Bruno Tadeu Martins de Oliveira

Efeito do inibidor de proteinase de origem vegetal BbKI, sobre a lesão pulmonar induzida pela elastase em camundongos C57/Bl6

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

Programa: Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos

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

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Bruno Tadeu Martins de

Efeito do inibidor de proteinase de origem vegetal BdkI, sobre a lesão pulmonar induzida pela elastase em camundongos C57/Bl6 / Bruno Tadeu Martins de Oliveira. -- São Paulo, 2015.

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.Elastase pancreática 2.Doença pulmonar obstrutiva crônica/fisiopatologia 3.Enfisema pulmonar 4.Bauhinia 5.Inibidores de proteases 6.Inflamação 7.Remodelamento das vias aéreas/fisiopatologia 8.Estresse oxidativo 9.Camundongos

USP/FM/DBD-364/15

“Quando humanamente tudo parece perdido, quando parece que Deus empreendeu uma grande viagem e não se importa mais com o mundo, então vale tanto mais: Deus dirige tudo, hoje ainda, segundo um plano de amor. Em sua onipotência, ELE há de encontrar cainhos que me conduzam para onde Ele quer que eu vá. Preciso, apenas, de tanta luz do alto, que possa ver o passo seguinte. Estou abrigado. O plano da minha vida está traçado e há de ser realizado por Deus. Isto me conde uma grande calma e segurança.”

J. Kentenich

Dedicatória

Acima de tudo decido ao senhor bom Deus e nossa Mãe Maria que como mãe realiza os projetos do Pai em minha vida. “Totus Tuus”!

Aos meus queridos pais, que sempre apoiaram aos meus estudos e nunca descreditaram nem mesmo em minhas quedas. Amos vocês!

A minha amada esposa, que teve muita paciência com as horas que perdemos juntos, nas dificuldades me fortaleceu e me deu a grande alegria da minha vida chamada Maria Antonia. Amo você!

A professora Iolanda Tibério que me orientou nesse trabalho sendo sempre muito generosa e paciente com seu tempo dedicado para meu trabalho. Muito Obrigado!

Agradecimentos

Pessoas muito importantes no desenvolvimento deste projeto: Aos meus companheiros de experimentos: Osmar, Rafael e em especial Renato e Leandro Oliva que me ajudaram do inicio ao fim, sou muito grato a vocês.

Ao LIM-20 que alem de colaborar com as pesquisas foram muito atenciosas ajudando sempre com algo a mais. Em especial Edna Leick, Carla Prado, Fernanda Lopes, Nathália Pinheiro e Clarice Olivo.

Agradeço em especial a Angélica da secretária da Pós Graduação que por varias vezes me ajudou a não perder as datas do programa.

A Faculdade de Medicina da USP, à Universidade Federal de São Paulo, por darem condições de realizar este trabalho.

SUMÁRIO

1.0 Introdução	13
1.1 Definição	13
1.2 Dados epidemiológicos	15
1.3 Diagnóstico	17
1.4 Aspectos fisiopatológicos	20
1.5 Modelos experimentais	30
1.6 Inibidores de proteinases	31
2.0 Objetivos	35
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivo Específicos	35
3.0 Materiais e métodos	36
3.1 Animais	36
3.2 Material vegetal	37
3.3 Indução do enfisema por elastase	37
3.4 Grupos experimentais	38
3.5 Avaliação da mecânica respiratória	40
3.6 Determinação do óxido nítrico (NO) exalado	42
3.7 Lavado bronco alveolar	43
3.8 Descarte de carcaças	44
3.9 Estudo histopatológico	44
3.9.1 Colorações	44
3.9.2 Análise Morfométrica	47
3.9.3 Análise do diâmetro alveolar médio (Lm)	49

3.10 Análise estatística	49
4.0 Resultados	50
4.1 Elastância do sistema respiratório (Ers)	51
4.2 Resistência do sistema respiratório (Rrs)	51
4.3 Resistência de vias aéreas (Raw)	52
4.4 Resistência de tecido pulmonar (Gtis)	53
4.5 Elastância do tecido pulmonar (Htis)	54
4.6 Lavado Broncoalveolar: células totais	55
4.7 Intercepto linear médio (Lm)	56
4.8 Avaliação dos Marcadores inflamatórios	57
4.8.1 Marcadores inflamatórios nas paredes alveolares	57
4.8.2 Marcadores Inflamatórios nas vias aéreas	58
4.9 Avaliação dos Marcadores de Remodelamento de Matriz Extracelular	59
4.9.1 Marcadores de remodelamento das paredes alveolares e das vias áreas	59
4.10 Avaliação dos Marcadores de Estresse Oxidativo	61
4.10.1 Marcadores de estresse oxidativo nas paredes alveolares ...	62
4.10.2 Marcadores de estresse oxidativo nas vias aéreas	63
4.11 Avaliação do Óxido nítrico exalado (NOex)	63
4.12. Avaliação do número de células positivas para MUC-5	64
4. 13 Fotomicrografias	
5. Discussão	68
6.0 Conclusão	76
7.0 Referências bibliográficas	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM	Família de Proteinases de Membrana
BbCi	<i>Bauhinia bauhinioides</i> Cruzipain Inhibitor
CAT	Teste de Avaliação de DPOC
CVF	Capacidade Vital Forçada
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epitelial
ENA78	Peptídeo Epitelial Ativador de Neutrófilos
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
Ers	Elastância de Sistema Respiratório
GOLD	Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease
GPI	Glicosil Fosfatidil Inositol
GROα	Oncogene Relacionado ao Crescimento α
Gtis	Tissue Damping
HAT	Proteinase Trypsin-Like de Via Aérea de Humanos
Htis	Tissue Elastance
IL-8	Interleucina 8
INFγ	Interferon γ
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
KGF	Fator de Crescimento de Queratinócitos
LBA	Lavado Broncoalveolar
Lm	Intercepto Linear Médio
LTB4	Leucotrieno B4

MCP1	Peptideo Quimiotático para Monócitos
MMP	Metaloproteinase de Matriz
mMRC	Conselho Britânico de Pesquisa modificado
NANC	Não Adrenérgico Não Colinérgico
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PAR2	Receptor Protease-Ativado 2
PMN	Polimorfonucleares
Raw	Resistência de Vias Aéreas
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Rrs	Resistência de Sistema Respiratório
SaO2	Saturação Periférica de Oxigênio
TIMP	Inibidor Tecidual da Metaloproteinase
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
VEF1	Volume Expiratório ao final do primeiro segundo

Resumo

Oliveira, B. T. M, EFEITO DO INIBIDOR DE PROTEINASE DE ORIGEM VEGETAL *BbKI*, SOBRE A LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA ELASTASE EM CAMUNDONGOS C57Bl6. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: O desequilíbrio protease-antiprotease é fundamental para a fisiopatologia da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). No entanto, poucos estudos para a inibição da elastase têm sido investigados. **Objetivo:** O nosso estudo avaliou a capacidade do inibidor proteinase derivada da planta *Bauhinia bauhinioides* (BbKI) na modulação da inflamação pulmonar induzida pela elastase. **Métodos:** Camundongos C57BL receberam instilação intratraqueal de elastase (0,025 mg, ELA n=6) ou solução salina (SAL n=6) e foram tratados por via intraperitoneal com BbKI (2 mg/kg, de ELA-BbKI n=6, SAL-BbKI n=6) nos dias 1, 14 e 21. No dia 28 foram realizadas as seguintes análises: (I) avaliação da mecânica pulmonar (II) medida do óxido nítrico exalado (ENO), (III) a determinação do número de células no lavado broncoalveolar (FLBA), e (IV) coloração imunohistoquímica do fluído pulmonar, (V) intercepto linear médio (Lm),

Resultados: Além de diminuir alterações mecânicas e a lesão do septo alveolar (Lm), BbKI reduziu o número de células no fluido de FLBA e diminuiu a expressão celular de TNF- α , MMP-9, MMP-12, TIMP-1, eNOS e iNOS em vias aéreas e nas paredes alveolares em comparação com o grupo de ELA ($p < 0,05$). BbKI diminuiu a proporção de volume de 8-iso-PGF₂, as fibras

colagenas e as elásticas nas vias aéreas e paredes alveolares em comparação com o grupo de ELA ($p < 0,05$). Houve redução do número de células para positivas MUC-5 nas paredes das vias aéreas ($p < 0,05$). Houve redução do número de neutrófilos em vias aéreas e parênquima e de macrófagos nas paredes alveolares. **Conclusão:** BbKI foi eficaz na redução da inflamação pulmonar, mecânica pulmonar e do remodelamento da matriz extracelular induzida por elastase. BbKI pode ser uma ferramenta farmacológica potencial para o tratamento da DPOC; no entanto, são necessárias análises adicionais.

Descritores: 1.Elastase pancreática; 2.Doença pulmonar obstrutiva crônica; 3.Enfisema pulmonar; 4. Bauhinia; 5.Inibidores de proteases; 6.Inflamação; 7.Remodelamento das vias aéreas; 8.Estresse oxidativo; 9.Camundongos.

Abstract

Oliveira, B. M. Plant-derived proteinase inhibitor *Bauhinia Bauhinioides* Kallikrein Inhibitor (BbKI) attenuates elastase-induced emphysema in mice. [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, in 2015.

Introduction: The protease-antiprotease imbalance is essential to the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). However, few studies for inhibition of elastase have been investigated. **Objective:** Our study evaluated the ability of proteinase inhibitor derived *Bauhinia bauhinioides* plant (BbKI) in modulating lung inflammation induced by elastase. **Methods:** Mice C57BL received intratracheal elastase instillation (0.025 mg, ELA n = 6) or saline (SAL n = 6) and were treated intraperitoneally with BbKI (2 mg/kg of ELA-BbKI n = 6, SAL-BbKI n = 6) on days 1, 14 and 21. On the 28th the following analyzes were performed: (i) assessment of pulmonary mechanics (II) measurement of exhaled nitric oxide (ENO), (III) determining the number of cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and (IV) immunohistochemical staining of lung fluid, (V) mean linear intercept (Lm)

Results: In addition to reducing mechanical changes and Lm, BbKI reduced the number of cells in BALF fluid and decreased cellular expression of TNF- α , MMP-9, MMP-12, TIMP-1, eNOS and iNOS in the airway and alveolar walls compared with ELA group (p <0.05). BbKI decreased volume proportion of 8-iso-PGF₂, collagen fibers and elastic airway and alveolar walls compared with ELA group (p <0.05). There was a reduction from MUC-5 positive cells in the airway walls (p <0.05). There was a reduction in the number of neutrophils in

airway and alveolar walls ($p < 0.005$) and a reduction in macrophages in alveolar walls ($p < 0.005$). **Conclusion:** BbKI was effective in reducing inflammation, pulmonary mechanics and remodeling of the extracellular matrix induced by elastase. BbKI may be a potential pharmacological agent for the treatment of COPD; however, additional tests are required.

