ROSANA BANZATO FRANCO

Efeitos da redução da função colinérgica na mecânica e na histopatologia pulmonar em modelo experimental de enfisema

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

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos

Orientadora: Profa. Dra. Carla Máximo Prado

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Banzato Franco, Rosana

Efeitos da redução da função colinérgica na mecânica e na histopatologia
pulmonar em modelo experimental de enfisema / Rosana Banzato Franco. --
São Paulo, 2013.

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

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

Orientadora: Carla Máximo Prado.

*Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós
mesmos.*

(Friedrich Nietzsche)

DEDICATÓRIA

À você meu querido filho Diogo, como José Saramago já escreveu: “Filho é um ser que nos emprestam para um curso intensivo de como amar alguém além de nós mesmos, de como mudar nossos piores defeitos para darmos os melhores e de aprendermos a ter coragem”. E você é tudo isso, meu grande amigo e grande incentivador dessa minha fase de crescimento. Obrigada por seus ensinamentos (isso mesmo! Hoje aprendo mais como você, do que você comigo). Amo você demais!!

Aos meus pais, Ciniro Banzato que deixou saudades enormes que o tempo teima em não apagar e a minha mãe Valdelice Banzato, guerreira e amiga de todos esses anos. A vocês sou grata, por todos os ensinamentos de integridade, respeito e amor... Hoje só estou aqui graças a tudo que vocês puderam me oferecer, mesmo com as dificuldades, em todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Mulher, pesquisadora, coordenadora, orientadora, esposa e mãe (será que esqueci algo? Ah! Amiga). Essa é minha orientadora Carla MÁXIMO Prado, mulher de caráter ético indiscutível, determinada, tanto que introduziu no nosso laboratório a pesquisa com os VACHTs. Foi um começo árduo, mas desde o início mostrou e nos encorajou a vencer essa etapa. E hoje estamos aqui com um trabalho estruturado em relação a esses animais. Não tem quem vá discordar do que eu vou escrever agora: Sua característica marcante é o seu raciocínio rápido e devo confessar que por muitas vezes fiquei com “aquela cara de?” e ela ao perceber, iniciava a explicação novamente”. Carla só tem a agradecer por esses anos que pude ter o privilégio de conviver com você, agradecer na confiança ao entregar em minhas mãos esse trabalho. Muito obrigada por tudo, por todo aprendizado e incentivo.

À Nathalia Pinheiro Montoro, agora a Senhora Nathalia Pinheiro. Sempre brinquei com ela: Nath você é meu braço direito! E realmente, foi minha grande companheira nessa trajetória. Uma verdadeira pesquisadora, sua postura ética é admirável e sua experiência prática é exemplar. Deus foi bondoso comigo, quando

colocou você no meu caminho! Muito obrigada amiga, você é um exemplo a ser seguido!

À Clarice R. Olivo, companheira dos experimentos, sua característica marcante é a inteligência e organização, fundamentais para todo pesquisador. Muito obrigada por toda ajuda durante a realização deste estudo.

À Fernanda D.T.Q.S. Lopes, por sua doçura e ética profissional, sempre me acolhendo prontamente para auxiliar nas leituras de lâminas, fizeram-me admirá-la e respeitá-la. Obrigada pelos seus ensinamentos, estão guardados aqui comigo.

À Fernanda Roncon, companheira durante essa jornada, sempre disponível para me socorrer nos minutos finais do segundo tempo. Obrigada por sua delicadeza e ajudas pontuais.

À Luciana Ritha de Cássia Rolin Barbosa Aristóteles, o tamanho do seu nome é proporcional ao seu coração. Num belo dia de janeiro, quando passo em sua casa para fazer uma visita, ela simplesmente diz: “Vamos, hoje vou te apresentar á sua orientadora!”. E assim, iniciei meus primeiros passos nesse laboratório. Obrigada pelo seu carinho durante todos esses anos, companheira dos momentos difíceis e alegres na minha vida. Mulher completa é você!

“Segundo um provérbio Oriental: Existe uma linha vermelha, invisível aos olhos, que conecta todos que estão destinados a se encontrar. E não importa o tempo, o lugar ou as circunstâncias, esse fio pode ser tão apertado, ou emaranhado, mas nunca rompido.” E é exatamente isso que ocorreu comigo e com Claudia Jeane Claudino Pontes Miranda, simplesmente Claudinha. O universo nos aproximou e nos mantém unidas (e agora ela está no Pará). Claudinha obrigada por todos esses anos de amizade, de cumplicidade no trabalho, nos momentos onde uma falava e a outra simplesmente ouvia, nas lágrimas, nas risadas e no VACHT (até aqui não deixamos de ser cúmplice mais uma vez). A distância é grande agora, mas não poderá romper a nossa linha vermelha que nos une!

Aos meus familiares: ao meu marido Carlos, pelos anos que estamos juntos (e ponham anos...), me apoiando silenciosamente e segurando meus vários momentos de insegurança. À minha cunhada Maricy Leal Banzato, uma irmã que Deus me enviou anos depois, obrigada pela compreensão das minhas várias recusas aos seus convites, durante essa fase dedicada a essa dissertação. Ao meu irmão Marcelo Banzato, mas que um irmão, um amigo! Há coisas que não sabemos explicar, porque duas pessoas podem ter tanta cumplicidade? Obrigada Má, por você estar ao meu lado e sei que sempre estará.

À chefia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, ao gerente Carlos Alberto Costa e a supervisora Sandra Vitti, primeiramente pela amizade construída nestes 18 anos e pelo apoio nesta minha nova etapa na vida, possibilitando realizar as várias trocas de horários quando necessitei. Muito obrigada, os tenho em minha vida como grandes amigos, a final nossa trajetória foi longa e desfrutamos de várias alegrias não apenas no trabalho, mas familiares.

À minha segunda família, meus amigos do Hospital Alemão Oswaldo Cruz. Sim minha segunda família, aqui passei boa parte da minha vida. Tive a oportunidade de conhecer pessoas ímpares em minha vida, Eliane Cristina Zacarias uma guerreira, Carmem Roncato (minha Carmensita) minha confidente, Renata Sapata amiga além HAO, meus amigos de viagem de congressos Sílvia Fukuzaki, Darlene Y. Yoshimori, Patrícia Porto, Fernanda Antunes Paula, Luciana Simão Ribeiro, Edmundo Suguitani e todos com quem convivo diariamente: Daisy Mendes Oliveira, Danilo A.Z. Figueira, Eduardo Almeida, Ali Mohamad Awada, Ana Claudia Fernandes, Camila Cadrobbi, Felipe C. Abreu, Fernanda E. da Silva, Gabriela Cillo, Janaine Mituiti, Luciana V. Pereira, Mariana Fernandes, Maurício Ormachea, Natália Monteiro, Paula Mendes, Raquel Camurça, Renata Perillo, Roberta Oliveira, Sabrina A.F. da Silva, Fernanda Evaristo Silva, Marcia Naoko Gushiken, Tabata Larissa Rodrigues Duarte. E

claro a nossa secretária, Simone Morgato (Simoninha), que tem que dar conta de todos nós! O meu muito obrigado! Podem acreditar o meu dia ao lado de vocês é gratificante.

À Edimilson Carvalho, secretário do Comitê de Ética (CEP) do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, uma pessoa de conhecimento ímpar em Pesquisa Clínica, o qual o admiro e sempre o elogio “aos quatro ventos”. Obrigada por passar uma tarde toda comigo formatando minha dissertação.

À Profa. Luciana Caperuto e ao Prof. Niels Câmara pelos ensinamentos e por disponibilizarem seus laboratórios, naquele momento crucial, onde precisamos acrescentar mais dados ao nosso trabalho.

Ao Prof. Milton Arruda Martins, responsável pelo LIM 20. Muito obrigado em me receber em sua equipe e possibilitar o meu crescimento junto a pessoas conceituais.

Aos meus novos amigos do LIM 20: Edna Leick, Fernanda Arantes, Beatriz Saraiva, Ademir Perini e Francine Maria de Almeida. Obrigada, com vocês aprendi e continuo aprendendo o que é ser um pesquisador.

À Rosana, secretária do laboratório. E ao nosso querido Davi, sempre atencioso e disposto a ajudar. Muito obrigada.

Fapesp pelo apoio financeiro – projeto jovem pesquisador n. 2008-55359-5

CNPq – Edital Universal – n. 471224/2009-0.

Todos vocês foram peças importante nesse trabalho em equipe, cada um representou uma parcela no resultado final.

O MEU MUITO OBRIGADO A TODOS!!!

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

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

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

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com Lista of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.....	02
1.1.1	Definição.....	02
1.1.2	Epidemiologia.....	07
1.1.3	Fisiopatologia.....	09
1.1.3.1	Desequilíbrio protease-antiprotease.....	14
1.1.3.2	Estresse oxidativo.....	16
1.2	Tratamento.....	19
1.2.1	Farmacológico.....	19
1.2.2	Não Farmacológico.....	21
1.3	Sistema Colinérgico.....	21
1.3.1	Receptores Muscarínicos.....	24
1.3.2	Receptores Nicotínicos.....	26
1.3.3	Sistema Colinérgico Anti-inflamatório.....	27
1.3.4	Modelos experimentais de DPOC.....	34
1.4	Justificativa do Estudo.....	37
2	OBJETIVO.....	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1	Animais.....	42
3.2	Grupos Experimentais.....	43
3.3	Indução da elastase.....	44
3.4	Avaliação da Mecânica do Sistema Respiratório.....	44
3.5	Lavado Bronco-alveolar (LBA).....	45
3.6	Estudo Morfométrico.....	46
3.6.1	Medidas do Intercepto Linear Médio (Lm).....	46
3.6.2	Avaliação do Remodelamento de Fibras de Colágeno e das Fibras Elásticas no Parênquima Pulmonar e no Eixo Broncovascular.....	47
3.6.3	Avaliação Imuno-histoquímica.....	49
3.7	Análise de Citocinas no Homogenato Pulmonar.....	50
3.8	Western blot para detecção de VACHT e M2 homogenato de pulmão.....	51

3.9	Análise Estatística.....	53
4.	RESULTADOS.....	54
4.1	Efeitos da VACHT no Peso do animal.....	55
4.2	Efeitos da VACHT na avaliação da Mecânica Respiratória.....	55
4.3	Efeitos da deficiência de VACHT na destruição alveolar (Lm).....	55
4.4	Efeitos da VACHT na Inflamação Pulmonar.....	59
4.4.1	No Lavado Bronco Alveolar (LBA).....	59
4.4.2	Em macrófagos no tecido pulmonar.....	60
4.4.3	Nas células positivas do NF- κ B no tecido pulmonar e no eixo broncovascular.....	64
4.5	Citocinas.....	67
4.6	Efeitos da deficiência em VACHT no remodelamento pulmonar.....	69
4.6.1	Nas fibras Colágenas.....	69
4.6.2	Nas fibras Elásticas.....	70
4.7	Efeitos da deficiência em VACHT no Estresse Oxidativo.....	75
4.7.1	Isoprostano (8-iso-PGF-2 α) no parênquima pulmonar e eixo peribroncovascular.....	75
4.8	Deteção de VACHT e M2 no homogenato de pulmão.....	78
5	DISCUSSÃO.....	80
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AP1	Proteína Ativadora1
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AVDs	Atividades de Vida Diária
$\alpha 7$nAChR	Receptores Nicotínicos $\alpha 7$
CAPPesp	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAT	Assessment Test
Ch	Colina
ChAT	Acetiltransferase
CHT1	Transportador de Colina de Alta Afinidade
CI	Capacidade Inspiratória
CRF	Capacidade Residual Funcional
CVF	Capacidade Vital Forçada
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung
Gtis	Resistência Tecidual
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
Htis	Elastância do Tecido
I-κB	Inibidor do Fator Nuclear kappa B
IFN-γ	Interferon-Gama
IL	Interleucinas

JAK2	Tirosina Quinase
LBA	Lavado Bronco-alveolar
LM	Intercepto Linear Médio
M	Receptores Muscarínicos
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos
MEC	Matriz Extracelular
MIP-2	Proteína 2 Macrofágica Inflamatória
MMPs	Metaloproteinase de matriz
mMRC	Modified British Medical Research Council
nAChR	Receptores Nicotínicos
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
NHLBI	National Heart Lung and Blood Institute
O₂⁻	Anion Superóxido
OH⁻	Radical de Hidroxila
ONOO⁻	Peroxinitrito
PaCO₂	Pressão Arterial Parcial de CO ₂
PAF	Ativador Plaquetária
PaO₂	Pressão Arterial Parcial de O ₂
Platino	Projeto Latino-Americano de Investigação de Enfermidade Obstrutiva
PPE	Elastase Pancreática Porcina
Raw	Resistência das Vias Aéreas
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOCS-3	Proteína Anti-Inflamatória
STAT3	Fator de Transcrição
SUS	Sistema Único de Saúde
Tc1	Células T citotóxicas do tipo 1
Tc2	Células T citotóxicas do tipo 2

TIMP	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases
VAC_hT	Transportador Vesicular de Acetilcolina
VAC_hT KD^{HOM} PPE	Animais mutantes submetidos ao protocolo de elastase
VAC_hT KD^{HOMO}-SAL	Animais mutantes submetidos ao protocolo de solução salina
VEF₁	Fluxo Expiratório Forçado no primeiro segundo
WT-PPE	Animais selvagens submetidos ao protocolo de elastase
WT-SAL	Animais selvagens submetidos ao protocolo de solução salina
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TGF-β	Fator de crescimento transformador
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Associação entre Sintomas, Classificação Espirométrica e Risco Futuros de Exacerbações.....	06
Figura 2.	Fisiopatologia do enfisema pulmonar.....	11
Figura 3.	Estresse Oxidativo.....	18
Figura 4.	Inervação parassimpática no pulmão.....	22
Figura 5.	Síntese da ACh.....	24
Figura 6.	Arco reflexo da inflamação.....	30
Figura 7.	Hipóteses dos mecanismos envolvidos na resposta colinérgica anti-inflamatória.....	33
Figura 8A e 8B.	Fotomicrografias representativas para análise do parênquima pulmonar e eixo peribroncovascular respectivamente.....	49
Figura 9.	Peso do animal.....	56
Figura 10 A.	Efeito da deficiência de VACHT na avaliação da mecânica respiratória Respiratória-HTIS.....	57
Figura 10 B.	Efeito da deficiência de VACHT na avaliação da mecânica respiratória – Gtis.....	57
Figura 11 A.	Efeito da deficiência de VACHT na destruição alveolar (Lm).....	58
Figura 12 A.	Efeito da deficiência de VACHT no LBA em relação aos macrófagos, neutrófilos e linfócitos.....	60
Figura 13 A.	Efeito da deficiência de VACHT macrófagos no parênquima pulmonar.....	62
Figura 14 A.	Efeito da deficiência de VACHT macrófagos eixo peribroncovascular.....	63
Figura 15 A.	Efeito da deficiência de VACHT nas células positivas para NF- κ B no parênquima pulmonar.....	65
Figura 16 A.	Efeito da deficiência de VACHT nas células positivas para NF- κ B no eixo peribroncovascular.....	66
Figura 17 A.	Efeito da deficiência de VACHT nas fibras colágenas no parênquima pulmonar.....	71
Figura 18 A.	Efeito da deficiência de VACHT nas fibras colágenas no eixo peribroncovascular.....	72
Figura 19 A.	Efeito da deficiência de VACHT nas fibras elásticas no parênquima pulmonar.....	73
Figura 20 A.	Efeito da deficiência de VACHT nas fibras elásticas no eixo peribroncovascular.....	74
Figura 21 A.	Área positiva para isoprostano no parênquima pulmonar.....	76

Figura 22 A.	<i>Área positiva para isoprostano no eixo peribroncovascular...</i>	77
Figura 23 A.	Detecção de VaCht.....	79
Figura 24 A.	Detecção de M2.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Grupos baseados na associação entre Sintomas, Classificação Espirométrica e Risco Futuros de Exacerbações.....	05
Tabela 2.	Citocinas na DPOC.....	12
Tabela 3.	Subunidades nicotínicas e suas funções.....	27
Tabela 4.	Resultados de citocinas.....	68

Resumo

Banzato R. *Efeitos da redução da função colinérgica na mecânica e na histopatologia pulmonar em modelo experimental de enfisema pulmonar* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: O enfisema pulmonar é o maior componente da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), é caracterizado pelo alargamento, destruição alveolar e inflamação do parênquima e vias aéreas pulmonares. A recente descrição do sistema colinérgico anti-inflamatório, um mecanismo neural que controla a inflamação por inibição de citocinas pró-inflamatórias, sugere uma importante participação deste sistema na fisiopatologia das doenças pulmonares. A acetilcolina (ACh), principal mediador deste sistema, é estocada em vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de ACh (VACHT), proteína essencial para sua liberação na fenda sináptica. **Objetivos:** Avaliar se os efeitos da hipofunção colinérgica, por redução da expressão do VACHT, interferem com as alterações pulmonares em modelo experimental de enfisema pulmonar. **Metodologia:** Camundongos machos selvagens e mutantes, estes últimos com redução da função colinérgica por modificação genética nos níveis do VACHT, foram submetidos ao protocolo de elastase (PPE instilação nasal) ou salina. No dia 28, foi avaliado a função pulmonar, a inflamação e o remodelamento pulmonar. Por imunohistoquímica, avaliou-se a expressão de macrófago, NF- κ B e isoprostano no pulmão. Algumas citocinas pró-inflamatórias foram avaliadas no homogenato pulmonar pelo Bioplex. **Resultados:** Animais selvagem que receberam elastase tiveram redução de elastância de tecido, aumento da inflamação no LBA e no tecido, aumento de citocinas pró-inflamatórias e IL-10, aumento do remodelamento pulmonar, e da expressão de NF- κ B e de isoprostano. A deficiência colinérgica nestes animais submetidos ao mesmo protocolo de elastase amplificou a resposta inflamatória (macrófago e neutrófilo) no pulmão, níveis de MCP-1 e também aumento células positivas para NF- κ B e isoprostano na região do eixo broncovascular. **Conclusão:** A ACh parece ter um papel protetor da inflamação neste modelo de enfisema pulmonar, pelo menos em parte pelo controle do NF- κ B e do estresse oxidativo. Estes resultados sugerem ainda que o remodelamento e a função pulmonar no enfisema experimental não dependem totalmente do grau de inflamação pulmonar.

Descritores: Enfisema pulmonar; Proteínas vesiculares de transporte de acetilcolina/genética; Acetilcolina; Inflamação; Modelos animais; Camundongos.

