aéreas.

Figura 49. Fotomicrografias representativas de células TNF α positivas nos septos alveolares.

Figura 50. Fotomicrografias representativas de células TNF α positivas nas paredes das vias aéreas.

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

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

Figura 53. Fotomicrografias representativas da fração de volume de fibras colágenas nos septos alveolares.

Figura 54. Fotomicrografias representativas da fração de volume de fibras colágenas nas paredes das vias aéreas.

Figura 55. Fotomicrografias representativas de células MMP-9 positivas nos septos alveolares.

Figura 56. Fotomicrografias representativas de células MMP-9 positivas nas paredes das vias aéreas.

Figura 57. Fotomicrografias representativas de células MMP-12 positivas nos septos alveolares.

Figura 58. Fotomicrografias representativas de células MMP-12 positivas nas paredes das vias aéreas.

Figura 59. Fotomicrografias representativas de células TIMP-1 positivas nas paredes das vias aéreas.

Figura 60. Fotomicrografias representativas de células TIMP-1 positivas nos septos alveolares.

Figura 61. Fotomicrografias representativas de células iNOS positivas nos septos alveolares.

Figura 62. Fotomicrografias representativas de células iNOS positivas nas paredes das vias aéreas.

Figura 63. Fotomicrografias representativas de células eNOS positivas nos septos alveolares.

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

Figura 65. Fotomicrografias representativas da fração de volume de 8-iso-PGF2α nos septos alveolares.

Figura 66. Fotomicrografias representativas da fração de volume de 8-iso-PGF2 α nas paredes das vias aéreas.

DISCUSSÃO

6.0 Discussão

O desequilíbrio entre os sistemas de proteinases e antiproteinases é a teoria fisiopatológica dominante na literatura, que explica a destruição pulmonar (Churg e Wright, 2005; Gina, 2013). Segundo esta hipótese, a inalação de fumaça de cigarro induz um aumento no número de neutrófilos e macrófagos que liberam enzimas proteolíticas nos pulmões tais como: elastase neutrofílica; catepsina K, L e S; proteinase 3; metaloproteinase de matriz 9 e 12 (Shapiro, 2000). Recentemente, as novas estratégias terapêuticas destinadas a controlar a produção e/ou inativação de proteinases são discutidos, uma vez que as enzimas não são mais consideradas importantes apenas na degradação de proteínas, mas também são consideradas moléculas sinalizadoras envolvidas em muitos processos biológicos importantes.

Utilizando um modelo de lesão pulmonar induzida pela elastase intratraqueal, observamos neste trabalho que o grupo elastase (ELA) apresentou uma exacerbação nos parâmetros da mecânica pulmonar relativos às alterações de parênquima (E_{RS} e H_{tis}) e vias aéreas (R_{aw}), no óxido nítrico exalado e no intercepto alveolar médio (L_m). Notamos também aumento nas células encontradas no lavado broncoalveolar (células totais, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos) e em macrófagos, neutrófilos e em células que expressam $TNF-\alpha$ nos septos alveolares. Em relação às vias aéreas, houve um aumento de neutrófilos e de células que expressam $TNF-\alpha$. Sobre o processo de remodelamento pulmonar, tanto nos septos alveolares quanto nas vias aéreas

houve um aumento de fibras colágenas, elásticas e de células que expressam MMP-9, MMP-12 e TIMP-1. Nas vias aéreas, houve um aumento das células MUC-5 positivas. Na avaliação da resposta do estresse oxidativo ocorreu um aumento de células que expressam eNOS, iNOS além da fração de volume de isoprostano nos septos alveolares e em vias aéreas.

Considerando agora o tratamento com o inibidor de protease EcTI, no grupo que recebeu elastase intratraqueal e foi tratado com EcTI (ELA-EcTI), houve uma atenuação dos parâmetros da mecânica pulmonar relativos às alterações de parênquima (E_{RS} e H_{tis}) e vias aéreas (R_{aw}), além do óxido nítrico exalado, e no índice de alargamento dos septos alveolares (L_m). O lavado broncoalveolar apresentou uma diminuição significativa das células totais, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos. Avaliando a inflamação pulmonar, notamos que nos septos alveolares houve diminuição de macrófagos, neutrófilos e células que expressam $TNF-\alpha$. Nas vias aéreas ocorreu redução de neutrófilos e células que expressam $TNF-\alpha$. Sobre a resposta de remodelamento pulmonar, tivemos como resultado tanto nos septos alveolares quanto nas vias aéreas uma diminuição da fração de volume das fibras colágenas e de células que expressam MMP-9 e MMP-12. Com relação às fibras elásticas, a redução foi notada nas vias aéreas, e para células que expressam TIMP-1, esta diminuição foi encontrada nos septos alveolares. Nas vias aéreas houve também redução das células MUC-5 positivas. Com o mesmo padrão de resposta, durante a avaliação da resposta do estresse oxidativo, nos deparamos com uma diminuição de células que expressam eNOS, iNOS e fração de volume de isoprostano nos septos alveolares e em vias aéreas.