Descriptors: 1.Pancreatic elastase; 2.Chronic Obstructive Pulmonary Disease; 3.Pulmonary Emphysema; 4. Bauhinia; 5.Protease inhibitors; 6.Inflammation; 7. Airway remodeling; 8.Oxidative stress; 9.Mice

1. INTRODUÇÃO

1.2 Definição

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma enfermidade respiratória prevenível e tratável. Caracteriza-se pela presença de obstrução crônica do fluxo aéreo. 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. O processo inflamatório crônico pode produzir alterações dos brônquios (bronquite crônica), bronquíolos (bronquite obstrutiva) e parênquima pulmonar (enfisema pulmonar). A predominância destas alterações é variável em cada indivíduo, tendo relação com os sintomas apresentados (GOLD, 2015).

A conscientização que a DPOC é uma doença tratável é um dos marcos desta definição. Até recentemente, mesmo entre alguns especialistas na área, tinha-se a ideia errônea de que não há nada a se fazer pelos pacientes com esta enfermidade. O conceito incluído na definição como uma doença sistêmica indica claramente os caminhos para o tratamento do paciente. É preciso ressaltar que apesar dos sinais e sintomas e dos achados fisiológicos e patológicos da enfermidade, são raros aqueles pacientes para os quais não conseguimos intervir positivamente. Finalmente, a definição de DPOC ressalta que esta é uma doença inflamatória (Jardim *et al.*, 2005, GOLD, 2015).

O enfisema pulmonar é um distúrbio caracterizado por destruição das estruturas pulmonares, mais notadamente as paredes alveolares distais aos bronquíolos terminais. O tabagismo é o agente etiológico mais óbvio do enfisema.

O enfisema é definido anatomicamente como um alargamento anormal e permanente dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, acompanhado de destruição das suas paredes, sem fibrose óbvia. Devido a isto, o exame clínico frequentemente pode ser normal (Scanlan *et al.*, 2000; Presto, 2007).

Os pacientes com enfisema mais pronunciado tendem a ser magros, taquipnéicos, com tórax em barril, timpanismo, utilizando os músculos acessórios da respiração. Aqueles em que predomina a bronquite crônica, por outro lado, têm tendência à obesidade, são dispneicos, cianóticos, com sinais de insuficiência cardíaca direta (Friedman, 2008).

O enfisema é classificado em tipos específicos de acordo com a porção do ácino ou principal lobo afetado pela doença. São eles: enfisema centrolobular, enfisema panlobular, enfisema parasseptal e enfisema paracicatricial (Friedman, 2008).

Os espaços aéreos formados têm uma área reduzida para a troca gasosa e a sua distensão pode ter um efeito negativo na perfusão pulmonar. Com a destruição do tecido elástico nas paredes alveolares e entre os bronquíolos respiratórios, a retração elástica é perdida resultando em retenção de ar e, juntamente, perde-se a tração radial que causa colapso precoce das vias aéreas na expiração, contribuindo para a retenção de ar (Friedman, 2008).

Dentre os sinais e sintomas do enfisema temos: dispneia, tosse, expiração prolongada, inatividade física, uso dos músculos respiratórios

acessórios e hiperinsuflação. Os sons respiratórios estão diminuídos devido a presença de hiperinsuflação, mas os sons adventícios com sibilos e estertores não são frequentes. O paciente frequentemente assume uma postura sentada, fletida e sobre os braços para possibilitar maior vantagem mecânica para os músculos inspiratórios acessórios (Nazari, 2002).

1.2 Dados epidemiológicos

A DPOC é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo, e resulta em uma grande e crescente carga econômica e social. A prevalência da DPOC está diretamente relacionada com a prevalência de fumantes. (GOLD 2015).

Entretanto, em muitos países a prevalência de DPOC ocupacional e a DPOC relacionada a poluição atmosférica, resultante da queima de madeira/carvão e da queima de combustíveis de biomassa, são os maiores fatores de risco para a DPOC (Pauwels, 2001). A projeção da prevalência da DPOC é alarmante, devido à grande exposição aos fatores de risco, e com a nova estimativa de vida da população, que levam a população a um enorme tempo e uma intensa exposição aos fatores de risco (Buist, 2007; GOLD 2015).

Uma meta-análises de estudos realizados entre 1990 e 2004, apontaram que a prevalência de DPOC é maior em fumantes do que em não fumantes. Os autores também mostraram que a DPOC é mais prevalente em indivíduos maiores de 40 anos do que os menores de 40 anos, e também é mais prevalente em homens do que em mulheres (Halbert, 2006).

Em adultos com mais de 40 anos, a prevalência mundial da DPOC é cerca de 9-10%, quando esta é definida pela limitação do fluxo aéreo. Porém existe uma

grande variação desta medida dependendo da região, que pode ser causada por diferenças na exposição das populações aos fatores de risco, ou por diferenças nas definições de DPOC usadas nos muitos estudos epidemiológicos (Halbert, 2006).

O fardo econômico da DPOC também é grande. Existe uma relação direta entre os custos do cuidado do paciente portador de DPOC com a gravidade da doença e das exacerbações. Isto se deve ao fato de pacientes em que a DPOC se encontra mais grave, necessitam de maiores recursos terapêuticos com oxigênio, além de maior tempo de internação (Lopez, 2006).

Na União Europeia, o custo total direto relacionado 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).

Nos Estados Unidos, os custos diretos com a DPOC são 29,5 bilhões de dólares e os custos indiretos 20,4 bilhões de dólares (Institute NHLaB.2009).

A morbidade da DPOC pode ser acessada por visitas ao médico ou ao pronto socorro e internações. Entretanto, existem poucos trabalhos que mediram estes dados. A morbidade da DPOC pode ser afetada por outras comorbidades (doença cardiovascular, diabetes, déficit musculoesquelético) que são ligadas a DPOC e podem ter um impacto na saúde do paciente assim como pode interferir no tratamento da DPOC. (GOLD 2015).

Em um estudo mostrando as estatísticas brasileiras, a DPOC se encontra em primeiro lugar considerando a mortalidade por doenças respiratórias, sendo responsável por um quarto do total de óbitos da população adulta hospitalizada com problemas respiratórios (Menezes, 2005). Na cidade de São Paulo, a prevalência de DPOC, definida por espirometria em indivíduos com mais de 40

anos, foi de 15,8% (Menezes, 2005). Embora a prevalência paulistana seja maior que os dados mundiais supracitados, estes valores são compatíveis com dados encontrados no Brasil, onde a cidade de Pelotas no Rio Grande do Sul, apresenta uma prevalência de 15,2% (Menezes, 2006). Dados do DATASUS* mostram que bronquite crônica e enfisema pulmonar foram responsáveis por cerca de 170.000 internações em 2007 no sistema público de saúde brasileiro, representando 1,5% do total de internações em hospitais públicos *(Fonte: Ministério da Saúde, Brasil, 2011).

Em relação a mortalidade, embora a DPOC seja frequentemente a primeira causa de morte, algumas vezes é subestimada e omitida da certidão de óbito, causando uma falta de acurácia nos dados de mortalidade (Jensen, 2006). O “Global Burden Disease Study” projetou que a DPOC, que em 1990 foi a sexta causa de morte, será a terceira causa de morte em 2020 no mundo inteiro. Uma nova projeção estimou que em 2030, a DPOC será a quarta maior causa de mortalidade (Mathers, 2006).

1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da DPOC é realizado com base na história clínica, no exame clínico e confirmada com dados espirométricos. Em relação a história clínica, o diagnóstico de DPOC deve ser considerado em todo paciente que apresente dispneia, tosse crônica, produção de catarro e a exposição de fatores de risco. A dispneia presente na DPOC é persistente, progressiva (piora com o tempo) e piora com a prática de exercícios físicos. A tosse crônica característica da DPOC é intermitente, e às vezes improdutiva. A produção de catarro na DPOC

é um fator chave no diagnóstico da DPOC, porém o fato de ter sido fumante e a exposição à fumaça (de fogões a lenha e combustão de motores), assim como o histórico de DPOC na família são os fatores mais importantes no diagnóstico da doença (GOLD, 2015).

Embora seja uma parte importante no cuidado com o paciente, o diagnóstico de DPOC raramente é detectado no exame clínico. Os sinais clínicos que poderiam indicar a doença, como a limitação do fluxo aéreo, só podem ser percebidos quando existe um dano significativo na função pulmonar. A espirometria é o exame complementar reprodutível e objetivo para a avaliação da limitação do fluxo aéreo, e é obrigatório na suspeita clínica de DPOC. As medidas de espirometria são avaliadas antes e depois da administração de broncodilatador, se possível durante uma fase estável da doença. Os parâmetros clínicos mais importantes são a CVF (Capacidade Vital Forçada) e o VEF1 (Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo), e a relação VEF1/CVF. A obstrução é definida pela relação VEF1/CVF abaixo de 0,70 é indicativo de DPOC (18). Além da espirometria, a radiografia simples de tórax pode ajudar não na definição da doença, mas para descartar outros diagnósticos e até para identificar regiões com possível indicação cirúrgica. A avaliação gasométrica e da oxigenação (Saturação Arterial Periférica de Oxigênio, SpO₂) são outros exames laboratoriais que auxiliam no diagnóstico da DPOC.

Os resultados do exame de espirometria balizam a classificação da gravidade da DPOC. Pacientes que apresentam VEF1/CVF inferior a 0,7 após o broncodilatador são classificados como:

- **Estágio Leve (GOLD I):** VEF1 $\geq$ 80% do previsto
- **Estágio Moderado (GOLD II):** VEF1 $<$ 80% e $>$ 50% do previsto
- **Estágio Grave (GOLD III):** VEF1 $<$ 50% e $\geq$ 30% do previsto
- **Estágio Muito Grave (GOLD IV):** VEF1 $<$ 30% do previsto

Recentemente foi adicionado ao diagnóstico da DPOC, uma relação que combina o perfil sintomático com a classificação espirométrica dos pacientes. O perfil sintomático pode ser avaliado por dois questionários já validados mundialmente, o CAT (*COPD Assessment Test*) e o mMRC (*Modified British Medical Research Council*). O questionário mais comum é o mMRC que acessa as deficiências relacionadas à dispneia, entretanto o CAT é um teste que cobre a DPOC de um modo mais amplo e acessa a vida diária e o bem estar do paciente (GOLD, 2015).

