Leandro Vilela Oliva

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

C57/Bl6

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

Programa: Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos

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

São Paulo

2014

Leandro Vilela Oliva

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

C57/Bl6

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

(versão corrigida, versão original se encontra
disponível na FMUSP)

Programa: Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos

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

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliva, Leandro Vilela

Efeito do inibidor de proteinase de origem vegetal CrataBL, sobre a lesão pulmonar induzida pela elastase em camundongos C57/Bl6 / Leandro Vilela Oliva. -- São Paulo, 2014.

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

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

Orientadora: Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério.

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

USP/FM/DBD-011/14

“O homem não teria alcançado o possível, se inúmeras vezes não
tivesse tentado **atingir o impossível**”

Max Weber

Dedicatória

Dedico esta tese a instituição que a base de minha vida: **minha Família**.

Aos meus pais, que me ensinaram a ter dignidade, personalidade e objetivos. Mostraram-me o valor dos estudos e me apoiaram em todas as minhas decisões na vida. Eu amo vocês... MUITO OBRIGADO!

A minha esposa, Juliana, minha companheira de todas as horas, meu ponto de equilíbrio. Seu carinho, dedicação à família e sua forma positiva de enfrentar as dificuldades da vida, foram incentivos determinantes para eu chegar até aqui.

Ao meu filho, Paulo Henrique. O tempo de nossa convivência “roubado” pela tese, só fez aumentar a vontade de estar com você.

A minha mãe, Maria Luiza, sem você, nada disso seria possível...

Ao meu pai, Paulo Roberto, a determinação em ver mais uma conquista do filho, serviram de incentivo e exemplo para mim.

Aos meus irmãos, Paula e Vinícius, meus companheiros de todas as horas.

Ao meu primo, Marlon, por me passar um pouco de seus conhecimentos.

Sem esta FAMÍLIA unida me ajudando, não chegaria a lugar nenhum!

À Dra Iolanda Tibério e Edna Leick, por me receberem no laboratório, me ensinar o verdadeiro papel de um pesquisador e me orientar no sentido literal da palavra.

Agradecimentos

A todas as pessoas que foram muito importantes no desenvolvimento deste projeto:

Agradeço a Profa. Dra. Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério pela orientação e por sempre ter acreditado em mim e no potencial desse Projeto de Pesquisa.

Ao Marlon de Brito e Edna Leick pela influência na execução do trabalho

Ao *staff* do LIM-20: Fernanda Arantes, Bruno Martins, Osmar Theodoro e Rafael dos Reis.

Ao pessoal do laboratório de Histologia e Histoquímica.

Aos meus companheiros alunos: Thales, Daniel.

Aos meus pais, por aguentar todo meu stress.

À minha mulher Juliana, por entender meus momentos de desespero.

Aos animais de experimentação, que são os maiores heróis da ciência. Sem eles nada disto teria acontecido.

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

Bolsa Mestrado nº. 2011/01165-8

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Sumário

1.0	Introdução	23
1.1	Aspectos gerais e epidemiológicos	24
1.2	Definição	27
1.3	Aspectos fisiopatológicos	29
1.4	Inibidores de proteinases	38
1.5	Modelos experimentais	43
2.0	Justificativa	45
2.1	Justificativas para estudo	46
3.0	Objetivos	47
3.1	Objetivo geral	48
3.2	Objetivos específicos	48
4.0	Materiais e métodos	50
4.1	Animais	51
4.2	Material vegetal	52
4.3	Indução do enfisema por elastase	52
4.4	Grupos experimentais	53
4.5	Avaliação da mecânica respiratória	55
4.6	Determinação do óxido nítrico (NO) exalado	57
4.7	Lavado bronco alveolar	57
4.8	Descarte de carcaças	58
4.9	Estudo histopatológico	58
4.9.1	Colorações	59
4.9.2	Análise Morfométrica	61
4.9.3	Análise do diâmetro alveolar médio (Lm)	62
4.10	Análise estatística	63
5.0	Resultados	64
5.1	Elastância do sistema respiratório (Ers)	65
5.2	Resistência do sistema respiratório (Rrs)	66
5.3	Resistência de vias aéreas (Raw)	67
5.4	Resistência de tecido pulmonar (Gtis)	68
5.5	Elastância do tecido pulmonar (Htis)	69

5.6	Óxido nítrico exalado (NOex)	70
5.7	Lavado Broncoalveolar: células totais	71
5.8	Lavado Broncoalveolar: macrófagos	72
5.9	Lavado broncoalveolar: neutrófilos	73
5.10	Lavado broncoalveolar: linfócitos	74
5.11	Lavado broncoalveolar: eosinófilos	75
5.12	Intercepto linear médio (Lm)	76
5.13	Avaliação do número de macrófagos no parênquima pulmonar	77
5.14	Avaliação da infiltração neutrofílica no parênquima pulmonar e nas vias aéreas	78
5.15	Avaliação do número de células positivas para TNF-α no parênquima pulmonar e nas vias aéreas	81
5.16	Proporções de volume de fibras colágenas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas	84
5.17	Proporções de volume de fibras elásticas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas	87
5.18	Avaliações de células MMP-9 positivas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas	90
5.19	Avaliações de células MMP-12 positivas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas	93
5.20	Avaliação do número de células TIMP-1 positivas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas	96
5.21	Avaliação de MUC-5 nas vias aéreas	99
5.22	Avaliação do número de células eNOS positivas no Parênquima Pulmonar e nas Vias Aéreas	101
5.23	Avaliação do número de células iNOS positivas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas	106
5.24	Avaliação da proporção de volume de isoprostano-8 no parênquima pulmonar e nas vias aéreas	107
6.0	Discussão	110
7.0	Conclusão	123
8.0	Referências bibliográficas	125

Lista de Abreviaturas

BbCI	<i>Bauhinia bauhinioides</i> Cruzipain Inhibitor
BrTI	<i>Bauhinia rufa</i> Trypsin Inhibitor
CAPPesq	Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa
CrataBL	<i>Crataeva tapia</i> Bark Lectin
DATASUS	Banco de Dados do Sistema Único de Saúde
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EcTI	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> Trypsin Inhibitor
ELA	Animais do grupo Elastase
eNOS	Oxido Nítrico Sintase endotelial
Ers	Elastância do Sistema Respiratório
Gtis	Resistência de tecido pulmonar
GRO- α	Oncogene Relacionado ao Crescimento de α
Htis	Elastância do Tecido Pulmonar
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
iNOS	Oxido Nítrico Sintase induzida
8-iso-PGF-2 α	Principal membro da classe F2-isoprostano
LBA	Lavado Broncoalveolar
Lm	Diâmetro Alveolar Médio
LTB4	Leucotrieno B4
MMP	Metaloproteinase de matriz
MUC	Mucina
NANC	neurotransmissor endógeno não adrenérgico não colinérgico
NO	Óxido Nítrico
NOA	Nitric Oxide Analyzer
NOex	Óxido Nítrico Exalado
Picro	Picrosírius
PMN	Polimorfonucleares
Ppb	partes por bilhão

Raw	Resistência de Vias Aéreas
RFO	Resorcina-fucsina oxidada
Rrs	Resistência do Sistema Respiratório
SAL	Animais do Grupo Controle que receberam salina
SBPT	Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia
SBTI	Simpósio Brasileiro de Tecnologia de Informação
Th2	Linfócitos T auxiliares CD4
TIMP-1	Inibidor Tecidual De Metaloproteinase Da Matriz
TNF α	Fator De Necrose Tumoral α
VEF1	Volume Expirado Forçado no Primeiro Segundo

Lista de Figuras

Figura 1.	Comparação da sequência de aminoácido da CrataBL com outros inibidores de proteinases	42
Figura 2.	Estrutura terciária da <i>Crataevea tapia</i> bark lectin-CrataBL	43
Figura 3.	Camundongos C57/Bl6	51
Figura 4	Injeção intraperitoneal do inibidor CrataBL	54
Figura 5	Mostra uma representação esquemática do protocolo estabelecido para o estudo	55
Figura 6	Aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (<i>FlexiVent</i> , Scireq, Montreal, Canadá)	56
Figura 7	280 NOA – Nitric Oxide Analyzer – Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, USA	57
Figura 8A	Posicionamento do retículo nas vias aéreas	62
Figura 8B	Posicionamento do retículo no parênquima pulmonar	62
Figura 9	Gráfico: Elastância do Sistema Respiratório (Ers)	65
Figura 10	Gráfico: Resistência do Sistema Respiratório (Rrs)	66
Figura 11	Gráfico: Resistência de Vias Aéreas (Raw)	67
Figura 12	Gráfico: Resistência de tecido pulmonar (Gtis)	68
Figura 13	Gráfico: Elastância do Tecido Pulmonar (Htis)	69
Figura 14	Gráfico: Óxido Nítrico Exalado (ENO)	70
Figura 15	Gráfico: Lavado Broncoalveolar: Células Totais	71
Figura 16	Gráfico: Lavado Broncoalveolar: Macrófagos	72
Figura 17	Gráfico: Lavado Broncoalveolar: Neutrófilos	73
Figura 18	Gráfico: Lavado Broncoalveolar: Linfócitos	74
Figura 19	Gráfico: Lavado Broncoalveolar: Eosinófilos	75
Figura 20A	Gráfico: Intercepto Linear Médio (Lm)	76
Figura 20B	Fotomicrografias do intercepto linear médio no parênquima pulmonar	76
Figura 21A	Gráfico: Células Macrófagos positivas no parênquima pulmonar	77
Figura 21B	Fotomicrografias de Células Macrófagos positivas no	

	parênquima pulmonar	77
Figura 22A	Gráfico: Células Neutrófilos positivas no parênquima pulmonar	79
Figura 22B	Fotomicrografias de Células Neutrófilos positivas no parênquima pulmonar	79
Figura 23A	Gráfico: Células Neutrófilos positivas nas vias aéreas	80
Figura 23B	Fotomicrografias de Células Neutrófilos positivas nas vias aéreas	80
Figura 24A	Gráfico: Células TNF- α positivas no parênquima pulmonar	82
Figura 24B	Fotomicrografias de Células TNF- α positivas no parênquima pulmonar	82
Figura 25A	Gráfico: Células TNF- α positivas nas vias aéreas	83
Figura 25B	Fotomicrografias de Células TNF- α positivas nas vias aéreas	83
Figura 26A	Gráfico: Conteúdo de Fibras Colágenas no parênquima pulmonar	85
Figura 26B	Fotomicrografias de Fibras Colágenas no parênquima pulmonar	85
Figura 27A	Gráfico: Conteúdo de Fibras Colágenas nas vias aéreas	86
Figura 27B	Foto micrografias de Fibras Colágenas nas vias aéreas	86
Figura 28A	Gráfico: Conteúdo de Fibras Elásticas no parênquima pulmonar	88
Figura 28B	Fotomicrografias de Fibras Elásticas no parênquima pulmonar	88
Figura 29A	Gráfico: Conteúdo de Fibras Elásticas nas vias aéreas	89
Figura 29B	Fotomicrografias de Fibras Elásticas nas vias aéreas	89
Figura 30A	Gráfico: Células MMP-9 positivas no parênquima pulmonar	91
Figura 30B	Fotomicrografias de Células MMP-9 positivas no parênquima pulmonar	91
Figura 31A	Gráfico: Células MMP-9 positivas nas vias aéreas	92
Figura 31B	Fotomicrografias de Células MMP-9 positivas nas vias	

	aéreas	92
Figura 32A	Gráfico: Células MMP-12 positivas no parênquima pulmonar	94
Figura 32B	Fotomicrografias de Células MMP-12 positivas no parênquima pulmonar	94
Figura 33A	Gráfico: Células MMP-12 positivas nas vias aéreas	95
Figura 33B	Fotomicrografias de Células MMP-12 positivas nas vias aéreas	95
Figura 34A	Células TIMP-1 positivas no parênquima pulmonar	97
Figura 34B	Fotomicrografias de Células TIMP-1 positivas no parênquima pulmonar	97
Figura 35A	Células TIMP-1 positivas nas vias aéreas	98
Figura 35B	Fotomicrografias de Células TIMP-1 positivas nas vias aéreas	98
Figura 36A	Células MUC-5 positivas nas vias aéreas	100
Figura 36B	Fotomicrografias de Células MUC-5 positivas nas vias aéreas	100
Figura 37A	Gráfico: Células eNOS positivas no parênquima pulmonar	101
Figura 37B	Fotomicrografias de Células eNOS positivas no parênquima pulmonar	101
Figura 38A	Gráfico: Células eNOS positivas nas vias aéreas	103
Figura 38B	Fotomicrografias de Células eNOS positivas nas vias aéreas	103
Figura 39A	Células iNOS positivas no parênquima pulmonar	105
Figura 39B	Fotomicrografias de Células iNOS positivas no parênquima pulmonar	105
Figura 40A	Células iNOS positivas nas vias aéreas	106
Figura 40B	Fotomicrografias de Células iNOS positivas nas vias aéreas	106
Figura 41A	Células Isoprostano 8PGF2 α positivas no parênquima pulmonar	108
Figura 41B	Fotomicrografias de Células Isoprostano 8PGF2 α	

	positivas no parênquima pulmonar	108
Figura 42A	Células Isoprostano 8PGF2 α positivas nas vias aéreas	109
Figura 42B	Fotomicrografias de Células Isoprostano 8PGF2 α positivas nas vias aéreas	109

Resumo

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

[dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;2014.

