



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Gabriela Gomes Ferreira

**Efeito do tratamento com nanopartículas de ouro sobre a resposta
fibrótica pulmonar induzida por bleomicina em camundongos**

Rio de Janeiro
2023

Gabriela Gomes Ferreira

Efeito do tratamento com nanopartículas de ouro sobre a resposta fibrótica pulmonar induzida por bleomicina em camundongos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F383 Ferreira, Gabriela Gomes.
Efeito do tratamento com nanopartículas de ouro (AuNPs) sobre a resposta
fibrótica pulmonar induzida por bleomicina em camundongos / Gabriela Gomes
Ferreira. - 2023.
59 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

Mestrado (Dissertação) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de
Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Fibrose pulmonar idiopática – Terapia – Teses. 2. Nanopartículas metálicas –
Uso terapêutico – Teses. 3. Bleomicina – Teses. 4. Pulmão – Fisiopatologia. I.
Martins, Patrícia Machado Rodrigues e Silva. II. Universidade do Estado do Rio de
Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.24

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo
CRB7/7341

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Gabriela Gomes Ferreira

Efeito do tratamento com nanopartículas de ouro sobre a resposta fibrótica pulmonar induzida por bleomicina em camundongos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 11 de abril de 2023.

Orientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins
Fundação Oswaldo Cruz

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques
Laboratório de Farmacologia Celular e Molecular - UERJ

Prof.^a Dra. Josiane Sabbadini Neves
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Márcia Aguila Mandarin-de-Lacerda
Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doenças Cardiovascular - UERJ

Rio de Janeiro

2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, aos Guias e a todos meus amigos espirituais por estarem sempre comigo me dando orientação, proteção, luz e sabedoria para continuar em frente e não desistir, mesmo nos momentos mais difíceis, tanto acadêmicos/profissionais quanto na minha vida pessoal;

À minha orientadora Dra Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins por ter me dado a oportunidade de estar no Laboratório de Inflamação exercendo esse lindo trabalho, por todo profissionalismo, cuidado, preocupação, paciência e acima de tudo, todo carinho que tem comigo, só tenho a agradecer;

Ao Dr. Marco Aurélio Martins por ter me recebido e sempre cuidar do nosso laboratório e da nossa equipe com tanta maestria e carinho;

À Dra. Fernanda Verdini Guimarães, minha co-orientadora do coração, que sempre esteve comigo em todo percurso e percalços desse projeto, me orientando, aconselhando e amparando. Obrigada por todo seu carinho, pela confiança que deposita em mim, pela parceria na bancada e amizade fora dela, sem você certamente os dias não teriam sido tão leves e divertidos quanto foram;

Ao Dr. Vinicius de Frias Carvalho e Dra. Andressa Bernardi que estiveram prontos a me ajudar no que fosse preciso, muito obrigada;

À Ana Carolina Arantes, Camila Dantas, Milena Tiengo e Joyce Lima por participarem ativamente em toda parte do processamento histológico desenvolvido no projeto;

Ao Andrey Junior por ajudar na elaboração do escore, uma das técnicas essenciais no meu trabalho;

À Dra. Tatiana Paula Teixeira Ferreira e Dra. Amanda da Costa Cotias por todo carinho e ajuda nos ensaios que fizemos juntas, aprendi bastante com vocês;

Aos colegas Rafael Sampaio Pimentel e Marcella Dutra de Almeida pela ajuda, conselhos e conversas que alegraram meu dia no Laboratório;

À Brenda Daumas Ferreira Santos, Gabriella da Costa Ferreira e Lucas Eliseu Santos Martins por fazerem parte dos meus dias no laboratório, se disponibilizando e ajudando sempre que possível;

À Natália Barreto da Silva Ribeiro e Yago Janinni de Sá que hoje não compõem mais a equipe do laboratório, mas me ajudaram no início da minha vida na pesquisa;

À Ana Lúcia Aguiar Pires sempre atuante com as questões burocráticas, de organização e planejamento, além coordenar os ensaios de ELISA, juntamente com a Marina Fernandes Santos Neves e Dra. Daniella Bianchi Reis Insuela;

À secretária Osirene Loureiro (querida Dadá) por estar sempre pronta a ajudar a todos no laboratório com carinho e muita eficiência;

À toda equipe do biotério pelo cuidado com animais, sem vocês esse trabalho não seria possível;