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

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

Muitos portadores de DPOC são diagnosticados como portadores de enfisema pulmonar ou bronquite crônica devido às diferentes apresentações clínicas da doença. Enfisema pulmonar, ou destruição das superfícies de troca gasosa do pulmão (alvéolo), é um termo anatomopatológico que é frequentemente (porém incorretamente) usado na clínica médica, porém descreve somente uma de várias anormalidades estruturais presentes na DPOC. Bronquite crônica, ou presença de tosse e produção de catarro por pelo menos 3 meses por 2 anos consecutivos, também é um termo bastante utilizado tanto clínica como do ponto de vista epidemiológico (GOLD, 2015).

1.4 Aspectos Fisiopatológicos

O processo inflamatório crônico das vias aéreas é uma característica muito relevante na fisiopatologia da DPOC (Barnes *et al.*, 2003, GOLD, 2015). A inflamação crônica causa mudanças estruturais e diminuição da luz brônquica. A destruição do parênquima pulmonar leva à perda do acoplamento alveolar nas pequenas vias aéreas e diminui o recolhimento elástico do pulmão. Estas alterações diminuem a possibilidade das vias aéreas de se manterem abertas durante a expiração (Barnes *et al.*, 2003; GOLD, 2015).

É importante ressaltar que o processo inflamatório crônico pulmonar nos portadores de DPOC por tabagismo não cessa após a interrupção do fumo (Lapperre e Postma, 2006). A inflamação acomete grandes e pequenas vias aéreas, onde encontramos hiperplasia de células caliciformes e aumento de glândulas mucosas, além de ocorrer infiltração de neutrófilos, macrófagos e

linfócitos CD8+ nas grandes vias aéreas, principalmente nas fases mais avançadas da DPOC. O infiltrado inflamatório também é encontrado nas vias aéreas menores, com predomínio de macrófagos nas fases iniciais da doença (Shapiro *et al.*, 2005).

Dentre os mediadores inflamatórios mais envolvidos na fisiopatologia da DPOC esta o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Tarantino, 2002, Loureiro, 2009). O TNF- α é produzido por macrófagos e células do epitélio respiratório que proporcionam uma comunicação celular por meio de sinais químicos.

A destruição do tecido pulmonar é decorrente do desequilíbrio entre os sistemas de proteinases e antiproteinases. Evidências apoiam a hipótese que a inalação da fumaça de cigarro induz um aumento no número de neutrófilos e macrófagos, os quais liberam enzimas como as catepsinas B, K, L e S, elastase neutrofílica, proteinase 3, metaloproteinase de matriz (MMP) 9 e 12. Estas enzimas não são totalmente inibidas pelas antiproteinases, levando à destruição do tecido conectivo pulmonar (Macnee *et al.*, 2005; Churg *et al.*, 2005, GOLD, 2015).

Alguns fatores quimiotáticos para neutrófilos são encontrados nos pulmões de indivíduos expostos ao cigarro tais como: leucotrieno B4 (LTB₄), oncogene relacionado ao crescimento de α (GRO- α) e peptídeo epitelial ativador de neutrófilo (ENA78) (Thompson *et al.*, 1989; Bosken *et al.*, 1992; Kuschner *et al.*, 1996). Cabe ressaltar que as células mais encontradas no lavado broncoalveolar em pacientes com DPOC são macrófagos, sugerindo que estas células são fundamentais no desenvolvimento da doença. Os macrófagos ativados por substâncias presentes na fumaça dos cigarros liberam, LTB₄, fator de necrose tumoral α (TNF α), peptídeo quimiotático para

monócitos (MCP1), e também, elastase, catepsinas B, K, L e S, MMP-2, 9 e 12, que atuam como efetores e mediadores de lesão pulmonar (Shapiro *et al.*, 2003).

Adaptado de Chung, KF e Adcock, LM 2008

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

O remodelamento brônquico é caracterizado pelo aumento de deposição de proteínas de matriz extracelular nas vias aéreas, o que ocasiona a fibrose subepitelial, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, bem como a hiperplasia

das glândulas submucosas, o que leva a um espessamento da parede brônquica e menor calibre brônquico. Tais alterações também são observadas em pacientes bronquíticos e em estudos experimentais, sugerindo que o remodelamento brônquico é devido à liberação de diversos fatores inflamatórios, de crescimento celular e de liberação de citocinas (Johnson, Knox, 1997, Vieira *et al.*, 2007). Assim, concluem que a melhor compreensão da fisiopatologia da DPOC e o seu adequado tratamento estão entre as estratégias preventivas da doença.

A participação de proteinases na fisiopatologia do enfisema é vastamente aceita (Churg, 2005). Porém, ainda são focos de discussão quais são as principais proteinases e as funções específicas para o desenvolvimento e progressão do enfisema. Alguns autores sugerem que as proteinases das classes serino, cisteíno e metalo são provavelmente as substâncias mais envolvidas na patogênese da DPOC (Churg e Wright, 2005; Owen, 2008).

A elastase neutrofílica, proteinase 3 e catepsina G são serino proteinases armazenadas por células polimorfonucleares (PMN) e monócitos, e liberadas quando mediadores pró-inflamatórios induzem a desgranulação, podendo causar destruição do parênquima pulmonar e a produção de muco (Owen, 2008). As cisteíno-proteinases representadas pelas catepsinas S, B e L, e serino proteinases representada pela elastase contribuem para a degradação da matriz extracelular mediada por macrófagos. As metalo-proteinases representadas pelas MMP1, 2, 9, 14 e ADAM, além de promover a degradação de colágeno e elastina também aumentam a expressão epitelial de Muc5 (Deshmukh, 2005; Owen, 2008).

Recentemente, novas estratégias terapêuticas visando o controle da produção e/ou inativação das proteinases estão sendo discutidas para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica. Desde que as proteinases deixaram de ser consideradas apenas como proteínas de degradação enzimática e tornaram-se importantes moléculas sinalizadoras envolvidas em vários processos biológicos vitais, os inibidores da proteinase estão sendo intensamente investigados (Turk, 2006). Algumas moléculas sintéticas foram desenvolvidas para testar o papel terapêutico dos inibidores de proteinases na DPOC, tais como CP-471,474 (Selman, 2003); ZD0892 (Wright, 2003); SP-B (Guarnieri, 2010); MR889 (Luisetti, 1996); FR901277 (Benetazzo, 1999).

As metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) são endoproteinases cujo ataque nucleofílico é mediado por uma molécula de água ativada por um metal (Barrett *et al.*, 2004). São também denominadas matrixinas, são secretadas como zimogênios que são ativadas no meio extracelular pelo sistema uPA, ativador de plasminogênio tipo urokinase, calicreínas tissulares, catepsina B ou por outro membro da família das metaloproteinases (Stetler-Stevenson e Yu, 2001).

São fundamentalmente enzimas extracelulares, excetuando-se MMPs do tipo membrana (MT-MMPs) que são secretadas como pró-enzimas. A expressão das MMPs geralmente é regulada por fatores de transcrição, hormônios, citocinas e transformação celular. Já a atividade é controlada pela regulação da transcrição, ativação de seus precursores e inibição por inibidores endógenos, α -macroglobulina e pelos inibidores teciduais específicos de metaloproteinases (TIMPs). Baseando-se na sequência, especificidade do substrato, similaridade, e organização do domínio, as MMPs de vertebrados foram

divididas nos seguintes grupos: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, MMPs tipo-membrana e outras MMPs (Amalinei *et al.*, 2010).

As MMPs, em conjunto com cisteíno proteinases, aspártico proteinases e serino proteinases são enzimas proteolíticas capazes de degradar componentes da matriz extracelular (MEC) e da membrana basal (MB). Estas estão envolvidas na adesão, mobilização, celular e regulação do processo de apoptose e podem ativar outras proteinases. Atuando em diversos processos fisiológicos, como reparo do tecido, ovulação, embriogênese e menstruação, em condições patológicas, agem principalmente na destruição dos tecidos, promovendo a invasão tumoral por metástase, na fibrose, na DPOC em vários tipos de esclerose; e no enfraquecimento da matriz, tal como acontece na cardiomiopatia dilatada e aneurisma da aorta (Koks *et al.*, 2000; Amalinei *et al.*, 2010).

Existem proteinases e inibidores de proteinases envolvidos no processo de remodelamento pulmonar. As metaloproteinases (MMPs) degradam seletivamente componentes da matriz extracelular, além de exercerem função crucial no tráfego de células inflamatórias e estruturais. O desequilíbrio entre MMPs e seus inibidores contribuem para o dano tecidual e algumas das características de remodelamento pulmonar (Vignola *et al.*, 2003).

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 inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz (TIMP-1) são os principais envolvidos (Cataldo *et al.*, 2003).

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.

É fato que a cooperação entre macrófagos e neutrófilos é necessária para a destruição do tecido conectivo em modelo agudo de exposição ao cigarro (Shapiro *et al.*, 2003). Pacientes que apresentam deficiência de $\alpha 1$ antitripsina (um inibidor da proteinase neutrofílica) podem evoluir com destruição do parênquima pulmonar (Barnes *et al.*, 2003). Esta correlação foi evidenciada há 50 anos, quando cientistas relataram que pacientes com deficiência de alfa-1 antitripsina desenvolveram enfisema de início precoce (Laurell e Eriksson, 1963).

Posteriormente, pesquisadores foram capazes de induzir enfisema por instilação de enzimas, nas vias respiratórias de animais experimentais, incluindo a elastase de neutrófilos humanos. Observou-se que a ação da elastase é a mais provável causa da destruição do tecido no enfisema (Gross *et al.*, 1965). Evidências em modelos animais mostram que camundongos geneticamente modificados, deficientes em elastase neutrofílica, não desenvolveram enfisema após exposição à fumaça do cigarro (Shapiro *et al.*, 2003).