Os resultados do presente estudo mostraram uma redução da resistência do sistema respiratório (Rrs) dos animais tratados com EcTI, independente de receber ou não elastase intratraqueal. Esta ação broncodilatadora sugere que o inibidor de proteinase EcTI deve ser testado também em modelos experimentais de asma brônquica. Ainda com relação ao calibre das vias aéreas, em relação à Raw, notamos que houve aumento no grupo elastase e o tratamento com EcTI reduziu este parâmetro. Os dados sugerem que a elastase intratraqueal causou constrição das vias aéreas destes animais e o tratamento efetuado foi capaz de controlar esta resposta.

Em relação à elastância do sistema respiratório (Ers), que avalia as alterações de vias aéreas distais e parênquima pulmonar, ocorreu aumento nos animais que receberam elastase intratraqueal. Estes dados são corroborados pelos resultados obtidos nos valores de elastância de tecido pulmonar (Htis), que manteve o mesmo padrão de resposta. Estes resultados demonstraram a efetividade do modelo experimental visto que, além do alargamento e destruição dos alvéolos também mostrou alteração das vias aéreas distais. Para melhor compreender os determinantes dessa resposta, optamos por avaliar as alterações de inflamação, remodelamento e de estresse oxidativo nas vias aéreas.

Em estudos com lesão pulmonar pela induzida elastase, vários parâmetros funcionais podem ser avaliados (Chung e Adcock, 2008). Tibboel e Post (2010), avaliaram a função pulmonar de camundongos que receberam 0,016 mg de elastase, e identificaram uma alteração do padrão respiratório, com um aumento

na frequência respiratória e no volume corrente. Estes animais apresentaram uma diminuição na elastância de tecido e um alargamento dos espaços alveolares.

Ito *et al.*, (2004) que avaliaram a mecânica pulmonar de camundongos após a administração da mesma dose de elastase (0,016 mg) por via intratraqueal, também mostraram uma diminuição da elastância do sistema respiratório. Os autores sugerem que o remodelamento anormal de fibras colágenas tem um papel importante na função pulmonar e nas alterações mecânicas neste modelo experimental.

Com um padrão de resposta similar quanto a queda de elastância, Hantos *et al.* (2008), avaliaram a mecânica pulmonar de camundongos que receberam uma dose menor de elastase (0,010 mg), por via intratraqueal. Além da queda da elastância de tecido dos pulmões, os animais apresentaram um aumento do volume corrente. Este estudo não demonstrou alterações na resistência de vias aéreas e nem na resistência de tecidos. Estes autores, diferentemente dos outros, concluíram que a destruição tecidual não está associada à disfunção pulmonar, e as diferenças observadas podem ser em decorrência das diferenças nos protocolos e nas doses de elastase empregadas.

Para Scuri *et al.* (2000), a administração de elastase, por ativação de calicreinas teciduais, gera um aumento da produção de bradicinina, e este mediador por sua vez, aumentou a resistência e a elastância pulmonar, levando a uma broncoconstrição. Esses autores mostraram que o tratamento com um antagonista de histamina não é capaz de reverter essa resposta, porém esta ação foi eficientemente bloqueada pelo antagonista do receptor β_2 de bradicinina, confirmando assim o envolvimento do sistema calicreína-kinina nesse processo.

Considerando a avaliação da lesão alveolar, através do resultado do Lm, que avalia o índice de alargamento dos alvéolos, observamos que o modelo experimental utilizado foi efetivo em aumentar os espaços alveolares. Notamos também que o inibidor de proteinase EcTI atenuou a destruição do parênquima pulmonar dos camundongos que receberam elastase intratraqueal.

Cabe ressaltar que, embora alguns autores argumentem que as medidas de Lm não sejam apuradas, pois não estimam diretamente o diâmetro do alvéolo, estas medidas continuam sendo amplamente utilizadas e aceitas pela comunidade científica (Mitzner, 2008).

Shapiro *et al.* (2003) também avaliaram o efeito da elastase sobre o alargamento dos espaços aéreos. Estes autores utilizaram camundongos geneticamente modificados que não produziam elastase de neutrófilos, e os expôs ao cigarro. Neste estudo, os resultados demonstraram que os animais que não produziam elastase apresentaram uma redução da destruição tecidual (medida pelo Lm) em torno de 59% em relação aos animais sem alteração genética.

Já Guarnieri *et al.* (2010), utilizando uma dose alta de elastase (0,036 mg) mostraram que um inibidor da enzima ligado ao trifluoro, usado em testes clínicos com fragmentos de aminoácidos de surfactante humano, preveniu alargamento dos alvéolos dos camundongos que receberam elastase.