Summary

Banzato R. *Effects of cholinergic function reduction in lung mechanics and histopathology in an experimental model of pulmonary emphysema* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

Background: Pulmonary emphysema is a major component of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), is characterized by enlargement, alveolar destruction and inflammation of the airways and lung tissue. The recent description of the cholinergic anti-inflammatory, a neural mechanism that controls inflammation by inhibition of proinflammatory cytokines, suggests an important role of this system in the pathophysiology of lung disease. The main mediator of this system is acetylcholine (ACh), which is stored in synaptic vesicles by vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein, which is essential for ACh release into the synaptic cleft. **Aim:** To evaluate whether the effects of cholinergic hypofunction by reduction on VACHT expression, interferes with pulmonary alterations in an experimental model of pulmonary emphysema. **Methods:** Male mice wild-type and mutant, the last one with reduced cholinergic function by genetic modification in the levels of VACHT, were submitted to the protocol of elastase (PPE intranasally) or saline. On day 28, pulmonary mechanics, inflammation in bronchoalveolar lavage fluid and tissue remodeling were analyzed. By immunohistochemistry, the expression of macrophage, NF- κ B and isoprostane in lung was evaluated. Some proinflammatory cytokines were measured in lung homogenate by Bio Plex. **Results:** Wild-Type animals that received elastase presented a reduction in tissue elastance, an increase in BALF and tissue inflammation as well as in proinflammatory cytokines, IL-10, pulmonary remodeling, and expression of NF- κ B and isoprostane. Cholinergic deficient in these animals submitted to the same elastase-induced emphysema protocol amplified the inflammatory response (macrophage and neutrophils) in the lungs, the levels of MCP-1 and the number of positive cells to NF- κ B and isoprostane in bronchovascular axis. **Conclusions:** The ACh seems to have a protective role inflammation in this experimental model of emphysema, at least in part by controlling NF- κ B and oxidative stress. These results further suggest that the remodeling and lung function in experimental emphysema does not depend entirely on the degree of lung inflammation.

Descriptors: Pulmonary emphysema; Vesicular acetylcholine transport proteins/genetics; Acetylcholine; Inflammation; Models animal; Mice.

1. Introdução

1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

1.1.1 Definição

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é caracterizada por limitação ao fluxo aéreo, usualmente progressivo e associada a uma resposta inflamatória anormal nos pulmões frente à exposição a partículas e gases nocivos. A limitação ao fluxo aéreo caracterizada na DPOC é causada por um conjunto de alterações entre doenças pulmonares das vias aéreas (bronquiolite obstrutiva) e a destruição do parênquima pulmonar (enfisema) (1-3). A limitação do fluxo aéreo caracteriza-se pela redução do fluxo expiratório detectada pela espirometria, com redução irreversível de fluxo expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) e da relação VEF_1/CVF (capacidade vital forçada). Segundo Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), a limitação ao fluxo aéreo ocorre quando a relação VEF_1/CVF é $<70\%$ (3).

O fator de risco mais importante para o desenvolvimento da DPOC é o tabagismo, mas outros fatores de risco foram identificados, como a poluição do ar e a exposição ocupacional (3, 4). O diagnóstico é baseado na exposição aos fatores de riscos, nos sintomas e na relação VEF_1/CVF pós-brondilatador menor que 0,7 (3). A DPOC se manifesta por dois tipos clínicos, a bronquite e o enfisema. A bronquite é clinicamente definida pela presença de tosse produtiva por no mínimo três meses nos últimos dois anos consecutivos (5). O enfisema é caracterizado por destruição das paredes alveolares, resultando no alargamento dos espaços aéreos distais e bronquíolos terminais, ocasionando a perda da superfície respiratória e de irrigação sanguínea, diminuição do recolhimento elástico e hiperinsuflação pulmonar. Pode ser classificado em:

- a) enfisema centroacinar que é mais comumente causado pelo uso do tabaco e se observa um alargamento ou destruição dos bronquíolos respiratórios.
- b) enfisema pancinar, encontrado mais comumente em pacientes com deficiência da α -1antitripsina (uma desordem envolvendo o cromossomo 14) (6).

Ambos os tipos de enfisema podem ser encontrados em pacientes portadores da DPOC, sendo que aproximadamente metade dos pacientes apresentam ambas as formas de enfisema pulmonar e cerca de 25% apresentam apenas uma das formas (7).

A DPOC é uma condição respiratória caracterizada por dispneia progressiva, tosse e produção de muco. A dispneia é fisiologicamente causada pela limitação ao fluxo aéreo (8) e por outro lado à limitação ao fluxo aéreo pode se desenvolver sem a presença de tosse e a produção de muco (9).

Os pacientes com a DPOC podem apresentar um agravamento da sintomatologia (exacerbações), como aumento da quantidade de secreção muco purulenta expectorada e da dispneia. Essas exacerbações podem ser uma ameaça à vida, podendo ocorrer em média, três vezes por ano em pacientes com DPOC moderada ou grave (10). A cada exacerbação experimentada pelo paciente, implica num declínio na sua qualidade de vida e aumento da utilização de serviços de saúde e os custos econômicos atribuíveis a essa doença (11). As exacerbações são definidas como um evento agudo ocasionado por infecções frequentes do trato respiratório por vírus ou bactérias e agentes poluentes (12).

A espirometria é utilizada para a classificação da DPOC. Segundo GOLD (3), a DPOC pode ser classificada em quatro estágios: leve, moderada, grave e muito grave.

- a) GOLD I- Leve: Caracterizado por leve limitação ao fluxo aéreo ($VEF_1/CVF < 0,70$; $VEF_1 \geq 80\%$ do previsto). Apresenta como sintomatologia, tosse crônica e a produção de secreção aumentada poderão estar presentes.
- b) GOLD II- Moderada: Caracterizado pelo agravamento do fluxo aéreo ($VEF_1/CVF < 0,70$; $50\% \leq VEF_1 < 80\%$ do previsto). Os pacientes apresentam sintomas como: dispneia aos esforços e às vezes tosse produtiva com expectoração de secreção. Nessa fase os pacientes procuram ajuda médica, devido sintomatologia respiratória crônica e pelo o surgimento de exacerbações.
- c) GOLD III- Grave: Caracterizado pelo agravamento da limitação ao fluxo aéreo ($VEF_1/CVF < 0,70$; $30\% \leq VEF_1 < 50\%$ do previsto). Como sintomatologia pode ser observada maior dispneia, redução da capacidade ao exercício, fadiga e exacerbações repetidas que quase sempre têm um impacto na qualidade de vida dos pacientes.
- d) GOLD IV- Muito Grave: Caracterizado pela limitação grave do fluxo aéreo ($VEF_1/CVF < 0,70$; $VEF_1 < 30\%$ do previsto, mais a presença de falência respiratória crônica). A falência respiratória é caracterizada pela pressão arterial parcial de O_2 (PaO_2) menor que 60 mmHg e/ou aumento da pressão arterial parcial de CO_2 ($PaCO_2$) maior que 50 mmHg, associada à dispneia aos mínimos esforços.

Neste estágio observam-se sinais de *Cor Pulmonale* e a qualidade de vida desses pacientes está bastante depreciável.

Segundo Gold de 2013 recomenda-se que a espirometria é necessária para o diagnóstico clínico da DPOC, para evitar erros de diagnóstico e para garantir uma correta avaliação da gravidade da limitação do fluxo aéreo. O documento destaca que a avaliação do paciente com DPOC deve sempre incluir a avaliação de a) sintomas, b) gravidade da limitação do fluxo aéreo, c) história de exacerbações e d) comorbidades. Os primeiros três itens podem ser utilizados para avaliar o nível de risco e dos sintomas de exacerbações futuras, e isto é feito de uma forma que divide os pacientes com DPOC em quatro categorias A, B, C, e D. (Figura 1).

Baseando-se neste gráfico (Figura 1), podemos ter os seguintes grupos (Tabela 1).

Tabela 1- Grupos baseados na associação entre Sintomas, Classificação Espirométrica e Risco Futuros de Exacerbações. (Adaptado GOLD 2013) (3)

	Pacientes Grupo A	Pacientes Grupo B	Pacientes Grupo C	Pacientes Grupo D
Risco	Baixo risco e poucos sintomas	Baixo risco e mais sintomas	Alto risco e poucos sintomas	Alto risco e mais sintomas
Gold	Gold 1-2 (limitação do fluxo baixo e moderado)	Gold 1-2 (limitação do fluxo baixo e moderado)	Gold 3-4 (limitação do fluxo grave ou muito grave)	Gold 3-4 (limitação do fluxo grave ou muito grave)
Exacerbação/ano	0-1 exacerbação/ano e mMRC 0-1 ou escala de CAT<10	0-1 exacerbação/ano e mMRC ≥ 2 ou escala de CAT≥10	2 exacerbações por ano/≥ 1 hospitalização e mMRC < 2 ou escala de CAT<10	2 exacerbações por ano/≥ 1 hospitalização e mMRC ≥2 ou escala de CAT≥10

Figura 1. Associação entre Sintomas, Classificação Espirométrica e Risco Futuros de Exacerbações: Primeiramente para a avaliação dos sintomas, deve-se determinar se o paciente pertence ao lado esquerdo do gráfico - menos sintomas (como indicado pela Modified British Medical Research Council (mMRC) grau 0-1 ou Assessment Test (CAT) <10) - ou do lado direito - mais sintomas (conforme indicado pelo mMRC > 2 ou CAT > 10). Em seguida avaliar o risco de exacerbações para determinar se o paciente se encontra na parte inferior do gráfico - Baixo Risco - ou a parte superior do gráfico- Alto Risco. Isto pode ser feito por qualquer um de dois métodos: a) utilização da classificação espirométrica para determinar o Grau GOLD de limitação do fluxo aéreo (GOLD 1-2 indicam baixo risco, enquanto o GOLD 3-4 indicam Alto risco), ou b) determinar o número de exacerbações que o paciente teve nos últimos meses (0 ou 1 indica baixo risco, enquanto duas ou mais exacerbações indica alto risco). (Modificado Gold, 2013) (3).

Os pacientes com DPOC apresentam aumento da capacidade residual funcional (CRF) e diminuição da capacidade inspiratória (CI) o que caracteriza a hiperinsuflação pulmonar. Em pacientes enfisematosos com falência pulmonar, observar-se a diminuição da oxigenação arterial, aumento dióxido de carbono e hipoxemia grave. Geralmente estes pacientes evoluem com hipertensão pulmonar ocasionando o desenvolvimento da hipertrofia ventricular direita, *Cor Pulmonale* agravando o prognóstico (13). As manifestações extra

pulmonares, que aparecem juntamente com alterações pulmonares são comuns na DPOC.

Conforme foi observado no estudo ECLIPSE (14), as comorbidades foram maiores em indivíduos fumantes quando comparados aos não fumantes. As comorbidades mais observadas na DPOC são: doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, síndromes metabólicas, obesidade, osteoporose, acidente vascular cerebral (AVC), câncer de pulmão, caquexia, anemia, depressão e declínio cognitivo. O aumento das patologias cardiovasculares está relacionado à inflamação sistêmica, aumento do estresse oxidativo e alterações neuro-humorais (15).

1.1.2 Epidemiologia

A DPOC é considerada uma das principais causas de mortalidade no mundo. A prevalência de morbidade e a taxa de mortalidade, devido a DPOC, variam nos diferentes países e diferentes grupos de pessoas e estão relacionadas à prevalência de fumantes na população e a inalação de gases tóxicos. Estima-se que a exposição prolongada aos fatores de risco e o aumento do envelhecimento na população induzem maior prevalência e contribuem com o maior impacto sócio econômico dessa patologia, tornando-se um desafio para a saúde mundial nas próximas décadas, GOLD (3). Acredita-se que em 2020, a DPOC será a terceira causa de morte no mundo.

Apesar do aumento dos estudos em DPOC nos últimos anos, essa patologia ainda é desconhecida da população, pela confusão da nomenclatura

utilizada, principalmente o termo bronquite crônica que muitas vezes é referida pelo paciente leigo como sinônimo de asma brônquica (3, 16).

Estima-se que um quarto da população com mais de 40 anos, pode ter limitação ao fluxo aéreo classificado em GOLD I: DPOC leve. A prevalência da DPOC entre as mulheres, bem como o custo médio com o seu tratamento, aumentou consideravelmente nos últimos 20 anos (17), tendo um impacto econômico significativo na sociedade.

Nos Estados Unidos em 2010, o National Heart Lung and Blood Institute (NHLBI), estimou um gasto de US \$ 13,2 bilhões em custos hospitalares, US \$ 5,5 bilhões em serviços médico, e US \$ 5,8 bilhões na utilização de drogas para o tratamento dessa patologia (18).

O Projeto Latino-Americano de Investigação de Enfermidade Obstrutiva (Platino) estudou a prevalência da limitação ao fluxo aéreo pós-broncodilatador, em pessoas com mais de 40 anos na América Latina em diferentes países, como Brasil, Chile, México, Uruguai e Venezuela (16). No Brasil, este número pode ser de até sete milhões de pessoas, enquanto no Estado de São Paulo, a prevalência da limitação ao fluxo aéreo pós-broncodilatador acomete aproximadamente 15,8% dos indivíduos com mais de 40 anos. A DPOC impõe um gasto substancial ao Sistema Único de Saúde (SUS); cerca de 180 mil pacientes por ano são admitidos em hospitais devido a esta doença e foi a sexta principal causa de morte no Brasil em 2004, com 33.000 mortes. Apesar da elevada carga sobre a saúde pública, a DPOC, todavia ainda é subdiagnosticada (19).

Pelos dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) a DPOC, foi a quinta maior causa de internação no sistema público de saúde no nosso país, em indivíduos com mais de 40 anos, com 196.698 internações em 2003 e gasto aproximado de 72 milhões de reais, o que a coloca entre as principais doenças consumidoras de recursos de saúde (<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>).

Nos últimos 20 anos, houve um aumento do número de óbitos por DPOC em ambos os sexos no Brasil, tendo a taxa de mortalidade passado de 7,88/100.000 habitantes na década de 1980 para 19,04/100.000 habitantes, na década de 1990. Houve um crescimento de óbitos entre os anos de 1980 e 2001 de 340% (20).

Pelos motivos acima apresentados, a DPOC é um problema grave de saúde pública que acomete uma população economicamente ativa prejudicando significativamente a qualidade de vida destes pacientes.

1.1.3 Fisiopatologia

As mudanças fisiopatológicas na DPOC são decorrentes de alterações patológicas observadas nas vias aéreas centrais, nas vias aéreas periféricas e nos vasos pulmonares (13).

Uma característica importante envolvida na patogênese do enfisema é a inflamação pulmonar (8), resultando no influxo de diferentes tipos de células inflamatórias, incluindo macrófagos, neutrófilos, linfócitos T (especialmente

CD8+), para as vias aéreas, do parênquima e artérias pulmonares. (21). Quando estas células são ativadas libertam vários mediadores, tais como proteases, citocinas (Tabela 2) e espécies reativas de oxigênio (EROs) (22) (Figura 2) que contribui para a destruição do pulmão e na manutenção da inflamação. Dentre os mediadores, destacam-se aqueles com atividade quimiotática pelas as células inflamatórias, os leucotrienos e interleucinas-8 (IL-8), bem como as citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucinas-6 (IL-6), fator de crescimento transformador (TGF- β) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) que induz fibrose nas pequenas vias aéreas (23). Esse grupo de citocinas pró-inflamatórias (Tabela 2) pode ser produzido por uma variedade de células, incluindo fibroblastos, células T, neutrófilos e principalmente monócitos/macrófagos. Em resposta a fumaça do cigarro, os monócitos se acumulam nos pulmões e provavelmente o fumo, ative a liberação de quimiocinas, como a Proteína Quimiotática de Monócito (MCP-1) no sangue periférico (24).

Existem dois padrões de resposta para as células T CD8+: células T citotóxicas do tipo 1 (Tc1) e células T citotóxicas do tipo 2 (Tc2). No primeiro padrão, há produção de interferon gama (IFN- γ) capaz de ativar os macrófagos que produz uma serie de citocinas e no segundo padrão não há essa produção. No caso da DPOC, o interesse é para o padrão Tc1, que foi observado aumentado no escarro, no Lavado Broncoalveolar (LBA) quando comparado com participantes em uma pesquisa com não fumantes (25).

Figura 2 - Fisiopatologia do enfisema pulmonar. Devido à ativação de macrófagos e células epiteliais no trato respiratório por fumaça de cigarro e outros irritantes e observamos liberação de fatores quimiotáticos de neutrófilos, incluindo IL-8 e leucotrienos B₄, que ativam os neutrófilos. Os macrófagos e neutrófilos atuam na liberação de proteases que quebram o tecido conjuntivo no parênquima pulmonar, resultando na destruição da parede alveolar ou enfisema e ainda podem também estimular a hipersecreção de muco. As proteases são normalmente neutralizadas por inibidores de protease, incluindo α -1-antitripsina e inibidores de tecidos de metaloproteinases de matriz. Na DPOC, o equilíbrio entre as proteases e seus inibidores parece ser inclinado em favor de proteólise aumentada. As células T citotóxicas CD8⁺ (linfócitos) podem também estar envolvidos na cascata inflamatória e podem também induzir a destruição da parede alveolar. (Modificado de Barnes PJ, 2004) (1).

Geralmente, a inflamação é caracterizada pela regulação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e inibidores de citocinas. O principal inibidor é a interleucina 10 (IL-10), que é liberada por monócitos e macrófagos em resposta a estímulos inflamatórios (26).

Estudos tem demonstrado que pacientes não fumante com DPOC, apresentam uma resposta inflamatória discreta, possivelmente devido a uma reação de defesa da mucosa à inalação de irritantes. Já pacientes fumantes portadores de DPOC, observa-se uma resposta inflamatória amplificada, que se acentua com a progressão da doença (27, 28). O mecanismo dessa amplificação ainda é desconhecido, mas acredita-se que fatores genéticos, infecções virais latentes e o estresse oxidativo prolongado contribuam para esse fator (2, 29). O mecanismo de regulação da morte celular denominado de apoptose permite a eliminação de células infectadas ou danificadas que necessitam ser removidas do organismo. Caso não ocorra a eliminação adequada dessas células, estas permanecerão no tecido pulmonar e ocorrerá a lesão do citoplasma e extravasamento de mediadores inflamatórios e consequentemente progressão da patologia (30).