A elastase é uma enzima com capacidade de degradação da elastina. Esta apresenta um papel mecânico e estrutural muito importante em tecidos elástico como o pulmão, vasos sanguíneos e pele (Lee and Downey 2001; Shapiro *et al.*, 2002). Estes são muito similares entre si e com outras serino proteinases, por exemplo, a elastase de leucócitos apresenta 43% de similaridade da estrutura primária com a elastase pancreática de porco, 39%

com a calicreína pancreática de porco e 37% com a catepsina G, além de apresentar similaridade, em menor proporção, com a elastase de outros animais (Morrison *et al.*, 1999).

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 NO tem sido bem descrito como um neurotransmissor endógeno não adrenérgico não colinérgico (NANC) em vias aéreas responsáveis pela modulação do tônus bronquial (Barnes *et al.*, 1996), tônus vascular e exudação plasmática tanto em modelo animal quanto em humanos. A partir do substrato L-arginina ocorre síntese do óxido nítrico (Moncada *et al.*, 1991) por intermédio da ação das isoformas óxido nítrico sintases (NOS) constitutivas (Bredt *et al.*, 1990; Lamas *et al.*, 1992) ou induzidas (Prado *et al.*, 2010)

O NO é produzido a partir da L-arginina com ação das óxido nítrico sintases (NOS). As enzimas NOS apresentam três isoformas, sendo duas constitutivas e uma induzida. A enzima constitutiva pode estar expressa nas células endoteliais (Lamas *et al.*, 1992) ou nos neurônios (Bredt *et al.*, 1990), sendo denominada eNOS e nNOS, respectivamente. A forma induzida (iNOS) pode estar expressa em uma variedade de tecidos e órgãos e também no endotélio vascular. Sua produção é estimulada pelo lipopolissacarídeo bacteriano ou por algumas citocinas como o TNF- α , IL-1 e IFN- γ (Moncada e Higgs, 1993, Moncada *et al.*, 1991). É responsável pela produção de

quantidades nanomolares de NO e parece estar presente principalmente em condições patológicas (Prado *et al.*, 2009).

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-PGF2 α é o melhor caracterizado. Há evidências que sugerem que o 8-iso-PGF2 α 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 PGF2 α (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 PGF2 α . Este último isoprostano 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 PGF2 α .

Recentemente, os isoprostanos, particularmente o PGF2 α , 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).

1.5 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, 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 (Tsuyuki S, 1997). 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.* (1987) 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).

1.6 Inibidores de Proteinases

Os inibidores são compostos de origem vegetal ou animal que bloqueiam a hidrólise por uma enzima de um determinado substrato. Inibidores de natureza proteica são capazes de produzir complexos com enzimas sendo assim capazes de inibir competitivamente as atividades catalíticas (Richardson, 1991). Atuam em um grupo específico de enzimas, sendo os mais conhecidos os inibidores de cisteíno-proteinases, serino proteinases, metaloproteinases,

aspártico-proteinases e os multifuncionais que têm a capacidade de inibir diferentes classes de enzimas ao mesmo tempo (Richardson, 1991).

A principal característica das serino proteinases é a sua especificidade primária com o substrato. A inibição destas, por inibidores proteicos, ocorre por uma ligação específica e restrita ao sítio reativo. Esta inibição pode ser de dois tipos: reversível ou irreversível (Bode e Huber, 2000).

Esses inibidores de proteinases são classificados em famílias, segundo sua estrutura primária molecular. A família de inibidores do tipo Kunitz apresentam massa molecular aproximada de 20 kDa. O inibidor mais estudado deste grupo é o SBTI, um inibidor de tripsina extraído de feijão de soja (Laskowski e Kato, 1980; Oliva *et al.*, 2000).

Inibidores de proteinase inibem enzimas proteolíticas ou aumentam os níveis de antiproteinase endógena e podem contribuir para a prevenção da progressão da doença (Barnes & Stockley, 2005). As proteinases são moléculas de sinalização envolvidas na hemostasia, a morte celular, proliferação de células, replicação de DNA na resposta inflamatória e remodelamento tecidual (Turk, 2006). Os inibidores de protease estão também presentes em plantas e estão envolvidos em funções biológicas de plantas e de condições patológicas. Por conseguinte, a prevenção de proteólise indesejada tem sido extensamente estudada (De Leo et al, 2002; Oliva et al, 2009).

Bauhinia é um gênero de plantas da subfamília *Caesalpinoideae* que compreende mais de 600 espécies nativas de florestas tropicais e subtropicais (Richardson, 1991). Numerosos inibidores de proteases têm sido isolados a partir deste gênero, particularmente a partir das espécies de Bauhinia

bauhinioides. No presente estudo, avaliou-se o inibidor de calicreína, *Bauhinia bauhinioides Inibidor* (BbKI) (Mendes, CR (1998).

Calicreínas são glicoproteínas presentes em células glandulares, neutrófilos e fluidos biológicos. Calicreínas de tecidos humanos são glicoproteínas expressas nas células e tecidos com funções reguladoras específicas, tais como o transporte de íons, o transporte de glicose em sinergia com insulina e regulação do fluxo sanguíneo através da formação de cininas (Oliva e Sampaio 2008). Níveis elevados de cininas e calicreína têm sido associados com hipertensão e diabetes. (Cohen et al., 1991).

BbKI é um inibidor da tripsina, quimotripsina e plasmina. É também um potente inibidor da calicreína plasmática humana (huPK). A inibição da huPK por BbKI provoca uma redução na liberação de bradicinina, devido à diminuição da disponibilidade de huPK. BbKI é o primeiro inibidor derivado da planta com estrutura primária descrita e que é um inibidor de calicreína tissular (Cagliari C, Caroli, et al 2003;. Oliva, 2003).

O uso farmacológico dos inibidores de proteinase está associado as terapias antivirais, no tratamento da AIDS e da hepatite. Nestes casos os inibidores de proteinase agem prevenindo a replicação viral por se ligar em seletivamente nas proteinases dos vírus. Bloqueiam a clivagem proteolítica de proteínas precursoras que são necessárias para a produção de partículas infecciosas dos vírus. Existem vários inibidores de proteinases aprovados e utilizados para o tratamento do HIV, sendo alguns deles: Saquinovir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Atazanavir, Fosamprenavir, Tipranavir e Darunavir. Todos esses já são comercializados por grandes companhias farmacêuticas (Turk, 2006).

Recentemente, novas estratégias terapêuticas visando o controle da produção e/ou inativação das proteinases estão sendo discutidas para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (GOLD, 2015). Desde que as proteinases deixaram de ser consideradas apenas como proteínas de degradação enzimas e tornaram-se importantes moléculas sinalizadoras envolvidas em vários processos biológicos vitais, os inibidores da proteinase estão sendo intensamente investigados (Turk, 2006- Korkmaz, 2010). Algumas moléculas sintéticas foram desenvolvidas para testar o papel terapêutico dos inibidores de proteinases na DPOC, tais como CP-471,474 (Selman, 2003); ZD0892 (Wright, 2003); SP-B (Guarnieri, 2010); MR889 (Luisetti, 1996); FR901277 (Fujie, 1999). Frente às evidências da crescente morbidade e mortalidade de pacientes portadores de DPOC, que são frequentemente associados ao desequilíbrio proteinase-antiproteinase, torna-se fundamental estabelecer modelos experimentais onde ocorra a inflamação e a destruição de tecido pulmonar para que possam ser utilizadas para a busca de novas drogas.

O presente estudo teve como objetivo avaliar se *Bauhinioides Kallikrein Inibidor* (BbKI) contribuiu para a inativação das alterações de mecânica pulmonar, inflamação, remodelamento e estresse oxidativo induzidas pela elastase em camundongos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

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

2.2 Objetivos Específicos

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

3. Materiais e Métodos

3.1 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 **244/10**). 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 (*Figura 3*). 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.

Figura 3. Camundongos C57/Bl6

3.2 Material Vegetal

O inibidor de proteinase BbKI foi purificado no laboratório de Bioquímica da UNIFESP, em colaboração com a Profa. Dra. Maria Luiza V. Oliva. A concentração da calicreínas/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 CrataBL, outro inibidor de proteinase que foi utilizado pelo grupo, para comparação da eficácia de ação.(Oliva et al, 2015).

3.3 Indução do Enfisema por Elastase

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 injetada uma 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/ M 5,2 unidade/ mg proteína, Sigma, Califórnia, EUA), volume de 50 µL diretamente na traqueia através de uma seringa de 30 unidades entre os anéis cartilagosos. 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.

3.4 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, de acordo com o protocolo a que foram submetidos (*Figuras 4 e 5*):

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 (0,025mg 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 BbKI - grupo SAL-BbKI – Os animais receberam injeção intraperitoneal, (50 µL) de BbKI (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 BbKI (2 mg/kg) a cada 7 dias (n=8).

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

Figura 4. Descrição do Protocolo Experimental.

Figura 5. Foto da aplicação intraperitoneal de BbK1.

3.5 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 6*). 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 (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 $\alpha = (2/\pi) * \arctan(Htis/Gtis)$. 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 6. Aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (*FlexiVent*, Scireq, Montreal, Canadá).

3.6 Determinação do Óxido Nítrico Exalado (NO exalado)

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 por intermédio de um analisador de resposta rápida (280 NOA – *Nitric Oxide Analyzer* – *Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, USA*) (*Figura 7*). A concentração média de NO foi registrada em partes por bilhão (ppb), como um índice da concentração de NO no ar exalado.

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

3.7 Avaliação do fluído do 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 óptica 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 foi 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 óptico com objetiva de imersão (1000X).

3.8 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.

3.9 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.

3.9.1 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 de citocinas:

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).

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 (anti-goat) / PK-6101 (anti-rabbit).

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* (Merck, etc). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.9.2 Análise Morfométrica

A análise morfométrica foi realizada com um microscópio óptico e com auxílio de um retículo de retas e pontos, com 50 retas e 100 pontos, com área conhecida ($62500 \mu\text{m}^2$ no aumento de 400x) usando a técnica de contagem de pontos (Weibel ER. 2010). (*Figura 8*).