Para avaliação da inflamação pulmonar, analisamos o lavado broncoalveolar, que é uma das maneiras mais eficientes e comuns de monitorar tal inflamação (Churg e Wright, 2005). Notamos neste estudo que o EcTI causou uma diminuição significativa no número de macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, indicando um efeito antiinflamatório importante deste inibidor de

proteinase. Estes resultados são semelhantes aos relatados por Neuhoof *et al.*, (2003) no modelo de edema pulmonar causado por ativação dos neutrófilos. Estes autores, utilizando o inibidor de elastase BbCI da família Kunitz de origem vegetal, demonstraram uma diminuição do edema pulmonar, na mesma magnitude de uma outra substância utilizada como referência para o tratamento dessa doença.

Ao analisarmos os dados da literatura referentes a outros inibidores de proteinases e particularmente do curcumim no enfisema induzido por 0,010 mg de elastase via intratraqueal, Suzuki *et al.* (2009) observaram que este inibidor, extraído de uma raiz da família do gengibre, foi capaz de reduzir o número total de células, de macrófagos e de neutrófilos no lavado broncoalveolar destes animais.

Adicionalmente, Plantier *et al.* (2007) avaliaram o lavado broncoalveolar de camundongos que receberam 0,086 mg de elastase, por via intratraqueal e foram tratados pelo fator de crescimento de queratinócitos (KGF). Os autores mostraram que o KGF diminui de forma significativa o número total de células, o número de macrófagos e de neutrófilos.

Para melhor caracterizar a resposta inflamatória, realizamos análises imunohistoquímicas para quantificar a presença de neutrófilos e células que expressam TNF- α , um importante mediador inflamatório liberado por macrófagos, em vias aéreas e nos septos alveolares, além dos macrófagos nos septos alveolares. Notamos um aumento importante destas células nos animais que receberam elastase, e demonstramos que o EcTI foi capaz de diminuir o número de macrófagos, o que se refletiu em diminuição de TNF- α , além da diminuição de neutrófilos, todos nos septos alveolares. Nas vias aéreas, também encontramos

valores mais baixos de células que expressam TNF- α e neutrófilos. Esse efeito anti-inflamatório corrobora com os achados do lavado broncoalveolar.

Em relação à resposta de remodelamento observamos um aumento na proporção de volume de fibras elásticas e colágenas nos animais que receberam elastase. O tratamento com o EcTI reverteu esta alteração, em vias aéreas, e na quantidade de fibras de colágeno em septos alveolares. Provavelmente isto pode estar associado ao fato de que o EcTI, causando bloqueio da ativação de proteinases, incluindo a elastase de neutrófilo altera a quebra de fibras elásticas situadas no parênquima pulmonar. Este efeito é semelhante ao demonstrado nos estudos de Almeida-Reis *et al.*, (2012) que utilizaram um inibidor direto da atividade proteolítica dessa enzima, o BbCI.

Na avaliação das metaloproteinases 9 e 12 (MMP-9 e MMP-12) observamos que no grupo ELA ocorreu aumento da expressão celular dessas enzimas, sendo que o tratamento com EcTI reduziu de forma significativa esta expressão, tanto nos septos alveolares quanto nas vias aéreas.

Estudando os efeitos da carbocisteína, em um modelo de exposição à fumaça de cigarro em ratos, Hanaoka *et al.* (2011) observaram um aumento da expressão de MMP-9 no parênquima pulmonar, sendo que o tratamento com carbocisteína reduziu esta alteração. Shapiro *et al.* (2003), usando camundongos *knocked-out*, que não produzem MMP-12, mostraram que essa proteinase possui importante papel no desenvolvimento do enfisema induzido pela exposição da fumaça de cigarro.

Observamos uma atenuação da expressão celular de TIMP-1, um inibidor de MMP-9, nos septos alveolares dos animais tratados com EcTI. Em situações de

aumentos da expressão celular de MMP-9, o organismo recorre a mecanismos compensatórios aumentando a expressão de TIMP-1. No nosso modelo, os animais do grupo ELA apresentaram um aumento deste inibidor. A alteração da relação TIMP-1/MMP-9 pode interferir no tráfego celular, no reparo tecidual e também pode ajudar a aumentar a deposição de matriz extracelular e fibrose agindo na inibição da MMP-9.

Verificamos também que houve um aumento no número de células positivas para MUC-5 nos animais que receberam elastase, o que pode sugerir que seja uma alteração mais tardia no desenvolvimento da doença. Também em relação a esse aspecto, os nossos resultados apontaram uma atenuação no número de células positivas para MUC-5, nos animais tratados com o EcTI.

A produção de muco na DPOC é um importante fator na fisiopatologia da doença (GOLD, 2013). A ativação de neutrófilos tem um papel importante na produção de muco dependente do receptor do fator de crescimento do epitélio (EGFR) pois estimula a produção de $TNF\alpha$ pelas células do epitélio, libera espécies reativas de oxigênio (ROS), que ativam a EGFR; além de causar uma desgranulação potente das células caliciformes. (Zhou *et al*, 2013).