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a proteína bifuncional de planta, CrataBL, que tem lectina e as propriedades inibidoras de enzima, modula alterações de mecânica pulmonar, inflamatórias e remodelamento induzidas por elastase intratraqueal em camundongos. **Métodos:** 36 camundongos C57BL6 receberam elastase (0,025 mg) por instilação intratraqueal (grupo ELA e ELA-CrataBL). Os grupos controles receberam salina (grupo SAL e SAL-CrataBL). Os camundongos foram tratados com instilação intraperitoneal de CrataBL (2mg/kg) nos dias 1, 14 e 21 após a instilação intratraqueal de elastase (grupo SAL-CrataBL e ELA-CrataBL) os animais controle receberam salina no mesmo volume. No dia 28, os camundongos foram anestesiados, ventilados mecanicamente e foram analisados a resistência e elastância do sistema respiratório (Ers e Rrs), elastância e resistência tecidual (Htis e Gtis), resistência das vias aéreas (Raw) e óxido nítrico exalado (NOex). Após, o lavado broncoalveolar (LBA) foi realizado, os pulmões foram retirados e por morfometria, e foram quantificados o intercepto linear médio (Lm), a quantidade de neutrófilos, células positivas para TNF- α , fibras colágenas,

elásticas, células positivas para MMP-9, MMP-12, TIMP-1, eNOS e iNOS e isoprostano no parênquima pulmonar e vias aéreas. No parênquima foram avaliados os macrófagos nos septos alveolares e nas vias aéreas, foram também avaliadas as células para MUC-5. **Resultados:** No grupo ELA houve um aumento na Ers, Raw, Gtis, Htis, Lm, NOex, nas células totais, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos no LBA em relação aos controles ($p < 0,05$), sendo que Raw, diminuiu também nos grupos SAL-CrataBL e ELA-CrataBL. Nos grupos tratados com CrataBL houve uma diminuição de Ers ($37,0 \pm 2,2$ cmH₂O/L), Htis ($37,9 \pm 3,5$ cmH₂O/ml/s), E_{NO} ($14,7 \pm 0,7$ ppb), comparativamente ao grupo ELA ($p < 0,05$). No LBA houve atenuação de neutrófilos ($0,003 \pm 0,001$ 10^4 células/ml), linfócitos ($0,003 \pm 0,001$ 10^4 células/ml) e de Lm ($54,6 \pm 6,0$ mm). Complementando a avaliação, no grupo que recebeu elastase houve um aumento no número de macrófagos ($22,88 \pm 2,24$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), neutrófilos ($1,18 \pm 0,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), células positivas para TNF- α ($12,52 \pm 0,42$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) no parênquima pulmonar. Nas alterações de remodelamento no parênquima pulmonar, houve um aumento da proporção de volume de fibras colágenas ($11,5 \pm 0,11\%$), elásticas ($0,5 \pm 0,03\%$), na quantidade de células positivas para MMP-9 ($18,59 \pm 1,87$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), MMP-12 ($20,17 \pm 1,92$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), TIMP-1 ($14,42 \pm 2,05$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os controles ($p < 0,001$). No estresse oxidativo, houve um aumento de eNOS ($13,15 \pm 0,40$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), iNOS ($10,49 \pm 0,65$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e isoprostano ($18,11 \pm 5,38\%$). O tratamento CrataBL (grupo ELA-CrataBL) reduziu no parênquima pulmonar a quantidade de macrófagos ($9,58 \pm 1,36$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), neutrófilos ($0,75 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), células positivas para TNF- α ($10,4 \pm 0,49$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), fibras colágenas

($10,8 \pm 0,13\%$), elásticas ($0,3 \pm 0,02\%$), a quantidade de células positivas para a MMP-9 ($10,35 \pm 0,65$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), MMP-12 ($14,15 \pm 0,59$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), TIMP-1 ($9,89 \pm 2,79$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), MUC-5 ($3,56 \pm 0,54$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), eNOS ($6,98 \pm 0,32$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e iNOS ($6,21 \pm 0,42$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e isoprostano ($8,96 \pm 3,08 \%$) em relação ao grupo ELA ($p < 0,001$). Nas vias aéreas também ocorreu um aumento significativo de neutrófilos ($5,97 \pm 1,03$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), células positivas para TNF- α ($15,82 \pm 1,03$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$). Nas alterações de remodelamento pulmonar nas vias aéreas também ocorreu um aumento da proporção de volume de fibras colágenas ($8,73 \pm 2,59\%$), elásticas ($2,56 \pm 0,18\%$), na quantidade de células positivas para MMP-9 ($14,86 \pm 1,77$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), MMP-12 ($18,56 \pm 1,79$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), TIMP-1 ($1,31 \pm 0,12$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e MUC-5 ($7,09 \pm 1,71$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os controlos ($p < 0,001$). No estresse oxidativo, houve um aumento de células positivas para eNOS ($3,09 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), iNOS ($5,4 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e isoprostano ($18,11 \pm 5,38\%$) em comparação com os controlos ($p < 0,001$). O tratamento CrataBL (grupo ELA-CrataBL) reduziu nas vias aéreas a quantidade de neutrófilos ($4,62 \pm 0,61$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), TNF- α ($14,30 \pm 1,28$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), fibras colágenas ($7,80 \pm 1,37\%$), elásticas ($1,4 \pm 0,13\%$), a quantidade de células positivas para a MMP-9 ($9,93 \pm 1,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), MMP-12 ($12,06 \pm 1,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), TIMP-1 ($0,73 \pm 0,05$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), MUC-5 ($3,56 \pm 0,54$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), eNOS ($1,89 \pm 0,16$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e iNOS ($4,3 \pm 0,31$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), isoprostano ($7,34 \pm 2,31\%$) em relação ao grupo ELA ($p < 0,001$). **Conclusão:** CrataBL atenua as alterações de mecânica pulmonar, lavado bronco alveolar, responsividade

inflamatória, controle do remodelamento e estresse oxidativo induzidas pela elastase. Embora mais estudos devam ser realizados, esta proteína bifuncional pode contribuir como potencial ferramenta terapêutica para o tratamento da DPOC.

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

Summary

OLIVA LV. Effect of vegetable proteinase inhibitor, CrataBL, on lung injury induced by elastase in mice C57/Bl6. [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, in 2014.

The aim of this study was to evaluate whether the bifunctional protein plant, CrataBL, which has lectin and enzyme inhibitory properties, modulates changes in lung mechanics, inflammatory and remodeling induced by intratracheal elastase in mice. **Methods** : 36 C57/Bl6 mice received elastase (0.025 mg) by intratracheal (group ELA and ELA-CrataBL). Control groups received saline (group SAL and SAL-CrataBL). The mice were treated with intraperitoneal instillation of CrataBL (2mg/kg) on days 1, 14 and 21 after intratracheal instillation of elastase (group SAL-CrataBL and ELA-CrataBL), control animals received saline in the same volume. On day 28, the mice were anesthetized and mechanically ventilated were analyzed resistance and respiratory system elastance (Ers and Rrs), elastance and tissue resistance (Htis and Gtis), airway resistance (Raw) and exhaled nitric oxide (ENO). After the bronchoalveolar lavage (BAL) was performed, the lungs were removed and morphometry were quantified and the linear intercept mean (Lm), the number of neutrophils, positive cells for TNF- α , collagen fibers, positive cells for MMP-9, MMP-12, TIMP-1, eNOS, iNOS and isoprostane in lung parenchyma and airways. Parenchyma was also evaluated macrophages in the alveolar septa. Airway

was also evaluated MUC-5 cells. **Results:** In group ELA was an increase in Ers, Raw, Gtis, Htis, Lm, ENO, in total cells, macrophages, neutrophils, eosinophils and lymphocytes in BAL compared to controls ($p<0.05$), and Raw, decreased in both groups SAL-CrataBL and ELA-CrataBL. In the groups treated with CrataBL there was a decrease in Ers (37.0 ± 2.2 cmH₂O/L) Htis (37.9 ± 3.5 cmH₂O/ml/s) and ENO (14.7 ± 0.7 ppb) compared to the ELA group ($p<0.05$). In BAL there was attenuation of neutrophils (0.003 ± 0.001 10^4 cells/ml), lymphocytes (0.003 ± 0.001 10^4 cells/ml) and Lm (54.6 ± 6.0 mm). Complementing the assessment, the group that received elastase was an increase in the number of macrophages (22.88 ± 2.24 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$), neutrophils (1.18 ± 0.15 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$), positive TNF- α cells (12.52 ± 0.42 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$) in the lung parenchyma. In remodeling changes in lung parenchyma, there was an increase in the volume ratio of collagen fibers ($11.5\pm0.11\%$), elastic ($0.5\pm0.03\%$), the number of positive MMP-9 cells (18.59 ± 1.87 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$), MMP-12 (20.17 ± 1.92 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$) TIMP-1 (14.42 ± 2.05 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$) compared to controls ($p<0.001$). Oxidative stress, was an increased of eNOS (13.15 ± 0.40 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$), iNOS (10.49 ± 0.65 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$) and isoprostane ($18.11\pm5.38\%$). Treatment CrataBL (ELA-CrataBL group) reduced the amount of parenchymal lung macrophages (9.58 ± 1.36 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$), neutrophils (0.75 ± 0.1 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$), positive TNF- α cells (10.4 ± 0.49 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$), collagen ($10.8\pm0.13\%$), elastic ($0.3\pm0.02\%$), the number of positive MMP-9 cells (10.35 ± 0.65 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$), MMP-12 (14.15 ± 0.59 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$), TIMP-1 (9.89 ± 2.79 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$) MUC-5 (3.56 ± 0.54 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$), eNOS (6.98 ± 0.32 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$) and iNOS (6.21 ± 0.42 cells/ $10^4\mu\text{m}^2$) and isoprostane ($8.96\pm3.08\%$) compared to group ELA ($p<0.001$). Airway was also a significant increase in

neutrophils (5.97 ± 1.03 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), positive TNF- α cells (15.82 ± 1.03 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$). Changes in lung airway remodeling also occurred an increase in the volume ratio of collagen fibers ($8.73 \pm 2.59\%$), elastic ($2.56 \pm 0.18\%$), the number of positive MMP-9 cells (14.86 ± 1.77 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), MMP-12 (18.56 ± 1.79 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) TIMP-1 (1.31 ± 0.12 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) and MUC-5 (7.09 ± 1.71 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) compared to controls ($p < 0.001$). Oxidative stress, an increase of eNOS (3.09 ± 0.08 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), iNOS (5.4 ± 0.3 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) and isoprostane ($18.11 \pm 5.38\%$) compared to controls ($p < 0.001$). Treatment CrataBL (ELA-CrataBL group) reduced the amount airway neutrophils (4.62 ± 0.61 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), TNF- α (14.30 ± 1.28 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), collagen fibers ($7.80 \pm 1.37\%$), elastic ($1.4 \pm 0.13\%$), the number of positive MMP-9 cells (9.93 ± 1.39 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), MMP-12 (12.06 ± 1.15), TIMP-1 (0.73 ± 0.05 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), MUC-5 (3.56 ± 0.54 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), eNOS (1.89 ± 0.16 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) and iNOS (4.3 ± 0.31 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), isoprostane ($7.34 \pm 2.31\%$) compared to group ELA ($p < 0.001$).

Conclusion: CrataBL attenuates changes in lung mechanics, broncho alveolar inflammatory responsiveness, control remodeling and oxidative stress induced by elastase. Although more studies should be conducted, this bifunctional protein may contribute as a potential therapeutic tool for the treatment of COPD.

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

INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais e Epidemiológicos

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é caracterizada pelo lento e progressivo desenvolvimento de limitação ao fluxo aéreo não reversível e está associada a uma resposta inflamatória anormal a partículas ou gases tóxicos causando variadas alterações patológicas no tecido pulmonar. Pode-se associar a varias comorbidades que contribuem significativamente para a gravidade da doença (GOLD, 2013). As partículas geradas pelo fumo do tabaco são das fontes mais frequentes de estabelecimento da DPOC (Simpson *et al.*, 2010; GOLD, 2013).

Atualmente a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que até o ano de 2020 a DPOC seja a doença mundialmente mais prevalente e, conforme GOLD - *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease* (2005), a quinta causa de morte no mundo.