Para a realização da contagem referentes 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 as vias aéreas, foram selecionadas de 3 a 5 vias aéreas de tamanhos equivalentes. O retículo foi posicionado adjacente a parede da via aérea, a partir da base do epitélio. Foi contado o número de pontos que incidiam nas células positivas sobre o número de pontos que incidiam na parede das vias aéreas para cada campo escolhido. Foram avaliados 3 campos por via aérea no aumento de 400x. Esta medida foi usada para quantificar os neutrófilos e as células positivas para macrófagos, $\text{TNF}\alpha$, MMP-9, MMP-12, TIMP-1, iNOS, eNOS e a expressão de MUC5 foi feita somente nas vias aéreas e a avaliação do número de macrófagos nas paredes alveolares.

Figura 8. Posicionamento do retículo no parênquima pulmonar para realização da técnica de contagem de pontos.

A análise da fração de volume das fibras colágenas, elásticas e de isopropano 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). (Prado *et al.*, 2010).

Figura 9. Posicionamento do retículo na parede da via aérea para a realização da técnica de contagem de pontos.

3.9.3 Análise do Diâmetro Alveolar Médio (Lm)

O Lm foi lido através de 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).

3.10 Análise Estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa *SigmaStat* (SPSS Inc, Chicago, IL). As comparações múltiplas foram feitas por *One Way Anova*. Para as comparações entre os grupos foi utilizado o teste de *Holm-Sidak*. Os

dados foram apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão. Os gráficos foram feitos na forma de barra e erro. Foi considerado significativo um $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Elastância do sistema respiratório (Ers)

Na Figura 2A observamos os valores da elastância do sistema respiratório (Ers) em todos os grupos. Ocorreu um aumento de Ers no grupo ELA quando comparado com os grupos controles ($p < 0,05$, SAL: $36,99 \pm 7,64$ cmH₂O.mL.⁻¹; ELA: $53,58 \pm 15,36$ cmH₂O.mL.⁻¹.s; SAL-BbKI: $38,96 \pm 4,58$ cmH₂O.mL.⁻¹.s; ELA-BbKI: $36,83 \pm 5,7$ cmH₂O.mL.⁻¹.s, $p < 0,05$). Ocorreu também uma redução no grupo ELA BbKI comparado ao grupo ELA (ELA-BbKI: $36,83 \pm 5,7$ cmH₂O.mL.⁻¹.s, $p < 0,05$).

Figura 2A. Elastância do sistema respiratório: valores de média e erro padrão dos quatro grupos experimentais (* $p < 0,05$ em comparação com os controles, ** $p < 0,05$ comparativamente ao grupo ELA).

4.2 Resistência do sistema respiratório (Rrs)

Na Figura 2B mostra os valores da resistência do sistema respiratório (Rrs) em todos os grupos experimentais. Houve uma diminuição significativa de

Rrs em grupos BbKI em comparação com o grupo SAL [$p < 0,05$, SAL: $1,06 \pm 0,19$ cmH₂O/mL.⁻¹.s; ELA: $0,94 \pm 0,24$ cmH₂O/mL.⁻¹.s; SAL-BbKI: $0,77 \pm 0,09$ cmH₂O/mL.⁻¹.s; ELA-BbKI: $0,84 \pm 0,18$ cmH₂O/mL.⁻¹.s). Os animais que receberam a elastase e que foram tratados com BbKI demonstraram um decréscimo em Rrs comparando com o grupo elastase ($p < 0,05$).

Figura 2B. Resistência do sistema respiratório: valores de média e erro padrão dos quatro grupos experimentais (* $p < 0,05$ comparado a SAL e ELA, ** comparados ao grupo ELA).

4.3 Resistência de vias aéreas (Raw)

A Figura 2C mostra os valores da resistência das vias aéreas (Raw) em todos os grupos experimentais. Houve um aumento significativo da Raw no grupo ELA quando comparado com os grupos controles [$p < 0,05$, SAL: $0,35 \pm 0,22$ cmH₂O/mL/s; ELA: $0,66 \pm 0,36$ cmH₂O/mL/s; SAL-BbKI: $0,34 \pm 0,04$ cmH₂O/mL/s). Houve redução no grupo ELA-BbKI (ELA-BbKI: $0,33 \pm 0,04$ cmH₂O/mL/s) comparativamente ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 2C. Resistência das vias aéreas: valores de média e erro padrão de quatro grupos experimentais (* p <0,05 em comparação com os controles, ** p <0,05 comparado ao grupo ELA).

4.4 Resistência de tecido pulmonar (Htis)

A Figura 2D mostra os valores de elastância tecido pulmonar (Htis) em todos os animais (SAL: $39,50 \pm 6,89$ cmH₂O/mL/s^(1-α); ELA: $67,59 \pm 28,18$ cmH₂O/mL/s^(1-α); SAL-BbKI: $40,85 \pm 6,19$; ELA-BbKI: $37,36 \pm 6,2$ cmH₂O/mL/s^(1-α)). Os animais que receberam a elastase e que foram tratados com BbKI obtiveram diminuição de Htis quando comparados com o grupo ELA (p <0,05). O grupo ELA aumentou em comparação ao grupo controle (p <0,05).

Figura 2D. Elastância do tecido pulmonar: Os valores médios e erro padrão de quatro grupos experimentais (* p <0,05 em comparação com os controles, ** p <0,05 comparado ao grupo ELA).

4.5 Elastância do tecido pulmonar (Gtis)

A figura 2E mostra os valores de resistência de parênquima pulmonar (Gtis) em todos os grupos experimentais. Não houve diferença entre os grupos (SAL: $7,50 \pm 0,76$ cmH₂O/mL/s^(1-α); ELA: $8,56 \pm 1,69$ cmH₂O/mL/s^(1-α); SAL-BbKI: $7,25 \pm 0,62$ cmH₂O/mL/s^(1-α); ELA-BbKI: $8,86 \pm 2,39$ cmH₂O/mL/s^(1-α)).

Figura 2E. Resistência de parênquima pulmonar: Os valores médios e erro padrão dos quatro grupos experimentais.

4.6. Avaliação do fluido do lavado broncoalveolar

A contagem das células totais e diferenciais estão apresentadas na Tabela 1. O grupo ELA obteve aumento no total de macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos em comparação ao grupo SAL e SAL-BbKI ($p < 0,05$). Todas as contagens de células apresentaram redução significativa nos grupos ELA- BbKI comparativamente ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Na Tabela 1 demonstramos valores absolutos da quantidade de células do lavado broncoalveolar (LBA). O total de células, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos são expressos em 10^4 células /mL.

Células(10^4 células/mL)	SAL	ELA	SAL-BbKI	ELA-BbKI
Células totais	0,79±0,34	2,59±0,99 *	0,40± 0,09	0,67±0,23**
Macrófagos	0,78±0,35	1,34±0,53 *	0,37± 0,66	0,45± 0,21**
Neutrófilos	0,00±0,00	0,87±0,80 *	0,02±0,05	0,18± 0,16**
Linfócitos	0,00±0,00	0,32±1,07 *	0,00±0,00	0,00±0,00**
Eosinófilos	0,00±0,00	0,049 ± 0,028 *	0,0019±0,0018	0,01 ± 0,01**

Tabela 1.; *P < 0,05, comparado aos controles; **P < 0,05 comparado grupo ELA.

4.7. Avaliação do Intercepto linear médio (Lm)

A Figura 5 mostra os valores de Lm em todos os grupos experimentais. Houve um aumento de Lm nos grupos ELA comparado aos grupos controles [$p < 0,05$ (SAL: $44,68 \pm 3,9 \mu\text{m}$; ELA: $69,01 \pm 6,5 \mu\text{m}$; SAL-BbKI: $53,52 \pm 7,1$; ELA-BbKI: $59,32 \pm 4,7 \mu\text{m}$). O grupo ELA-BbKI apresentou valores reduzidos em comparação com grupo ELA ($p < 0,05$).

Figura 5. Intercepto linear médio: Os valores médios e erro padrão de quatro grupos experimentais (* $p < 0,05$ em comparação com os controles, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo ELA).

4.8 Marcadores inflamatórios

4.8.1 Avaliação dos marcadores inflamatórios nas paredes alveolares

A resposta inflamatória pulmonar foi observada tanto na parede do alvéolo quanto nas vias aéreas. Na Tabela 2 apresentamos os valores absolutos da análise morfométrica de marcadores inflamatórios nas paredes alveolares. Observamos um aumento do número de neutrófilos, macrófagos e células positivas para o TNF- α nas paredes alveolares no grupo ELA em comparação aos grupos controles. Houve redução no grupo ELA-BbKI em relação ao grupo ELA ($p < 0,05$).

Marcadores Inflamatórios (células/10 ⁴ μm ²)	SAL	ELA	SAL- BbKI	ELA-BbKI
Neutrófilos	0,33±0,07	1,35±0,14 *	0,55±0,03	0,83±0,78**
Macrófagos	0,36±0,03	1,19±0,05 *	0,68±0,05	0,81±0,41**
TNF-α	2,86±0,54	12,50±1,28 **	4,85±0,77	9,69±0,91**

Tabela 2. *P < 0,05 comparado aos controles; **P < 0,05 comparado grupo ELA.

4.8.2 Avaliação dos marcadores inflamatórios nas vias aéreas

Com relação aos resultados dos marcadores inflamatórios nas vias aéreas observamos o aumento de neutrófilos e de células TNF-α positivas nas paredes das vias aéreas no grupo ELA comparado aos grupos SAL e SAL-BbKI (p <0,05). No grupo ELA-BbKI o tratamento reduziu o número de neutrófilos e de células positivas para o TNF-α nas vias aéreas em comparação ao grupo ELA (p <0,05).

Marcadores Inflamatórios(células/10 ⁴ μm ²)	SAL	ELA	SAL-BbKI	ELA-BbKI
Neutrófilos	2,31±0,27	4,23±0,44*	2,20±0,69	2,75±0,46**
TNF-α	5,34±0,34	15,38±0,44*	6,90±1,30	12,65±0,53**

Tabela 3. *P < 0,05, comparado aos controles; **P < 0,05 comparado grupo ELA.

4.9 Avaliação dos marcadores de Remodelamento de Matriz Extracelular

Os valores absolutos dos marcadores de remodelamento em todos os grupos experimentais estão apresentados na Tabela 4 para as paredes alveolares e na Tabela 5 para vias aéreas.