Tabela 2 - Citocinas na DPOC. Modificado de Chung, 2001 (24)

CATEGORIA	CITOCINAS
Linfócitos	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13
Fator quimiotático para neutrófilo	IL-1, IL-8, TNF- α , IL-17
Monócitos/Macrófagos	MCP-1, MIP-1 α , RANTES
Pró-inflamatória	IL-1 β , TNF- α , IL-6
Anti-inflamatória	IL-10, IFN- γ

Duas hipóteses relacionadas sobre o desenvolvimento do enfisema são aceitas: a. o desequilíbrio entre protease e antiprotease pulmonar, como a metaloproteinases (MMPs), MMP-9, MMP-12, MMP-2, e seus inibidores teciduais de metaproteinases da matriz (TIMP), TIMP-1 e TIMP-2, que interferem no turn over de fibras do tecido conjuntivo (6); b. o estresse oxidativo excessivo pulmonar, devido a um aumento de EROs que causam danos no tecido pulmonar (22, 31).

As alterações inflamatórias e o desequilíbrio protease-antiprotease que ocorrem em pacientes com DPOC também são vistos em fumantes sem DPOC, mas em menor grau (32, 33), sugerindo que o declínio da função pulmonar pode ser devido a amplificação da resposta pulmonar à substâncias irritantes. Estas diferenças podem ser explicadas pelo polimorfismo nos genes, que codificam as citocinas, as proteases, as proteínas anti-inflamatórias e as antiproteases (34).

A inflamação persistente é uma característica importante da lesão tecidual (35) no pulmão que está associada com aumento da secreção de muco, metaplasia do epitélio das vias respiratórias, aumento das glândulas mucosas dos brônquios, alteração dos vasos sanguíneos e da matriz extracelular, obstrução das vias aéreas menores, destruição do parênquima pulmonar (3) e piora das trocas gasosas. O remodelamento das vias aéreas compreende essas alterações estruturais, caracterizada por lesões repetidas e processos de reparações. O remodelamento das vias aéreas é sem dúvida um dos problemas mais difíceis dessa patologia, que conduz á perda irreversível da função pulmonar (36). Em relação ao remodelamento vascular,

característica da hipertensão pulmonar, observar-se o espaçamento da parede dos vasos sanguíneos decorrente da hipertrofia e hiperplasia da íntima vascular, resultando na proliferação de células mesenquimais, depósito de colágeno e de fibras elásticas (37). A hipertensão pulmonar é uma complicação de mau prognóstico da DPOC, geralmente é diagnóstica em pacientes em fase avançada dessa patologia, mas as alterações nos vasos pulmonares já são visíveis em estágios iniciais da DPOC, bem como em pacientes fumantes sem obstrução do fluxo aéreo (38). Segundo Hirota et al.(36), não há nenhuma terapia disponível que comprove a melhora ou previna a remodelação das vias aéreas em seres humanos, apesar de que há estudos em modelos animais de DPOC, que sugiram essa reversibilidade do remodelamento.

Apesar de o tabagismo ser a principal causa da DPOC, a interrupção à exposição ao cigarro não resulta em resolução da resposta inflamatória nas vias aéreas (39). Isto sugere que há mecanismos que perpetuem o processo inflamatório crônico, após este estar estabelecido. Esses mecanismos podem ser responsáveis pela sintomatologia da DPOC em pacientes que já pararam de fumar. Entretanto, os mecanismos de persistência da doença ainda são desconhecidos (40).

1.1.3.1 Desequilíbrio protease-antiprotease

A hipótese do desequilíbrio protease-antiprotease tem sido apontada como uma das explicações centrais da patogenia do enfisema nos últimos anos, induzindo a destruição da parede alveolar decorrente da ação

enzimáticas proteolíticas ativas que degradam a (MEC), afetando as fibras colágenas e elásticas (41). Este conceito provém de duas teorias: a) observação clínica em pacientes com deficiência da enzima α 1-antitripsina e que desenvolvem o enfisema grave. Essa enzima possui atividade inibitória sobre a elastase neutrofílica com maior rapidez do que sobre outras proteinases; b) e por meio da observação de modelos animais de enfisema pulmonar submetido à instilação de enzimas proteolíticas, resultando na destruição da MEC do ácino pulmonar, levando alterações morfofisiológicas semelhantes às alterações em seres humanos (42, 43).

A teoria do desequilíbrio protease-antiprotease acima citada parte do princípio de que as proteases nos pulmões de pacientes com DPOC destroem os componentes do tecido conjuntivo e as antiproteases protegem contra isso (3). A inalação de fumaça de cigarro induz uma resposta inflamatória crônica no trato respiratório, e as células inflamatórias liberam uma variedade de proteases, causando a proteólise do tecido conjuntivo e consequentemente o enfisema (29, 44, 45). Já foi demonstrado que essas proteases quebram componentes do tecido conjuntivo, especialmente a elastina, para produzir o enfisema pulmonar. A elastina é o principal componente da fibra elástica. Em modelos animais com instilação de elastase, observa-se a degradação da elastina no pulmão em poucas horas(29).

A exposição crônica a fumaça de cigarro, leva ao acúmulo de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T CD8+ nas vias aéreas distais e espaços alveolares. Os macrófagos e os neutrófilos são as principais fontes de proteases nos pulmões. O excesso de neutrófilos sobrecarregam os inibidores

de proteases que conduzem ao desenvolvimento do enfisema. A fumaça do cigarro também ativa o epitélio das vias aéreas para acionar o remodelamento pulmonar (8, 46).

Várias enzimas da MEC ou produzidas por células inflamatórias são capazes de causar a proteólise, como as MMPs. Geralmente essas enzimas estão aumentadas em várias patologias pulmonares, como a DPOC e possuem a capacidade de degradar o colágeno e a elastina. No caso do enfisema pulmonar podemos citar três MMPs relacionadas a essa patologia: MMP-2, MMP-9 e MMP-12. A fumaça do cigarro ativa macrófagos alveolares, que expressam as MMP-9 e MMP-12 que podem decompor a elastina em fragmentos. Esses fragmentos são quimiotáticos para monócitos e fibroblastos, aumentando o processo inflamatório levando a destruição do parênquima pulmonar. Isso cria uma retroalimentação positiva que resultará na destruição contínua do parênquima pulmonar (45).

Podemos citar três inibidores da MMPs: TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 (Figura 2). O tabagismo induz a inflamação e o aumento da liberação de proteases, que são neutralizadas pelas antiproteases, necessário para prevenir a destruição do parênquima. Mas em pacientes fumantes que desenvolvem a DPOC, não ocorre a produção adequada das antiproteases necessárias para inibir as proteases, ocasionando então a destruição do tecido alveolar. Um dos fatores que podem explicar a ocorrência de DPOC em somente 10 a 15% dos fumantes deve-se provavelmente ao polimorfismo genético (1).

1.1.3.2 Estresse oxidativo

Os radicais livres de oxigênio (ânios superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxilia) podem ser formados após ativação de várias células inflamatórias, por exemplo, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e neutrófilos. Quando as células das vias aéreas e os tecidos são expostos a poluentes ambientais, ao tabaco, infecções ou mesmo em situações nas quais os sistemas antioxidantes do organismo estão diminuídos, ocorre o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), que são responsáveis por vários efeitos deletérios nas vias aéreas, induzindo diversas condições patológicas (47).

Com a ação prolongada do uso do tabaco, juntamente com o estresse oxidativo levam ao desequilíbrio das substâncias protetoras e agressoras no ácido pulmonar. As ROS, derivadas do estresse oxidativo da fumaça do cigarro, promovem ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e da proteína ativadora1 (AP1), potencializando a resposta inflamatória nos pulmões dos pacientes com DPOC (48, 49). Estudos tem demonstrados aumento da expressão do NF- κ B associados à degradação do inibidor do NF- κ B (I- κ B) α nas células bronquiais de pacientes com DPOC (50, 51).

O estresse oxidativo tem um papel importante na patogênese da DPOC. Há um aumento da concentração de peróxido de hidrogênio no ar exalado de pacientes com DPOC, especialmente durante as exacerbações, onde observa-se aumento da concentração de 8-isoprostano na urina desses pacientes, que é um marcador do estresse oxidativo (52, 53). O estresse

oxidativo pode agravar a DPOC, através de vários mecanismos, como já citado pela ativação do NF- κ B, que está ligado aos genes TNF- α e IL-8 e outras células inflamatórias. E também pela deficiência das antiproteases, como α 1-antitripsina, aumentando assim a inflamação e a lesão proteolítica (40) (Figura 3).

A inflamação crônica juntamente com o estresse oxidativo, estão envolvidos em mecanismos geradores das manifestações sistêmicas, como a perda de peso e disfunção da musculatura esquelética, observadas em alguns pacientes com DPOC. Também pode-se observar nos pacientes com DPOC risco aumentado de patologias cardiovasculares, devido ao aumento do dano endotelial causado pelo estresse oxidativo e à inflamação sistêmica (54).

Figura 3 - Estresse Oxidativo: As espécies reativas de oxigênio a partir de fumo do cigarro ou a partir de células inflamatórias têm vários efeitos prejudiciais: incluindo redução de antiprotease; ativação do NF-κB resultando em aumento da secreção de citocinas IL-8 e TNF-α. O aumento da produção de isoprostanos que induz a broncoconstrição e extravasamento do plasma. Além disso, o estresse oxidativo também pode afetar a hipersecreção de muco. (Modificado de Barnes PJ, 2004) (27).

1.2 Tratamento

O primeiro passo para o tratamento da DPOC e controle da progressão da doença é o parar de fumar (3, 13, 55). Os tratamentos para essas patologias são direcionados para a diminuição da sintomatologia, melhora da qualidade de vida e prevenção das exacerbações (3). Os broncodilatadores são o tratamento central, melhorando modestamente a função pulmonar, reduzindo a

hiperinsuflação, o que melhora a dispneia, e diminui as exacerbações (56, 57). Ainda pode ser associado os corticoides para pacientes com exacerbações graves e frequentes, mas diferentemente da Asma, os corticoides não melhoram a função pulmonar nos pacientes com DPOC (3).

1.2.1 Farmacológico

De acordo com o GOLD 2013 o tratamento é guiado pela classificação dos pacientes em grupo A, B, C e D (Figura 1).

Pacientes do Grupo A: a escolha primária é a utilização broncodilatadores de curta duração (anticolinérgicos ou β_2 -agonista de curta duração). Como segunda escolha, usa-se a combinação broncodilatadores de curta duração (anticolinérgicos curta duração e β_2 -agonista de curta duração) ou a combinação broncodilatadores de longa duração (anticolinérgicos longa duração ou β_2 -agonista de longa duração). A teofilina poderá ser utilizada nesse grupo também.

Pacientes do Grupo B: O tratamento desse grupo é semelhante ao do Grupo A, sendo que caso o paciente possua dispneia grave. Esses pacientes poderão ser tratados com a combinação de broncodilatadores de curta duração (anticolinérgicos curta duração e/ou β_2 -agonista de curta duração) associado a teofilina.

Pacientes do Grupo C: Esses pacientes necessitam de um tratamento fixo de inalações com corticoides e a utilização de medicamentos anticolinérgicos de longa duração ou β_2 -agonista de longa duração. E como

segunda escolha, a combinação de broncodilatadores de curta duração (anticolinérgicos curta duração e/ou β_2 -agonista de curta duração) associado a teofilina. O inibidor de fosfodiesterase-4 poderá ser associado.

Pacientes do Grupo D: Como no Grupo C, esses paciente necessitam de um tratamento fixo de inalações com corticoides e a utilização de medicamentos anticolinérgicos de longa duração ou β_2 -agonista de longa duração. A diferença desse grupo está na escolha da segunda proposta medicamentosa: a) inalações com corticoides e a utilização de medicamentos anticolinérgicos de longa duração; b) utilização inalações com corticoides mais os β_2 -agonista de longa duração e anticolinérgicos de longa duração; c) utilização inalações com corticoides mais os β_2 -agonista de longa duração e inibidores fosfodiesterase-4; d) utilização dos β_2 -agonista de longa duração e os anticolinérgicos de longa duração juntamente com os inibidores fosfodiesterase-4. Outro tratamento alternativo é a utilização de broncodilatadores de curta duração (anticolinérgicos de curta duração e β_2 -agonista de curta duração) juntamente com a teofilina e carbocisteína.

1.2.2 Não farmacológico

A reabilitação pulmonar é uma terapêutica importante não farmacológica em pacientes com DPOC. Um programa de reabilitação consiste, a partir da avaliação do paciente, de treinamento físico, educação, intervenção nutricional e apoio psicossocial (3). Vários estudos têm demonstrado que um programa de reabilitação pulmonar tem impactos positivos sobre a saúde do paciente relacionados á qualidade de vida, diminuição dos sintomas,

melhora da resistência as atividades de vida diária (AVDs) e redução do número de dias de hospitalização (58, 59).

Outro tratamento não farmacológico importante é a oxigenoterapia. O uso de oxigênio suplementar está estabelecido para aumentar a sobrevida e é indicado para pacientes com PaO_2 inferior a 55 mmHg, com o objetivo de manter uma saturação de oxigênio maior de 90% durante o repouso, no esforço e durante o sono (3).

1.3 Sistema colinérgico

O sistema nervoso colinérgico está envolvido em diversas funções fisiológicas do organismo. A inervação colinérgica do pulmão se dá principalmente pelos nervos parassimpáticos que atingem este órgão via nervo vago e tem sua atuação predominantemente em vias aéreas proximais, uma vez que ocorre redução destes nervos no decorrer da árvore traqueobrônquica (60, 61). O nervo vago surge no tronco cerebral e se dirigem até os pulmões através de suas fibras, fazendo sinapses com os gânglios embutidos ou expressos na parede da via aérea, traqueias e brônquios para dar origem a fibras pós-ganglionares e inervar as glândulas submucosas, vasos sanguíneos e músculo liso das vias aéreas (62) (Figura 4). A via descendente vagal é formada por fibras não mielinizadas que inervam a laringe, traqueia, a porção condutora dos brônquios, e também glândulas e a musculatura lisa das vias aéreas (63, 64). O seu principal neurotransmissor é a acetilcolina (ACh).

Figura 4 - Inervação parassimpática no pulmão. (Modificado de Gwilt et al., 2007) (62).

A estimulação nervosa parassimpática induz a liberação de ACh que, por sua vez, induz a contração da musculatura lisa traqueobrônquica (65) e aumento da secreção de muco (66). A inervação simpática, na qual a ACh atua como neurotransmissor pré-ganglionar, libera nos receptores adrenérgicos, adrenalina e noradrenalina, que levam a broncodilatação (67).

A ACh é um éster de ácido acético e colina, que possui um papel crucial no controle das funções fisiológicas do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (68). A Colina-O-acetil-Transferase (ChAT) é a enzima responsável pela síntese da ACh a partir do substrato de acetil-CoA e colina (69). Uma vez sintetizada, a ACh é transportada para o interior das vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) e posteriormente as vesículas liberam, por exocitose, ACh na fenda sináptica (70,

71). Após ser liberada, a ACh interage com receptores colinérgicos (muscarínicos e nicotínicos) presentes na membrana pós- sináptica (62, 68, 72, 73). A ação da ACh cessa, quando essa é hidrolisada em acetato e colina pela enzima acetilcolinesterase (AChE), presente na fenda sináptica (74). A colina retorna ao terminal nervoso através do transportador de colina de alta afinidade (CHT1) e um novo ciclo da síntese da ACh reinicia (Figura 5).

Segundo Lima et al. (12), o VAcHT é um dos componentes do sistema colinérgico mais importante para o controle da liberação da ACh e quando inibido, altera a liberação da ACh na fenda sináptica comprometendo sua interação com os receptores muscarínicos e nicotínicos.

O sistema colinérgico tem uma importante participação na fisiopatologia das doenças pulmonares, através da detecção dos seus componentes, como a ACh, CHT1, acetiltransferase (ChAT), VAcHT, AChE e receptores da acetilcolina em células das vias aéreas (75, 76).

Figura 5 - Síntese da ACh: (1) A colina (Ch) é recaptada pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1) para síntese de novas moléculas de ACh. (2) No citoplasma das terminações nervosas, a ACh é sintetizada pela enzima ChAT, e, em seguida, é carregado em vesículas sinápticas (3) por VACHT. (4) Após a chegada do impulso nervoso, as vesículas migram até a membrana plasmática e libertaram o neurotransmissor, que pode, em seguida, ligar-se aos receptores nicotínicos (N) e muscarínicos (M) (5). ACh é rapidamente degradada em acetato e colina (6) pela ação enzimática da AChE. (Adaptado de Prado et al. 2013).(77).

1.3.1 Receptores muscarínicos

Os receptores muscarínicos (M) são amplamente distribuídos por diversos sistemas biológicos, onde participam de várias funções vitais. Segundo Gosen et al. (78), a ACh age como um potente broncoconstritor ao se ligar aos receptores muscarínicos, o que explica a utilização dos anticolinérgicos como broncodilatadores, principalmente os antagonistas muscarínicos, no tratamento das doenças respiratórias.

Os receptores muscarínicos pertencem à família de receptores acoplados a proteína G. Cinco diferentes subtipos foram identificados M1-M5, dos quais três exercem efeitos fisiológicos nas vias aéreas M1, M2 e M3 (79). Os receptores M2 e M3 estão expressos na musculatura lisa na proporção de 4:1, sendo que os receptores M3 é o subtipo mais envolvido na contração da musculatura brônquica e traqueal, hipersecreção brônquica e em células inflamatórias (80). A hipersecreção de muco é uma característica patológica visto na DPOC, o que contribui para a limitação do fluxo aéreo (81).

Profita et al. (82) investigaram a expressão dos receptores M1, M2 e M3 no escarro de pessoas saudáveis, fumantes e em pacientes portadores de DPOC. Foram observados os três tipos de receptores em macrófagos e neutrófilos, sendo que o subtipo M3 esteve aumentado significativamente nos macrófagos de pacientes com DPOC.

A ACh, o principal neurotransmissor parassimpático das vias respiratórias, possui um papel importante na DPOC, através da regulação da broncoconstrição e da hipersecreção com o uso dos anticolinérgicos. No entanto, os mecanismos pelos quais os receptores muscarínicos regulam as respostas inflamatórias, com o uso dos anticolinérgicos, ainda não estão totalmente esclarecidos (83). O efeito mais importante parece ocorrer com o bloqueio dos receptores M2 e M3, através dos anticolinérgicos de curta e longa duração (9). De acordo com o Gold (3) o uso de anticolinérgicos inalatórios resultam na melhora da dispneia, qualidade de vida e diminuição das exacerbações. Se os anticolinérgicos muscarínicos são similares ou melhores que os β adrenérgicos para o tratamento da broncodilatação nos DPOCs em pacientes idosos,

geralmente são sutis. Apesar de muitos trabalhos usarem a espirometria como parâmetro para demonstrar a eficácia medicamentosa, mas para o paciente o mais importante é a mudança da sintomatologia, controle das exacerbações e melhora na tolerância ao exercício (84).