No presente estudo demonstramos que a lesão pulmonar por elastase intratraqueal causou um aumento no óxido nítrico exalado, associado à elevação do número de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos no lavado broncoalveolar. O tratamento com EcTI atenuou esta resposta, envolvida com a redução da inflamação, e com a produção de óxido nítrico exalado.

Evidenciamos também uma atenuação da resposta de estresse oxidativo com redução de expressão celular de eNOS e iNOS tanto nos septos alveolares como em vias aéreas. De acordo com Prado *et al.* (2005) e Prado *et al.* (2010), o óxido nítrico exerce importante papel na fisiopatologia da asma, com aumento da expressão de iNOS em eosinófilos e células linfomononucleares presentes nas vias aéreas distais de animais sensibilizados. Ainda, estes mesmos autores mostraram que a isoforma nNOS, embora constitutiva, encontra-se presente em células inflamatórias (linfomononucleares e eosinófilos) (Prado *et al.*, 2003).

Em estudos realizados pelo mesmo grupo, em relação a resposta do parênquima pulmonar em animais com inflamação alérgica crônica, a inibição da iNOS com 1400W ou de todas as NOS com L-NAME atenuou a resposta constritora ao desafio com antígeno. Esta alteração funcional se associou ao controle da resposta de inflamação, remodelamento e estresse oxidativo (Angeli *et al.*, 2008, Starling *et al.*, 2009, Prado *et al.*, 2010). Este efeito de atenuação da resposta constritora pelo bloqueio da iNOS parece depender também da modulação da Rhoquinase (Possa *et al.*, 2012)

Além disso, os resultados de Prado *et al.*, (2011) também demonstraram que a inibição de iNOS é capaz de reduzir a expressão celular de MMP-9, TIMP-1 e TGF-beta nas paredes vasculares dos brônquios dos animais sensibilizados por ovalumina. O remodelamento da matriz extracelular nas vias aéreas pode estar explicado em decorrência deste mecanismo de ação, já que todos estes mediadores atuam na produção de colágeno e fibras elásticas. Assim, a diminuição tanto das metaloproteinases como do TIMP-1 pelo inibidor de

proteínase EcTI pode também ser entendida como decorrência do efeito inibitório deste inibidor de proteína sobre a iNOS.

Por fim, quantificamos também, a expressão de isoprostano PGF2 α . O contato de agentes oxidantes com a membrana celular leva à peroxidação lipídica da membrana celular, responsável pela formação de uma série de compostos bioativos análogos às prostaglandinas, conhecidos como isoprostanos (Morrow, 2006). Estes possuem uma potente atividade biológica e são responsáveis pela mediação de certos aspectos da lesão oxidativa (Milne *et al.*, 2008). Observamos um aumento do isoprostano PGF2 α nos grupos que receberam a elastase sendo que o EcTI conseguiu diminuir os efeitos observados.

Os resultados obtidos sugerem que, neste modelo, o inibidor EcTI por diminuir o processo inflamatório, é capaz de induzir a produção de iNOS, reduzindo a formação exacerbada de NO, protegendo assim o tecido. A redução da resistência do sistema respiratório (Rrs), nos grupos de animais SAL e ELA em animais tratados por EcTI sugere um efeito broncodilatador deste inibidor e aponta para uma investigação mais aprofundada em modelos experimentais de asma. Além disso, verificamos uma modulação do remodelamento da matriz extracelular e do estresse oxidativo nos animais tratados com EcTI, neste modelo experimental. Assim, estes efeitos sugerem que o EcTI possa contribuir como uma ferramenta no tratamento de pacientes com DPOC.

CONCLUSÃO

7.0 Conclusão

No modelo de elastase intratraqueal ocorre a constrição das vias aéreas e parênquima pulmonar. No lavado broncoalveolar houve um aumento no número total de células, no número de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. Na resposta inflamatória, houve um aumento de macrófagos no parênquima pulmonar, de neutrófilos e de células que expressam $\text{TNF-}\alpha$ no parênquima e em vias aéreas. Com relação ao remodelamento pulmonar houve um aumento da fração de volume de fibras colágenas e elásticas, células que expressam MMP-9, MMP-12 e TIMP-1 no parênquima pulmonar e nas vias aéreas, e de MUC-5 nas vias aéreas. Sobre o estresse oxidativo, houve um aumento de células que expressam eNOS, iNOS e da fração de volume de isoprostano no parênquima pulmonar e nas vias aéreas.

O tratamento com o inibidor EcTI neste modelo experimental foi capaz de diminuir a constrição de vias aéreas e parênquima pulmonar. O EcTI se associou a uma redução significativa de óxido nítrico exalado e levou a um controle da resposta inflamatória com diminuição do lavado broncoalveolar do número de macrófagos, neutrófilos, de linfócitos e de eosinófilos, além do intercepto linear médio. O inibidor de proteinase, EcTI, também foi capaz de diminuir o número de neutrófilos e $\text{TNF-}\alpha$ positivas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas e de macrófagos no parênquima pulmonar.