4.9.1 Marcadores de remodelamento das paredes alveolares e das vias aéreas.

Marcadores Remodelamento	SAL	ELA	SAL- BbKI	ELA- BbKI
Fibras Colágeno (%)	0,45±0,03	1,95±0,08*	0,97±0,06	1,23±0,05**
Fibras Elásticas (%)	0,66±0,06	2,58±0,16*	1,05±0,06	1,39±0,09**
MMP-9 células positivas /10⁴µm²	7,72±0,87	16,57±0,79*	6,63±0,79	10,59±1,04**
MMP-12 células positivas /10⁴µm²	13,45±0,48	17,81±1,00 *	7,04±1,07	11,77±0,78**
TIMP-1 células positivas /10⁴µm²	4,34±0,82	13,15±1,15*	5,20±0,79	6,72±1,06**

Tabela 4. *P < 0,05, comparado aos controles; **P < 0,05 comparado grupo ELA,

Nas paredes alveolares, houve um aumento na fração de volume de fibras de colágeno no grupo ELA comparado aos grupos SAL e SAL- BbKI (p <0,05). No grupo ELA- BbKI, houve uma redução na fração de volume de fibras de colágeno em comparação com o grupo de ELA (p <0,05). Por outro lado, houve um aumento na fração de volume de fibras elásticas no grupo ELA comparado com os grupos SAL e SAL- BbKI (p <0,05). Não houve diferenças entre o grupo de ELA e ELA- BbKI.

Ao avaliar o remodelamento das vias aéreas houve um aumento na fração de volume de colágeno e fibras elásticas no grupo ELA comparado aos

grupos SAL e SAL- BbKI ($p < 0,05$). O tratamento no grupo ELA- BbKI reduziu a fração de volume de fibras de colágeno e elásticas em comparação com o grupo de ELA ($p < 0,05$).

Ao avaliar as células positivas para MMP-9, MMP-12 e TIMP-1 nas paredes alveolares, observamos um aumento das células positivas para MMP-9, MMP-12 e TIMP-1 no grupo ELA comparado com os grupos SAL e SAL- BbKI ($p < 0,05$). O tratamento com BbKI (grupo ELA- BbKI) reduziu o número de células positivas MMP-9, MMP-12 e de TIMP-1 em comparação com o grupo de ELA ($p < 0,05$).

Marcadores Remodelamento (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	SAL	ELA	SAL- BbKI	ELA- BbKI
Fibras Colágenos (%)	9,64 $\pm$ 0,12	11,62 $\pm$ 0,83*	7,75 $\pm$ 0,91	10,30 $\pm$ 2,85
Fibras Elásticas (%)	0,29 $\pm$ 0,05	0,47 $\pm$ 0,08*	0,32 $\pm$ 0,10	0,30 $\pm$ 0,09
MMP-9	6,39 $\pm$ 0,79	17,92 $\pm$ 0,86*	7,90 $\pm$ 0,92	10,82 $\pm$ 1,96**
MMP-12	9,75 $\pm$ 0,92	21,46 $\pm$ 3,65*	7,88 $\pm$ 1,32	13,21 $\pm$ 1,51**
TIMP-1	4,76 $\pm$ 0,53	13,58 $\pm$ 1,14*	5,95 $\pm$ 0,60	6,80 $\pm$ 1,08**

Tabela 5 *P < 0,05, comparado aos controles; **P < 0,05 comparado grupo ELA.

Obtivemos resultados semelhantes ao avaliar as vias aéreas. Houve um aumento de células MMP-9 e MMP-12 no grupo de ELA em comparação com os grupos SAL e SAL- BbKI ($p < 0,05$). O tratamento com BbKI no grupo ELA- BbKI reduziu o número de células MMP-9 e MMP-12 positivas em comparação com o grupo de ELA ($p < 0,05$). Houve um aumento de células positivas para TIMP-1 nas vias aéreas dos grupos ELA e ELA- BbKI comparado aos grupos SAL e SAL- BbKI ($p < 0,05$). Houve redução da TIMP-1 no grupo ELA-BbKI comparativamente ao grupo ELA ($p < 0,05$).

4.10 Avaliação dos Marcadores de Estresse Oxidativo

Os valores absolutos de marcadores de estresse oxidativo para todos os grupos experimentais da Tabela 6 para a parede alveolar e na Tabela 7 para as vias aéreas.

4.10.1 Marcadores de estresse oxidativo nas paredes alveolares

Estresse Oxidativo(células/10⁴ μm²)	SAL	ELA	SALBbKI	ELA- BbKI
iNOS	4,52±0,47	19,60±2,75*	6,23±1,24	9,82±1,13**
eNOS	4,13±0,58	12,33±1,87*	5,85±0,78	7,00±1,05**
8-iso-PGF2α (%)	1,51±0,64	17,94±1,30*	1,48±0,46	7,03±1,25**

Tabela 6. *P < 0,05, comparado aos controles; **P < 0,05 comparado grupo ELA.

Nas paredes alveolares, houve um aumento das células positivas para de iNOS e eNOS no grupo ELA quando comparado com os grupos SAL e SAL-BbKI (p <0,001). No grupo ELA- BbKI observou-se uma redução do número de células positivas para iNOS e eNOS em comparação com o grupo de ELA (p <0,05).

4.10.2 Marcadores de estresse oxidativo nas vias aéreas

Observamos resultados semelhantes nas paredes das vias aéreas. Houve um aumento das células positivas para iNOS e eNOS no grupo ELA quando comparado com os grupos SAL e SAL- BbKI ($p < 0,001$). No grupo ELA- BbKI, houve uma redução do número de células positivas para iNOS e eNOS em comparação com o grupo de ELA ($p < 0,05$).

Estresse Oxidativo	SAL	ELA	SAL- BbKI	ELA- BbKI
iNOS	1,30±0,61	5,62±0,56*	1,16±0,91	6,99±0,61**
eNOS	3,64±0,57	12,22±0,25*	1,74±0,42	6,00±0,32**
8-iso-PGF2 α (%)	3,74±0,79	23,47±1,70*	3,78±0,52	16,19±1,07**

*P < 0,05, comparado aos controles; **P < 0,05 comparado grupo ELA.

A avaliação da fração de volume de 8-iso-PGF2 α nas paredes alveolares e das vias aéreas mostrou que houve um aumento da fração de volume de 8-iso-PGF2 α no grupo ELA comparado aos grupos SAL e SAL- BbKI ($p < 0,05$). No grupo ELA- BbKI observou-se uma redução da fração de volume de 8-iso-PGF2 α em comparação com o grupo de ELA ($p < 0,05$).

4.11 Óxido nítrico exalado (NOex)

A Figura 5 mostra os valores de óxido nítrico exalado (NO exalado) em todos os grupos experimentais. Houve um aumento significativo de NO exalado

no grupo de ELA em comparação com o grupo SAL ($p < 0,05$). O tratamento com BbKI reduziu o NO exalado nos grupos ELA- BbKI e SAL- BbKI ($p < 0,05$). Houve uma diminuição de NO exalado no grupo SAL- BbKI quando comparado com o grupo SAL ($p < 0,05$).

Figura 5. Óxido nítrico exalado (NO exalado): valores de média e erro padrão dos quatro grupos experimentais (* $p < 0,05$ em comparação a grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado aos grupos SAL e ELA).

4.12. Avaliação do número de células positivas para MUC-5

O número de células positivas para MUC-5 foram avaliadas apenas na via aérea e os valores absolutos são mostrados na Figura 6.

Figura 6. Células positivas para MUC-5: valores de média e erro padrão dos quatro grupos experimentais (* $p < 0,05$ em comparação com os grupos controles, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo ELA).

Houve um aumento de células positivas para MUC-5 nas vias aéreas em comparação ao ELA com os grupos SAL e SAL- BbKI ($p < 0,05$). No grupo ELA- BbKI observamos uma redução no número de células positivas MUC-5 em comparação ao grupo ELA ($p < 0,05$).

4.13 Fotomicrografias

Fotomicrografias representativas das células inflamatórias, marcadores de remodelamento e stress oxidativo na parede alveolar em aumento de 400x.

Figura 7. Fotomicrografias das paredes alveolares. Fotomicrografias representativas de células inflamatórias, marcadores de remodelamento e stress oxidativo nas vias aéreas parede em aumento de 400x.

Figura 8. Fotomicrografias das vias aéreas

5. Discussão

No presente estudo, foram avaliados os efeitos do inibidor de protease *Bauhinia Kallikrein (BbKI)* em um modelo animal de lesão pulmonar induzida por elastase intratraqueal. A teoria de desequilíbrio proteínase-antiproteínase, sugere que esta é a principal causa da inflamação e do remodelamento pulmonar observado na doença pulmonar obstrutiva crônica.

Em relação às ações e mecanismos intracelulares decorrentes do tratamento com BbKI sabe-se que o BbKI induz hiperpolarização da membrana da célula endotelial e provoca um aumento no Ca^{++} intracelular. Também reduz significativamente a atividade proliferativa, que é independente da hiperpolarização induzida pelo BbKI da membrana celular (M. Bilgin, C. Neuhof, Oliva ML, et al. 2014).

A relevância do efeito de proteinases no enfisema é amplamente aceito. No entanto, continua a haver controvérsia e discussão sobre quais as células e / ou proteases desempenham papéis principais no desenvolvimento e progressão do enfisema. Os autores sugeriram que a serina, cisteína e metaloproteinases são as substâncias mais provavelmente envolvidas na patogênese da COPD (Churg e Wright, 2005; Owen, 2008; Shapiro, 2003).

Para testar esta teoria, nosso estudo utilizou um modelo de lesão pulmonar induzida por elastase intratraqueal que causa um aumento nos parâmetros funcionais, relacionados com mudanças inflamatórias, remodelamento e de estresse oxidativo nas paredes alveolares e nas vias aéreas.

Nossos resultados demonstraram que o tratamento BbKI reduziu a resistência do sistema respiratório (R_{rs}), a resistência das vias aéreas (R_{aw}) e elastância do sistema respiratório (E_{rs}) previamente aumentadas pela instilação

intratraqueal de elastase sugerindo alterações tanto de vias aéreas quanto de septo alveolar.

Um efeito broncodilatador causado por tratamento BbKI foi observado nas vias aéreas, o qual foi demonstrado pela redução da resistência do sistema respiratório (Rrs) nos grupos de tratamento com BbKI (ELA-BbKI e SAL BbKI). Essa observação foi confirmada pelos dados de resistência das vias aéreas (Raw), que diminuiu em animais tratados com BbKI tanto nos grupos que receberam elastase quanto solução salina. Isto sugere que o tratamento com BbKI deve ser examinado em estudos futuros em modelos experimentais de asma.