A todos os professores que fizeram parte da minha formação como biomédica na Universidade Veiga de Almeida, e que de alguma forma puderam contribuir para a elaboração deste trabalho;

A todos os participantes do Programa de Pós-Graduação em Biociências da UERJ durante o período do mestrado; aos professores por todo o conhecimento e aprendizado e ao secretário Stênio pela ajuda com a parte burocrática do curso;

Aos membros da banca examinadora Dra. Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques, Dra. Márcia Barbosa Aguilá e Dra. Josiane Sabadinni Neves, assim como, ao leitor prévio Dr. Ralph Santos Oliveira por todas as importantes contribuições dadas ao projeto;

Aos meus pais, Katia Maria Gomes Ferreira e Edson Vital Ferreira, por todo suporte que me deram até aqui, sempre me incentivando na vida acadêmica e vibrando comigo a cada pequena vitória. Obrigada por todo amor, carinho e dedicação, sem vocês nada disso seria possível;

À minha avó Felicidade Inácio Ferreira e minha tia Eliane Inácio Ferreira, que não se fazem presentes em vida, mas tenho a certeza que estão me guiando lá de cima, me protegendo e torcendo muito por mim. Levo vocês no meu coração;

Ao meu namorado Daniel Ramos da Silva Innocente por toda a parceria, carinho e amor dados durante a realização desse trabalho. Obrigada pelos conselhos, apoio, paciência, calma, e por se fazer presente sempre na minha vida;

Aos meus padrinhos Fernanda Vieira e Pedro Vieira por sempre acreditarem em mim, me ajudarem e estarem presentes na minha vida para qualquer coisa. Sei que posso contar com vocês para tudo;

A Carla Marice Oliveira de Melo, Juliana Soares da Silva e Yamin Forte, que também estiveram do meu lado me apoiando diariamente na graduação, me dando força nos momentos mais difíceis, minhas amigas de caminhada nessa trajetória;

Às minhas amigas queridas do coração Daniela Viana Moura, Marina de Aragão Fernandes e Milenna Sangi Shushanof por estarem sempre comigo, me incentivando, me dando todo carinho e sempre alegrando meus dias. Obrigada pela amizade tão importante para mim;

À meu padrasto Arthur Botha, por sempre me incentivar e toda ajuda, carinho, que tem comigo. Muito obrigada;

Aos meus sogros Adriana Innocente e Douglas Innocente, e à minha sogra do coração Dhebora Innocente, pelo incentivo, ajuda e por sempre fazerem com que eu acredite em mim mesma. Obrigada pelo carinho por todos esses anos;

Às agências financiadoras pelo suporte financeiro para o desenvolvimento desse projeto, em especial à FAPERJ responsável pelo pagamento pela bolsa.

RESUMO

FERREIRA, Gabriela Gomes. **Efeito do tratamento com nanopartículas de ouro (AuNPs) sobre a resposta fibrótica pulmonar induzida por bleomicina em camundongos**. 2023. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é uma doença crônica e progressiva, caracterizada por infiltração de células inflamatórias, hiperplasia de células epiteliais alveolares, recrutamento de fibroblastos e fibrose, representando um desafio para os serviços de saúde devido à inexistência de uma terapia eficaz. Evidências apontam que as nanopartículas de ouro (AuNPs) possuem propriedade anti-inflamatória importante, o que as qualifica como opção terapêutica para distúrbios pulmonares. Nesse estudo investigamos o efeito da administração terapêutica de AuNPs sobre a inflamação e a fibrose pulmonar induzidos por bleomicina em camundongos, um modelo que reproduz o quadro clínico de fibrose pulmonar idiopática (FPI). Foram utilizados camundongos C57/Bl6 estimulados através de aspiração orofaríngea de bleomicina (0,06 U/ 40 µL), e tratados com aerossol de AuNPs (0,15 - 1,5 µg/mL) nos dias 14, 17 e 20 pós-bleomicina, e as análises foram realizadas 1 dia após a última dose. Os parâmetros avaliados incluíram i) avaliação da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas através de pletismografia invasiva de corpo inteiro; ii) análise morfológica através de técnicas histológicas padrões; iii) quantificação e qualificação de colágeno por Sircol e western blotting; iv) marcadores de estresse oxidativo por análises bioquímicas; e v) quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA. Verificamos que camundongos estimulados com bleomicina exibiram aumento na resistência e elastância pulmonares, bem como quadro de hiper-reatividade das vias aéreas. Observamos, também, no pulmão desses animais a presença de um infiltrado inflamatório, deposição de colágeno, com claro predomínio do tipo I comparativamente ao tipo III. Aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (SOD e a CAT), bem como o aumento nos níveis de malondialdeído (MDA), e do fator de transcrição NRF2 foram detectados após estimulação com bleomicina. Mais ainda, vimos aumento na produção de citocinas (IL-6, IL-1 β e TGF- β) e quimiocinas (KC, MCP-1 e MIP1- α). A administração terapêutica de AuNPs, a camundongos previamente desafiados com bleomicina, foi capaz de restabelecer a função respiratória, atenuou o quadro de fibrose pulmonar reduzindo os níveis de colágeno do tipo I. Observamos, também, diminuição na produção de citocinas e quimiocinas, a recuperação da atividade da enzima antioxidante CAT, redução do dano oxidativo atestado através dos níveis de MDA, e aumento do fator de transcrição NRF2. Tomados em conjunto, nossos achados mostram que o tratamento com as AuNPs reduziu os componentes inflamatórios e fibrogênico no pulmão de camundongos desafiados com bleomicina, sugerindo que as AuNPs parecem constituir uma abordagem terapêutica bastante promissora para aplicação em doenças pulmonares de caráter fibrótico como a FPI.