Houve controle do remodelamento pulmonar, pois o EcTI teve como ação a diminuição de fibras colágenas, MMP-9, MMP-12, TIMP-1 no parênquima

pulmonar e nas vias aéreas. Além disso, observamos também uma diminuição nas células MUC-5 positivas, além da proporção de fibras elásticas nas vias aéreas.

Houve atenuação da resposta de estresse oxidativo com redução da expressão de iNOS, eNOS e isoprostano, tanto em vias aéreas quanto no parênquima pulmonar.

De acordo com os resultados obtidos, e apesar de novas pesquisas serem necessárias, o EcTI pode ser considerado uma importante ferramenta no manejo terapêutico para o tratamento da DPOC.

REFERÊNCIAS

8.0 Referências Bibliográficas

Abbey DE, Burchette RJ, Knutsen SF, McDonnell WF, Lebowitz MD, Enright PL. Long-term particulate and other air pollutants and lung function in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Jul;158(1):289-98.

Almeida Reis R Oliveira, BM Theodoro-Junior, OA Oliva, LV Pinheiro, N Brito, MV Lopes, FDTQS Prado CM, Martins MA, Oliva MLV, Tibério IFLC. Treatment with proteinase inhibitor, BbCI, modulates inflammatory response, mechanic alterations and remodelling on elastase-induced emphysema in mice. In: European Respiratory Society Annual Congress, 2012, Viena, Austria. *Eur Respir J*, 2012; 40:138.

Amalinei C. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol*. 2010, 51: 215-28.

Amoli, K. Bronchopulmonary Disease Iranian Housewives Chronically Exposed To Indoor Smoke. *Eur Respir J*. 1998; 659-663.

Angeli P, Prado CM, Xisto DG, Silva PL, Pássaro CP, Nakazato HD, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Rocco PR, Tibério IF: Effects of chronic L- NAME treatment lung tissue responses induced by chronic pulmonary inflammation mechanics, eosinophilic and extracellular matrix. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 294:L1197-L1205.

Antão CM, Malcata FX. Plant serino proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol Biochem*, 2005; 43 (7): 637-50.

Antunes MA, Rocco PRM. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. *An. Acad. Bras. Ciênc.* [online]. 2011; 1385-1396.

Bakke PS; Baste V, Hanao R, Gulsvik A. Prevalence Of Obstructive Lung Disease In A General Population: Relation To Occupational Title And Exposure To Some Airborne Agents. [s.ed.) Thorax. 1991; 863-70.

Barnes P J, S I, A M, and D F Rogers. Nitric oxide inhibition of basal and neurogenic mucus secretion in ferret trachea in vitro. Br J Pharmacol. 1996; 998–1002.

Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. "Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms." Eur Respir J. 2003; 672-88.

Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press; New York: 2004.

Batista IFC; Oliva MLV; Araujo MS; Sampaio MU; Richardson M; Fritz H and Sampaio, CA. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. Phytochemistry. 1996; 1017-1022.

Batista IFC, Nonato MC, Bonfadini MR, Beltramini LM, Oliva MLV, Sampaio, MU, Sampaio CAM, Garratt RC. Preliminary crystallographic studies of EcTI, a serine proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. Acta Cryst, 2001, D57 : 602-604.

Bode W, Huber R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. Biochim Biophys Acta. 2000; 241-52.

Bosken CH, Hards J, Gatter K, Hogg JC. Characterization of the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry. Am Rev Respir Dis. 1992;145(4 Pt 1):911-7.

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 1990 Oct 25;347(6295):768-70.

Cataldo DD, Gueders MM, Rocks N, Sounni NE, Evrard B, Bartsch P, Louis R, Noel A, Foidart JM. Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors. *Cell Mol Biol*. 2003; 49(6):875–84.

Cheng SL, Wang HC, Yu CJ, Tsao, PN. Prevention of elastase-induced emphysema in placenta growth factor knock-out mice." *Respiratory Research*, 2009; 10:115.

Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir* 2008; 31: 1334-1356.

Churg A, Wright JL. "Proteinases and emphysema." *Curr Opin Pulm Med*. 2005; 11: 153-9.

Dawkins, PA, RA. Stockley. "Animal models of chronic obstructive pulmonary disease." 2001; 56: 972-7.

D'Armiento JM, Scharf SM, Roth MD *et al*. Eosinophil and T cell markers predict functional decline in COPD patients. *Respiratory Research*, (2009); 10:113.

Dennis R, Maldonado D, Norman S, Baena E, Martinez G. Woodsmoke Exposure and Risk For Obstructive Airways Disease Among Women. [s.ed.] *Chest*. 1996; 109: 115-119.

Deshmukh HS, Case LM, Wesselkamper SC, Borchers MT, Martin LD, Shertzer HG, Nadel JA, and Leikauf GD. Metalloproteinases mediate mucin 5AC expression

by epidermal growth factor receptor activation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171: 305-314.