O aumento da elastância do sistema respiratório (Ers) em animais que receberam elastase intratraqueal é um efeito agudo de lesão pulmonar induzida por elastase. Os dados Ers são corroborados pelos resultados Htis, que mostraram o mesmo padrão de resposta. Estes parâmetros funcionais demonstraram o efeito da BbKI atuou nas vias aéreas e septos alveolares. No entanto, outros autores observaram efeitos diferentes sobre a mecânica pulmonar em modelos animais tratados com elastase, que provavelmente podem depender de dose e ou via de administração.

Hantos et al. (2008), examinaram camundongos que receberam uma instilação intratraqueal de elastase (0,03mg em 50 µL) e demonstraram um aumento de volume e uma diminuição elastância no tecido pulmonar. Os autores não observaram mudanças na resistência das vias aéreas e resistência do tecido. Estes autores concluíram que a destruição do tecido pulmonar não foi associada com alterações de mecânica pulmonar.

Ito et al. (2004) estudaram ratos que receberam a elastase pancreática porcina por nebulização. Os autores observaram uma diminuição na elastância do sistema respiratório. Os autores sugerem ainda que o remodelamento do anormal do colágeno é um dos principais determinantes da função pulmonar e das forças mecânicas associadas com enfisema.

No entanto, Scuri et al. (2000) demonstraram que os resultados da elastase podem ser decorrentes de um aumento da produção de bradicinina que levaria a um aumento da resistência e elastância do sistema respiratório. Os autores demonstraram que esta resposta não foi revertida por tratamento com um antagonista da histamina, mas foi eficazmente bloqueada por um antagonista do receptor B2 da bradicinina, confirmando o envolvimento do sistema calicreína-cinina neste processo.

Além disso, um outro aspecto importante que contribuiu para o aumento da elastância e resistência do tecido do pulmão é o aumento da fração de volume da fibras de colágeno e elásticas no grupo grupo ELA. As fibras elásticas e colágenas parecem ser os principais constituintes da matriz extracelular, contribuindo para propriedades mecânicas viscoelásticas do tecido pulmonar. As fibras elásticas se dispõem mais linearmente do que as fibras de colágeno.

Na análise do Lm, observamos que a atividade inibidora de BbKI atenuou a destruição do tecido do pulmão induzida por elastase intratraqueal. Embora haja debate se essas medidas estão diretamente relacionados com o diâmetro dos alvéolos, este parâmetro ainda é amplamente utilizado e aceito pela comunidade científica. Shapiro et al. (2003) estudaram camundongos *knockout* elastase de neutrófilos e os animais expostos à fumaça do cigarro. Os autores demonstraram que os animais que não produzem elastase tiveram uma

redução de aproximadamente 59% na destruição de tecido (medido por Lm) em comparação com animais de tipo selvagem.

Chung e Adcock (2008) sugeriram que a avaliação do fluido do lavado broncoalveolar é um dos métodos mais comuns e mais eficazes para a avaliação da inflamação pulmonar.

Em nosso estudo, observamos um aumento no número de células inflamatórias nos grupos tratados com elastase. Estes resultados são provavelmente devido ao recrutamento de células inflamatórias pela elastase. Não houve diferenças significativas no número de macrófagos no lavado broncoalveolar de animais nos grupos SAL e SAL-BbKI. Houve uma diminuição significativa do número de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos no grupo ELA-BbKI, indicando que BbKI tem um efeito antiinflamatório significativo. Estes resultados foram semelhantes ao descrito por Neuhofer et al. (2003) no modelo de edema pulmonar causada por ativação de neutrófilos. Neuhofer et al. (2003) observaram que um inibidor da elastase da família Kunitz (BBCi) causou redução do edema. Suzuki et al. (2009) observaram que curcumin, um membro da família do gengibre, reduziu o número de macrófagos, neutrófilos e células totais do lavado broncoalveolar de camundongos que receberam elastase intratraqueal.

Plantier et al. (2007) avaliaram o efeito de crescimento de queratinócitos (KGF) em ratos que receberam tratamento intratraqueal de elastase. Os autores demonstraram que KGF diminuiu significativamente o número total de células de macrófagos e de neutrófilos no fluido lavado broncoalveolar.

O número de neutrófilos, macrófagos e células positivas TNF α estavam aumentados nas paredes dos alvéolos e das vias respiratórias do grupo ELA.

Tratamento com BbKI diminuiu o número destas células nas paredes alveolares e das vias aéreas.

Nossa avaliação do remodelamento da matriz extracelular foi realizada avaliando as fibras colágenas e elásticas, além das células positivas para metaloproteinase (MMP-9, MMP-12) e TIMP- 1 nas paredes dos alvéolos e das vias aéreas. O tratamento com BbKI reduziu a fração de volume das fibras elásticas das fibras de colágenas nas paredes alveolares e das vias aéreas. O estudo realizado por Lopes et al (2013) demonstraram que ratos que receberam elastase apresentaram valores de elastina mais elevados em comparação com os animais que fumaram durante seis meses. O mesmo padrão foi observado para colágeno tipo I, mas os autores não encontraram diferenças significativas entre os grupos experimentais. No entanto, a expressão de colágeno tipo III foi maior nos animais com seis meses de exposição à fumaça em comparação com os ratos induzidos por elastase.

O tratamento com BbKI diminuiu o número de células positivas para MMP-9 e MMP-12 nos alvéolos e nas vias aéreas. Sabe-se que as catepsinas podem ativar pró-uroquinase, que ativa o plasminogênio para formar plasmina, a qual por sua vez ativa metaloproteinases, principalmente de MMP-2 e MMP-9. A plasmina também ativa a elastase, que aumenta de metaloproteinases e catepsina. O tratamento com BbKI inibe fortemente a atividade da tripsina, a plasmina e huPK (calicreína de plasma humano).

A inibição da atividade da calicreína plasmática humana por BbKI provoca uma diminuição da liberação de bradicinina, diminuindo a disponibilidade de huPK. (C Cagliari, Caroli et al 2003;. Olive, 2003).

Portanto, a heparina desempenha um papel importante ao amplificar a ativação da rede de proteinases durante processos fisiopatológicos.

O aumento de MMP-9 resultou em excesso de produção do seu inibidor TIMP-1, como uma tentativa de reparar o dano tecidual. Um excesso de TIMP-1 em animais podem interferir com o tráfego celular, reparação de tecidos e pode também contribuir para um aumento de deposição de matriz extracelular e fibrose por inibição MMP-9 (Tang et al, 2006).

Observou-se um aumento no número de células positivas de MUC-5 em animais que receberam a elastase, que pode sugerir que uma etapa posterior da progressão da doença. No entanto, os camundongos ao contrário dos humanos não têm células caliciformes verdadeiras, e isso deve ser levado em consideração (Shapiro, 2000). Além disso, os passos de lavagem durante a preparação da lâmina podem também ter contribuído para o aparecimento de muco nas vias respiratórias. Os resultados demonstraram que o tratamento BbKI reduziu o número de células positivas para MUC5.

Na avaliação de estresse oxidativo, demonstramos que o dano pulmonar induzido por elastase intratraqueal causou um aumento de óxido nítrico no ar exalado (NOex), que estava associado com aumento do número de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos.

No grupo de tratamento BbKI (ELA-BbKI) houve uma resposta ao estresse oxidativo atenuada, com redução da expressão de células positivas para eNOS e iNOS nos septos alveolares e das vias aéreas. Prado et AL., 2005, 2011) demonstrou a importância da participação do óxido nítrico em modelo experimental de asma com aumento da expressão de iNOS em células linfomononucleares e eosinófilos presentes nas vias aéreas distais de animais

sensibilizados e mostrou que a isoforma nNOS, embora constitutiva, encontra-se presente em células inflamatórias (linfomononucleares e eosinófilos) (Prado *et al.*, 2005).

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 construtora 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.*, 2011). Este efeito de atenuação da resposta construtora pelo bloqueio da iNOS parece depender também da modulação da Rhoquinase (Possa *et al.*, 2012).

Desta forma, na inflamação, a super ativação de proteinases leva a uma produção maior de bradicinina, que leva a ativação de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, o aumento da expressão de iNOS e cNOS. O NO produzido tanto pela iNOS como pela cNOS (nNOS e ecNOS) leva ao aumento do NO, que pode ter desencadeado os eventos observados neste modelo (Viaro *et al.*, 2000).

Considerando a resposta dos isoprostanos, houve uma redução na fração de volume de 8-iso-PGF2 nas paredes alveolares e das vias aéreas. Em relação a resposta ao isoprostano, sabe-se que o contato entre os agentes oxidantes com a membrana celular leva a peroxidação de lípidos da membrana celular, a qual é responsável pela formação de um número de compostos bioativos conhecidos como os isoprostanos, que são semelhantes às prostaglandinas (Morrow, 2006). Os isoprostanos possuem potente atividade biológica e são mediadores da resposta de estresse oxidativo (Milne *et al.*, 2008).

Observamos anteriormente que a inibição iNOS inibe a hiperresponsividade em animais com inflamação alérgica crônica (Prado et al., 2008). Estes resultados podem explicar as alterações na resistência das vias aéreas, porque iNOS participa na contração da musculatura lisa das vias aéreas. Estes efeitos parecem estar relacionados com a modulação da atividade Rhoquinase pela iNOS (Possa SS, Righetti RF et al., 2012)

6. Conclusão

Neste modelo experimental de lesão pulmonar induzida pela elastase administrada via intratraqueal observa-se na injúria dos septos alveolares e vias aéreas, alterações dos parâmetros funcionais avaliados pela mecânica pulmonar, aumento do número de células inflamatórias e do remodelamento de matriz extracelular, o que contribuiu para o aumento da resposta de estresse oxidativo.

O tratamento com BbKI atenuou as alterações de mecânica pulmonar, do recrutamento inflamatório, do remodelamento da matriz extracelular e de estresse oxidativo neste modelo experimental. Embora sejam necessários mais estudos para explicar o mecanismo bioquímico, BbKI é uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de enfisema pulmonar.

7. Referências bibliográficas

Almeida PC, Nantes IL, Rizzi CC, Júdice WA, Chagas JR, Juliano L, Nader HB, Tersariol IL. Cysteine proteinase activity regulation. A possible role of heparin and heparin-like glycosaminoglycans. *J Biol Chem*. 1999; 274: 30433-8.

Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CC, Faljoni-Alario A, Carmona E, Juliano L, Nader HB, Tersariol IL. Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):944-51.

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.

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

Araújo RMS, Vaz, AFM, Santos ME, Zingali RB, Coelho LCBB, Paiva PMG, Correia MTS, Oliva MLV, Ferreira RS. A new exogen anticoagulant with high selectivity to intrinsic pathway of coagulation. *Thromb Res*, 2011; 395-397.

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.

Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. Pharmacol Rev 1992; 44: 1-80. 129

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

Bosken CH, Hards J, Gatter K, and Hogg JC. Characterization of the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry. Am Rev Respir Dis. 1992; 911-917.

Bredt DS, Hwang MP, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. Nature. 1990; 347:768-70.

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.

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

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

Collins CE. Quaggiotto P. Wood L. O'Loughlin EV. Henry RL. Garg ML. Elevated plasma levels of F2 α isoprostane in cystic fibrosis. *Lipids*. 1999; 34(6):551-556.

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

De Oliveira C, Navarro-Xavier RA, Anjos Vallota EA, Martins JO, Silveira VL F, Gonçalves LRC, Araújo MS, Motta G, Sannomiya P, Oliva MLV. Effect of plant neutrophil elastase inhibitor on leucocyte migration, adhesion and cytokine release in inflammatory conditions. *Br J. of Pharmacol*. 2010; 161: 899-910.

Dennis R, Maldonado D, Norman S, Baena E, Martinez G. Woodsmoke Exposure and Risk For Obstructive Airways Disease Among Women. *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.

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.

Ferreira RD, Zhou D, Ferreira JG, Silva MC, Silva-Lucca RA, Mentele R, Paredes- Gamero EJ, Bertolin TC, Dos Santos Correia MT, Paiva PM, Gustchina A, Wlodawer A, Oliva ML. Crystal Structure of *Crataeva tapia* Bark

Protein (CrataBL) and Its Effect in Human Prostate Cancer Cell Lines. PLoS One. 2013 18;8(6):e64426. 131

Fischer, BM; Pavlisko, E; Voynow, JA. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease–antiprotease imbalance, and inflammation. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis., 2011; v. 6, p. 413-421.

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

Friedman PJ. Imaging studies in emphysema. Proc Am Thorac Soc 2008; 5:494- 500.

GOLD. Executive Summary: Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Available in: www.GOLDcopd.com. 2015.

Gross P, Pfitzer E, Tolker E, Babyak M, Kaschak M. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. Arch Environ Health. 1965; 11:50-58.

Gozzo AJ, Nunes VA, Cruz-Silva I, Carmona AK, Nader HB, Faljoni-Alario A, Sampaio MU, Araújo MS. Heparin modulation of human plasma kallikrein on different substrates and inhibitors. Biol Chem. 2006;387: 1129-38.

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.

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.

Hazem F Elewa, Anna Kozak, Azza B El-Remessy, Reginald F Frye, Maribeth H .Johnson, Advije Ergul, and Susan C Fagan. Early Atorvastatin Reduces. J Pharmacol Exp Ther. 2009; 330(2): 532–540.

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.

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.

Jedeszko, C and Sloane, B F. Cysteine cathepsins in human cancer. Biol Chem. 2004; 385: 1017-1027.

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. 133 Biochem Biophys Res Commun. 1997; 233(3):668-72.

Kawikova I, Barnes PJ, Takahashi T, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Belvisi MG. 8-epi- PGF₂α, a novel noncyclooxygenase-derived prostaglandin, constricts airways in vitro. Am J Respir Crit Care Med. 1996; 153:590-596.

Koks CA, Groothuis, PG, Slaats P. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in antegradely shed menstruum and peritoneal fluid. Fertil. Steril. 2000; 73: 604–612.

Kuschner W G, A D'Alessandro. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. Eur Respir J. 1996; 9: 1989-94.

Lakshmi RTS, Priyanka T, Meenakshi J, Mathangi KR, Jeyaraman V, Babu M. Low molecular weight heparin mediated regulation of nitric oxide synthase during burn wound healing. *Annals of Burns and Fire Disasters*. 2011; 29:24-29.

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*. 1992; 89:6348-52.

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

Laskowski M Jr, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem*. 1980; 49:593-626. 134

Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic alpha 1-globulin pattern of serum in antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Invest*. 1963; 15:132–140

Laskowski, M, Jr. and I Kato. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem*. 1980; 49: 593-626.

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.

Liu Z, Liu B, Zhang ZT, Zhou TT, Bian HJ, Min MW, Liu YH, Chen J, Bao JK. A mannose-binding lectin from *Sophora flavescens* induces apoptosis in HeLa cells. *Phytomedicine*. 2008; 15: 867-875.

Liu B, Bian HJ, Bao JK. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Lett*. 2010; 287: 1-12.

Luisetti M, Sturani C, Sella D, Madonini E, Galavotti V, Bruno G, Peona V, Kucich U, Dagnino G, Rosenbloom J, Starcher B, Grassi C. MR889, a neutrophil elastase inhibitor, in patients with chronic obstructive pulmonary

disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Eur Respir J*. 1996; 9(7):1482-6.

Macnee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005; 2: 258-66. 135

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.

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

Mitzer W. Counterpoint: Lung impedance measurements are not more useful than simpler measurement of lung function in animal models of pulmonary diseases. *J Appl Physiol* 2007; 103(5): 1901-3.

Moertel 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, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991; 43:109-42. 136

Moncada S, Higgs EA. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329:2002-12,

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

Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell*. 1999; 96(5):737-49.

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.

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.

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 LV, Almeida-Reis R, Theodoro-Junior O, Oliveira B.M. A plant proteinase inhibitor from *Crataeva tapia* (CrataBL) attenuates elastase-induced pulmonary inflammatory, remodeling, and mechanical alterations in mice. *Process Biochemistry*. 2015; 1477: 64-74

Oliva MLV, EM Santomauro-Vaz. Synthetic peptides and fluorogenic substrates related to the reactive site sequence of Kunitz-type inhibitors isolated from *Bauhinia*: interaction with human plasma kallikrein. *Biol Chem*. 2001; 382: 109-13.

Oliva MLV, Andrade SA, Juliano MA, Sallai RC, Torquato RJ, Sampaio MU, Pott, VJ, and Sampaio, CA. Kinetic Characterization of Factor Xa Binding Using

a Quenched Fluorescent Substrate Based on the Reactive site of Factor Xa Inhibitor from *Bauhinia unguolata* Seeds. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10: 1085-1093.

Oliveira C, Santana LA, Carmona AK, Cezari MH, Sampaio MU, Sampaio CAM and Oliva MLV. Structure of Cruzipain/Cruzain Inhibitors Isolated from *Bauhinia bauhinioides* Seeds. *Biol. Chem.* 2001; 382: 847-852. 138

Oliveira MDL, Andrade CAS, Santos-Magalhães NS, Coelho LCBB, Teixeira JA, Carneiro-da-Cunha MG, Correia MTS. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Lett. Appl. Microbiol.* 2008; 46: 371- 376.

Owen CA, Hu Z, Lopez-Otin C, Shapiro SD. Membrane-bound matrix metalloproteinase-8 on activated polymorphonuclear cells is a potent, tissue inhibitor of metalloproteinase-resistant collagenase and serpinase. *J Immunol.* 2004; 172(12):7791-803.

Pando, SC, Oliva, MLV, Sampaio, CAM, Ciero, LD, Novello, JC, Marangoni, S. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. *Phytochemistry*, 2001. 57: 625-631.

Possa SS, Charafeddine HT, Righetti RF, da Silva PA, Almeida-Reis R, Saraiva- Romanholo 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 F_{2α} 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.

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.

Richardson, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry*. 1991; 5:259-305. 140

Scuri M, Forteza R, Lauredo I, Sabater JR, Botvinnikova Y, Allegra L, Abraham

WM. Inhaled porcine pancreatic elastase causes bronchoconstriction bradykinin-mediated mechanism. *J Appl Physiol*. 2000 89(4):1397-402.

Selman M, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Ramírez R, Kudlacz EM, Mitchell PG, Pardo A. Matrix metalloproteinases inhibition attenuates tobacco smoke-induced emphysema in Guinea pigs. *Chest*. 2003.123(5):1633-41.

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, 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.

Shapiro SDEP, Ingenito. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005; 32: 367-72.

Simpson CR, Hippisley-Cox J, Sheikh A. Trends in the epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease in England: a national study of 51 804 patients. *Br J Gen Pract*. 2001; 576: 483–488.

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.

Stetler-Stevenson W, Yu, A. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin. Cancer Biol*. 2001; 11: 143-152.

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.

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.

Tang LF, Du LZ, Chen ZM, Zou CC. Levels of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in bronchoalveolar lavage cells of asthmatic children. *Fetal Pediatr Pathol*. 2006;25(1):1-7.

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.

Thompson ABD Daughton. Intraluminal airway inflammation in chronic bronchitis. Characterization and correlation with clinical parameters. *Am Rev Respir Dis*. 2011; 140: 1527-37.

Tibboel J, and Post M. Characterization of elastase-induced emphysema in mice: Lung function. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 181: 5065.

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.

Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5: 785-799. 143

Viaro, Fernanda; Nobre, Fernando and Evora, Paulo Roberto B. Expression of nitric oxide synthases in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Arq. Bras. Cardiol*. 2000, vol.74, n.4, pp. 380-393.

Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore G. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003; 417S-22S.

Yang, SW, Ubillas, R Mcalpine, J, Stafford, A, Ecker, DM, Talbot, MKB. Three new phenolic compounds from a manipulated plant cell culture, *Mirabilis jalapa*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, 2001; v. 64, p. 313-317.

Wang Monteiro Lobato; Petsonk, EI; 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. The challenge of measuring lung structure. On the "Standards for the Quantitative Assessment of Lung Structure". *The journal of the Japanese Respiratory Society* 48:9 2010 Sep pg 637-43.

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

Wright JL, Churg A. Smoking cessation decreases the number of metaplastic secretory cells in the small airways of the guinea pig. *Inhal Toxicol.* 2002;14:101–7.

Wright JL, Farmer SG, Churg A. A neutrophil elastase inhibitor reduces cigarette smoke-induced remodelling of lung vessels. *Eur Respir J.* 2003; 22(1):77-81. 144