Indivíduos diagnosticados como portadores de DPOC comumente apresentam associações em proporções variáveis de bronquite crônica e enfisema pulmonar. A definição da predominância de uma ou de outra é extremamente variável e difícil de quantificar “in vivo”. O enfisema é caracterizado como um distúrbio do pulmão no qual ocorre aumento permanente dos espaços aéreos terminais devido à destruição das paredes alveolares (Barnes *et al.*, 2003; GOLD, 2013).

O diagnóstico da DPOC baseia-se em sinais e sintomas relacionados com a doença e é confirmado pelo teste de espirometria. As determinações de características clínicas presentes em um indivíduo ajudam a definir condutas apropriadas. Nos estágios iniciais da doença muitos indivíduos podem apresentar pouco ou nenhum sintoma e conforme a doença progride, os sintomas variam de indivíduo para indivíduo. Assim, a DPOC pode ser diagnosticada em qualquer fase da doença. Os sintomas característicos são tosse, produção de catarro, dispnéia aos esforços e sibilância (GOLD, 2013).

O diagnóstico de DPOC exige testes de função pulmonar. As estratégias de manejo importantes são a cessação do tabagismo, vacinação, reabilitação e terapia com drogas broncodilatadores, fundamentalmente por inalação. Alguns pacientes, no entanto, passam a exigir terapia de longo prazo com oxigênio ou mesmo o transplante de pulmão (Rabe *et al.*, 2007, GOLD, 2013).

O fator de risco associado à DPOC mais encontrado é a exposição à fumaça de cigarro (GOLD, 2013). A contribuição do tabagismo para o desenvolvimento de DPOC foi estimada de 70% a 80% para os homens e 70% para as mulheres (Torres e Godoy, 2004). Entretanto, em muitos países, a poluição do ar resultante da queima de madeira e de combustíveis de biomassa, também foi identificada como um fator de risco para a DPOC. Outro fator de risco é a deficiência de α 1- antitripsina (GOLD, 2013).

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

A poluição do ar interno (em ambiente fechado) proveniente da queima de combustíveis de biomassa para o aquecimento ou cozimento em ambientes mal ventilados tem sido apontada como fator de risco para o desenvolvimento de DPOC (GOLD, 2013; Amoli, 1998; Dennis *et al.*, 1996).

O número de óbitos devido à DPOC cresce vertiginosamente (GOLD, 2013). Foi classificada como a sexta maior causa de morte em 1990 e está projetada para ser a quarta principal causa de morte no mundo em 2030, devido ao aumento nas taxas de fumantes e às mudanças demográficas em muitos países (Mathers *et al.*, 2006). Evidentemente, por ser a terceira principal causa de morte nos EUA (Hazem, 2009) e pelo alto ônus econômico, devido aos custos dos cuidados de saúde e perda de produtividade, essa doença tem sido bastante estudada, sendo importante a busca de medicamentos ou biomarcadores para o diagnóstico precoce (Kitaguchi, 2006).

No Brasil, estima-se que entre 3 e 7 milhões de brasileiros tenham DPOC. Segundo dados do DATASUS, a DPOC gerou no ano de 2010, no Sistema Nacional de Saúde Pública, 141.994 hospitalizações que levaram a 778.428 dias de internação. O custo total dessas internações foi de R\$ 92.434.415,51 e 7.937 mortes diretamente relacionadas com a DPOC. Segundo a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT), a prevalência de DPOC no Brasil é de 15,8% em adultos acima de 40 anos. (www.datasus.com.br – 26/09/2012, 18:30 horas).

A DPOC está associada com custos elevados. Na União Européia, os custos diretos totais com as doenças respiratórias são estimados em 6% dos custos totais com saúde, sendo que a DPOC representa 56% destes gastos (38,6 bilhões de euros). Nos Estados Unidos, os custos diretos com a DPOC

são de 29,5 bilhões e os custos indiretos da ordem de 20,4 bilhões. A exacerbação é responsável por grande parte destes custos, desta forma, existe uma relação forte entre a gravidade do DPOC e os custos do atendimento (GOLD, 2013).

Nos países em desenvolvimento, os custos médicos diretos podem ser menos importantes que o impacto da doença na produtividade do indivíduo nos trabalhos profissionais e domésticos. Isto porque o sistema de saúde pode não fornecer os cuidados necessários para os pacientes, desta forma economizando recursos públicos diretos. No entanto, isto causa a interrupção prolongada das atividades diárias dos indivíduos bem como dos familiares que terão de cuidar destes pacientes (GOLD, 2013).

No Projeto Latino-americano de Investigação de Enfermidade Obstrutiva Crônica, chamado de Projeto Platino, coordenado pela Associação Latino-Americana de Tórax no Brasil, no ano de 2003, São Paulo foi à cidade escolhida com uma prevalência de 15,8% de DPOC, segundo os dados espirométricos (Menezes, 2004).

1.2 Definição

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma enfermidade respiratória previnível e tratável. Caracteriza-se pela presença de obstrução crônica do fluxo aéreo, que não é totalmente reversível, após uso de bronco dilatador. Esta obstrução é, geralmente, progressiva e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões e à inalação de partículas e gases tóxicos, causada primeiramente pelo tabagismo. Embora a DPOC comprometa

os pulmões, também produz consequências sistêmicas significativas. O processo inflamatório crônico pode produzir alterações dos brônquios (bronquite crônica), bronquíolos (bronquite obstrutiva) e parênquima pulmonar (enfisema pulmonar). A predominância destas alterações é variável em cada indivíduo, tendo relação com os sintomas apresentados (GOLD, 2013).

A conscientização que a DPOC é uma doença tratável é um dos marcos desta definição. Até recentemente, mesmo entre alguns especialistas na área, tinha-se a ideia errônea de que não há nada a se fazer pelos pacientes com esta enfermidade. O conceito incluído na definição como uma doença sistêmica indica claramente os caminhos para o tratamento do paciente. É preciso ressaltar que apesar dos sinais e sintomas, achados fisiológicos e patológicos da enfermidade, são raros aqueles pacientes para os quais não conseguimos intervir positivamente. Finalmente, a definição de DPOC ressalta que esta é uma doença inflamatória (Jardim *et al.*, 2005, GOLD, 2013).

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

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

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

outro lado, têm tendência à obesidade, são dispneicos, cianóticos, com sinais de insuficiência cardíaca direta (Friedman, 2008).

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

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

Dentre os sinais e sintomas do enfisema temos: dispneia, tosse, expiração prolongada, inatividade física, uso dos músculos respiratórios acessórios e hiperinsuflação. Os sons respiratórios estão diminuídos devido a presença de hiperinsuflação, mas os sons adventícios com sibilos e estertores não são frequentes. O paciente frequentemente assume uma postura sentada, fletida e sobre os braços para possibilitar maior vantagem mecânica para os músculos inspiratórios acessórios (Nazário, 2003).

1.3 Aspectos Fisiopatológicos

O processo inflamatório crônico das vias aéreas é uma característica muito relevante na fisiopatologia da DPOC (Barnes *et al.*, 2003, GOLD, 2013). A inflamação crônica causa mudanças estruturais e diminuição da luz

brônquica. A destruição do parênquima pulmonar leva à perda do acoplamento alveolar nas pequenas vias aéreas e diminui o recolhimento elástico do pulmão. Estas alterações diminuem a possibilidade das vias aéreas de se manterem abertas durante a expiração (Barnes *et al.*, 2003; GOLD, 2013).

É importante ressaltar que o processo inflamatório crônico pulmonar nos portadores de DPOC por tabagismo não cessa após a interrupção do fumo (Lapperre e Postma, 2006). A inflamação acomete grandes e pequenas vias aéreas, onde encontramos hiperplasia de células caliciformes e aumento de glândulas mucosas, além de ocorrer infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos CD8+ nas grandes vias aéreas, principalmente nas fases mais avançadas da DPOC. O infiltrado inflamatório também é encontrado nas vias aéreas menores, com predomínio de macrófagos nas fases iniciais da doença (Shapiro *et al.*, 2005).

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

A destruição do tecido pulmonar é decorrente do desequilíbrio entre os sistemas de proteinases e antiproteinases. Evidências apoiam a hipótese que a inalação da fumaça de cigarro induz um aumento no número de neutrófilos e macrófagos, os quais liberam enzimas como as catepsinas B, K, L e S, elastase neutrofílica, proteinase 3, metaloproteinase de matriz (MMP) 9 e 12 (Fischer *et al.*, 2011). Estas enzimas não são totalmente inibidas pelas antiproteinases, levando à destruição do tecido conectivo pulmonar (Macnee *et al.*, 2005; Churg *et al.*, 2005, GOLD, 2013).

Alguns fatores quimiotáticos para neutrófilos são encontrados nos pulmões de indivíduos expostos ao cigarro tais como: leucotrieno B₄ (LTB₄), oncogene relacionado ao crescimento de α (GRO- α) e peptídeo epitelial ativador de neutrófilo (ENA78) (Thompson *et al.*, 1989; Bosken *et al.*, 1992; Kuschner *et al.*, 1996). Cabe ressaltar que as células mais encontradas no lavado bronco alveolar em pacientes com DPOC são macrófagos, sugerindo que estas células são fundamentais no desenvolvimento da doença. Os macrófagos ativados por substâncias presentes na fumaça dos cigarros liberam, LTB₄, fator de necrose tumoral α (TNF- α), peptídeo quimiotático para monócitos (MCP1), e também, elastase, catepsinas B, K, L e S, MMP-2, 9 e 12, que atuam como efetores e mediadores de lesão pulmonar (Shapiro *et al.*, 2003).

O remodelamento brônquico é caracterizado pelo aumento de deposição de proteínas de matriz extracelular nas vias aéreas, o que ocasiona a fibrose subepitelial, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, bem como a hiperplasia das glândulas submucosas, o que leva a um espessamento da parede brônquica e menor calibre brônquico. Tais alterações também são observadas em pacientes bronquíticos e em estudos experimentais, sugerindo que o remodelamento brônquico é devido à liberação de diversos fatores inflamatórios, de crescimento celular e de liberação de citosinas (Johnson e Knox, 1997, Vieira *et al.*, 2007). Assim, concluem que a melhor compreensão da fisiopatologia da DPOC e o seu adequado tratamento estão entre as estratégias preventivas da doença.

A participação de proteinases na fisiopatologia do enfisema é vastamente aceito (Churg, 2005). Porém, ainda são focos de discussão quais

são as principais proteinases e as funções específicas para o desenvolvimento e progressão do enfisema. Alguns autores sugerem que as proteinases das classes serino, cisteíno e metalo são mais envolvidas na patogênese da DPOC (Churg e Wright, 2005; Owen, 2004).

A elastase neutrofílica, proteinase 3 e catepsina G são serino proteinases armazenadas por células polimorfonucleares (PMN) e monócitos, e liberadas quando mediadores pró-inflamatórios induzem a desgranulação, podendo causar destruição do parênquima pulmonar e a produção de muco (Owen, 2004). As cisteíno proteinases representadas pelas catepsinas S, B e L, e serino proteinases representada pela elastase contribuem para a degradação da matriz extracelular mediada por macrófagos. As metalo proteinases representadas pelas MMP1, 2, 9, 14 e ADAM, além de promover a degradação de colágeno e elastina também aumentam a expressão epitelial de Muc5 (Deshmukh, 2005; Owen, 2004).

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

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

São fundamentalmente enzimas extracelulares, excetuando-se MMPs do tipo membrana (MT-MMPs) que são secretadas como pró-enzimas. A expressão das MMPs geralmente é regulada durante a transcrição por fatores de crescimento, hormônios, citocinas e transformação celular. Já atividade é controlada pela regulação da transcrição, ativação de seus precursores e inibição por inibidores endógenos, α -macroglobulina e pelos inibidores teciduais específicos de metalo proteinases (TIMPs). Baseando-se na sequência, especificidade do substrato, similaridade, e organização do domínio, as MMPs de vertebrados foram divididas nos seguintes grupos: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, MMPs tipo-membrana e outras MMPs (Amalinei *et al.*, 2010).

As MMPs, em conjunto com cisteíno proteinases, aspártico proteinases e serino proteinases são capazes de degradar componentes da matriz extracelular (MEC) e da membrana basal (MB). Estas estão envolvidas na adesão, mobilização, celular e regulação do processo de apoptose e podem ativar outras proteinases. Atuando em diversos processos fisiológicos, como reparo do tecido, ovulação, embriogênese e menstruação. Em condições

patológicas, agem principalmente na destruição dos tecidos, promovendo a invasão tumoral e metástase, na fibrose, na DPOC, relaciona, por exemplo, vários tipos de esclerose, além do enfraquecimento da matriz, tal como na cardiomiopatia dilatada e aneurisma da aorta (Koks *et al.*, 2000; Amalinei *et al.*, 2010).