De Paula CA, Coulson-Thomas VJ, Ferreira JG, Maza PK, Suzuki E, Nakahata AM, Nader HB, Sampaio UM, Oliva, MLV. Enterolobium contortisiliquum trypsin inhibitor (EcTI), a plant proteinase inhibitor, decreases in vitro cell adhesion and invasion by inhibition of Src protein-focal adhesion kinase (FAK) signaling pathways. *J Biol Chem*, 2012; 287: 170–182.

Di Stefano A, Capelli, et al. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998; 158(4): 1277-85.

Eisner MD, Balmes J, Katz PP, Trupin L, Yelin EH, Blanc PD. Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Environmental health: a global access science source*. 2005;4(1):7.

Eyles JE, Williamson ED, and Alpar HO. Immunological responses to nasal delivery of free and encapsulated tetanus toxoid: studies on the effect of vehicle volume. *Int J Pharm*. 1999; 189: 75-79.

Fukunaga M, Takahashi K, Badr KF. Vascular smooth muscle actions and receptor interactions of 8-isoprostaglandin E2, an E2isoprostane. *Biochem Biophys Res Comm* .1993;195:507–515.

Gina. The Global Initiative for Asthma, Available in: <http://www.ginasthma.org>. 2013.

GOLD. Executive Summary: Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Available in: www.GOLDcopd.com. 2013.

Guarnieri F, Spencer JL, Lucey EC, Nugent MA, and Stone PJ. A human surfactant peptide-elastase inhibitor construct as a treatment for emphysema. *Proc Natl Acad Sci*. 2010; 107: 10661-10666.

Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2006 Sep;28(3):523-32.

Hantos Z, Adamicza A, Janosi TZ, Szabari MV, Tolnai J, and Suki B. Lung volumes and respiratory mechanics in elastase-induced emphysema in mice. *J Appl Physiol*. 2008; 105: 1864-1872.

Held HD, Uhlig S. Mechanisms of endotoxin-induced airway and pulmonary vascular hyperreactivity in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1547-1552.

Hogg JC, McDonough JE, Gosselink JV, Hayashi S. What Drives the Peripheral Lung-Remodeling Process in Chronic Obstructive Pulmonary Disease? *Proc Am Thorac Soc*, 2009; 6: 668-672.

Hunninghake GM, Cho MH, Tesfaigzi Y, Soto-Quiros ME, Avila L, Lasky-Su J, et al. MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. *N Engl J Med*. 2009 Dec 31;361(27):2599-608.

Institute NHLaB. Morbidity and mortality chartbook on cardiovascular, lung and blood diseases. In: Services UDoHaH, editor. Bethesda, Maryland: National Institute of Health; 2009.

Ito S, Ingenito EP, Arold SP, Parameswaran H, Tgavalekos NT, Lutchen KR, and Suki B. Tissue heterogeneity in the mouse lung: effects of elastase treatment. *J Appl Physiol*. 2004; 97: 204-212.

Jensen HH, Godtfredsen NS, Lange P, Vestbo J. Potential misclassification of causes of death from COPD. *Eur Respir J*. 2006 Oct;28(4):781-5.

Johnson SR, Knox AR. Synthetic functions of airway smooth muscle in asthma. *Trends Pharmacol Sci*. 1997; 18:288-92.

Jourdan KB, Mitchell JA, Evans TW. Release of isoprostanes by human pulmonary artery in organ culture: a cyclo-oxygenase and nitric oxide dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 233(3):668-72.

Kaplan A, Cosentino L. α 1-Antitrypsin deficiency. *Can Fam Physician*, 2010; 56: 19-24.

Kawikova I, Barnes PJ, Takahashi T, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Belvisi MG. 8-epi-PGF₂ α , a novel noncyclooxygenase-derived prostaglandin, constricts airways in vitro. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 153:590-596.

Kromer BM, Tippins JR. Coronary artery constriction by the isoprostane epi-prostaglandin F₂ α . *Br J Pharmacol*. 1996; 119:1276-1280.

Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jul 15;89(14):6348-52.

Lapperre, TS, Postma DS. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. *Thorax*. 2006; 61: 115-21.

Lee W L and G P Downey. "Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury." *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164: 896-904.

Macnee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Pro Am Thorac Soc*. 2005; 2: 258-66.

Mallat Z, Philip I, Lebreton M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-isoprostaglandin F₂α in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation*. 1998; 97:1536-9.

Mathers CD, Loncar D. "Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030". *PLoS Med*. 2006; 3: e442.

Mehrabi MR, Serbecic N, Ekmekcioglu C, Tamaddon F, Ullrich R, Sinzinger H, Glogar HD. The isoprostane 8-epi-PGF (2α) is a valuable indicator of oxidative injury in human heart valves. *Cardiovasc Pathol*. 2001; 10:241-245.

Menezes AMB, Perez-Padilla R, Jardim JRB, Muino A, Lopez MV, Valdivia G, Oca MM, Talamo C, Hallal PC, Victoria CG. Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*, 2005; 366 (9500): 1875-81.