1.3.2 Receptores nicotínicos

Os receptores nicotínicos (nAChR) se encontram em diversos tecidos e leucócitos. É um canal iônico que modela a neurotransmissão em junções neuromusculares, gânglios autônomos e em algumas regiões do sistema nervoso central, e a sua ativação é responsável pela potencialização das funções cognitivas, estimulação psicomotora e analgesia (85). Eles estão localizados tanto pré quanto pós-sinapticamente e a sua ativação pela ACh gera a abertura do canal permitindo a entrada de íons de sódio e cálcio e consequente a saída de íons de potássio (86, 87).

Os nAChRs, como a maioria dos canais iônicos, são compostos de cinco subunidades, arranjadas em α/β heteroméricas ou em α homéricas, reunidas em torno de um canal iônico central, mediando o influxo de cálcio (88). O epitélio das vias aéreas expressa $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 2$ e $\beta 4$ (89). Nas vias aéreas, os receptores nicotínicos são encontrados em células nervosas, células epiteliais, macrófagos alveolares e linfócitos T (90). Devido às várias descobertas de novas unidades e subunidades dos nAChRs expressos em células das vias aéreas e no tecido pulmonar, as suas funções são bastante complexas, como podemos observar na Tabela 3.

Tabela 3 - Subunidades nicotínicas e suas funções (Adaptado Racké et al., 2004) (91)

Evidência direta	Subunidades	Função
Células epiteliais brônquicas	$\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 2$, $\alpha 4$	Liberação de cálcio
Células epiteliais Alveolares	$\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$	?
Glândulas submucosas	$\alpha 7$	?
Musculatura lisa das vias aéreas	$\alpha 7$	Inibição de contração
Células endoteliais	$\alpha 7$	?
Fibroblastos	$\alpha 7$	Ativação do fator de crescimento e síntese de colágeno
Macrófagos alveolares	$\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 2$	Inibição da liberação do TNF- α

1.3.3 Sistema colinérgico anti-inflamatório

Diversos estudos demonstraram a expressão e a função do sistema colinérgico anti-inflamatório nos últimos anos (73). A detecção de componentes do sistema colinérgico, tais como a acetilcolina, o ChT1, a AChE, o VACHT e receptores de acetilcolina em células inflamatórias de vias aéreas sugerem uma importante participação do sistema colinérgico na fisiopatologia das doenças pulmonares (75, 76).

Neste sentido, foi detectado (92) a presença de componentes do sistema colinérgico nas células epiteliais de vias aéreas proximais de humanos

e receptores muscarínicos também foram observados nas células epiteliais de vias aéreas e alveolares de diferentes espécies (60, 92, 93). Até o momento, as células que expressam componentes do sistema colinérgico reconhecidas no pulmão são os mastócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (94, 95). Como tanto as células inflamatórias quanto as células epiteliais são importantes na fisiopatologia de várias doenças pulmonares, como a asma e a DPOC, o sistema colinérgico anti-inflamatório pode representar um possível mecanismo regulador da inflamação nestas patologias.

A inflamação é uma resposta que o organismo dispõe para localizar, neutralizar e eliminar um agente agressor, assim como reparar os danos causados e promover a homeostase. A inflamação pode ocorrer em qualquer órgão ou tecido o que desencadeia a cascata inflamatória, que se inicia primeiramente localizada e regulada (72). Frente a uma agressão, seja ela causada por agentes agressores, trauma, infecção, isquemia ou hipersensibilidade imunológica, dá-se o início da cascata inflamatória, com a liberação de mediadores pró-inflamatória como citocinas TNF- α , IL, moléculas de adesão, mediadores vasoativos e espécies reativas de oxigênio (96). Esses mediadores promovem a vasodilatação e a migração de células inflamatórias como neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilo que podem corroborar para eliminação ou erradicação dos agentes patogénicos e possibilitar a resolução do processo inflamatório (97). Puerta et al. (98) descreveram que a regulação da resposta inflamatória e a sua auto regulação é atingida por uma série de mecanismos neuro-imuno-inata. No entanto, o restabelecimento da homeostasia pode não ser atingido, devido a uma quantidade excessiva de

mediadores pró-inflamatórios na circulação resultando numa inflamação sistêmica, falha do sistema e até a morte (97).

Foi em 2000 que Borovikova et al. (99), descreveram pela primeira vez o arco reflexo da inflamação com a descoberta da via colinérgica anti-inflamatória. O sistema colinérgico anti-inflamatório é um mecanismo neural que suprime a resposta inflamatória inata e controla a inflamação por inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . A interação do sistema nervoso e imunológico na tentativa de regular a inflamação através das fibras sensitivas do nervo vago, iniciam o arco reflexo aferente da inflamação devido a estímulos provenientes de mediadores químicos liberados no foco inflamatório. Estes estímulos são transmitidos, via fibras aferentes vagais, ao núcleo do trato solitário que juntamente com outras estruturas centrais ativam os neurônios vagais eferentes (100) (Figura 6). Esse é o arco reflexo melhor descrito, onde por meio da estimulação direta do nervo vago, libera seu principal neurotransmissor, a ACh, que interage com os receptores nicotínicos α -7 (α 7nAChR) expressos principalmente em macrófagos para suprimir a liberação de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatória na tentativa de controlar a resposta inflamatória (100, 101).

Embora o sistema colinérgico tenha sido pouco explorado no pulmão e em situações de doenças respiratórias, dados da literatura sugerem seu efeito em outras situações patológicas. Neste sentido, Westerloo et al. (102) mostraram que a vagotomia induziu um aumento das células totais e de citocinas pró-inflamatórias no lavado peritoneal de animais com sepse. Corroborando a importância do sistema colinérgico, Hofer et al. (103)

demonstraram que a administração de fisostigmina (inibidor de colinesterase) aumentou a sobrevivência de camundongos após indução de sepse experimental. Mais recente, em 2011 Boland et al. (104), estudaram síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) provocada por peritonite séptica e ao estimularem eletricamente o nervo vago, observaram um aumento na liberação de ACh, que consequentemente reduziu a lesão pulmonar e aumentou a sobrevivência dos animais.

Figura 6 - Arco reflexo da inflamação (Adaptado de Tracey KJ, 2002) (100).

Wessler et al. (102) observaram uma redução significativa do conteúdo de ACh tanto em vias aéreas quanto em parênquima pulmonar de pacientes portadores de fibrose cística comparativamente aos controles. Por outro lado, o aumento dos níveis teciduais de ACh pode induzir a vasodilatação com

aumento da secreção mucosa e constrição das fibras musculares lisas das vias aéreas, além de ativar as células do sistema imune (76).

Utilizando ratos e camundongos com inflamação alérgica aguda de vias aéreas, Lips et al. (103) demonstraram que houve redução da ChAT, CHT1, VACHT no pulmão dos animais sensibilizados e desafiados com alérgeno, sugerindo que há uma redução na atividade do sistema colinérgico anti-inflamatório nestes animais, o que poderia contribuir para o dano epitelial e as disfunções das células ciliadas observadas na asma brônquica.

Os macrófagos alveolares expressam ChAT e por isso tem a capacidade de produzir acetilcolina (76, 104), o que pode suprimir a resposta inflamatória observada na DPOC, atenuando mediadores pró-inflamatórios liberados via ativação destas células (62, 94). Considerando os eosinófilos que estão aumentados na fase de exacerbação, embora os efeitos diretos da acetilcolina nestas células não tenham sido ainda bem descritos, sabe-se que um agonista nicotínico inibe a liberação de MMP-9 secretados por eosinófilos de sangue periférico de humanos induzidos por fator de ativador plaquetária (PAF) (105). Além disso, assim como os neurônios, os linfócitos B e T expressam VACHT e estocam acetilcolina em suas vesículas (106).

Os receptores nicotínicos, expressados nas células inflamatórias, exercem efeitos anti-inflamatório potentes, onde o subtipo desses receptores, o $\alpha 7$ parece ter uma papel central, podendo representar um alvo importante para o tratamento de patologias pulmonares. As citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , MIP-2, IL-6, através do arco reflexo inflamatório, estimulam o nervo vago a liberar a ACh que interage com o $\alpha 7$ nAChR e inibe a translocação do

NF- κ B para o núcleo, inibindo a cascata inflamatória. A ativação do $\alpha 7$ recruta tirosina quinase (JAK2) que promove a fosforilação e ativação de fator de transcrição (STAT3), essa via JAK2/STAT3 induz a expressão de citocinas anti-inflamatórias (97) (Figura 7). Também se observa um aumento da proteína anti-inflamatória (SOCS-3) com a ativação do STAT3, em células epiteliais no cólon de patologias intestinais (107) e na artrite reumatoide em modelos experimentais. (108). Yoshimura, 2009 (109) relata que em situações patológicas, a SOCS-3 pode suprimir reações inflamatórias em que citocinas IL-6 estejam relacionadas. A ativação do STAT3 seguida pela expressão de SOCS-3 sugere que a SOCS-3 faça parte da retroalimentação negativa do STAT3.

O papel do $\alpha 7$ nAChR, nas vias aéreas da musculatura lisa e no remodelamento na asma e na DPOC, até o momento é desconhecido (110). Acreditamos da necessidade de novos estudos para definir as bases fisiológicas na tentativa de atenuar as divergências entre os receptores nicotínicos e muscarínicos.

Figura 7 - Hipóteses dos mecanismos envolvidos na resposta colinérgica anti-inflamatória: Durante a injúria tecidual, as fibras sensitivas do nervo vago iniciam o arco reflexo aferente da inflamação devido a estímulos provenientes de mediadores químicos liberados no foco inflamatório, ativando o tronco cerebral. Em seguida os neurônios vagais eferentes liberam ACh que ao ativar o $\alpha 7nAChR$ inibe a translocação de NF- κ B para o núcleo e consequentemente a produção de citocinas pró-inflamatórias. A ativação do $\alpha 7nAChR$ atua sobre via JAK2/STAT3, que desempenha um papel na sinalização de citocinas anti-inflamatórias, como SOCS-3, que levam à inibição da ativação das células imunes e de supressão de TNF, a síntese da proteína inflamatória-2 (MIP-2) e IL-6 de macrófagos. (Modificado de Puerta e Pavlov, 2007) (91).

1.3.4 Modelos experimentais de DPOC

Na literatura vários modelos que tem sido utilizado para tentar reproduzir o enfisema, com suas vantagens e desvantagens. Mas nenhum modelo ainda foi capaz de reproduzir as alterações exatas observadas no ser humano, devido à complexidade da fisiopatologia da DPOC, pelas exacerbações agudas e porque essa patologia se desenvolve no ser humano ao longo de décadas (110). Atualmente os modelos mais utilizados em animais para induzir o enfisema são: instilação de proteases; inalação de gases tóxicos (como a fumaça de cigarro e poluentes da atmosfera) e animais geneticamente modificados.

Em 1964 Gross et al. (111) conseguiram reproduzir pela primeira vez o enfisema, através da instilação intratraqueal de papaína, enzima proteolítica que resulta em alterações morfo-histológicas e fisiológicas dos pulmões, semelhante a encontrada nos pulmões de seres humanos. Com um único desafio intratraqueal de proteinase, com a elastase neutrofílica de humanos, a elastase pancreática porcina (PPE) ou a papaína, observa-se a degradação do tecido pulmonar levando a um quadro de enfisema pulmonar (112). Com a administração de PPE, observa-se a metaplasia de células secretoras, anormalidades da função pulmonar e hipertrofia ventricular direita que são características na DPOC humana (42). O alargamento do espaço aéreo desenvolve-se imediatamente após a lesão elastolíticas seguido da inflamação. A progressão do enfisema nos meses seguintes ocorre provavelmente pelo efeito destrutivo das proteases inflamatórias (112).

Vários outros agentes também têm sido utilizados na tentativa de recriar a inflamação e a lesão pulmonar, como por exemplo, a utilização da fumaça do cigarro. Esse modelo é o que mais se aproxima da patologia pulmonar, uma vez que o tabaco é a principal causa do desenvolvimento do enfisema humano (42). Em 1990, Wright et al. (113) utilizaram pela primeira vez esse modelo de enfisema pulmonar em cobaias. Eles puderam observar o surgimento progressivo de um enfisema com alterações da função pulmonares e alargamento dos espaços aéreo, semelhante às observadas em indivíduos fumantes que desenvolvem a DPOC.

Após as cobaias, outros animais foram utilizados nesse modelo de enfisema pulmonar, como coelhos, cachorros, ratos e camundongos. Os camundongos C57BL/6 têm sido os animais de preferencia para esses estudos, apesar destes serem mais resistente ao desenvolvimento do enfisema que as cobaias (42). Esses animais tem essa preferência, devido ao baixo custo em seu desenvolvimento em comparação com outro tipo de animal, disponibilidade de anticorpos para estudo das citocinas, possibilidade de serem desenvolvidas linhagens de camundongos com diferentes reações ao fumo e devido à facilidade de manipulação da expressão dos genes nestes animais (110). Apesar de tudo isso, deve-se ter o cuidado na transposição dos resultados obtidos com esses animais para a patologia humana, uma vez que existem grandes diferenças na anatomia do aparelho respiratório entre eles. Nos camundongos diferentemente dos seres humanos, a maioria das suas células epiteliais são de natureza olfativas, possuem um epitélio respiratório menos ciliado, menos células Clara e uma diminuição das glândulas

submucosa ao longo da traqueia. Essa diminuição do epitélio ciliado pode vir a interferir na filtração dos produtos proveniente da fumaça de cigarro (114).

Com a primeira exposição de fumaça de cigarro, observa-se nos camundongos um recrutamento de neutrófilos, aumento gradual de macrófagos e um aumento de substâncias proveniente da degradação de colágeno e elastina. Já em resposta a uma exposição de 2 meses, observa-se uma perda de células epiteliais ciliadas e infiltração de células inflamatórias (linfócitos, macrófagos e neutrófilos). Também se acredita que uma exposição à fumaça de cigarro superior a 6 meses, as vias aéreas de pequeno calibre, são obstruídas por células inflamatórias, o que contribui para a restrição ao fluxo aéreo observada na DPOC (114).

Importante ressaltar que apesar do modelo de enfisema pulmonar induzido pela fumaça do cigarro se aproximar mais do enfisematoso, esse modelo leva mais tempo para apresentar resultados, quando comparados aos modelos de enfisema pulmonar induzido por substâncias elastolíticas. Mas o mais importante, é que com esse tipo de protocolo, a patologia que se consegue desenvolver é leve, o que deve equivale no ser humano aos estágios 1 e 2. Nos seres humanos, a maioria de morbidade e mortalidade dos pacientes ocorrem nos estágios 3 e 4 da doença, mas essas fases não podem serem reproduzidas apenas com a exposição à fumaça (110).

Estudos recentes no desenvolvimento de modelos de enfisema pulmonar têm usado camundongos geneticamente modificados, produzindo animais com aumentam ou diminuição da expressão de algum gene em particular (110). A combinação desses animais com protocolos de inalação de

substâncias tóxicas e/ou com a instilação de PPE pode corroborar com a identificação de mediadores anti-inflamatórios e pró-inflamatórios desta patologia (42). Possivelmente nos facilite a responder algumas perguntas, que serão extremamente úteis para o desenvolvimento do tratamento para a DPOC. Como no caso de apenas 10 a 15% dos fumantes desenvolvam a DPOC, possivelmente decorrente de uma suscetibilidade genética a essa doença (115).

Em nosso laboratório, utiliza-se o modelo de instilação de papaína e de PPE em camundongos que em um curto espaço de tempo possibilita a representação de mudanças no pulmão desses animais que facilitam o estudo de mediadores. Neste modelo, uma dose de instilação intranasal de PPE induz o desenvolvimento do enfisema pulmonar e alterações morfometrias em comparação as alterações funcionais, medido pela mecânica respiratória (116).

1.4 Justificativa do estudo

Drogas anticolinérgicas (brometo de ipatrópio e brometo de tiotrópio) são classificadas como broncodilatadores e são comumente prescritos para o tratamento clínico do paciente com DPOC (117). No entanto, como antagonista de receptores muscarínicos, estas drogas podem modificar os efeitos inflamatórios da acetilcolina. Um exemplo disso é que os anticolinérgicos tendem a inibir a liberação de citocinas pró- inflamatórias pelas células epiteliais, mediada pela acetilcolina, o que pode reduzir a inflamação e limitar o recrutamento de células inflamatórias para o pulmão (62). Por outro lado, os

efeitos locais da acetilcolina na estimulação dos receptores nicotínicos parecem ter efeito anti-inflamatório e pouco foi estudado em relação ao pulmão.

Assim, a acetilcolina não pode ser considerada exclusivamente como um neurotransmissor do sistema nervoso parassimpático, mas sim reconhecida como um componente integral da defesa e regulador da inflamação pulmonar. Considerando que a descrição da presença do sistema colinérgico anti-inflamatório é recente, pouco se sabe da participação deste sistema em situações fisiopatológicas no pulmão. Desta forma, o melhor entendimento deste sistema no curso de doenças pulmonares, em particular do enfisema pulmonar, é de extrema relevância para permitir novos diagnósticos, protocolos terapêuticos e preventivos que modulem este sistema.

A importância fisiopatológica do sistema colinérgico anti-inflamatório tem sido recentemente descrita em outros modelos experimentais de doenças cerebrovasculares e musculares, entre outros. Consideramos, portanto de relevância esclarecer os múltiplos papéis biológicos da ACh, identificando a repercussão morfofuncional da diminuição de sua liberação sistêmica particularmente em doenças pulmonares.

Por fim, a DPOC por ser uma patologia com alto índice de mortalidade, necessita de novos estudos na tentativa da compreensão dos mecanismos envolvidos, possibilitando o desenvolvimento de novas moléculas para o seu tratamento.

2. Objetivo

O objetivo geral deste projeto foi avaliar se os efeitos da hipofunção colinérgica, por redução da expressão do transportador vesicular de acetilcolina, interferem com as alterações pulmonares observadas em modelo experimental de enfisema pulmonar induzida pela PPE em camundongos.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar se a redução da expressão do transportador vesicular de acetilcolina modula as alterações funcionais do sistema respiratório induzidas por PPE;
2. Avaliar se a redução da expressão do transportador vesicular de acetilcolina afeta a resposta inflamatória pulmonar e o remodelamento induzida por instilação de PPE;

3. Materiais e Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesp) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo número 0766/08. Os animais foram manejados de acordo com o “Guia de cuidados e uso de animais de laboratório” (NIH publication 85-23, revisado em 1985), e foram mantidos num ciclo de 12 horas de luz/escuro, em uma sala com temperatura controlada de 21 a 23°C, com livre acesso a água e comida.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Terapêutica Experimental I (LIM-20) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Morfologia Laboratório 22 do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema.