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

Há pelo menos 23 tipos de metalo proteinases implicadas em muitos processos fisiológicos e patológicos, sendo que na asma as MMPs 2, 8, 9, 12 e inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz (TIMP-1) são os principais envolvidos (Cataldo *et al.*, 2003).

O excesso de TIMP-1 sobre a MMP-9 pode interferir com o tráfego celular e reparo tecidual, e também pode contribuir para aumento na deposição de matriz extracelular e fibrose pela inibição da MMP-9.

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

deficiência de alfa-1 antitripsina desenvolveram enfisema de início precoce (Laurell e Eriksson, 1963).

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

As elastases são enzimas com capacidade de degradação da elastina. Esta apresenta um papel mecânico e estrutural muito importante em tecidos elástico como o pulmão, vasos sanguíneos e pele (Lee and Downey 2001; Shapiro *et al.*, 2002). Estes são muito similares entre si e com outras serino proteinases , por exemplo, a elastase de leucócitos apresenta 43% de similaridade da estrutura primária com a elastase pancreática de porco, 39% com a calicreína pancreática de porco e 37% com a catepsina G, além de apresentar similaridade, em menor proporção, com a elastase de outros animais (Morrison *et al.*, 1999).

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

O NO tem sido bem descrito como um neurotransmissor endógeno não adrenérgico não colinérgico (NANC) em vias aéreas responsáveis pela modulação do tônus bronquial (Barnes *et al.*, 1996), tônus vascular e exudação plasmática tanto em modelo animal quanto em humanos. A partir da L-arginina ocorre síntese do óxido nítrico (Moncada *et al.*, 1991) por intermédio da ação das isoformas óxido nítrico sintases (NOS) constitutivas (Bredt *et al.*, 1990; Lamas *et al.*, 1992) ou induzidas (Prado *et al.*, 2011)

As enzimas NOS apresentam três isoformas, sendo duas constitutivas e uma induzida. A enzima constitutiva pode estar expressa nas células endoteliais (Lamas *et al.*, 1992) ou nos neurônios (Bredt *et al.*, 1990), sendo denominada eNOS e nNOS, respectivamente. A forma induzida (iNOS) pode estar expressa em uma variedade de tecidos e órgãos e também no endotélio vascular. Sua produção é estimulada pelo lipopolissacarídeo bacteriano ou por algumas citocinas como o TNF- α , IL-1 e IFN- γ (Moncada *et al.*, 1991, Moncada e Higgs, 1993). É responsável pela produção de quantidades nanomolares de NO e parece estar presente principalmente em condições patológicas (Prado *et al.*, 2009).

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

plasma, aumento da secreção do muco e ativação indireta de células Th2 (Prado *et al.*, 2009).

Resultados de nosso grupo de pesquisa demonstraram uma importante participação do óxido nítrico em modelo experimental de asma (Prado *et al.*, 2005, 2011). Prado *et al.*, (2005) demonstraram que existe um aumento da expressão de iNOS em células linfomononucleares e eosinófilos presente nas vias aéreas distais de animais sensibilizados. Além disso, ainda observaram que a isoforma nNOS, embora constitutiva, encontra-se presente em células inflamatórias (linfomononucleares e eosinófilos) e o número de células que expressam esta isoforma é maior nos animais sensibilizados com ovoalbumina (Prado *et al.*, 2005).

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

O potente oxidante peroxinitrito é formado por meio da interação do óxido nítrico e superóxido por uma rápida reação iso-estequiométrica (Muijers *et al.*, 1997; Pryor e Squadrito, 1995). A formação de peroxinitrito leva a peroxidação e a geração de isoprostanos e, dentre eles o PGF₂α (Wood *et al.*, 2003). Embora estudos prévios avaliassem os efeitos do PGE₂, outro representante da família dos isoprostanos, e demonstrassem um efeito mais

potente como constritor do que um PGF2 α . Este último isoprostano é considerado a forma predominantemente gerada durante a ativação da via do estresse oxidativo (Montuschi *et al.*, 1999a). Jourdan *et al.*, em 1997 mostraram que o tratamento com L-NAME é capaz de quase abolir a produção de PGF2 α .

Os isoprostanos, particularmente o PGF2 α , têm sido considerados como marcadores viáveis da injúria oxidante *in vivo* (Mehrabi *et al.*, 2001; Mallat *et al.*, 1998) e a sua produção está associada à potencialização da obstrução brônquica e alteração de permeabilidade vascular e formação de edema em cobaias (Collins *et al.*, 1999).

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

1.4 Inibidores de Proteinases

Os inibidores são compostos de origem vegetal, animal ou sintéticos que bloqueiam a hidrólise por uma enzima de um determinado substrato. Inibidores de natureza proteica são capazes de produzir complexos com enzimas sendo assim capazes de inibir competitivamente as atividades catalíticas (Richardson, 1991). Atuam em um grupo específico de enzimas, sendo os inibidores de cisteíno proteinases, serino proteinases, metalo proteinases, aspártico proteinases e os multifuncionais que têm a capacidade de inibir diferentes classes de enzimas ao mesmo tempo (Richardson, 1991).

A inibição destas, por inibidores proteicos, ocorre por uma ligação específica e restrita ao sítio reativo. Esta inibição pode ser de dois tipos: reversível ou irreversível (Bode e Huber, 2000).

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

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, que interagem com carboidratos através de, no mínimo, dois sítios de ligação, aglutinando células animais e/ou vegetais, precipitando polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos, sem causar modificações em suas estruturas. Esta concepção permitiu estabelecer um método de detecção da presença de lectina em uma amostra a partir do ensaio de hemaglutinação, utilizando eritrócitos de diferentes espécies de animais, onde estas interagem com os eritrócitos, através de seus sítios de ligação, formando diversas ligações reversíveis (Oliveira *et al.*, 2008). As lectinas podem ser específicas para

eritrócitos de diferentes origem animal ou tipagem ou podem ser não específicas para grupos sanguíneos. A presença de lectinas numa amostra é confirmada por ensaios de inibição de sua hemaglutinação na presença de carboidrato(s) em solução (Oliveira *et al.*, 2008).

As lectinas apresentam diversas propriedades biológicas, incluindo atividade antibacteriana (Rittidach *et al.*, 2007), antifúngica (Yang *et al.*, 2001), mitogênica (Zheng *et al.*, 2007), inseticida (Coelho *et al.*, 2007) e antitumoral (Liu *et al.*, 2008, 2009, 2010).

Recentemente (2013), no laboratório da Profa. Dra. Maria Luiza V. Oliva, do Departamento de Bioquímica da UNIFESP/EPM foi caracterizada a estrutura uma proteína descrita inicialmente como lectina, denominada CrataBL, (*Crataeva tapia* Bark Lectin). Os estudos demonstraram que trata-se de uma glicoproteína e, além da atividade lectínica, é capaz de inibir serino proteinases e de se ligar à heparina.

Crataeva tapia Linn. ssp. odora (Jacob.) Almeida (Syn.C. var religiosa. nurvala Hook. f.), é uma pequena e muito ramificada árvore originária do sul da Índia, pertencente à família *Capparidaceae*. O extrato de sua casca é usado popularmente para o tratamento de diabetes, dor de estômago e febre (Sharon *et al.*, 2001).

Os estudos farmacológicos com a casca da raiz e casca do caule de *C. tapia*, e têm confirmado os seus efeitos benéficos no apoio à gestão dos distúrbios urinários, incluindo urolitíase e revelou seus potenciais benefícios na diminuição de processos inflamatórios, tais como a artrite (Sharon *et al.*, 2001). E por isso, dele foi produzido o inibidor CrataBL que inicialmente foi denominado como sendo uma lectina (Ferreira *et al.*, 2013).

A atividade lectínica de *Crataeva tapia* é inibida pelos açúcares galactose e manose e pela glicoproteína ovoalbumina. CrataBL aglutina eritrócitos de humanos, galinha e coelho e sua atividade hemaglutinante não foi alterada após adição de Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} (Araújo *et al.*, 2011).

A estrutura primária (*Figura 1*) da CrataBL foi determinada recentemente (2013), bem como sua estrutura terciária (*Figura 2*). Ambas confirmaram a similaridade estrutural com membros da família Kunitz de inibidores de proteinases, apresentado os mesmos resíduos de aminoácidos em posição conservadas, inclusive as pontes disulfetos. A sua estrutura terciária apresenta predominantemente folhas beta, como é a característica dos inibidores de proteinase da família Kunitz de planta (Neuhof *et al.*, 2003). A função inibidora de CrataBL foi confirmada pela inibição nas atividades das serino proteinases tripsina ($K_i=42 \mu\text{M}$) e Fator Xa ($8,2 \mu\text{M}$) (Ferreira *et al.*, 2013).

Não interfere na atividade de calicreína plasmática humana, calicreína plasmática porcina, elastase de neutrófilo humano, papaína, plasmina e quimotripsina. Ainda, os estudos mostraram que a CrataBL liga-se a glicosaminoglicanos (Ferreira *et al.*, 2013), que são compostos negativos ligados à superfície das células (Lindahl *et al.*, 1978; Nader *et al.*, 2004).

A heparina, além da propriedade anti coagulante, por amplificar a ação do inibidor de trombina (Walenga *et al.*, 2005), também modula a atividade de proteinases, principalmente catepsinas (Almeida *et al.*, 2001). As catepsinas podem ativar a pro-uroquinase que irão ativar o plasminogênio formando plasmina. Essa enzima, por sua vez, pode ativar metalo proteinases, principalmente a MMP-2 e MMP-9. A plasmina também pode ativar a elastase que ativa metalo proteinases e mais catepsinas. Desta forma, a heparina tem

Figura 1. Comparação da sequência de aminoácido da CrataBL com outros inibidores de proteinases. BvTI- *Bauhinia variegata* Trypsin Inhibitor ; BuXI- *Bauhinia unguolata* factor-Xa Inhibitor (Oliva *et al.*, 2003); EcTI- *Enterolobium contortisiliquum* Trypsin Inhibitor (Batista *et al.*, 1996); DrTI- *Delonix regia* Trypsin Inhibitor (Pando, *et al.*, 2001); BrTI-*Bauhinia rufa* Trypsin Inhibitor (Nakahata, *et al.*, 2006); BbCI- *Bauhinia bauhinioides* Cruzipain Inhibitor (de Oliveira, *et al.*, 2001); BbKI- *Bauhinia bauhinioides* Kallikrein Inhibitor (Oliva *et al.*, 2001). Os resíduos de cisteína estão destacados em cinza e os aminoácidos altamente conservados estão mostrados em preto. Os sítios de glicosilação estão indicados com asteriscos.

Figura 2. Estrutura terciária da *Crataeva tapia* Bark Lectin - CrataBL (Ferreira *et al.*, 2013)

1.5 Modelos experimentais

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

Tsuyuki *et al.*, (1997) testaram a efetividade da via nasal instilando azul de Evans em camundongos, e observaram que 75% do total instilado encontrava-se na via aérea e não havia corante no trato digestório (Tsuyuki S, 1997). Eyles *et al.*, (1999), também testaram a efetividade da instilação nasal,

utilizando esferas marcadas com material radioativo e observaram 48% do volume total no pulmão após 15 minutos da instilação. Porém, Takafuji *et.al.* (1987) encontraram apenas 19% do total de ovoalbumina misturada com partículas de diesel, mostrando que o modelo de instilação nasal pode ter grande variação.

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

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

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

Justificativa

2.1 Justificativas para o Estudo

A DPOC é hoje uma doença de grande importância em termos de saúde da população mundial. Dados epidemiológicos comprovam a ascendência do número de óbitos causados pela DPOC, com um aumento de 340% no período de 20 anos (GOLD, 2013). As causas da DPOC ainda não estão completamente elucidadas, mas as evidências apontam para a importância da teoria da proteinase-antiproteinase como um dos principais mecanismos fisiopatológicos. Neste sentido, torna-se necessário, a utilização de modelos experimentais de inflamação pulmonar para que possam ser utilizados na busca de novas drogas para o estudo da importância da inibição deste mecanismo no controle da lesão pulmonar. Como descrito anteriormente, a utilização do extrato de CrataBL na investigação fisiopatológica experimental da DPOC se apoia na teoria do controle de eventos desencadeados por proteinases, podendo alterar o desenvolvimento das lesões pulmonares causadas pela elastase. Ainda, a CrataBL é capaz de neutralizar os efeitos da heparina, além de inibir a atividade de algumas serino proteinases e, por isso, procuramos investigar o seu efeito em modelo onde a atividade proteolítica tem função importante.