Menezes AMB, Jardim JRB, Perez-Padilla R, Camelier A, Rosa F, Nascimento O, Hallal PC. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO study in São Paulo, Brazil. *Cad Saúde Pública*, 2005; 21 (5): 1565-73.

Milne GL, Yin H, Morrow JD. Human biochemistry of the isoprostane pathway. *J Biol Chem* 2008; 283:15533-15537.

Mitzner W. Use of mean airspace chord length to assess emphysema. *J Appl Physiol*. 2008 Dec;105(6):1980-1.

MoRobert J, Becker BF, Zahler S, Gerlach E. Hemodynamic effects of isoprostanes (8-isoprostaglandin F₂α and E₂) in isolated guinea pig hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 29:789–794.

Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. *Advances in second messenger and phosphoprotein research*. 1993; 28:97-9.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991; 43(2):109-42.

Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensation in asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999a; 160:216-220.

Morrison, H M, Welgus, H G. "Interaction between leukocyte elastase and elastin: quantitative and catalytic analyses." *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1430: 179-90.

Morrow JD. The isoprostanes – unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress. *Curr Pharm Des* 2006; 12:895-902.

Muijers RBR, Folkerts G, Henricks PAJ, Sadeghi-Hashjin G and NijKamp FP. Peroxynitrite: a two faced metabolite of nitric oxide. *Life Sci*. 1997; 60:1833- 45.

Nakahata AM, Mayer B, Ries C, de Paula CA, Karow M, Neth P, Sampaio, UM, Jochum M, Oliva MLV. The effects of a plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* on human tumor cell lines. *Biol Chem*. 2011; 392: 327–336.

Neuhof C, MLV Oliva. "Effect of plant Kunitz inhibitors from *Bauhinia bauhinioides* and *Bauhinia rufa* on pulmonary edema caused by activated neutrophils." *Biol Chem*. 2003; 384: 939-44.

NIH. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Research, 1996; Washington DC, National Academy Press.

Norman GJ, Ribisl KM, Howard-Pitney B. The relationship between home smoking bans and exposure to state tobacco control efforts and smoking behaviors. *Am J Health Promot*. 2000; 15: 81-88.

Okazawa A, Kawikova I, Cui Z, Skoogh B, Lotvall J. 8-epi-PGF₂α induces airflow obstruction and airway plasma exudation in vivo. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155:436-441.

Oliva MLV, Silva MCC, Sallai RC, Brito MV, Sampaio MU. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. *Biochimie*. 2010; 92: 1667-1673.

Owen CA. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2008;3(2):253-68.

Owen CA, Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol*. 1999 Feb;65(2):137-50.

Possa SS, Charafeddine HT, Righetti RF, da Silva PA, Almeida-Reis R, Saraiva-Romanhólo BM, Perini A, Prado CM, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Tibério I de F. Rho-kinase inhibition attenuates airway responsiveness, inflammation, matrix remodeling, and oxidative stress activation induced by chronic inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012; 303(11):L939-52.

Praticò D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated an increase in urinary levels of isoprostane F2 α III, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:1709-1714.

Pryor WA, Squadrito G. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric superoxide. *Am J Physiol*. 1995; 268:L699-722.

Plantier L, Marchand-Adam S, Antico VG, Boyer L, De Coster C, Marchal J, Bachoual R, Mailleux A, Boczkowski J, and Crestani B. Keratinocyte growth factor protects against elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293: 1230-1239.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Arata V, Kasahara DI, Martins MA, Tibério IFLC. Neurokinins and inflammatory cell INOS expression in guinea pigs with chronic allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 288: 741-8.

Prado CM, Starling CM, Leick-Maldonado EA, Lanças T, Reis FG, Aristóteles LR, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IF: Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates lung tissue responsiveness and remodeling in a model of chronic pulmonary inflammation in guinea pigs. *Respir Physiol and Neurobiol*. 2009;165:185-94.

Prado CM, Yano L, Rocha G, Starling CM, Capelozzi VL, Leick- Maldonado EA, Martins MA, Tibério IF. Effects of nitric oxide synthase inhibition in bronchial vascular remodeling-induced by chronic allergic pulmonary inflammation. *Exp Lung Res*. 2011;37(5):259-268.

Praticò D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated an increase in urinary levels of isoprostane F2 α III, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:1709-1714.

Prescott E, Lange P, Vestbo J. Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from the Copenhagen City Heart Study. *Eur Respir J*. 1999 May;13(5):1109-14.

Raad D, Gaddam S, Schunemann HJ, Irani J, Abou Jaoude P, Honeine R, et al. Effects of water-pipe smoking on lung function: a systematic review and meta-analysis. *Chest*. 2011 Apr;139(4):764-74.

Rabe KF, Hurd S, Anzueto A. "Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary". *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2007; 176: 532–55.

Ramnarine SI, Khawaja AM, Barnes PJ, Rogers DF. Nitric oxide inhibition of basal and neurogenic mucus secretion in ferret trachea in vitro. *Br J Pharmacol*. 1996 Jun;118(4):998-1002.