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos de fundo mixto das linhagens C5BL/6, modificados para uma menor expressão (Knockdown) da proteína transportadora vesicular de acetilcolina KD-(VACHT). Estes animais foram retrocruzados por três gerações e foram gerados pela segmentação 5 UTR do gene VACHT por recombinação homóloga em fundo misto. Foram desenvolvidos e procriados pelo grupo do Professor Marco Antônio M. Prado da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e a partir deste estudo, os animais tem sido procriados no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em heterozigose e acasalados para gerar animais homozigotos e selvagens. Para este estudo, posteriormente estes foram submetidos à genotipagem para sua identificação (118). Os animais homozigotos apresentam redução da expressão de ACh de aproximadamente 70%, o que induz a redução da liberação de ACh na fenda sináptica nesta mesma ordem (77).

3.2 Grupos experimentais

Foram utilizados no presente estudo 36 camundongos dos grupos mutantes (VACHT KD^{HOM}) e selvagem do sexo masculino, com idade de 6 a 8 semanas e separados de acordo com os resultados da genotipagem nos seguintes grupos:

- A. Animais mutantes submetidos ao protocolo de elastase (VACHT KD^{HOM} PPE, n=11);
- B. Animais selvagens submetidos ao protocolo de elastase (WT-PPE, n=09);
- C. Animais mutantes submetidos ao protocolo de solução salina (VACHT KD^{HOMO}-SAL, n=08);
- D. Animais selvagens submetidos ao protocolo de solução salina (WT-SAL, n=08).

3.3 Indução da elastase

A fim de induzir o enfisema, os animais foram anestesiados com xilazina (5mg/kg) e ketamina (40mg/kg) e em seguida, receberam uma instilação nasal de 50µl de solução de PPE (Elastase Tipo I/ E-1250, Sigma Aldric) (0,667 IU). O grupo controle recebeu a instilação nasal de solução salina no mesmo volume. Todos os animais foram avaliados após 28 dias da instilação de elastase ou solução salina.

3.4 Avaliação da mecânica do sistema respiratório

Após 28 dias do protocolo de elastase ou solução salina, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de Tiopental (70mg/kg), pesados, traqueostomizados e conectados a um respirador para pequenos animais (Flexivent, Scireq, Montreal, CA), com volume corrente de 10ml/kg e 150ciclos/min. Os dados de oscilação forçada foram obtidos após os animais serem paralisados com uma injeção de brometo de pancrônio (0,2mg/kg).

Para o cálculo dos dados foram feitas correções, considerando as perdas devido à compressibilidade dos gases (119) V_{cyl} será corrigido a fim de obter o volume que efetivamente chegará ao animal (V) e P_{cyl} será corrigido, nos dando o valor de P_{ao} , pressão de abertura das vias aéreas. Através da derivação no tempo de V , obteremos o fluxo (V'). E para análise das impedâncias, foi utilizado o modelo de fase constante, descrito por Hantos (120).

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

Onde R_{aw} é a resistência de vias aéreas, I_{aw} é a inertância, G_{tis} caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares, H_{tis} a energia acumulada no tecido do pulmão, i é a unidade imaginária, f é a frequência e

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

Esse modelo fase-constante considera o sistema pulmonar de forma multicompartimental, permitindo a obtenção de dados de diferentes compartimentos do pulmão: resistência das vias aéreas (R_{aw}) onde podemos analisar as vias aéreas sem a interferência tecidual; resistência tecidual (G_{tis}) e elastância do tecido (H_{tis}).

3.5 Lavado bronco alveolar (LBA)

Ao final da avaliação mecânica, os animais foram ensanguinados via secção da aorta abdominal e o LBA foi coletado (121), por meio da infusão de 0,5ml de solução salina por 3 vezes consecutivas (volume total de 1,5ml). O volume recuperado foi centrifugado a 1000 rpm, a 5°C/10min. Os sedimentos das células foi ressuspenso em 0,2ml de solução salina estéril. A contagem total de células foi realizada por microscopia ótica com auxílio de hemocítômetro de Neubauer no aumento de 400x.

Para a contagem do diferencial, 100µL do LBA foram citocentrifugados a 450 rpm/6min (Cytospin, Chehire, UK) e após seca as lâminas, estas foram coradas pela técnica de Diff-Quick (Biochemical Sciences INC, Swedesboro, NJ). Pelo menos 300 células foram contadas e os critérios hemocitológicos para diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos com auxílio de um microscópio óptico com objetiva de imersão (aumento de 1000x). Os resultados foram expressos em células por mL de LBA.

3.6 Estudo morfométrico

Após a coleta do LBA, a parede torácica anterior foi aberta, os pulmões foram removidos em bloco e fixados com formaldeído a 4% durante 24 horas a uma pressão constante de 20 cmH₂O. Os pulmões, em seguida, foram transferidos para uma solução de etanol a 70% e submetidos às técnicas habituais com parafina, para obtenção de cortes de 4µm de espessura.

Para morfometria convencional, foi utilizada a leitura cega, através de um retículo de 100 pontos e 50 retas, acoplado à ocular de um microscópio óptico convencional.

3.6.1 Medidas do intercepto linear médio (Lm)

O Lm é um índice do diâmetro dos espaços aéreos distais. Foram contados 15 campos por lâmina, com aumento de 200x, utilizando o retículo sobreposto ao parênquima pulmonar nas regiões distais. Foi contado o número de vezes que o intercepto cruzava a parede dos alvéolos (31, 70).

Foi feita a média dos quinze campos para cada lâmina e calculado o L_m através da seguinte equação:

$$L_m = \frac{2500 \mu m}{\text{média do número de vezes que o intercepto cruzou a parede dos alvéolos.}}$$

3.6.2 Avaliação do remodelamento de fibras de colágeno e das fibras elásticas no parênquima pulmonar e no eixo peribroncovascular

Para obtenção da medida das fibras de colágeno, foi realizada a coloração para a contagem das fibras colágenas no parênquima pulmonar usando Sirius-Red (Direct Red 80, C> I 35780, Aldrich, EUA). Os cortes foram desparafinados e levados à água. Foram corados por 1 hora no picro-sírius à temperatura ambiente e posteriormente lavada em água corrente por 5 minutos. Após esta etapa, os cortes foram corados pela Hematoxilina de Harris por 6 minutos e posteriormente lavados em água corrente por 10 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas (70).

Já para a obtenção das medidas das fibras elásticas, foi utilizado para sua coloração a Resorcina-Fucsina de Weigert Oxidada. Para tanto, os cortes foram desparafinados e hidratados em água. Sobre eles, foi gotejada uma solução aquosa de OXONA 10% e ficaram oxidando por 40 minutos. Foram então lavados em água corrente por 5 minutos e após foram submersos no álcool 70° e 95° (122).

O cálculo foi realizado através das medidas de fibras de colágeno e de elástica, por meio de um microscópio óptico com um auxílio de um retículo de 100 pontos e 50 retas contando o número de pontos que incidiram sobre as fibras de colágeno e elástico no parênquima pulmonar e no eixo peribroncovascular e também os pontos que incidiram no parênquima remanescente (123) e no eixo peribroncovascular.

Foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Proporção de fibras de colágeno ou elástica no parênquima remanescente} = \frac{\text{número de pontos que incidiram nas fibras de colágeno ou elástica}}{\text{número de pontos que incidiram no parênquima}}$$

Para a avaliação do parênquima pulmonar, as medições foram realizadas em 10-15 campos de cada pulmão de forma randomizada, com aumento de 400x e os resultados foram expressos em porcentagem. (116, 124). Para a avaliação do eixo peribroncovascular, o retículo foi acoplado entre a via aérea de pequeno calibre e seu vaso correspondente, e foram avaliados 10 campos por pulmão de cada animal. Os valores foram expressos em porcentagem.

3.6.3 Avaliação imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada pelo método Biotina-estreptavidina peroxidase para detecção de macrófagos e células positivas de NF- κ B no eixo peribroncovascular e no parênquima pulmonar. Para tanto, nos cortes foram utilizados os anticorpos primários Anti-Mouse Mac-2 (Cód.: CL 8942AP Cedarlane Lab. Ltda.) na titulação 1:10.000 e anti- NF- κ B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), na titulação de 1:300. A quantificação de macrófagos e NF- κ B foi realizada no parênquima pulmonar (Figura 8A) e no eixo peribroncovascular (Figura 8B) foi realizada de forma semelhante ao descrito no item anterior e a quantificação do número de células positivas deu-se pela razão entre o número de células em determinada área e o número de pontos que coincidiu com a área de septo alveolar, em um aumento de 1000x. Os resultados foram expressos como células por unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$). Foram analisados 10 campos no parênquima pulmonar e no eixo peribroncovascular por corte, selecionados de forma randômica.

Figura 8A E 8B - Fotomicrografias representativas para análise do parênquima pulmonar e eixo peribroncovascular respectivamente.

Para detecção do isoprostano, foi realizada a imuno-histoquímica com anticorpo Anti-8-epi-PGF2 α (Oxford Biomedical Research, Rochester Hills, MI, USA) na diluição de 1:500 (125). A análise foi realizada por meio de analisador de imagens (Image ProPlus 4.5.029 for Windows 98/NT/2000), onde a medida de densidade óptica é o método empregado para detecção das fibras. As imagens foram capturadas (aumento de 400x) por uma câmera modelo DFC420 (Leica, Wetzlar, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico trinocular DM2500 (Leica), e enviadas ao computador onde foram processadas pelo programa Qwin Plus (Leica). Após a captura das imagens, para cada coloração, um filtro de cores pré-montado com base em um número representativo de fotos de todos os grupos experimentais foi determinado. Este filtro foi aplicado em todas as leituras de todos os grupos experimentais. Manualmente a área positiva do parênquima e do eixo peribroncovascular foi determinada e os resultados foram expressos em porcentagem de área de fibras positivas em relação à área total de tecido no parênquima pulmonar ou no eixo peribroncovascular (70, 126).

O pesquisador que realizou as análises histopatológicas não tinha conhecimento do grupo experimental a que pertencia às lâminas.

3.7 Análise de citocinas no homogenato pulmonar

Em outro grupo de animais (5 por grupo), os animais foram anestesiados no dia 28 do protocolo experimental, ensanguinados da mesma forma descrita anteriormente e os pulmões foram imediatamente removidos e congelados para realizar a dosagem de citocinas em homogenato de pulmão.

por Bio Plex. Para tanto utilizamos o kit MILLIPLEX para marcação MCP-1, IL-6, INF- γ , MIP-2 e IL-10. Os pulmões foram macerados e a dosagem foi realizada no homogenato de pulmão de acordo com as instruções do fabricante. Os valores estão expressos por quantidade da citocina de interesse em pg por mg de proteína total. As amostras foram testadas em duplicada e uma curva padrão foi realizada em cada placa. Foram considerados somente valores que estavam dentro da curva.

3.8 Western blot para detecção de VACHT e M2 homogenato de pulmão

Foram utilizados os pulmões congelados a -70°C (os mesmo que foram utilizados para detecção de citocinas). Para tanto, os pulmões foram homogeneizados com um polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments modelo PT 10/35) em 1,5 mL de tampão a 100°C (1% g/mL SDS, 100 mM Trisma (pH 7,5), 10 mM EDTA, 100 mM pirofosfato de sódio tetra hidratado, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM ortovanadato de sódio). Depois de homogeneizado, uma fração das amostras foi colocada em um tubo para microcentrífuga e mantida em banho seco por aproximadamente 10 min a 96°C , e subsequentemente mantidas em gelo. Os extratos desses tecidos foram centrifugados a 12.000 rpm a 4°C por 40 min para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, parte do sobrenadante foi utilizada para determinação do conteúdo proteico por espectrofotometria com reagente Bradford (Biorad, CA, USA). O sobrenadante das amostras foi tratado com tampão de Laemmli (1970) contendo DTT 200 mM e aquecido em banho seco

a 96°C por 5 minutos. Estas amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 6 a 10%) no aparelho para minigel (Mini-Protean). Em cada gel foi utilizado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos.

A transferência das proteínas separadas no gel foi realizada eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de transferência semi-seca (Transblot SD Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad) por 90 minutos a 15 volts. Porém, no tampão, foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação desta com uma solução bloqueadora (leite desnatado 5% para anticorpos produzidos em camundongo ou coelho e gelatina 1,5% para anticorpos produzidos em cabras, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) a 4°C overnight. As membranas foram lavadas com solução basal por 30 min, e então, incubadas com anticorpo primário específico diluído em solução basal, acrescida de 3 % de leite desnatado para anticorpos produzidos em camundongo ou coelho, ou 1, 5 % de gelatina para anticorpos produzidos em cabras. As membranas foram mantidas assim a 4°C overnight ou 4 horas à temperatura ambiente e foram novamente lavadas, com solução basal, por 30 min. As membranas foram então, incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado à peroxidase. Para a revelação e posterior quantificação das proteínas, a membrana será incubada por 1 minuto em uma solução contendo: luminol (2,5 mM), ácido p-cumárico (450 uM); Tris pH 8,5 (100 uM), H₂O₂ (5,4 mM), podendo assim ser detectado em auto-radiografias, após a

exposição das membranas em filmes de raios-X. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica nas auto-radiografias reveladas, utilizando o programa Scion Image. Para análise utilizou-se a porcentagem de aumento em relação à média do grupo controle, depois que os valores de proteína já haviam sido corrigidos pelo conteúdo β -actina.

3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa Sigma Stat (SPSS Inc., Califórnia, EUA). Todos os dados passaram no teste de normalidade e foram avaliados por análise de variância de dois fatores (Two way ANOVA) (enfisema X deficiência colinérgica) seguidos pelo teste de Holm-Sidak. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM. O nível de significância foi ajustado para 5%.

4. *Resultados*

4.1 Efeitos da VACHT no Peso do animal

Observa-se na Figura 9 que os animais mutantes [(VACHT KD^{HOM}-SAL: 23,54 ± 0,79), (VACHT KD^{HOM}-PPE: 23,81 ± 0,71)] apresentaram uma redução no peso em relação aos grupos sem deficiência genética [(WT-SAL: 26,65 ± 0,75), (WT-PPE: 27,78 ± 0,68), (P <0,01)].

4.2 Efeitos da VACHT na avaliação da Mecânica Respiratória

Na Figura 10 pode-se observar os dados de mecânica pulmonar. Os animais submetidos ao protocolo de elastase [(WT-PPE: 43,92 ± 2,88), (VACHT KD^{HOM}-PPE: 45,43 ± 4,55)] apresentaram uma redução na elastância tecidual (Htis) (10A) quando comparados com os grupos salina [(WT-SAL: 50,19 ± 3,71), (VACHT KD^{HOM}-SAL: 59,11 ± 3,44), (P <0,05)]. Não houve diferença entre os grupos salinas e também não houve diferença significativa entre os grupos VACHT KD^{HOM}-PPE e WT-PPE.

Considerando o Gtis (Figura 10B) não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

4.3 Efeitos da deficiência de VACHT na destruição alveolar (Lm)

Na Figura 11A, observamos que o Lm está aumentado nos grupos submetidos ao protocolo de elastase [(WT-PPE: 79,39 ± 2,66), (VACHT KD^{HOM}-PPE: 79,76 ± 2,40)] em comparação com os grupos salina [(WT-SAL: 45,66 ± 3,01), (VACHT KD^{HOM}-SAL: 53,76 ± 3,25), (P<0,001 para todas as

comparações)]. Não houve efeito da deficiência colinérgica nesta resposta. Nas fotomicrografias representativas observa-se que o pulmão dos animais que receberam elastase apresenta aumento do espaço alveolar com áreas hiperinsufladas e com ruptura de tecido (setas, Figuras 11D e E) quando comparado ao pulmão de animais que receberam salina (B e C). Não houve interferência da modificação genética neste parâmetro.

Figura 9. - *Peso do animal.* Nesta figura está apresentado a média $\pm$ erro padrão do peso dos animais em g, dos quatro grupos estudados e que foram sacrificados após 28 dias da instilação de elastase ou salina. Nota-se que os animais mutantes apresentaram menor peso quando comparado aos selvagens * ($P < 0,01$).

Figura 10A - Efeito da deficiência de VAcHt na avaliação da mecânica respiratória - Htis. Podemos observar que os animais submetidos ao protocolo de elastase WT-PPE, VAcHt KD^{HOM}-PPE apresentaram uma redução na Htis em relação aos grupos salina WT-SAL, VAcHt KD^{HOM}-SAL: (P <0,05). Não houve diferença entre os grupos salinas. Não houve diferença entre os grupos HOM-PPE e WT-PPE.

Figura 10B - Efeito da deficiência de VAcHt na avaliação da mecânica respiratória - Gtis. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

Figura 11A - Efeito da deficiência de VAcHT na destruição alveolar (Lm): Observamos que o Lm está aumentado nos grupos submetidos ao protocolo de elastase WT-PPE (D), VAcHT KD^{HOM}-PPE (E) em comparação com os grupos salina WT-SAL (B), VAcHT KD^{HOM}-SAL (C) respectivamente * $P < 0,001$ para todas as comparações. Não houve efeito da deficiência colinérgica nesta resposta. Podemos observar nas fotomicrografias D e E, do pulmão dos animais que receberam elastase, apresentam aumento do espaço alveolar com áreas hiperinsufladas e com ruptura de tecido (setas).

4.4 Efeitos da VAcHT na inflamação pulmonar

4.4.1 No lavado bronco alveolar (LBA)

Na Figura 12 observa-se os valores de contagem diferencial de células quantificadas no LBA. O número de macrófagos (Figura 12A) [(WT-PPE: 21.049,45 $\pm$ 1.785,71), (VAcHT KD^{HOM}- PPE: 28.570,33 $\pm$ 2.766,40)], neutrófilos (Figura 12B) [(WT- PPE: 377,12 $\pm$ 143,24), (VAcHT KD^{HOM}- PPE: 973,94 $\pm$ 143,24)] e de linfócitos [(WT- PPE: 525,42 $\pm$ 173,69), (VAcHT KD^{HOM}- PPE: 933,50 $\pm$ 190,27)] (Figura 12C) foi maior nos animais submetidos ao protocolo de elastase em comparação com os grupos que receberam salina [macrófagos: (WT-SAL: 7.775,56 $\pm$ 2.525,37), (VAcHT KD^{HOM} -SAL: 10.509,17 $\pm$ 2.525,37)]; neutrófilos: (WT-SAL: 24,79 $\pm$ 167,97), (VAcHT KD^{HOM}-SAL: 160,48 $\pm$ 179,57), $P < 0,01$ para todas as comparações]. Não houve efeito significativo da deficiência colinérgica nos animais que receberam salina O número de eosinófilos neste modelo foi muito baixo e sem diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 12D).