Objetivos

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

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

3.2 Objetivos Específicos

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

- Conteúdo de fibras elásticas e colágenas;
- A expressão de metalo proteinases 9 e 12 e TIMP1;
- Expressão de MUC-5
- Expressão de iNOS, eNOS e isoprostano PGF2- α ;

Materiais e Métodos

4.0 Materiais e Métodos

4.1 Animais

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo CAPPesq número 2011/01165-8). Os animais foram manejados de acordo com as orientações para cuidados com animais de laboratório (NIH, 2002).

Foram utilizados 36 camundongos C57/Bl6, machos, adultos jovens, obtidos do biotério central da Faculdade de Medicina da USP (*Figura 3*). Houve 4 perdas durante os procedimentos de instilação intratraqueal. Os animais tinham 6 a 8 semanas de vida ao saírem do biotério central e passaram por um período de ambientação no biotério do laboratório por 2 semanas.

Figura 3. Camundongos C57/Bl6

4.2 Material Vegetal

A lectina CrataBL foi purificada no laboratório de Bioquímica da UNIFESP, em colaboração com a Profa. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva. A concentração da lectina/inibidor utilizada foi determinada através da dosagem de Lowry para quantificação de proteína e a dose utilizada (2mg/Kg) foi a mesma que a do inibidor de elastase BbCl, outro inibidor de proteinase que está sendo utilizado pelo grupo, para comparação da eficácia de ação.

4.3 Indução do Enfisema por Elastase

Os animais foram anestesiados com isoflurano, a região foi depilada e desinfetada com povidine. Foi realizada uma incisão de aproximadamente 0,5 cm na região do pescoço do animal para expor a traqueia, e foi injetado única dose de 0,025mg de Elastase Porcina Pancreática (E- 1250 - 100 mg, Elastase, Solução pancreática, tipo pâncreas de porco, 2x cristalizado solução aquosa, contém ~ 0,01% timol 14,29mL, 7mg proteína/ 5,2 unidade/mg proteína, Sigma, Califórnia, EUA), volume de 50 µL diretamente na traqueia através de uma seringa de 30 unidades entre os anéis cartilagosos. Após a instilação foi realizada um massagem no tórax do animal, para espalhar melhor a elastase, e posteriormente a este procedimento o animal foi suturado na incisão e novamente foi aplicado o povidine para desinfetar os pontos.

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

4.4 Grupos Experimentais

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

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

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

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

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

Figura 4. Descrição do Protocolo Experimental.

Figura 5. Foto da aplicação intraperitoneal de *CrataBL*.

4.5 Avaliação da Mecânica Pulmonar

Após os 28 dias dos procedimentos iniciais, os animais foram anestesiados com tiopental (250 mg/kg intraperitoneal) e traqueostomizados. Uma cânula de plástico (20 gauge, BD, MG, Brasil) foi inserida pelo orifício da traqueostomia, que foi fixada com fio de algodão ao redor da traqueia. Os animais foram conectados a um aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (*FlexiVent*, Scireq, Montreal, Canadá) e ventilados com volume corrente de 10 mL/Kg, frequência respiratória de 120 ciclos/min e curva de fluxo inspiratório senoidal (*Figura 6*). Para abolir seu esforço respiratório, os animais receberam pancurônio (0,2 mg/kg intraperitoneal). Quando não havia mais movimentação do animal, os dados para o cálculo da mecânica pulmonar foram registrados. Para tanto, utilizamos um sinal que produzia oscilações do fluxo aéreo com diferentes frequências primas (0,25 a

19,625) por 16 segundos, mantendo-se a válvula expiratória fechada. Os valores de pressão gerados foram obtidos e a impedância de via aérea (Pressão/Fluxo) foi calculada como função das diferentes frequências produzidas. Foi utilizada uma janela de sobreposição de 75% no sinal de 16 segundos e 3 blocos de 8 segundos foram usados para o cálculo dos parâmetros da mecânica oscilatória (i), segundo a equação:

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

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

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

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

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

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

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

4.7 Lavado Broncoalveolar

Foi realizado por intermédio da infusão de 0,5 ml de salina por três vezes consecutivas (total volume 1,5mL), pela cânula traqueal, com o uso de uma seringa. O volume recuperado foi centrifugado a 1000 rpm, a 5°C, por 10 minutos,

e média de recuperação foi de 80%. O botão celular foi ressuspensionado em 200 μ L de salina. A contagem total de células foi realizada por microscopia ótica com o hemocitômetro de *Neubauer* (400x).

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

4.8 Descarte de Carcaças

As carcaças dos animais foram colocadas em sacos de lixo branco e identificadas com etiqueta padrão. A coleta foi realizada por funcionários da empresa de limpeza técnica hospitalar e os resíduos transportados para o abrigo de resíduos, para coleta diária noturna para tratamento e disposição final, após a emissão (pelo veterinário responsável) do laudo e documento de movimentação.

4.9 Estudo Histopatológico

Após a realização do LBA os animais foram exsanguinados, a caixa torácica foi aberta e o coração e o pulmão foram retirados em bloco. Os pulmões foram fixados com formaldeído 4% a uma pressão constante de 20 cmH₂O, por 48

h, para homogeneizar a distensão do parênquima pulmonar. Os pulmões foram guardados em formalina 10% por até 7 dias, e em seguida, foram cortados no seu maior eixo e submetidos a processamento histológico de rotina.

4.9.1 Colorações

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

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

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

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

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

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

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

Foram utilizados os seguintes anticorpos para as marcações específicas:

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

- **TNF α** : anticorpo primário anti-TNF α (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA).
- **Isoprostano 8 (PGF2 α)**: anticorpo primário anti-8-Isoprostano (Oxford Biomedical Research, Oxford, Reino Unido) (1:10.000).
- **MUC-5**: anticorpo primário anti-MUC-5 (LabVision, NeoMarkers, Califórnia, EUA) (1:400).

4.9.2 Análise Morfométrica

A análise morfométrica foi realizada com um microscópio óptico e com um retículo de retas e pontos (com 50 retas e 100 pontos), usando a técnica de contagem de pontos (Weibel, 1979). Para a realização da contagem, o retículo foi sobreposto ao parênquima pulmonar (*Figura 8B*).

Avaliação das vias aéreas: o retículo foi acoplado adjacente à parede da via aérea, a partir da base do epitélio, sendo avaliadas aproximadamente três campos de três a cinco vias aéreas, aleatoriamente selecionadas por animal (*Figura 8A*). Esta técnica foi utilizada para contagem de células positivas para neutrófilos, TNF- α , MMP-9, MMP-12, TIMP-1, MUC-5, eNOS, iNOS e isoprostano.

Figura 8. Posicionamento do retículo no (A) vias aéreas, (B) parênquima pulmonar para realização da técnica de contagem de pontos.

A análise das fibras colágenas, elásticas e isoprostano foi realizada através do auxílio de um microscópio com retículo apropriado e realizada a análise das intersecções dos pontos e área do parênquima pulmonar. Analisamos 20 campos do parênquima pulmonar. Os resultados foram expressos em % de área positiva (volume de proporção) (Prado *et al.*, 2011).

4.9.3 Análise do Diâmetro Alveolar Médio (Lm)

O Lm foi lido através de um microscópio com retículo apropriado. Para o cálculo do diâmetro alveolar médio foi determinada, inicialmente, a área de parênquima pulmonar, excluindo-se vasos e vias aéreas. Estabelecemos sobre a área de parênquima pulmonar um retículo com 50 retas e contamos as intersecções das retas na parede alveolar. Deste modo, calculamos o diâmetro

alveolar médio pela relação entre a área do parênquima pulmonar e o número de intersecções das retas e o parênquima pulmonar (Prado *et al.*, 2011).

4.10 Análise Estatística

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

Resultados

5.0 Resultados

5.1 Elastância do sistema respiratório (Ers)

Na *Figura 9* pode-se observar os valores de elastância do sistema respiratório dos animais dos quatro grupos experimentais. Ocorre um aumento significativo de Ers nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $37,0 \pm 3,4$ cmH₂O.mL.⁻¹; ELA: $53,6 \pm 6,3$ cmH₂O.mL.⁻¹.s; SAL-CrataBL: $37,0 \pm 2,2$ cmH₂O.mL.⁻¹, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL: $32,6 \pm 2,0$ cmH₂O.mL.⁻¹, $p < 0,05$).

Figura 9. Média e erro padrão dos valores de elastância do sistema respiratório dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.2 Resistência do sistema respiratório (Rrs)

A *Figura 10* mostra os valores de resistência do sistema respiratório dos quatro grupos experimentais. Ocorre uma redução de Rrs nos animais que receberam o inibidor (SAL-CrataBL: $0,8 \pm 0,03$ cmH₂O/mL.⁻¹.s; ELA-CrataBL: $0,7 \pm 0,03$.cmH₂O/mL.⁻¹.s) quando comparados aos grupos SAL e ELA (SAL: $1,1 \pm 0,1$ cmH₂O/mL.⁻¹.s, ELA: $1,0 \pm 0,1$ cmH₂O/mL.⁻¹.s, $p < 0,05$).

Figura 10. Média e erro padrão dos valores de resistência do sistema respiratório dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos grupos ELA e SAL.

5.3 Resistência de vias aéreas (Raw)

A *Figura 11* mostra os valores de resistência de vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Ocorre um aumento significativo de Raw nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $0,35 \pm 0,1$ cmH₂O/mL/s; ELA: $0,7 \pm 0,1$ cmH₂O/mL/s; SAL-CrataBL: $0,3 \pm 0,02$ cmH₂O/mL/s, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL: $0,3 \pm 0,02$ cmH₂O/mL/s, $p < 0,05$).

Figura 11. Média e erro padrão dos valores de resistência de vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.4 Resistência de tecido pulmonar (Gtis)

A *Figura 12* mostra os valores de resistência de tecido pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. Ocorre um aumento significativo de Gtis nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $7,50 \pm 0,3$ cmH₂O/mL/s^(1-α); ELA: $8,6 \pm 0,7$ cmH₂O/mL/s^(1-α); SAL-CrataBL: $7,2 \pm 0,4$ cmH₂O/mL/s^(1-α), $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL: $6,7 \pm 0,3$ cmH₂O/mL/s^(1-α), $p < 0,05$).

Figura 12. Média e erro padrão dos valores de resistência de tecido pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.5 Elastância do tecido pulmonar (Htis)

Os valores de elastância de tecido pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais é mostrado da *Figura 13*. Observa-se um aumento significativo de Htis nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $40,0 \pm 3,1$ cmH₂O/mL/s^(1-α); ELA: $67,6 \pm 12,6$ cmH₂O/mL/s^(1-α); SAL-CrataBL: $37,9 \pm 3,5$ cmH₂O/mL/s^(1-α), $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL: $33,1 \pm 2,5$ cmH₂O/mL/s^(1-α), $p < 0,05$).

Figura 13. Média e erro padrão dos valores de elastância de tecido pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.6 Óxido nítrico exalado (NOex)

A *Figura 14* mostra os valores do óxido nítrico exalado dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $46,0 \pm 5,2$ ppb; ELA: $58,5 \pm 4,0$ ppb; SAL-CrataBL $14,3 \pm 0,7$ ppb, $p < 0,05$). Houve uma alteração significativa do NO exalado nos grupos tratados com CrataBL comparativamente aos demais (ELA-CrataBL $15,7 \pm 1,8$ ppb, $p < 0,05$).

Figura 14. Média e erro padrão dos valores de E_{NO} dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos ELA e SAL.

5.7 Lavado broncoalveolar: células totais

A *Figura 15* mostra os valores do número total de células no lavado broncoalveolar (LBA) dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo de células totais nos animais dos grupos elastase comparativamente aos controles (SAL: $0,5 \pm 0,2 \times 10^4$ células/mL, ELA: $2,8 \pm 0,4 \times 10^4$ células/mL, SAL-CrataBL: $0,7 \pm 0,1 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL: $1,5 \pm 0,1 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$).

Figura 15. Média e erro padrão dos valores do número total de células no LBA dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL.

5.8 Lavado broncoalveolar: macrófagos

A *Figura 16* mostra os valores do número de macrófagos no lavado broncoalveolar (LBA) dos animais dos quatro grupos experimentais. Ocorreu aumento significativo de macrófagos nos animais dos grupos que receberam elastase quando comparados aos controles (SAL: $0,63 \pm 0,04 \times 10^4$ células/mL; ELA: $1,47 \pm 0,2 \times 10^4$ células/mL; SAL-CrataBL: $0,7 \pm 0,1 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$. Não houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL: $1,46 \pm 0,09 \times 10^4$ células/mL, $p > 0,05$).

Figura 16. Média e erro padrão dos valores de macrófagos no LBA dos animais dos quatro grupos experimentais * $p < 0,05$ comparativamente aos grupos salina (SAL e SAL-CrataBL).