Richardson, N. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods Plant Biochem*, 1991; 5: 259-305.

Riet-Correa F, Medeiros RMT, Schild AL. A review of poisonous plants that cause reproductive failure and malformations in the ruminants of Brazil. *J Appl Toxicol*. 2012; 32 : 245-254.

Saetta M. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Nov;160(5 Pt 2):S17-20.

Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, et al. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Aug;160(2):711-7.

Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Ferraresso A, Drigo R, Potena A, et al. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Feb;147(2):301-6.

Scuri M, Forteza R, Lauredo I, Sabater JR, Botvinnikova Y, Allegra L, Abraham WM. Inhaled porcine pancreatic elastase causes bronchoconstriction via a bradykinin-mediated mechanism. *J Appl Physiol*. 2000 89(4):1397-402.

Shapiro S D. "Animal models for COPD." *Chest*. 2000; 117: 223S-7S.

Shapiro S D. "Neutrophil elastase: path clearer, pathogen killer, or just pathologic?" *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002; 26: 266-8.

Shapiro SD. Proteolysis in the lung. *Eur Respir J Suppl*. 2003 Sep;44:30s-2s.

Shapiro SD, GOLDstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, and Belaaouaj A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol*. 2003; 163: 2329-2335.

Society ER. European Lung White Book. Huddersfield, editor2003.

Starling CM, Prado CM, Leick-Maldonado EA, Lanças T, Reis FG, Aristóteles LR, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IF. Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates lung tissue responsiveness and remodeling in a model of chronic pulmonary inflammation in guinea pigs. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009;165:185-194.

Steiling K, Lenburg ME, Spira A. Airway Gene Expression in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc AM Thorac Soc*, 2009; 6: 697-700.

Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Odajima N, Moriyama C, Nasuhara Y, and Nishimura M. Curcumin attenuates elastase- and cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009; 296: 614-623.

Tager IB, Ngo L, Hanrahan JP. Maternal smoking during pregnancy. Effects on lung function during the first 18 months of life. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Sep;152(3):977-83.

Takafuji S, Suzuki S, Koizumi K, Tadokoro K, Miyamoto T, Ikemori R, and Muranaka M. Diesel-exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 79: 639-645.

Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert JD, Morrow JD, Roberts LJ. Glomerular actions of a free radical generated novel prostaglandin, 8-epi- PGF2 α , in the rat. Evidence for interactions with thromboxane A2 receptors. *J Clin Invest*. 1992; 90:136-141.

Takahashi S, Nakamura H, Seki M, Shiraishi Y, Yamamoto M, Furuuchi M, Nakajima T, Tsujimura S, Shirahata T, Nakamura M, Minematsu N, Yamasaki M, Tateno H, and Ishizaka A. Reversal of elastase-induced pulmonary emphysema and promotion of alveolar epithelial cell proliferation by simvastatin in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 294: 882-890.

Tan WC, Lo C, Jong A, Xing L, Fitzgerald MJ, Vollmer WM, et al. Marijuana and chronic obstructive lung disease: a population-based study. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2009 Apr 14;180(8):814-20.

Tanaka K, Tanaka Y, Miyazaki Y, Namba T, Sato K, Aoshiba K, Azuma A, and Mizushima T. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase on pulmonary emphysema. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011; 338: 810-818.

Tibboel J, Post M. Characterization of elastase-induced emphysema in mice: Lung function. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181:A5065.

Torres BS, Godoy I. Doenças Tabaco Relacionadas. In: Diretrizes para Cessação do Tabagismo. *Jornal de Pneumologia*. 2004; 30:2.

Tsuyuki S, Tsuyuki J, Einsle K, Kopf M, and Coyle AJ. Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness. *J Exp Med*. 1997; 185: 1671-1679.

Wang Monteiro Lobato; Petsonk, El; Beeckmann, LA; Wagner, GR. Clinically Important FEV1 Declines Among Coal Miners: Na Exploration Of Previously Unrecognised Determinants. [s.ed.) *Occup. Environ. Méd*. 1999; 56: 837-44.

Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1963 Feb;12:131-55.

Wood LG, Gibson PG, Garg ML. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur Respir J*. 2003; 21: 177-186.

van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, et al. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Apr 1;173(7):751-8.

Viegi G, Pistelli F, Sherrill DL, Maio S, Baldacci S, Carrozi L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur Respir J*, 2007; 30: 993-1013.

Zhou D, Lobo YA, Batista IFC, Marques-Porto R, Gustchina A, Oliva MLV, Wlodawer, A. Crystal Structures of a Plant Trypsin Inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) and of its complex with bovine trypsin. *Plos One*, 2013; 8(4): e62252.

Zhou J, Perelman JM, Kolosov VP, Zhou X. Neutrophil elastase induces MUC5AC secretion via protease-activated receptor 2. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013 May;377(1-2):75-85.

.