Analisando os efeitos da deficiência colinérgica na resposta inflamatória, nota-se que os animais mutantes que receberam elastase (VAcHT KD^{HOM}-PPE) ainda tiveram maior número de macrófagos (A) e neutrófilos (B) em comparação com o grupo WT- PPE ($P < 0,05$).

Figura 12A. Efeito da deficiência de VACHT no LBA em relação aos macrófagos, neutrófilos e linfócitos. O número de macrófagos (Figura 12 A) WT-PPE, VACHT KD^{HOM}- PPE, neutrófilos (Figura 12B) WT- PPE, VACHT KD^{HOM}- PPE e linfócitos (Figura 12C) WT-PPE, VACHT KD^{HOM}- PPE foram maior nos animais submetidos ao protocolo de elastase em comparação com os grupos que receberam salina [macrófagos: (WT-SAL:), (VACHT KD^{HOM}-SAL)]; [neutrófilos: (WT-SAL), (VACHT KD^{HOM}-SAL), $P < 0,01$ para todas as comparações]. Podemos observar uma resposta colinérgica amplificada para neutrófilo nos grupos homozigotos quando comparados com o seu controle. Os animais do grupo VACHT KD^{HOM}- PPE ainda apresentaram maior número de linfócitos (Figura 11 C) (VACHT KD^{HOM}- PPE) em relação ao seu controle salina [(VACHT KD^{HOM}-SAL), ($P < 0,01$)]. O número de eosinófilos neste modelo não apresentou alteração significativa entre os grupos experimentais (Figura 12D).

4.4.2 Em macrófagos no tecido pulmonar

Na Figura 13A, podemos observar que número de macrófagos no parênquima distal foi maior nos animais submetidos ao protocolo de elastase [(WT-PPE: $4,87 \pm 0,51$), (VACHT KD^{HOM}- PPE: $7,6 \pm 0,44$)] em comparação com os grupos que receberam salina [(WT-SAL: $1,27 \pm 0,48$), (VACHT KD^{HOM}- SAL: $0,94 \pm 0,54$), $P < 0,001$ para ambas as comparações]. A deficiência

colinérgica amplificou o número de macrófagos nos animais VACHT KD^{HOM}-PPE em comparação com WT-PPE ($P < 0,001$). Não houve efeito da deficiência colinérgica nos animais que receberam salina. Estes achados estão representados nas fotomicrografias do pulmão de animais dos grupos WT-SAL (B), VACHT KD^{HOM}-SAL (C), WT-PPE (D), VACHT KD^{HOM}-PPE (E), onde notamos que há um aumento de macrófagos positivos (setas, Figura 12A) nos animais que receberam elastase e que esta resposta está amplificada nos animais mutantes que receberam este mesmo tratamento (E).

Ao avaliar o número de macrófagos no eixo peribroncovascular, observamos comportamento semelhante ao descrito acima na Figura 14A. O número de macrófagos no eixo peribroncovascular foi maior nos animais submetidos ao protocolo de elastase [(WT-PPE: $1,32 \pm 0,24$), (VACHT KD^{HOM}-PPE: $2,31 \pm 0,21$)] em comparação com os animais dos grupos salina [(WT-SAL: $0,18 \pm 0,23$), (VACHT KD^{HOM}-SAL: $0,24 \pm 0,55$), $P < 0,01$ para ambas as comparações]. Ainda, a deficiência colinérgica aumentou o número de macrófagos no eixo peribroncovascular nos animais VACHT KD^{HOM}-PPE em comparação com WT-PPE ($P < 0,01$). Não observamos diferença do número de macrófagos entre os grupos experimentais que receberam salina. Na figura 14A, observam-se as fotomicrografias representativas (D e E) mostrando infiltrado macrofágico na região do eixo peribroncovascular, com aumento no número de células nos animais submetidos ao protocolo de elastase (setas).

Figura 13A - Efeito da deficiência de VACHT macrófagos no parênquima pulmonar. Podemos observar nas fotomicrografias D e E (setas) que o número de células macrófagos no tecido pulmonar foi maior nos animais submetidos ao protocolo de elastase WT-PPE, VACHT KD^{HOM}-PPE em comparação com os grupos salinas (fotomicrografias B e C) WT-SAL, VACHT KD^{HOM}-SAL. Também observamos na fotomicrografias E que a deficiência colinérgica aumentou o número em VACHT KD^{HOM}-PPE em comparação com WT-PPE (fotomicrografias D) com * $P < 0,001$ comparado ao salina e ** $P < 0,001$ comparado ao WT PPE.

Figura 14A - Efeito da deficiência de VACHT macrófagos eixo peribroncovascular. Podemos observar nas fotomicrografias D e E (setas) que o número de células macrófagos foi maior nos animais submetidos ao protocolo de elastase WT-PPE, VACHT KD^{HOM}-PPE em comparação com os grupos salinas WT-SAL, VACHT KD^{HOM}-SAL. Observamos que os grupos com deficiência colinérgica exposto ao protocolo de elastase (fotomicrografia E), apresentaram uma amplificação da resposta inflamatória, com aumento da células macrófagos no eixo peribronquialveolar (setas), quando comparado aos grupos salinos (fotomicrografia D) com *P<0,01 comparado ao salina e **P<0,01 comparado ao WT PPE.

4.4.3 Nas células positivas para NF- κ B no tecido pulmonar e no eixo peribroncovascular

Quantificamos as células positivas para NF- κ B no tecido pulmonar (Figura 15A) e observamos que os animais submetidos ao protocolo de elastase [(WT-PPE: $13,47 \pm 0,58$), (VACHT KD^{HOM}-PPE: $12,65 \pm 0,55$)] apresentaram um aumento das células positivas para NF- κ B no parênquima pulmonar distal em relação aos grupos salina [(WT-SAL: $3,95 \pm 0,55$), (VACHT KD^{HOM}-SAL: $3,33 \pm 0,62$), ($P < 0,001$)]. Não houve diferença entre os grupos salinas. Não houve amplificação da resposta nos animais VACHT KD^{HOM}-PPE em comparação com o grupo WT-PPE. Estes achados estão representados nas fotomicrografias do pulmão de animais dos grupos WT-SAL (B), VACHT KD^{HOM}-SAL (C), WT-PPE (D), VACHT KD^{HOM}-PPE (E), onde notamos que há um aumento de células positivas do NF- κ B (setas) nos animais que receberam elastase.

Também quantificamos as células positivas para NF- κ B no eixo peribroncovascular (Figura 16A). O número de células positivas do NF- κ B [(WT-PPE: $3,87 \pm 0,38$), (VACHT KD^{HOM}-PPE: $5,25 \pm 0,43$)] foi maior nos animais submetidos ao protocolo de elastase em comparação com os grupos salinos [(WT-SAL: $1,17 \pm 0,4$), (VACHT KD^{HOM}-SAL: $0,90 \pm 0,43$), ($p < 0,001$)]. Além disso, a deficiência colinérgica também aumentou o número de células positivas para NF- κ B nos animais VACHT KD^{HOM}-PPE em comparação com os selvagens WT-PPE ($P < 0,05$). Não observamos diferença das células positivas do NF- κ B entre os grupos experimentais que receberam salinas. Na figura 15, observam-se as fotomicrografias representativas (D e E) mostrando células positivas do NF- κ B (setas) na região do eixo peribroncovascular, com aumento

no número de células nos animais submetidos ao protocolo de elastase (setas). Podemos observar que houve uma amplificação da resposta nos animais com deficiência colinérgica (E) comparada com os animais enfisematosos sem deficiência (D).

Figura 15A. Efeito da deficiência de VACHT nas células positivas para NF- κ B no parênquima pulmonar. Podemos observar nas fotomicrografias do pulmão de animais submetidos ao protocolo de elastase WT-PPE (D), VACHT KD^{HOM}-PPE (E), um aumento de células positivas para NF- κ B (setas). Não houve efeito da deficiência colinérgica nesse parâmetro e nem diferença entre os grupos salina. *P< 0,001 comparado aos grupos salinas.

Figura 16A. Efeito da deficiência de VACHT nas células positivas para NF-κB no eixo peribroncovascular. Nós claramente notamos, nas fotomicrografias, que os animais submetidos ao protocolo de elastase WT-PPE, VACHT KD^{HOM}-PPE (setas), apresentaram um aumento das células positivas para NF-κB em comparação com os grupos controles WT-SAL e VACHT KD^{HOM}-SAL (fotomicrografias B e C). Observamos na fotomicrografia E, amplificação da resposta frente à deficiência colinérgica (setas). * $P < 0,001$ comparado ao grupo salina e ** $P < 0,05$ comparado ao WT-PPE.

4.5 Citocinas

Foram analisados os níveis de IL-6, IL-10, IFN- γ , MIP-2 e MCP-1 no homogenato do pulmão dos animais estudados (Tabela 3).

Considerando os níveis de IL-6, IFN- γ , MIP-2 e MCP-1 observamos aumento nos grupos submetidos ao protocolo de elastase em comparação com os grupos salina $P < 0,05$ para todas as comparações].

Considerando as células positivas para MCP-1 estas foram maiores nos animais nos animais VACHT KD^{HOM}-PPE em comparação com WT-PPE ($P < 0,05$).

No intuito de avaliar se a deficiência colinérgica interferia com interleucinas anti-inflamatórias, avaliamos os níveis de IL-10 no homogenato pulmonar e observamos aumento nos grupos submetidos ao protocolo de elastase em comparação com os grupos salina $P < 0,05$ para todas as comparações. Não houve efeito da deficiência colinérgica nesta resposta.

Tabela 4 - Resultados de citocinas: Podemos observar em relação aos níveis de IL-6, IL10, IFN- γ e MIP-2 aumento nos grupos submetidos ao protocolo de elastase (WT-PPE e VACHT KD^{HOMO}-PPE:) em comparação com os grupos salina (WT-SAL e VACHT KD^{HOMO}-SAL). Podemos observar em relação ao MCP-1, amplificação da resposta inflamatória no grupo submetido ao protocolo de elastase VACHT KD^{HOMO}-PPE quando comparado ao grupo controle. Com *P<0,05 comparado aos grupos salinas e **P≤0,05 comparado ao grupo VACHT KD^{HOMO}-PPE.

	WT-SAL	VACHT KD ^{HOMO} -SAL	WT-PPE	VACHT KD ^{HOMO} -PPE
IL-6	0,80 ± 0,18	0,97 ± 0,22	1,70 ± 0,18*	1,28 ± 0,22*
IL-10	5,09 ± 1,66	3,32 ± 2,14	12,29 ± 1,66*	9,97 ± 1,83*
IFN- γ	1,73 ± 0,53	1,81 ± 0,68	3,62 ± 0,48*	4,45 ± 0,59*
MIP-2	14,20 ± 2,38	13,52 ± 2,92	21,55 ± 2,61*	20,70 ± 2,92*
MCP-1	12,37 ± 3,29	7,60 ± 4,25	17,27 ± 3,68*	32,34 ± 4,25*, **

4.6 Efeitos da deficiência em VACHT no remodelamento pulmonar

4.6.1 Nas fibras colágenas

A Figura 17A representa valor das fibras quantificadas no parênquima pulmonar, observamos que os animais submetidos ao protocolo de elastase [(WT-PPE: $24,00 \pm 1,48$), (VACHT KD^{HOM}-PPE: $22,09 \pm 1,56$) apresentaram um aumento do colágeno em relação aos grupos salina [(WT-SAL: $14,45 \pm 1,77$), (VACHT KD^{HOM} SAL: $18,94 \pm 1,65$), $P < 0,001$]. Não houve efeito da modificação genética em nenhum dos grupos. Podemos observar nas fotomicrografias D e E, os animais submetidos ao protocolo de elastase (WT-PPE e VACHT KD^{HOM}-PPE) apresentaram um aumento do depósito de colágeno (setas) no tecido pulmonar.

Ao avaliarmos os achado no eixo peribroncovascular, Figura 18A, também observamos que os animais submetidos ao protocolo de elastase [(WT-PPE: $58,59 \pm 1,93$), (VACHT KD^{HOM}-PPE: $59,55 \pm 1,64$) apresentaram um aumento do colágeno em relação aos grupos salina [(WT-SAL: $51,81 \pm 2,43$), (VACHT KD^{HOM} -SAL: $48,28 \pm 2,06$) com $P < 0,001$]. Não houve efeito da modificação genética. Nas fotomicrografias D e E, também observamos que os animais submetidos ao protocolo de elastase (WT-PPE, VACHT KD^{HOM}-PPE) apresentaram um aumento do colágeno (setas) em relação aos grupos salina (WT-SAL e VACHT KD^{HOM}:-SAL) . Não houve diferença entre os grupos salina e entre os grupos (VACHT KD^{HOM}-PPE e WT-PPE).

4.6.2 Nas fibras elásticas

Na Figura 19A, observamos que o grupo de animais selvagem submetido ao protocolo de elastase [(WT-PPE: $46,68 \pm 1,17$) apresentou um aumento das fibras elásticas no parênquima pulmonar distal em relação ao grupo selvagem que recebeu salina WT-SAL ($42,67 \pm 1,36$) ($P < 0,001$). Não houve efeito da deficiência colinérgica nesta resposta. Na fotomicrografia D, podemos observar que o grupo submetido ao protocolo de elastase WT-PPE apresentou um aumento das fibras elásticas (setas) no parênquima pulmonar alveolar em relação ao grupo WT-SAL (fotomicrografia C).

No eixo peribroncovascular, Figura 20A, observamos que os animais submetidos à instilação de PPE [(WT-PPE: $43,01 \pm 1,65$), (VAC_hT KD^{HOM}-PPE: $40,83 \pm 1,45$) apresentaram um aumento das fibras elásticas em relação aos grupos salina [(WT-SAL: $31,81 \pm 1,45$), (VAC_hT KD^{HOM}-SAL: $34,69 \pm 1,54$), $P < 0,001$. Não houve efeito da modificação genética. Os animais submetidos ao protocolo de elastase (WT-PPE e VAC_hT KD^{HOM}-PPE) (fotomicrografias D e E) apresentaram um aumento das fibras elásticas (setas) em relação aos grupos salina (WT-SAL, VAC_hT KD^{HOM}-SAL), fotomicrografias B e C.

Figura 17A - Efeito da deficiência de VACHT nas fibras colágenas no parênquima pulmonar. No parênquima pulmonar observa-se que os animais submetidos ao protocolo de elastase (WT-PPE e VACHT KD^{HOM}-PPE) (fotomicrografias D e E) apresentaram um aumento do colágeno (setas) em relação aos grupos salina (WT-SAL e VACHT KD^{HOM}-SAL) (fotomicrografias B e C). Não houve diferença entre os grupos salinos, e entre os grupos WT e VACHT. * $P < 0,001$ comparado aos salinas.

Figura 18A - Efeito da deficiência de VACHT nas fibras colágenas no eixo peribroncovascular: Também observamos nas fotomicrografias D e E que os animais submetidos ao protocolo de elastase (WT-PPE e VACHT KD^{HOM}-PPE) apresentaram um aumento do colágeno (setas) em relação aos grupos salina (WT-SAL e VACHT KD^{HOM}-SAL). Não houve diferença entre os grupos salinos e entre os grupos WT e VACHT. *P<0,001 comparado ao salina.

Figura 19A - Efeito da deficiência de VACHT nas fibras elásticas no parênquima pulmonar: Observamos na fotomicrografia D que o grupo submetido ao protocolo de elastase WT-PPE, apresentou um aumento das fibras elásticas (setas) no parênquima pulmonar alveolar em relação ao grupo WT-SAL fotomicrografia C. Não houve efeito da deficiência colinérgica nesta resposta. * $P < 0,05$ comparado ao WT-SAL.

Figura 20A - Efeito da deficiência de VACHT nas fibras elásticas no eixo peribroncovascular: Observamos nas fotomicrografias D e E que os animais submetidos à instilação de PPE (WT-PPE e VACHT KD^{HOM}-PPE) apresentaram um aumento das fibras elásticas (setas) em relação aos grupos salina (WT-SAL, VACHT KD^{HOM}-SAL). Não houve efeito da deficiência colinérgica nesta resposta. *P<0,001 comparado ao salina.

4.7 Efeitos da deficiência em VACHT no Estresse Oxidativo

4.7.1 Isoprostano (8-iso-PGF-2 α) no parênquima pulmonar e eixo peribroncovascular

No parênquima pulmonar (Figura 21A), observamos que os animais submetidos à instilação de PPE [(WT-PPE: $17,85 \pm 1,98$), (VACHT KD^{HOM}-PPE: $17,36 \pm 1,79$)] apresentaram um aumento da área positiva para isoprostano em relação aos grupos salina [(WT-SAL: $13,10 \pm 2,10$), (VACHT KD^{HOM}-SAL: $13,28 \pm 2,10$), $P < 0,05$]. Não houve interferência da genotipagem nos animais que receberam salina e nos submetidos ao protocolo de elastase. Observamos nas fotomicrografias D e E maior áreas positivas no parênquima pulmonar (setas) dos animais submetidos à instilação de PPE (WT-PPE e VACHT KD^{HOM}-PPE) em relação aos grupos salina (WT-SAL e VACHT KD^{HOM}-SAL), fotomicrografias B e C.

No eixo peribroncovascular (Figura 22A), observamos que houve aumento de áreas positivas para isoprostano somente nos animais do grupo VACHT KD^{HOM}-PPE ($19,88 \pm 2,01$) em relação aos demais grupos que receberam salina [(WT-SAL: $13,67 \pm 2,15$), (VACHT KD^{HOM}-SAL: $10,57 \pm 2,15$)] ($P < 0,01$ para todas as comparações). Podemos observar na fotomicrografia E que os animais com deficiência colinérgica VACHT KD^{HOM}-PPE apresentaram aumento da área positiva em relação aos demais grupos.

Figura 21A - Área positiva para isoprostano no parênquima pulmonar: Nas fotomicrografias D e E observamos que os animais submetidos à instilação de PPE (WT-PPE e VACHT KD^{HOM}-PPE) apresentaram um aumento área positivas para isoprostano (setas) em relação aos grupos salina (WT-SAL e VACHT KD^{HOM}-SAL). Não houve diferença entre os grupos salinas e entre os grupos (VACHT KD^{HOM}-PPE e WT-PPE). *P < 0,05 comparado ao grupo salina.

Figura 22A - Área positiva para isoprostano no eixo peribroncovascular: Observamos na fotomicrografia E que os animais com deficiência colinérgica VAcHT KD^{HOM}-PPE apresentaram aumento da área positiva para isoprostano em relação aos grupos sem deficiência genética (WT-SAL: e WT-PPE) e ao seu controle VAcHT KD^{HOM}-SAL. *P< 0,01 comparado ao salina.