5.9 Lavado broncoalveolar: neutrófilos

A *Figura 17* mostra os valores do número de neutrófilos dos quatro grupos experimentais. Observa-se aumento significativo nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $0,0007 \pm 0,0007 \times 10^4$ células/mL; ELA: $0,50 \pm 0,17 \times 10^4$ células/mL; SAL-CrataBL: $0,003 \pm 0,001 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$). Houve atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $0,04 \pm 0,01 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$).

Figura 17. Média e erro padrão dos valores de neutrófilos no LBA dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.10 Lavado broncoalveolar: linfócitos

A *Figura 18* mostra os valores do número de linfócitos no lavado broncoalveolar (LBA) dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $0,0017 \pm 0,0007 \cdot 10^4$ células/mL; ELA: $0,26 \pm 0,09 \cdot 10^4$ células/mL; SAL-CrataBL: $0,003 \pm 0,001 \cdot 10^4$ células/mL, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL: $0,02 \pm 0,004 \cdot 10^4$ células/mL, $p < 0,05$).

Figura 18. Média e erro padrão dos valores de linfócitos no LBA dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

5.11 Lavado broncoalveolar: eosinófilos

A *Figura 19* mostra os valores do número de eosinófilos no lavado broncoalveolar (LBA) dos animais dos quatro grupos experimentais. Ocorreu um aumento significativo nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $0,000 \pm 0,00 \cdot 10^4$ células/mL; ELA: $0,05 \pm 0,01 \cdot 10^4$ células/mL; SAL-CrataBL: $0,005 \pm 0,001 \cdot 10^4$ células/mL, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL: $0,001 \pm 0,005 \cdot 10^4$ células/mL, $p < 0,05$).

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

5.12 Intercepto linear médio (Lm)

A *Figura 20* mostra os valores do intercepto linear médio (Lm) dos animais dos quatro grupos experimentais. Ocorreu aumento significativo de Lm nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $44,7 \pm 1,6 \mu\text{m}$; ELA: $69,0 \pm 2,7 \mu\text{m}$; SAL-CrataBL: $54,6 \pm 6,0 \mu\text{m}$, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL: $49,9 \pm 3,3 \mu\text{m}$, $p < 0,05$).

Figura 20. (A) Média e erro padrão dos valores de intercepto linear médio dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos. (B) Imagem de fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

5.13 Avaliação do número de macrófagos no parênquima pulmonar

A *Figura 21* mostra os valores do número de macrófagos no parênquima pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $11,75 \pm 0,75$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $22,88 \pm 2,24$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $7,86 \pm 0,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $9,58 \pm 1,36$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 21. (A) Média e erro padrão dos valores do número de macrófagos na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens das micrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

5.14 Avaliação da infiltração neutrofílica no parênquima pulmonar e nas vias aéreas

A *Figura 22* mostra os valores de neutrófilos no parênquima pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $0,43 \pm 0,05$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $1,18 \pm 0,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $0,57 \pm 0,06$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $0,75 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

A *Figura 23* mostra os valores de neutrófilos nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $0,23 \pm 0,05$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $0,59 \pm 0,10$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $0,26 \pm 0,04$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $0,46 \pm 0,06$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 22. (A) Média e erro padrão dos valores de neutrófilos no parênquima pulmonar na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

(A)

(B)

Figura 23. (A) Média e erro padrão dos valores de neutrófilos nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

5.15 Avaliação do número de células positivas para TNF- α no parênquima pulmonar e nas vias aéreas

A *Figura 24* mostra os números de células positivas para TNF- α no parênquima pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $3,11 \pm 0,13$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $12,52 \pm 0,42$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $4,83 \pm 0,16$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $10,41 \pm 0,49$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

A *Figura 25* mostra os números de células positivas para TNF- α nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $5,27 \pm 0,34$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $15,82 \pm 1,03$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $6,67 \pm 1,49$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $14,30 \pm 1,28$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 24. (A) Média e erro padrão dos valores de células TNF- α positivas no parênquima pulmonar na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

Figura 25. (A) Média e erro padrão dos valores de células TNF- α positivas nas vias aéreas na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-Cratabl. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-Cratabl, ELA-Cratabl, respectivamente.

5.16 Proporções de volume de fibras colágenas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas

A *Figura 26* mostra os valores da proporção de volume de fibras colágenas no parênquima pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. Ocorreu redução significativa de fibras colágenas nos animais dos grupos elastase (ELA: $11,5 \pm 0,11\%$; ELA-CrataBL: $10,8 \pm 0,13\%$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo salina (SAL: $9,4 \pm 0,1\%$; SAL-CrataBL: $8,8 \pm 0,8\%$, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA ($p < 0,05$).

A *Figura 27* mostra os valores da proporção de volume de fibras colágenas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Ocorreu redução significativa de fibras colágenas nos animais dos grupos elastase (ELA: $8,73 \pm 2,59\%$; ELA-CrataBL: $7,80 \pm 1,37\%$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo salina (SAL: $5,72 \pm 0,78\%$; SAL-CrataBL: $6,19 \pm 1,87\%$, $p < 0,05$).

Figura 26. (A) Média e erro padrão dos os valores do conteúdo de fibras colágenas no parênquima pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais, * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens de fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

Figura 27. (A) Média e erro padrão dos os valores do conteúdo de fibras colágenas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais, * $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens de fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

5.17 Proporções de volume de fibras elásticas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas

A proporção de volume de fibras elásticas no parênquima pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais esta mostrada na *Figura 28*. Observa-se um aumento significativo de fibras elásticas nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $0,3 \pm 0,03\%$; ELA: $0,5 \pm 0,03\%$; SAL-CrataBL: $0,3 \pm 0,3\%$, $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL: $0,3 \pm 0,02\%$, $p < 0,05$).

A proporção de volume de fibras elásticas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais esta mostrada na *Figura 29*. Observa-se um aumento significativo de fibras elásticas nos animais do grupo ELA quando comparados aos controles (SAL: $0,69 \pm 0,02\%$; ELA: $2,56 \pm 0,18\%$; SAL-CrataBL: $1,14 \pm 0,11\%$ $p < 0,05$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL: $1,4 \pm 0,13\%$, $p < 0,05$).

Figura 28. (A) Média e erro padrão dos conteúdos de fibras elásticas no parênquima pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrstaBL. (B) Imagens de fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrstaBL, ELA-CrstaBL, respectivamente.

Figura 29. (A) Média e erro padrão dos conteúdos de fibras elásticas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens de fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/BL6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

5.18 Avaliações de células MMP-9 positivas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas

A *Figura 30* mostra os valores do número de células MMP-9 positivas no parênquima pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $6,65 \pm 0,70$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $18,59 \pm 1,87$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $7,12 \pm 0,71$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $10,35 \pm 0,65$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

A *Figura 31* mostra os valores do número de células MMP-9 positivas no parênquima pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $7,39 \pm 1,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $14,86 \pm 1,77$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $5,64 \pm 0,66$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $9,93 \pm 1,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 30. (A) Média e erro padrão dos valores de células positivas para MMP-9 no parênquima pulmonar na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

Figura 31. (A) Média e erro padrão dos valores de células positivas para MMP-9 nas vias aéreas na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

5.19 Avaliações de células MMP-12 positivas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas

A *Figura 32* mostra os valores do número de células MMP-12 positivas no parênquima pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $10,12 \pm 0,83$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $20,17 \pm 1,92$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $7,49 \pm 0,63$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $14,15 \pm 0,59$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

A *Figura 33* mostra os valores do número de células MMP-12 positivas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $12,98 \pm 0,59$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $18,56 \pm 1,79$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $6,99 \pm 1,37$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $12,06 \pm 1,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

(A)

(B)

Figura 32. (A) Média e erro padrão dos valores de células positivas para MMP-12 no parênquima pulmonar na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

Figura 33. (A) Média e erro padrão dos valores de células positivas para MMP-12 nas vias aéreas na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. # $p < 0,001$ comparativamente ao grupo SAL-CrataBL. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/BL6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

5.20 Avaliação do número de células TIMP-1 positivas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas

A *Figura 34* mostra os valores de células TIMP-1 positivas no parênquima pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $3,63 \pm 0,59$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $14,42 \pm 2,05$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $5,73 \pm 1,95$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $9,89 \pm 2,79$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

A *Figura 35* mostra os valores de células TIMP-1 positivas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $0,44 \pm 0,09$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $1,31 \pm 0,12$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $0,55 \pm 0,07$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $0,73 \pm 0,05$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 34. (A) Média e erro padrão dos valores de células positivas para TIMP-1 no parênquima pulmonar na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

Figura 35. (A) Média e erro padrão dos valores de células positivas para TIMP-1 nas vias aéreas na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

5.21 Avaliação de MUC-5 nas vias aéreas

A *Figura 36* mostra os valores MUC-5 nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $1,31 \pm 0,95$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $7,09 \pm 1,71$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $1,01 \pm 0,42$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $3,56 \pm 0,54$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 36. (A) Média e erro padrão dos valores de MUC-5 nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

5.22 Avaliação do número de células eNOS positivas no Parênquima Pulmonar e nas Vias Aéreas

A *Figura 37* mostra os valores de células eNOS positivas no parênquima pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $4,13 \pm 0,26$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $13,15 \pm 0,40$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $6,36 \pm 0,19$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $6,98 \pm 0,32$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

A *Figura 38* mostra os valores de células eNOS positivas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $1,02 \pm 0,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $3,09 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $1,15 \pm 0,11$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $1,89 \pm 0,16$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 37. (A) Média e erro padrão dos valores de células positivas para eNOS na no parênquima pulmonar imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

Figura 38. (A) Média e erro padrão dos valores de células positivas para eNOS nas vias aéreas na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

5.23 Avaliação do número de células iNOS positivas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas

A *Figura 39* mostra os valores de células iNOS positivas no parênquima pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $2,68 \pm 0,27$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $10,49 \pm 0,65$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $3,83 \pm 0,50$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $6,21 \pm 0,42$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

A *Figura 40* mostra os valores de células iNOS positivas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $1,2 \pm 0,03$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ELA: $5,4 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-CrataBL $1,52 \pm 0,29$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $4,3 \pm 0,31$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$).

Figura 39. (A) Média e erro padrão dos valores de células positivas para iNOS no parênquima pulmonar na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

Figura 40. (A) Média e erro padrão dos valores de células positivas para iNOS nas vias aéreas na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos grupos salina. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

5.24 Avaliação da proporção de volume de 8-iso-PGF2 α no parênquima pulmonar e nas vias aéreas

A *Figura 41* mostra proporção de volume isoprostano-8 no parênquima pulmonar dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $1,68 \pm 0,58$ %; ELA: $18,11 \pm 5,38$ %; SAL-CrataBL $1,56 \pm 0,1$ % $p < 0,001$). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $8,96 \pm 3,08$ %, $p < 0,001$).

A *Figura 42* mostra os valores de células isoprostano-8 positivas nas vias aéreas dos animais dos quatro grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo nos animais do grupo elastase quando comparados aos controles (SAL: $1,41 \pm 0,57$ %; ELA: $17,31 \pm 3,56$ %; SAL-CrataBL $1,32 \pm 0,57$ %). Houve uma atenuação no grupo ELA-CrataBL em relação ao grupo ELA (ELA-CrataBL $7,34 \pm 2,31$ %, $p < 0,001$).

Figura 41. (A) Média e erro padrão dos valores de células positivas para isoprostano-8 no parênquima pulmonar na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-Cratabl. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-Cratabl, ELA-Cratabl, respectivamente.

Figura 42. (A) Média e erro padrão dos valores de células positivas para isoprostano-8 nas vias aéreas na imunohistoquímica dos animais dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos. ** $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-CrataBL. (B) Imagens das fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (400x) em camundongos C57/Bl6 dos grupos SAL, ELA, SAL-CrataBL, ELA-CrataBL, respectivamente.

Discussão

6.0 Discussão

O envolvimento de proteinases na fisiopatologia do DPOC já está estabelecido (Wright e Churg, 2002, Gina, 2013). Recentemente, as novas estratégias terapêuticas destinadas a controlar a produção e/ou inativação de proteinases são discutidos, uma vez que as enzimas não são mais consideradas importantes apenas na degradação de proteínas, mas também são consideradas moléculas sinalizadoras envolvidas em muitos processos biológicos importantes.

No presente trabalho, utilizando modelo de lesão pulmonar induzida pela elastase intratraqueal foi observado que em relação ao grupo elastase houve um aumento nos parâmetros funcionais relativos às alterações de parênquima (E_{RS} , G_{tis} , H_{tis}) e vias aéreas (R_{aw}), no óxido nítrico exalado e no intercepto alveolar médio (L_m). Notamos também aumento nas células encontradas no fluido do lavado broncoalveolar (células totais, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos) e em macrófagos, neutrófilos e de células que expressam $TNF-\alpha$ no parênquima pulmonar. Em relação às vias aéreas, houve um aumento de neutrófilos e que expressam $TNF-\alpha$. Em relação ao processo de remodelamento pulmonar, tanto no parênquima pulmonar quanto nas vias aéreas houve um aumento de fibras colágenas, elásticas e de células que expressam MMP-9, MMP-12 e TIMP-1. Nas vias aéreas, houve também um aumento das células MUC-5 positivas. Na avaliação da resposta do estresse oxidativo ocorreu um aumento de

células que expressam eNOS, iNOS e da fração de volume isoprostano no parênquima pulmonar e em vias aéreas.

No grupo que recebeu elastase intratraqueal e foi tratado com CrataBL, composto de origem vegetal que interfere diretamente na atividade de proteinases, ou indiretamente via heparina (Ferreira *et al.*, 2013), houve uma diminuição dos parâmetros funcionais relativos às alterações de parênquima (E_{RS} , G_{tis} , H_{tis}) e vias aéreas (Raw), no óxido nítrico e no índice de alargamento de septos alveolares (L_m). Observou-se também uma diminuição no fluido do lavado broncoalveolar das células totais, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. No parênquima pulmonar, houve diminuição de macrófagos, neutrófilos e células que expressam $TNF-\alpha$. Nas vias aéreas, ocorreu redução de neutrófilos e de células que expressam $TNF-\alpha$. Em relação à resposta de remodelamento pulmonar, notamos que no parênquima pulmonar e nas vias aéreas ocorreu uma diminuição das fibras colágenas, elásticas e de células que expressam MMP-9, MMP-12 e TIMP-1. Nas vias aéreas houve também redução das células MUC-5 positivas. Assim também, na avaliação da resposta do estresse oxidativo houve uma diminuição de células que expressam eNOS, iNOS e fração de volume de isoprostano no parênquima pulmonar e em vias aéreas.

Os resultados do presente estudo mostram que houve redução da resistência do sistema respiratório (R_{rs}) dos animais tratados com CrataBL independente de receber ou não elastase intratraqueal. Esta ação broncodilatadora sugere que o inibidor de proteinase CrataBL deve ser testado

também em modelos experimentais de asma brônquica. Em relação a Raw notamos que houve aumento no grupo elastase e o tratamento com CrataBL reduziu este parâmetro. Os dados sugerem que a elastase intratraqueal causou constrição das vias aéreas destes animais e o tratamento efetuado foi capaz de controlar esta resposta.

Em relação à elastância do sistema respiratório (Ers), que avalia as alterações de vias aéreas distais e parênquima pulmonar, ocorreu aumento nos animais que receberam elastase intratraqueal. Estes dados são corroborados pelos resultados obtidos nos valores de elastância e resistência pulmonar de tecido pulmonar (Htis e Gtis), que mantiveram o mesmo padrão de resposta. Estes resultados demonstraram a efetividade do modelo experimental visto que, além do alargamento e destruição dos alvéolos também mostrou alteração das vias aéreas distais, o que se assemelha ao observado em humanos com doença pulmonar obstrutiva crônica. Deste modo, optamos por avaliar as alterações de inflamação, remodelamento e de estresse oxidativo nas vias aéreas para contribuir para o entendimento dos mecanismos responsáveis por estas alterações.

Vários são os parâmetros funcionais avaliados nos estudos de lesão pulmonar pela elastase (Chung, 2008). Os estudos de Ito *et al.*, (2004) que avaliaram a mecânica pulmonar de camundongos após a administração de 0,016 mg de elastase por via intratraqueal, mostraram uma diminuição da elastância do sistema respiratório. Os autores sugerem que o remodelamento anormal de fibras colágenas tem um papel importante na função pulmonar e nas alterações mecânicas neste modelo experimental.

Tibboel *et al.* (2010) avaliaram a função pulmonar de camundongos que receberam a mesma dose de elastase (0,016 mg) e mostraram um aumento na frequência respiratória e no volume corrente. Estes animais também mostraram uma diminuição na elastância de tecido e um alargamento dos espaços alveolares.

Hantos *et al.* (2008), avaliando a mecânica pulmonar de camundongos que receberam uma dose menor de elastase (0,010 mg), por via intratraqueal, mostraram um aumento no volume e uma diminuição na elastância de tecido do pulmão. Este estudo não mostrou alterações na resistência de vias aéreas e nem na resistência de tecidos. Estes autores, diferentemente dos outros, concluíram que a destruição tecidual não está associada à disfunção pulmonar. As diferenças observadas podem ser devido às diferenças nos protocolos e nas doses de elastase empregadas.

Por outro lado, estudos de Scuri *et al.*, (2000) mostraram que a elastase, por ativar calicreinas teciduais, leva ao aumento de produção de bradicinina, que por sua vez aumenta a resistência e a elastância pulmonar, levando a uma bronco constrição. Esses autores mostraram que esta resposta não é revertida pelo tratamento com o antagonista de histamina, entretanto foi eficientemente bloqueado pelo antagonista do receptor de B2 de bradicinina, confirmando assim o envolvimento do sistema calicreína-cininas nesse processo.

Considerando a avaliação da lesão alveolar o resultado do Lm, que avalia o alargamento dos alvéolos, observamos que o modelo experimental utilizado foi efetivo em aumentar os espaços alveolares. Notamos também que o inibidor de

proteínase CrataBL atenuou a destruição do parênquima pulmonar dos camundongos que receberam elastase intratraqueal.

Cabe ressaltar que, embora alguns autores argumentem que as medidas de Lm não sejam apuradas, pois não estimam diretamente o diâmetro do alvéolo, estas medidas continuam sendo amplamente utilizadas e aceitas pela comunidade científica (Mitzner, 2007).

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

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

A resposta inflamatória foi avaliada pela técnica do lavado broncoalveolar, que é uma das maneiras mais eficientes e comuns de monitorar a inflamação pulmonar (Churg, 2005). Apesar de não haver diferenças significativas nos números de macrófagos do lavado broncoalveolar entre os animais do grupo ELA e ELA-CrataBL, houve uma diminuição significativa no número de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, indicando um efeito antiinflamatório importante da proteína, semelhante ao relatado por Neuhof *et al.*, (2003) no modelo de edema pulmonar causado por ativação dos neutrófilos. Neste estudo, inibidor de elastase, BbCl da família Kunitz de planta diminuiu o edema no mesmo grau da substância usada

como uma referência para o tratamento dessa doença. Os autores concluíram que este tipo de proteína pode ser um instrumento útil para o estudo do papel de elastase de neutrófilos em processos patofisiológicos.

Suzuki *et al.*, (2009) avaliaram o efeito do curcumim no enfisema induzido por 0,010 mg de elastase, via intratraqueal. Os autores observaram que o curcumim, que é uma raiz da família do gengibre, reduziu significativamente o número total de células, de macrófagos e de neutrófilos no lavado broncoalveolar em camundongos com enfisema induzido pela elastase intratraqueal. O tratamento por via oral inibiu significativamente o aumento da contagem de células totais, neutrófilos, macrófagos.

Plantier *et al.* (2007) avaliaram o lavado broncoalveolar de camundongos que foram induzidos ao enfisema por 0,086 mg de elastase, por via intratraqueal e tratados pelo fator de crescimento de queratinócitos (KGF). Os autores mostraram que o KGF diminuiu de forma significativa o número total de células, o número de macrófagos e de neutrófilos. Os resultados de Plantier *et al.* demonstraram que houve um aumento significativo do número de células totais, neutrófilos, macrófagos induzida pela elastase.

Os resultados obtidos com modelos de inflamatórios com os animais pré-tratados com BbCI, inibidor de HLE e catepsina G, e com BbKI, inibidor de calicreína plasmática humana e calicreína plasmática de rato, sugerem a participação dessas enzimas nos eventos de captura, rolamento, adesão e transmigração célula (de Oliveira *et al.*, 2010). A CrataBL, apesar de não ser inibidor direto da atividade dessas enzimas, é capaz de interferir, aumentando de

modo significativo sua ação, uma vez que essa proteína se liga a heparina e a glicosaminoglicanos de superfície (Almeida *et al.*, 1999). Como já é descrito, a heparina é capaz de potencializar a atividade de proteinases, principalmente catepsinas (Almeida *et al.*, 1999) e calicreína plasmática (Gozzo *et al.*, 2006). Como consequência, a CrataBL pode interferir na geração de peptídeos pro-inflamatório como as cininas, por exemplo a bradicinina. A interferência na atividade proteolítica, de forma indireta, também se relaciona com o fato das metalo proteinases estarem diminuídas pelo tratamento com inibidor, isto é a forma ativa ativada por proteólise específica esta diminuída.

Estudos descritos por Carl *et al.*, (1996), mostravam que a bradicinina aumentava a liberação de elastase dos PMN e essa, por sua vez, aumenta a permeabilidade. Os autores concluíram que tanto o bloqueio da liberação de bradicinina como da atividade de elastase poderiam ser úteis no tratamento de doenças inflamatórias, como a DPOC. Ainda, Bhoola *et al.*, (1992) mostraram que os neutrófilos tem todos os componentes para gerar cininas que são envolvidas na resposta inflamatória local, bem como na ativação e migração de células inflamatórias. Portanto, estas células têm implicações significativas no que diz respeito às condições patológicas nas quais a ativação de neutrófilos e o sistema calicreína-cininas ocorre, como também é o caso da DPOC.

Dentre os mediadores inflamatórios mais envolvidos na fisiopatologia da DPOC esta o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Tarantino, 2002). O TNF- α é produzido por macrófagos e/ou células do epitélio respiratório. A CrataBL foi capaz

de diminuir o número de macrófagos, o que se refletiu em diminuição de células TNF- α positivas. Esse efeito anti-inflamatório levou à uma melhora da condição funcional pulmonar do animal.

Em relação à resposta de remodelamento observamos um aumento na proporção de volume de fibras elásticas e colágenas nos animais que receberam elastase. O tratamento com o inibidor reverteu esta alteração. Provavelmente isto pode estar associado ao fato de que a CrataBL neutraliza o efeito da heparina, a qual tem um efeito eficaz no bloqueio da ativação de proteinases, incluindo a elastase de neutrófilo e, conseqüentemente, na quebra de fibras elásticas situadas no parênquima pulmonar. Este efeito é semelhante ao demonstrado nos estudos que utilizaram um inibidor direto da atividade proteolítica dessa enzima, o BbCI (Almeida-Reis, 2012).

Na avaliação das metalo proteinases 9 e 12 observamos que no grupo ELA ocorreu aumento significativo dessas enzimas, sendo que o tratamento com CrataBL reduziu de forma significativa a expressão destas enzimas, tanto no parênquima pulmonar quanto nas vias aéreas.

Além de ter grande afinidade com a heparina, as catepsinas podem ativar a pro-uroquinase que irá ativar o plasminogenio formando plasmina que, por sua vez, ativa metalo proteinases principalmente a MMP-2 e MMP-9. A plasmina também ativa a elastase que também ativa metalo proteinases e mais catepsina. Desta forma, a heparina tem papel importante, amplificando a rede de ativação de proteinases super ativadas em processos fisiopatológicos (Figueredo *et al.*, 2003).

Com o aumento da MMP-9, há um excesso de seu inibidor TIMP-1, na tentativa do organismo reparar o dano (Tang *et al.*, 2006). O excesso de TIMP-1

sobre a MMP-9 pode interferir no tráfego celular e reparo tecidual, e também pode contribuir para o aumento na deposição de matriz extracelular e fibrose pela inibição da MMP-9.

Verificamos também que houve um aumento no número de células positivas para MUC-5 nos animais que receberam elastase, o que pode sugerir que seja uma alteração mais tardia no desenvolvimento da doença. No entanto, é importante considerar que os camundongos, diferentemente do homem, não têm células caliciformes verdadeiras (Shapiro, 2000) e que a lavagem das lâminas, durante o preparo, também pode ter contribuído para eliminar o muco das vias aéreas. Deste modo, não podemos concluir se discreta alteração em relação ao muco ocorreu é devida a fase da doença e devida às limitações das técnicas utilizadas.

Demonstramos que a lesão pulmonar por elastase intratraqueal causou um aumento no óxido nítrico exalado. Houve a atenuação da resposta de estresse oxidativo com redução de expressão celular eNOS e iNOS tanto nas paredes alveolares quanto em vias aéreas. Como salientamos na introdução dessa tese, o grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Iolanda Tibério, do qual o aluno Leandro Vilela Oliva, faz parte, demonstrou a importante participação do óxido nítrico em modelo experimental de asma (Prado *et al.*, 2005, 2011), com aumento da expressão de iNOS em células linfomononucleares e eosinófilos presentes nas vias aéreas distais de animais sensibilizados. Ainda, o grupo também mostrou que a isoforma nNOS, embora constitutiva, encontra-se presente em células inflamatórias (linfomononucleares e eosinófilos) (Prado *et al.*, 2005).