4.8 Detecção de VAcHT e M2 no homogenato de pulmão

Na Figura 23A, observamos que os grupos de animais que foram submetidos ao protocolo de enfisema [(WT-PPE: $65,74 \pm 10,43\%$); (VAcHT KD^{HOM} -PPE: $51,90 \pm 14,75\%$)] tiveram uma redução na proteína VAcHT (% de redução em relação ao controle, normalizada pela β -actina) em comparação aos grupos salinas [(WT-SAL: $100,05 \pm 8,52\%$); (VAcHT KD^{HOM} -PPE: $88,75 \pm 8,52\%$), ($P < 0,05$ para ambas as comparações). Na Figura 23A, notamos as bandas de VAcHT na marcação de 56kDa de peso molecular.

Na Figura 24A observamos que não houve diferença no conteúdo da proteína de receptores muscarínicos M2 nos grupos estudados [(WT-SAL: $100,05 \pm 17,87\%$); (VAcHT KD^{HOM} -SAL: $77,82 \pm 17,87\%$); (WT-PPE: $89,41 \pm 16,54\%$); (VAcHT KD^{HOM} -PPE: $66,48 \pm 25,27\%$)].

Figura 23A - Detecção de VACht: Podemos observar que os grupos de animais que foram submetidos ao protocolo de enfisema (WT-PPE e VACht KD^{HOM}-PPE) tiveram uma redução na proteína VACht (% de redução em relação ao controle, normalizada pela β-actina) em comparação aos grupos salinas (WT-SAL e VACht KD^{HOM}-PPE *P<0.05).

Figura 24A - Detecção de M2: Neste caso observamos que não houve diferença na expressão da proteína de receptores muscarínicos M2 nos grupos estudados WT-SAL, VACht KD^{HOM}-SAL, WT-PPE e VACht KD^{HOM}-PPE.

5. Discussão

O presente estudo demonstra a deficiência colinérgica endógena a longo prazo aumentou a inflamação pulmonar induzida pela elastase em modelo experimental de enfisema pulmonar, o que sugere que a ACh seja um mediador endógeno importante para neutralizar a resposta inflamatória neste modelo. Embora a deficiência colinérgica tenha claramente piorado a inflamação pulmonar no grupo elastase, tanto no tecido pulmonar quanto na região peribronvascular, não observamos nos animais mutantes e tratados com elastase qualquer piora da função pulmonar, destruição alveolar e remodelamento do parênquima, quando comparado com os animais WT tratados com elastase. Estes resultados também sugerem que a mecânica respiratória e a remodelação do tecido pulmonar nem sempre espelham as respostas inflamatórias.

Mostramos que uma dose única de instilação de PPE em animais de tipo selvagem (grupo WT-PPE) induziu um aumento significativo na destruição alveolar, avaliada pelo diâmetro alveolar médio. Este índice é bastante aceito para inferir a destruição do tecido alveolar, conhecida como enfisema (127). Além disso, a elastase ainda induziu um aumento de macrófagos e neutrófilos presentes no LBA e de macrófagos teciduais, bem como um aumento do colágeno e da deposição de fibras elásticas no pulmão. Ainda observamos aumento de citocinas pró-inflamatórias MCP-1, MIP-2 e IL-6 e reguladora IL-10. Embora a instilação de elastase não seja a forma mais fisiológica para induzir o enfisema, principalmente em relação ao enfisema humano onde o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do enfisema é o tabagismo, este modelo apresenta inflamação pulmonar, destruição alveolar e remodelamento,

assim como alterações da função pulmonar, que mimetizam características semelhantes observadas no pulmão de pacientes com DPOC (110, 128, 129). Outros autores também demonstraram inflamação na região peribroncovascular em modelo de enfisema induzido por elastase (130).

A via colinérgica tem sido intensamente estudada em doenças pulmonares, principalmente relacionadas com a ação broncoconstritora da ACh nos receptores muscarínicos (84). No entanto, os efeitos da ACh não foram completamente elucidados. Considerando as múltiplas funções biológicas relacionados com os receptores de ACh e da relevância desse mediador na inflamação, é importante entender primeiro, se os níveis endógenos da alteração de ACh afeta a fisiopatologia do enfisema pulmonar. Para tanto, o enfisema foi induzido em animais com disfunção colinérgica (VACHT knockdown, homozigótica [VACHT KD^{HOM}]), que tem uma redução de cerca de 70% nos níveis VACHT (131). Castro et al. (131) desenvolveram animais Knockout para VACHT (VACHT KO) e observaram que esses animais morriam após o nascimento devido à insuficiência respiratória, sugerindo que a neurotransmissão colinérgica é essencial para manutenção da vida. Neste sentido, Prado et al. (70) geraram um modelo de camundongos com disfunção colinérgica (VACHT knockdown, homozigotos [VACHT KD^{HOM}]), onde os animais homozigotos apresentam redução de aproximadamente 70% nos níveis de VACHT, possibilitando compreender as consequências da expressão de VACHT e liberação de ACh. (77) em diversos sistemas. Os animais VACHT KD^{HOM} evoluem com insuficiência cardíaca a partir de 6 meses, déficits de memória e muscular (132, 133). Sabe-se que a hipofunção colinérgica no é à

base de alguns sintomas cognitivos e comportamentais observados na Doença de Alzheimer, demência vascular, bem como na doença de Parkinson (134, 135). Entretanto, sem efeito nas doenças pulmonares que ainda foi pouco estudado.

Nós demonstramos claramente que a diminuição dos níveis endógenos de ACh sistêmica agrava a inflamação pulmonar, aumentando o número de macrófagos e neutrófilos obtidos no LBA nos animais geneticamente modificados submetidos ao protocolo de elastase. Os nossos resultados sugerem que a ACh endógena exerce um efeito protetor e anti-inflamatório neste modelo de enfisema induzido por elastase. Pelo menos no nosso conhecimento é a primeira vez que o papel da deficiência colinérgica endógena foi investigado no enfisema pulmonar.

Para confirmar os resultados obtidos no lavado broncoalveolar, avaliamos os macrófagos no tecido pulmonar e observamos alterações tanto no parênquima como no eixo peribroncovascular que os efeitos da deficiência colinérgica amplificaram a inflamação, os macrófagos possuem um papel importante na DPOC, uma vez que essas células induzem a liberação de proteases, remodelação das vias respiratórias (43, 136). Esta resposta amplificada de macrófagos pode ter sido devido ao aumento da expressão de MCP -1 (como observamos pela análise do homogenato de pulmão no Bioplex), a MCP- 1, que sabidamente é quimiotática para estas células, induz a produção de mucina e a inflamação do pulmão.

A ação anti-inflamatória de ACh sobre os receptores nicotínicos, os quais são expressos em brônquios e alvéolos de células epiteliais, bem como nas células inflamatórias, tais como células de macrófagos, neutrófilos e linfócitos, foi reconhecido em modelos agudos de inflamação (97, 137). Pavlov et al. (72) demonstraram que o papel anti-inflamatório colinérgico controla a inflamação do nervo vago aferente e que a ACh tem interação com a subunidade $\alpha 7$ nAChR, que inibe a produção de TNF- α e outras citocinas inflamatórias, inibindo a cascata inflamatória. Corroborando com essa ideia, Su et al (138), observaram que a administração de agonista $\alpha 7$ nAChR levou a diminuição dos níveis de MIP-2 no LBA e a mortalidade num modelo de lesão pulmonar induzida por *Escherichia coli* em camundongos.

A fonte não neuronal de ACh também está envolvida no controle da inflamação. Rosas-Balina et al. (137) em um modelo de estudo de lesão pulmonar por endotoxina, mostraram que a estimulação eléctrica do nervo vago ou do nervo esplênico inibiu a produção de TNF- α desde linfócitos T no baço sintetizado ACh, que exerce um efeito anti-inflamatório. No entanto, os efeitos dos receptores nicotínicos na DPOC foram pouco investigados. Zhang et al. (115) mostraram que o gene nAChR é uma variante de susceptibilidade para o desenvolvimento de DPOC. Além disso, Budulac et al. (139) sugerem que os polimorfismos de um único nucleotídeo no cluster nAChR está indiretamente envolvido no desenvolvimento do enfisema, e juntamente com o hábito de fumar aumenta a dependência da nicotínica nos seres humanos.

Embora os medicamentos anti-muscarínicos tenham sido utilizados, a fim de controlar a broncoconstrição em pacientes com DPOC e este tratamento parece melhorar os sintomas em pacientes com DPOC (84, 140, 141), o papel dos receptores muscarínicos na inflamação e no remodelamento ainda é controverso. Há algumas evidências de que o tratamento com anti-muscarínicos, brometo de tiotrópio, possa reduzir a inflamação pela regulação de fatores quimiotáticos liberados pelas células epiteliais e de macrófagos(142). Pera et al (143) demonstraram que o brometo de tiotrópio inibe a inflamação pulmonar e remodelamento num modelo de cobaia de DPOC. No entanto, Verbout et al. (144) mostraram que o tratamento anti-muscarínico a longo prazo aumenta interação as células inflamatórias das vias aéreas, amplificando a resposta inflamatória. Entretanto, outros estudos realizados com pacientes com DPOC, não mostraram os efeitos da droga sobre a inflamação (141, 145).

No que diz respeito aos níveis de citocinas não houve efeito da deficiência colinérgica nas citocinas IL-10, MIP-2, IL-10 e IFN- γ . A MCP- 1, que sabidamente é quimiotática para estas células, induz a produção de mucina e a inflamação do pulmão (146). Corroborando com nossos achados, vários estudos têm demonstrado que o processo inflamatório é impulsionado por essas células inflamatórias (147-149). Corroborando em parte como nossos achados Borovikova et al., (2000) demonstraram que a estimulação eléctrica no nervo vago periférico *in vivo* inibiu os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , sem, no entanto ter qualquer efeito nos níveis de IL-10. Em conjunto, estes dados sugerem que a deficiência colinérgica contribuiu com a piora da inflamação

pulmonar, aumentando diretamente os níveis de citocinas pró-inflamatórias, sem interferência com citocinas anti- inflamatórias.

O efeito anti-inflamatório de ACh em $\alpha 7$ nAChR está associado a uma inibição da translocação de NF- κ B para o núcleo e, conseqüentemente, a inibição das citocinas liberadas dos macrófagos e outras células (97, 150). Portanto, avaliamos a expressão de NF- κ B nas células inflamatórias no tecido alveolar e no eixo peribroncovascular. A elastase induziu um aumento do NF- κ B no pulmão, e uma resposta amplificada pela deficiência colinérgica foi observada no eixo peribroncovascular. Em conjunto, estes dados sugerem que a deficiência colinérgica contribuiu com a piora da inflamação pulmonar, pelo aumento direto de MCP-1 e ativação de NF- κ B. É importante também considerar que a inervação parassimpática no pulmão se dá principalmente em vias aéreas através do nervo vago, predominantemente em vias aéreas proximais (62, 103) e talvez por isso o efeito tenha sido maior no eixo peribroncovascular.

Outros mecanismos estão provavelmente envolvidos nos efeitos anti-inflamatórios da ACh, além do efeito sobre a NF- κ B. A ativação de $\alpha 7$ nAChR também recruta tirosina quinase (JAK2) e promove a fosforilação e ativação subsequente de transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT3), reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (150). Neste momento não foi possível avaliar este mecanismo.

A remodelação do tecido pode ser definida por alterações na quantidade, composição, estrutura e organização da matriz extracelular e é

uma característica comum da reparação dos danos no tecido observados na DPOC (151). A análise morfológica do pulmão revelou que a longo prazo deficiência colinérgica não afeta a destruição do parênquima e o remodelamento tanto em parênquima pulmonar quanto na região peribroncovascular neste modelo enfisema, reforçando a ideia de que a resposta inflamatória por si só não é o principal determinante da função pulmonar ou destruição alveolar neste modelo. Embora seja bem conhecido que o remodelamento surja em resposta à inflamação e a lesão do pulmão, a causa-efeito da inflamação e remodelação é controversa. Corroborando com os nossos resultados, Anciães et al. (116) estudaram o curso temporal das alterações morfofuncionais pulmonares em um modelo de enfisema induzido pela papaína, mostraram que, além do aumento de macrófagos ocorrerem nos dias 1, 3, 15 e 28 dias após a instilação, a destruição alveolar, remodelamento e alterações na elastância foram evidentes apenas após há 15 dias.

Estas alterações morfológicas estão mais relacionadas com aumento da expressão de MMP-12 do que com a inflamação. Ito et al. (152) mostraram, num modelo de enfisema em ratos, que a função pulmonar e a complacência anormal estão associados à remodelação do colágeno. Talvez seja necessário induzir mudanças no desequilíbrio entre a metaloproteinase da matriz e seus inibidores, a fim de afetar a destruição alveolar e o remodelamento, uma vez que estas proteases estão envolvidas na remodelação e na degradação da matriz extracelular (153). Considerando que não houve alteração das estruturas da matriz extracelular entre animais mutante e não mutantes, não consideramos relevante avaliar as metaproteinases de matriz nesse momento.

A deficiência de VACHT não afetou a elastância do tecido previamente reduzida por instilação de elastase. Considerando que não houve qualquer efeito da deficiência em VACHT nas fibras elásticas era esperado que a deficiência colinérgica também não interferisse com a função pulmonar, particularmente com a elastância de tecido, uma vez que a remodelação do pulmão é um dos mais importantes determinantes de doença pulmonar observada em pacientes com DPOC.

O estresse oxidativo possui um papel importante na gênese da DPOC, através dos danos que causa sobre o trato respiratório e amplificação de mecanismos etiopatogênicos. Para quantificar o estresse oxidativo, avaliamos espécie de 8-isoprostano no parênquima pulmonar e no eixo peribroncovascular. Observamos elevação de aérea positiva nos animais submetidos à PPE no parênquima pulmonar. Corroborando com nossos achados, Ceylan et al. (154) e Kanazawa et al. (28) mostraram aumento desse marcador em pulmões de pacientes com DPOC quando comparados com indivíduos normais. Observamos também que no eixo peribroncovascular houve aumento da aérea positiva para 8-isoprostano somente nos animais VACHT KD^{HOM}-PPE.

Avaliamos o conteúdo de VACHT no pulmão dos animais estudados. Observamos que não há diferença entre os animais mutantes e selvagens em relação ao VACHT, confirmando resultados prévios de nosso grupo de pesquisa (155). Interessante, que estes animais têm sabidamente redução de VACHT neural e também em outros órgãos como coração e rim (118, 133). Não

sabemos o motivo desta expressão de VACht ter sido realizada no pulmão, e estudo em animais mais jovens poderão contribuir com o melhor entendimento desta resposta, uma vez que devam ocorrer alterações no desenvolvimento pulmonar. Por fim, um resultado bastante interessante foi o fato de que os animais enfisematosos apresentaram redução de VACht em relação aos animais salina. Ao menos no nosso conhecimento, esta é a primeira vez que este fato é relatado na literatura. Outros trabalhos sugerem que a redução de componentes colinérgicos no pulmão pode estar envolvida no controle da inflamação pulmonar em modelos de asma (103) e em pacientes com fibrose e cística (102), que tiveram redução de diversos componente colinérgico e também na liberação da ACh.

Embora estes resultados, curiosamente, revelem uma nova via envolvida na fisiopatologia da DPOC, não podemos transpor nossos dados diretamente para os seres humanos. No entanto, os modelos animais são extremamente úteis para entender melhor a patogênese da doença em um sentido amplo. Ainda falta neste trabalho a avaliação de outras vias que possam estar envolvidas nesta resposta, como por exemplo, a via JAK-STAT3.

Em conclusão, estes dados mostraram pela primeira vez que a redução da função colinérgica endógena a longo prazo e sistêmica, o que é observado em uma série de doenças como insuficiência cardíaca, disautonomia (133), afeta significativamente a inflamação pulmonar em modelo animal de enfisema induzido por elastase. Ainda mostramos que ocorre uma redução de VACht no

pulmão de animais enfisematosos. Em conjunto, sugere-se que o sistema colinérgico anti-inflamatório e a ACh possam ser uma nova via envolvida na fisiopatologia no enfisema, particularmente na inflamação, para tanto novos estudos são necessários para elucidar esses mecanismos de ação.

6. Referências

1. Agustí A, Barnes PJ. Update in chronic obstructive pulmonary disease 2011. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(11):1171-6.
2. Barnes PJ. COPD: is there light at the end of the tunnel? *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(3):263-72.
3. Committee GE. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2013.
4. Organization WH. World health statistics 2008. Geneva: WHO; 2008. 2009.
5. Senior RM, Anthonisen NR. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(4):S139-S47.
6. Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease–antiprotease imbalance, and inflammation. *Int J Chron Obstruct Pulm Dis*. 2011;6:413.
7. Snider GL. Clinical Relevance Summary Collagen vs Elastin in Pathogenesis of Emphysema; Cellular Origin of Elastases; Bronchiolitis vs Emphysema as a Cause of Airflow Obstruction. *Chest*. 2000;117(5_suppl_1):244S-6S.
8. Sharafkhaneh A, Hanania NA, Kim V. Pathogenesis of emphysema from the bench to the bedside. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5(4):475-7.

9. Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(4):347-65.
10. Donaldson G, Seemungal T, Patel I, Lloyd-Owen S, Wilkinson T, Wedzicha J. Longitudinal changes in the nature, severity and frequency of COPD exacerbations. *Eur Respir J*. 2003;22(6):931-6.
11. Schum M, Lydick E, Marton JP. A new method for examining the cost savings of reducing COPD exacerbations. *Pharmacoeconomics*. 2010;28(9):733-49.
12. Leidy NK, Wilcox TK, Jones PW, Roberts L, Powers JH, Sethi S. Standardizing measurement of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: reliability and validity of a patient-reported diary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(3):323-9.
13. Vijayan V. Centenary Review Article. *Indian J Med Res*. 2013;137:251-69.
14. Agusti A, Calverley P, Celli B, Coxson HO, Edwards LD, Lomas DA, et al. Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res*. 2010;11(1):122-36.
15. Tkáč J, Man SP, Sin DD. Review: Systemic consequences of COPD. *Ther Adv Respir Dis*. 2007;1(1):47-59.

16. Pessoa C, Pessoa R. Epidemiologia da DPOC no presente—aspectos nacionais e internacionais. *Pulmão RJ-Atualizações Tematicas*. 2009;1:7-12.
17. Blanchette CM, Dalal AA, Mapel D. Changes in COPD demographics and costs over 20 years. *J Med Econ*. 2012;15(6):1176-82.
18. National Heart L, Institute B. Morbidity & mortality: 2009 chartbook on cardiovascular, lung, and blood diseases. National Heart, Lung, and Blood Institute Web site.2011.
19. Carvalho AK, Menezes AMB, Camelier A, Rosa FW, Nascimento OA, Perez-Padilla R, et al. Prevalence of self-reported chronic diseases in individuals over the age of 40 in São Paulo, Brazil: the Platino study. *Cadernos de Saúde Pública*. 2012;28(5):905-12.
20. Jardim JR, Nascimento A. Epidemiologia, impacto e tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) no Brasil. *Revista Racine*. 2007;101:32-47.
21. Chung K, Adcock I. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J*. 2008;31(6):1334-56.
22. MacNee W, Tuder RM. New paradigms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease I. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6(6):527-31.
23. Barnes P, Shapiro S, Pauwels R. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003;22(4):672-88.
24. Chung K. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2001;18(34 suppl):50s-9s.