Em relação a resposta do parênquima pulmonar em animais com inflamação alérgica crônica, a inibição da iNOS com 1400W ou de todas as NOS com L-NAME, atenuou a resposta construtora ao desafio com antígeno. Esta alteração funcional se associou ao controle da resposta de inflamação, remodelamento e estresse oxidativo (Angeli *et al.*, 2008, Starling *et al.*, 2009, Prado *et al.*, 2011). Este efeito de atenuação da resposta construtora pelo bloqueio da iNOS parece depender também da modulação da Rhoquinase (Possa *et al.*, 2012)

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

A CrataBL, como mencionamos, é capaz de neutralizar os efeitos da heparina, além de ser capaz de inibir a atividade de algumas serino proteinases e, por isso, se mostrou importante para auxiliar o entendimento dos diversos mecanismos de doenças onde a atividade de proteolítica tem função importante (Zhang *et al.*, 2013). Os estudos descritos por Lakshmi *et al.*, (2011) mostram que heparina de baixo peso molecular inibe a iNOS ativada em condições de injúria. Essa propriedade nos permite entender porque o tratamento com o inibidor CrataBL causou uma redução do óxido nítrico exalado nos animais que receberam elastase. Ainda, os achados de Prado *et al.*, (2011) mostraram que a inibição iNOS reduz a expressão de MMP-9, TIMP-1 e TGF-beta nas paredes vasculares dos brônquios dos animais sensibilizados por ovalbumina. Todos estes

mediadores atuam na modulação da produção de colágeno e fibras elásticas, contribuindo para o remodelamento da matriz extracelular nas vias aéreas. A diminuição da expressão celular de tanto das metalo proteinases como na TIMP-1 por CrataBL pode também ser entendida como decorrente do efeito inibitório da iNOS.

De forma surpreendente, o tratamento com o inibidor nos animais salina também se associou a uma redução significativa de óxido nítrico exalado. Embora experimentos específicos precisem ser realizados, é provável que a ligação desse composto com a heparina tenha reflexo na atividade das óxido nítrico sintases, tanto na iNOS que produz grandes quantidades de NO, quanto nas constitutivas. Além disto, é interessante notar que houve uma redução significativa da resistência do sistema respiratório (Rrs) que avalia a resposta de vias aéreas proximais, nos animais que receberam CrataBL, independentemente de receberem salina ou elastase. A redução de Rrs, e, portanto um efeito broncodilatador, pode ter sido decorrente de um efeito do CrataBL na iNOS e na eNOS. A avaliação da expressão das duas enzimas no parênquima e nas vias aéreas mostrou redução significativa.

Considerando a resposta do isoprostano sabe-se que o contato de agentes oxidantes com a membrana celular levam à peroxidação lipídica da membrana celular, responsável pela formação de uma série de compostos bioativos análogos às prostaglandinas, conhecidos como isoprostanos (Morrow, 2006). Estes possuem uma potente atividade biológica e são responsáveis pela mediação de certos aspectos da lesão oxidativa (Milne *et al.*, 2008). Observamos um aumento

de isoprostano nos grupos que receberam a elastase sendo que a CrataBL conseguiu diminuir os efeitos observados, consequentemente com diminuição da formação de peroxinitrito e de isoprostano $\text{PGF2}\alpha$.

Os resultados obtidos sugerem que, neste modelo, o inibidor CrataBL por diminuir o processo inflamatório, desencadeado pela ativação de proteinase, é capaz de interferir com a indução de iNOS reduzindo a formação exacerbada de NO, e proteger o tecido. A redução da resistência do sistema respiratório (Rrs), nos grupos de animais SAL e ELA animais tratados por CrataBL sugere um efeito broncodilatador deste inibidor e aponta para uma investigação mais aprofundada em modelos experimentais de asma.

Conclusão

7.0 Conclusão

No modelo de elastase intratraqueal ocorre a constrição das vias aéreas e parênquima pulmonar. No lavado broncoalveolar houve um aumento no número total de células, no número de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. Ainda na resposta inflamatória, houve um aumento de macrófagos no parênquima pulmonar, de neutrófilos e de células que expressam TNF- α no parênquima e em vias aéreas. No remodelamento pulmonar houve, um aumento da fração de volume de fibras colágenas e elásticas, células que expressam MMP-9, MMP-12 e TIMP-1 no parênquima pulmonar e nas vias aéreas, e de MUC-5 nas vias aéreas. No estresse oxidativo, houve um aumento de células que expressam eNOS, iNOS e da fração de volume de isoprostano no parênquima pulmonar e nas vias aéreas.

O tratamento com o inibidor CrataBL, neste modelo experimental, foi capaz de diminuir a constrição de vias aéreas e parênquima pulmonar. A CrataBL se associou a uma redução significativa de óxido nítrico exalado e levou a um controle da resposta inflamatória com diminuição do lavado broncoalveolar do número de neutrófilos, de linfócitos, de eosinófilos e do diâmetro alveolar médio. O inibidor de proteinase, CrataBL, também foi capaz de diminuir o número de neutrófilos e TNF- α positivas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas pulmonar e de macrófagos só no parênquima pulmonar.

Houve controle do remodelamento pulmonar, pois a CrataBL teve como ação a diminuição de fibras colágenas e fibras elásticas, MMP-9, MMP-12, TIMP-1

no parênquima pulmonar e nas vias aéreas. Observamos também uma diminuição nas células MUC-5 positivas nas vias aéreas.

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

Portanto, a CrataBL se mostrou uma ferramenta farmacológica eficaz para o controle das alterações morfofuncionais induzida pela elastase em camundongos.

Referências Bibliográficas

8.0 Referências Bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Benetazzo, MG; Gilè, LS; Bombieri, C; Malerba, G; Massobrio, M; Pignatti, PF; Luisetti, M. *Resp Med*. 1999; 648-654.

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

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

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

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

Carl VS, Moore EE, Moore FA, Whalley ET. Involvement of bradykinin B1 and B2 receptors in human PMN elastase release and increase in endothelial cell monolayer permeability. *Immunopharmacology*. 1996; 33(1-3):325-9.

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

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

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

Coelho, MB, Marangoni, S, Macedo, MLR. Insecticidal action of Annona coriacea lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2007; 146: 406-414.

Collins CE, Quaggitto P, Wood L, O'Loughlin EV, Henry RL, Garg ML. Elevated

plasma levels of F2 α isoprostane in cystic fibrosis. *Lipids*. 1999; 34(6):551-556.

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

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

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

Deshmukh HS, Case LM, Wesselkamper SC, Borchers MT, Martin LD, Shertzer HG, Nadel JA, and Leikauf GD. Metalloproteinases mediate mucin 5AC expression by epidermal growth factor receptor activation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171: 305-314.

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

Ferreira RD, Zhou D, Ferreira JG, Silva MC, Silva-Lucca RA, Mentele R, Paredes-Gamero EJ, Bertolin TC, Dos Santos Correia MT, Paiva PM, Gustchina A, Wlodawer A, Oliva ML. Crystal Structure of *Crataeva tapia* Bark Protein (CrataBL) and Its Effect in Human Prostate Cancer Cell Lines. *PLoS One*. 2013 18;8(6):e64426.

Figueredo, CMS, Crispino, AF, Tinoco, EMB. Níveis elevados de metaloproteinase da matriz-9 em sítios com destruição tecidual de pacientes com periodontite crônica generalizada. *Rev Cien Med Biol*, 2003. v.2, n.1, p.40-47.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Jardim, José Roberto; Nascimento, Oliver; Aguiar, Carolina; Nonato, Nívia: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. [s.ed.) Doença Pulmonar Obstrutiva. 2005; 5: 35.

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

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

Jourdan KB, Mitchell JA, Evans TW. Release of isoprostanes by human pulmonary artery in organ culture: a cyclo-oxygenase and nitric oxide dependent pathway.

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

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

Kitaguchi Y, Fujimoto K, Kubo K, Honda T. "Characteristics of COPD phenotypes classified according to the findings of HRCT". *Respir Med.* 2006; 100: 1742–52.

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

Kromer BM, Tippins JR. Coronary artery constriction by the isoprostane 8-epi-prostaglandin F₂α. *Br J Pharmacol.* 1996; 119:1276-1280.

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

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

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

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

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

Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic α_1 -globulin pattern of serum in α_1 -antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Invest*. 1963; 15:132–140

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

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

Lindahl U, Höök M Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Annu Rev Biochem*. 1978;47:385-417.

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

Liu B, Min MW, Bao JK. Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. *Autophagy*. 2009; 5: 432-433.

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

Luisetti M, Sturani C, Sella D, Madonini E, Galavotti V, Bruno G, Peona V, Kucich U, Dagnino G, Rosenbloom J, Starcher B, Grassi C. MR889, a neutrophil elastase inhibitor, in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Eur Respir J*. 1996; 9(7):1482-6.

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

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

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

Menezes AM, Macedo SC, Gigante DP, Dias-da-Costa J, Olinto MT. Prevalence Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease And Associated Factors: The Platino Study In São Paulo, Brazil. *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2004; 1:173-9.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nader H B, Lopes C C, Rocha HAO, Santos EA, Dietrich CP. Heparins and Heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. *Current Pharmaceutical Design.* 2004; 10:951-966.

National Institutes of Health (NIH). Environment, housing and animal management. in: Institutional Animal Care and use Committee guidebook. Bethesda. NIH 2002. Publication nº.92-3415.2ª ed.

Nazário, B. Caracterização da Resposta Fisiológica de uma Prova de Orientação de Distancia Média em Atletas de Elite Nacional- Estudo Comparativo de uma

Prova de Orientação com e sem Componente de Navegação. Tese de monografia, Universidade de Coimbra. 2003.

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

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

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

Oliva MLV, JC Souza-Pinto. "Leucaena leucocephala serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema." *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1477: 64-74

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

Oliva MLV, Andrade SA, Juliano MA, Sallai RC, Torquato RJ, Sampaio MU, Pott, VJ, and Sampaio, CA. Kinetic Characterization of Factor Xa Binding Using a Quenched Fluorescent Substrate Based on the Reactive site of Factor Xa Inhibitor from *Bauhinia unguolata* Seeds. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10: 1085-1093.

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

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

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

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

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

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

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

Plantier L, Marchand-Adam S, Antico VG, Boyer L, De Coster C, Marchal J, Bachoual R, Mailleux A, Boczkowski J, and Crestani B. Keratinocyte growth factor

protects against elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293: 1230-1239.

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

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

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

Praticò D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated an increase in urinary levels of isoprostane F_{2α} III, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:1709-1714.

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

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

Rittidach W, Paijit N and Utarabhand P. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2007; 1770: 106-114.

Scanlan CL. *Fundamentos da Terapia Respiratória de Egan*. 2000; 20: 457-466.

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

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

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

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

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

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

Sharon N, Lis H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: Wu, editor. *The molecular immunology of complex carbohydrates-2*. Taiwan: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2001; 1-16.

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

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

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

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

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

Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert JD, Morrow JD, Roberts LJ. Glomerular actions of a free radical generated novel prostaglandin, 8-epi- PGF₂α, in the rat. Evidence for interactions with thromboxane A₂ receptors. *J Clin Invest.* 1992; 90:136-141.

Takahashi S, Nakamura H, Seki M, Shiraishi Y, Yamamoto M, Furuuchi M, Nakajima T, Tsujimura S, Shirahata T, Nakamura M, Minematsu N, Yamasaki M, Tateno H, and Ishizaka A. Reversal of elastase-induced pulmonary emphysema

and promotion of alveolar epithelial cell proliferation by simvastatin in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 294: 882-890.

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

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

Tarantino, A B. Doenças pulmonares. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

Walenga JM, Jeske WP, Fareed J. Short- and long-acting synthetic pentasaccharides as antithrombotic agents. *Expert Opin Investig Drugs.* 2005; 14: 847–858.

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

Weibel ER. Fleischner Lecture. Looking into the lung: what can it tell us? *AJR Am J Roentgenol* 133 (6):1021-31, 1979.

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

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

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

Vieira RP, Claudio RC, Duarte AC, Santos AB, Perini A, Faria Neto HC, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176:81-877.

Vignola AM, Mirabella F, Constanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore G. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003; 123(Suppl 3):417-22.

Yan, Q, Jiang, Z, Yang, S, Deng, W, Han, L. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005; 442: 72-81.

Zhang F, Walcott B, Zhou D, Gustchina A, Lasanajak Y. Structural studies on the interaction of *Crataeva tapia* bark protein with heparin and other glycosaminoglycans. 2013. *Biochemistry* v. 52, n. 12, p. 2148-2156.

Zheng Z, Mosher SL, Fan B, Klessig DF, Chen Z. Functional analysis of *Arabidopsis* WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. *BMC Plant Biol*. 2007; 7: 2.