25. Cosio MG, Majo J, Cosio MG. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPDrole of T cells. *Chest*. 2002;121(5_suppl):160S-5S.
26. Wouters EF. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(1):26-33.
27. Barnes P. Pathophysiology of COPD. *Asthma and COPD: Basic Mechanisms and Clinical Management*. 2009:425.
28. Kanazawa H, Yoshikawa J. Elevated oxidative stress and reciprocal reduction of vascular endothelial growth factor levels with severity of COPD. *Chest*. 2005;128(5):3191-7.
29. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(4):258-66.
30. Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res*. 2006;7(1):53.
31. Tomashefski JF, Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 1991;143(2):391-400.
32. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(2):449-53.
33. Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, et al. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary

- disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(10):1114-21.
34. Hersh CP, DeMeo DL, Lazarus R, Celedón JC, Raby BA, Benditt JO, et al. Genetic association analysis of functional impairment in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(9):977.
35. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Tissue renewal and repair: regeneration, healing and fibrosis. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 2005;7:87-118.
36. Hirota N, Martin JG. Mechanisms of Airway Remodeling Mechanisms of Airway Remodeling. *Chest*. 2013;144(3):1026-32.
37. Barberà JA, Riverola A, Roca J, Ramirez J, Wagner PD, Ros D, et al. Pulmonary vascular abnormalities and ventilation-perfusion relationships in mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149(2):423-9.
38. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;163(5):1256-76.
39. Rutgers SR, Postma DS, Ten Hacken NH, Kauffman HF, van der Mark TW, Koëter GH, et al. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke. *Thorax*. 2000;55(1):12-8.
40. Barnes PJ. Transcription factors in airway diseases. *Lab Invest*. 2006;86(9):867-72.

41. Kanner RE, Anthonisen NR, Connett JE. Lower Respiratory Illnesses Promote FEV1 Decline in Current Smokers But Not Ex-Smokers with Mild Chronic Obstructive Pulmonary Disease Results from the Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(3):358-64.
42. Groneberg DA, Chung KF. Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2004;5(1):18.
43. Shapiro S. Proteolysis in the lung. *Eur Respir J*. 2003;22(44 suppl):30s-2s.
44. Churg A, Wright JL. Proteases and emphysema. *Curr Opin Pulm Med*. 2005;11(2):153.
45. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2007;28(3):479-513.
46. Houghton AM. Endogenous Modifiers of Cigarette Smoke Exposure within the Lung. *Proc Am Thorac Soc*. 2012;9(2):66-8.
47. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev*. 2004;84(3):731-65.
48. Kamata H, Honda S-i, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. 2005;120(5):649-61.
49. Mossman BT, Lounsbury KM, Reddy SP. Oxidants and signaling by mitogen-activated protein kinases in lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;34(6):666.

50. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, et al. Increased expression of nuclear factor- κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J*. 2002;20(3):556-63.
51. Szulakowski P, Crowther AJ, Jiménez LA, Donaldson K, Mayer R, Leonard TB, et al. The effect of smoking on the transcriptional regulation of lung inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(1):41-50.
52. Montuschi P, Collins JV, Ciabattini G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, et al. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(3):1175-7.
53. Pratico D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, FitzGerald GA. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Is Associated with an Increase in Urinary Levels of Isoprostane F₂ α -III, an Index of Oxidant Stress. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(6):1709-14.
54. Barnes P, Celli B. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J*. 2009;33(5):1165-85.
55. Wu J, Sin DD. Improved patient outcome with smoking cessation: when is it too late? *Int J Chron Obstruct Pulm Dis*. 2011;6:259.
56. Drummond MB, Wise RA, John M, T. Zvarich M, McGarvey LP. Accuracy of death certificates in COPD: analysis from the TORCH trial. *COPD: Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2010;7(3):179-85.

57. Stoloff SW. Chronic obstructive pulmonary disease megatrials: taking the results into office practice. *Am J Med Sci*. 2011;342(2):160-7.
58. Rice KL, Dewan N, Bloomfield HE, Grill J, Schult TM, Nelson DB, et al. Disease management program for chronic obstructive pulmonary disease: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(7):890-6.
59. Ries AL, Bauldoff GS, Carlin BW, Casaburi R, Emery CF, Mahler DA, et al. Pulmonary Rehabilitation Executive Summary Joint American College of Chest Physicians/American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2007;131(5_suppl):1S-3S.
60. Barnes P. Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol Rev*. 1992;72(3):699.
61. Leff AR, Munoz NM, Hendrix SG. Parasympathetic and adrenergic contractile responses in canine trachea and bronchus. *J Appl Physiol*. 1983;55(1):113-20.
62. Gwilt CR, Donnelly LE, Rogers DF. The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacol Ther*. 2007;115(2):208-22.
63. Daniel E, Kannan M, Davis C, Posey-Daniel V. Ultrastructural studies on the neuromuscular control of human tracheal and bronchial muscle. *Respir Physiol*. 1986;63(1):109-28.

64. Jeffery P, Reid L. Intra-epithelial nerves in normal rat airways: a quantitative electron microscopic study. *J Anat.* 1973;114(Pt 1):35.
65. Canning BJ. Reflex regulation of airway smooth muscle tone. *J Appl Physiol.* 2006;101(3):971-85.
66. Rogers DF. Motor control of airway goblet cells and glands. *Respir Physiol.* 2001;125(1):129-44.
67. Valle JSd, Borges HE, Alves-do-Prado W. Autoregulação colinérgica da transmissão neuromuscular; Cholinergic autoregulation of neuromuscular transmission. *Arquivos Ciências Saúde UNIPAR.* 2002;6(2):181-5.
68. Kummer W, Lips K, Pfeil U. The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol.* 2008;130(2):219-34.
69. Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(4):294-302.
70. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, et al. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Molecular Biol.* 2006;35(4):457.
71. Prado MA, Reis RA, Prado V, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem Int.* 2002;41(5):291-9.
72. Pavlov V, Tracey K. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(6):1037-40.

73. Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest.* 2007;117(2):289-96.
74. Ribeiro FM, Black SA, Prado VF, Rylett RJ, Ferguson SS, Prado MA. The “ins” and “outs” of the high-affinity choline transporter CHT1. *J Neurochem.* 2006;97(1):1-12.
75. Kawashima K, Fujii T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci.* 2004;9(2):063.
76. Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther.* 1998;77(1):59-79.
77. Vania FP, Ashbeel R, Benjamin K, Robert G, Marco A. Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. *Biochem J.* 2013;450(2):265-74.
78. Gosens R, Roscioni SS, Dekkers BG, Pera T, Schmidt M, Schaafsma D, et al. Pharmacology of airway smooth muscle proliferation. *Eur J Pharmacol.* 2008;585(2):385-97.
79. Racké K, Juergens UR, Matthiesen S. Control by cholinergic mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 2006;533(1):57-68.
80. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res.* 2006;7(73):9.

81. Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(3):176-83.
82. Profita M, Giorgi RD, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F, et al. Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Allergy*. 2005;60(11):1361-9.
83. Oenema TA, Kolahian S, Nanninga JE, Rieks D, Hiemstra PS, Zuyderduyn S, et al. Pro-inflammatory mechanisms of muscarinic receptor stimulation in airway smooth muscle. *Respir Res*. 2010;11:130.
84. Belmonte KE. Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(4):297-304.
85. Zanardi A, Leo G, Biagini G, Zoli M. Nicotine and neurodegeneration in ageing. *Toxicol Lett*. 2002;127(1):207-15.
86. Romanelli MN, Gualtieri F. Cholinergic nicotinic receptors: competitive ligands, allosteric modulators, and their potential applications. *Med Res Rev*. 2003;23(4):393-426.
87. Vaupel DB, Stein EA, Mukhin AG. Quantification of $\alpha 4\beta 2^*$ nicotinic receptors in the rat brain with microPET® and 2-[¹⁸F] FA-85380. *Neuroimage*. 2007;34(4):1352-62.
88. Biasi M. Nicotinic mechanisms in the autonomic control of organ systems. *J Neurobiol*. 2002;53(4):568-79.

89. Millar NS, Gotti C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*. 2009;56(1):237-46.
90. Maus AD, Pereira EF, Karachunski PI, Horton RM, Navaneetham D, Macklin K, et al. Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*. 1998;54(5):779-88.
91. Racke K, Matthiesen S. The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm Pharmacol Ther*. 2004;17(4):181-98.
92. Reinheimer T, Bernedo P, Klapproth H, Oelert H, Zeiske B, Racke K, et al. Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and human: species differences in role of airway mucosa. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1996;270(5):L722-8.
93. Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci*. 1993;52(5):521-7.
94. Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *Copd: Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2004;1(1):59-70.
95. Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ. The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sci*. 2003;72(18):2055-61.
96. Pavlov VA, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun*. 2005;19(6):493.
97. Rosas-Ballina M, Tracey K. Cholinergic control of inflammation. *J Intern Med*. 2009;265(6):663-79.

98. Gallowitsch-Puerta M, Pavlov VA. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Life Sci.* 2007;80(24-25):2325.
99. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 2000;405(6785):458-62.
100. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002;420(6917):853-9.
101. Wang DW, Zhou RB, Yao YM. Role of cholinergic anti-inflammatory pathway in regulating host response and its interventional strategy for inflammatory diseases. *Chin J Traumatol.* 2009;12(6):355-64.
102. Wessler I, Bittinger F, Kamin W, Zepp F, Meyer E, Schad A, et al. Dysfunction of the non-neuronal cholinergic system in the airways and blood cells of patients with cystic fibrosis. *Life Sci.* 2007;80(24):2253-8.
103. Lips KS, Lührmann A, Tschernig T, Stoeger T, Alessandrini F, Grau V, et al. Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse. *Life Sci.* 2007;80(24):2263-9.
104. Wessler IK, Kirkpatrick CJ. The non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther.* 2001;14(6):423-34.
105. Blanchet MR, Langlois A, IsraëlAssayag E, Beaulieu MJ, Ferland C, Laviolette M, et al. Modulation of eosinophil activation in vitro by a nicotinic receptor agonist. *J Leukoc Biol.* 2007;81(5):1245-51.

106. Tayebati SK, El-Assouad D, Ricci A, Amenta F. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 2002;132(1):147-55.
107. Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, et al. CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2001;193(4):471-82.
108. Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, et al. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* 2001;108(12):1781-8.
109. Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling by the SOCS and Spred family proteins. *Keio J Med.* 2009;58(2):73-83.
110. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;295(1):L1-15.
111. Gross P, Babyak MA, Tolker E, Kaschak M. Enzymatically produced pulmonary emphysema: a preliminary report. *J Occup Environ Med.* 1964;6(12):481-4.
112. Mahadeva R, Shapiro S. Chronic obstructive pulmonary disease• 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax.* 2002;57(10):908-14.
113. Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am J Respir Crit Care Med.* 1990;142(6 Pt 1):1422-8.

114. Shapiro SD. Animal models for COPD. *Chest*;117(5 Suppl 1):223S-7S.
115. Zhang J, Summah H, Zhu YG, Qu JM. Nicotinic acetylcholine receptor variants associated with susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *Respir Res*. 2011;12(1):158.
116. Anciaes AM, Olivo CR, Prado CM, Kagohara KH, Pinto Tda S, Moriya HT, et al. Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema. *Clinics*. 2011;66(10):1797-803.
117. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(6):532-55.
118. Prado VF, Martins S C, de Castro BM, Lima RF, Barros DM, Amaral E, et al. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron*. 2006;51(5):601-12.
119. Bates J, Daroczy B, Hantos Z. A comparison of interrupter and forced oscillation measurements of respiratory resistance in the dog. *J Appl Physiol*. 1992;72(1):46-52.
120. Hantos Z, Daroczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg J. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol*. 1992;72(1):168-78.
121. Lazarus SC. Inflammation, inflammatory mediators, and mediator antagonists in asthma. *J Clin Pharmacol*. 1998;38(7):577-82.

122. Angeli P, Prado CM, Xisto DG, Silva PL, Pássaro CP, Nakazato HD, et al. Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(6):L1197-205.
123. Lanças T, Kasahara DI, Prado CM, Tibério IF, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. *J Appl Physiol*. 2006;100(5):1610-6.
124. Lopes FD, Pinto TS, Arantes-Costa FM, Moriya HT, Biselli PJ, Ferraz LF, et al. Exposure to ambient levels of particles emitted by traffic worsens emphysema in mice. *Environ Res*. 2009;109(5):544-51.
125. Montuschi P, Curro D, Ragazzoni E, Preziosi P, Ciabattini G. Anaphylaxis increases 8-iso-prostaglandin F2alpha release from guinea-pig lung in vitro. *Eur J Pharmacol*. 1999;365(1):59-64.
126. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Kasahara DI, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IF. Effects of acute and chronic nitric oxide inhibition in an experimental model of chronic pulmonary allergic inflammation in guinea pigs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289(4):L677-83.
127. Fló C, Lopes FD, Kasahara DI, Silva ACD, Jesus RC, Rivero DH, et al. Effects of exercise training on papain-induced pulmonary emphysema in Wistar rats. *J Appl Physiol*. 2006;100(1):281-5.

128. Andersen MP, Parham AR, Waldrep JC, McKenzie WN, Dhand R. Alveolar fractal box dimension inversely correlates with mean linear intercept in mice with elastase-induced emphysema. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2012;7:235.
129. Janoff A. Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132(2):417-33.
130. Cruz FF, Antunes MA, Abreu SC, Fujisaki LC, Silva JD, Xisto DG, et al. Protective effects of bone marrow mononuclear cell therapy on lung and heart in an elastase-induced emphysema model. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012;182(1):26-36.
131. Castro BM, De Jaeger X, Martins-Silva C, Lima RD, Amaral E, Menezes C, et al. The vesicular acetylcholine transporter is required for neuromuscular development and function. *Mol Cell Biol*. 2009;29(19):5238-50.
132. Gallagher M, Colombo PJ. Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. *Curr Opin Neurobiol*. 1995;5(2):161-8.
133. Lara A, Damasceno DD, Pires R, Gros R, Gomes ER, Gavioli M, et al. Dysautonomia due to reduced cholinergic neurotransmission causes cardiac remodeling and heart failure. *Mol Cell Biol*. 2010;30(7):1746-56.
134. Berson A, Barbash S, Shaltiel G, Goll Y, Hanin G, Greenberg DS, et al. Cholinergic-associated loss of hnRNP-A/B in Alzheimer's disease impairs cortical splicing and cognitive function in mice. *EMBO Mol Med*. 2012;4(8):730-42.

135. Mesulam M. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learn Mem.* 2004;11(1):43-9.
136. Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(5 Pt 2):S29-32.
137. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science.* 2011;334(6052):98-101.
138. Su X, Matthay MA, Malik AB. Requisite Role of the Cholinergic $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Pathway in Suppressing Gram-Negative Sepsis-Induced Acute Lung Inflammatory Injury. *J Immunol.* 2010;184(1):401-10.
139. Budulac SE, Vonk JM, Postma DS, Siedlinski M, Timens W, Boezen MH. Nicotinic acetylcholine receptor variants are related to smoking habits, but not directly to COPD. *PloS one.* 2012;7(3):e33386.
140. On LS, Boonyongsunchai P, Webb S, Davies L, Calverley PM, Costello RW. Function of pulmonary neuronal M2 muscarinic receptors in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(6):1320-5.
141. Tashkin DP, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S, et al. A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2008;359(15):1543-54.

142. Vacca G, Randerath WJ, Gillissen A. Inhibition of granulocyte migration by tiotropium bromide. *Respir Res.* 2011;12(1):24.
143. Pera T, Zuidhof A, Valadas J, Smit M, Schoemaker RG, Gosens R, et al. Tiotropium inhibits pulmonary inflammation and remodelling in a guinea pig model of COPD. *Eur Respir J.* 2011;38(4):789-96.
144. Verboort NG, Lorton JK, Jacoby DB, Fryer AD. Atropine pretreatment enhances airway hyperreactivity in antigen-challenged guinea pigs through an eosinophil-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292(5):L1126-35.
145. Wang T, Luo G, Hu Y, Li F, Ma J, Wang J, et al. Comparative study on the efficacy of tiotropium bromide inhalation and oral doxofylline treatment of moderate to severe stable chronic obstructive pulmonary disease. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2011;31:614-8.
146. Monzon ME, Forteza RM, Casalino-Matsuda SM. MCP-1/CCR2B-dependent loop upregulates MUC5AC and MUC5B in human airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011;300(2):L204-15.
147. Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L, Barnes PJ. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respir Med.* 2003;97(12):1299-302.
148. Kang MJ, Choi JM, Kim BH, Lee CM, Cho WK, Choe G, et al. IL-18 Induces Emphysema and Airway and Vascular Remodeling via IFN- γ , IL-17A, and IL-13. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(11):1205-17.

149. Moermans C, Heinen V, Nguyen M, Henket M, Sele J, Manise M, et al. Local and systemic cellular inflammation and cytokine release in chronic obstructive pulmonary disease. *Cytokine*. 2011;56(2):298-304.
150. Gallowitsch-Puerta M, Tracey KJ. Immunologic Role of the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway and the Nicotinic Acetylcholine $\alpha 7$ Receptor. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1062(1):209-19.
151. Gosens R, Zaagsma J, Grootte Bromhaar M, Nelemans A, Meurs H. Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodelling? *Eur J Pharmacol*. 2004;500(1):193-201.
152. Ito S, Ingenito EP, Brewer KK, Black LD, Parameswaran H, Lutchen KR, et al. Mechanics, nonlinearity, and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodeling. *J Appl Physiol*. 2005;98(2):503-11.
153. Hunninghake GM, Cho MH, Tesfaigzi Y, Soto-Quiros ME, Avila L, Lasky-Su J, et al. MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. *N Engl J Med*. 2009;361(27):2599-608.
154. Ceylan E, Kocyigit A, Gencer M, Aksoy N, Selek S. Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass. *Respir Med*. 2006;100(7):1270-6.
155. Pinheiro N, Santana F, Tibério I, Martins MA, Prado M, Prado VF, et al. 7 nAChR agonist, but not systemic cholinergic deficiency, attenuates lung inflammation induced by LPS in mice. 2010.