Palavras Chaves: Pulmão. Bleomicina. Fibrose. Tratamento. Nanopartículas de ouro.

ABSTRACT

FERREIRA, Gabriela Gomes. *Effect of treatment with gold nanoparticles (AuNPs) on the pulmonary fibrotic response induced by bleomycin in mice*. 2023. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic and progressive disease, characterized by infiltration of inflammatory cells, hyperplasia of alveolar epithelial cells, and recruitment of fibroblasts and fibrosis, representing a challenge for health services due to the lack of effective therapy. Evidence indicates that gold nanoparticles (AuNPs) have important anti-inflammatory properties, which qualifies them as a therapeutic option for lung disorders. In this study, we investigated the effect of the therapeutic administration of AuNPs on inflammation and pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice, a model that reproduces the clinical picture of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). C57/Bl6 mice stimulated through oropharyngeal aspiration of bleomycin (0.06 U/40 μ L) and treated with an aerosol of AuNPs (0.15 - 1.5 μ g/mL) on days 14, 17 and 20 post-treatment were used. bleomycin and analyzes were performed 1 day after the last dose. Parameters assessed included i) assessment of lung function and airway hyper-reactivity using invasive whole-body plethysmography; ii) morphological analysis using standard histological techniques; iii) quantification and qualification of collagen by Sircol and western blotting; iv) oxidative stress markers by biochemical analysis; and v) quantification of cytokines and chemokines by ELISA. We found that mice stimulated with bleomycin exhibited an increase in lung resistance and elastance, as well as airway hyperreactivity. We also observed, in the lungs of these animals, the presence of an inflammatory infiltrate, collagen deposition, with a clear predominance of type I compared to type III. Increased production of reactive oxygen species (ROS), decreased activity of antioxidant enzymes (SOD and CAT), as well as increased levels of malondialdehyde (MDA) and the transcription factor NRF2, were detected after stimulation with bleomycin. Furthermore, we saw an increase in the production of cytokines (IL-6, IL-1 β e TGF- β) and chemokines (KC, MCP-1 and MIP-1 α). The therapeutic administration of AuNPs, to mice previously challenged with bleomycin, was able to restore respiratory function and attenuated the pulmonary fibrosis condition by reducing the levels of type I collagen. We also observed a decrease in the production of cytokines and chemokines, recovery of the activity of the antioxidant enzyme CAT, reduction of oxidative MDA levels, and increase of the NRF2 transcription factor. Taken together, our findings show that treatment with AuNPs reduced the inflammatory and fibrogenic components in the lung of mice challenged with bleomycin, suggesting that AuNPs seem to constitute a promising therapeutic approach for application in fibrotic lung diseases such as IPF.

Keywords: Lung. Bleomycin. Fibrosis. Treatment. Gold nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Arquitetura pulmonar na fibrose pulmonar idiopática (FPI).....	16
Figura 2 -	Nanoescala e nanoestruturas.....	22
Quadro 1 -	Tabela representativa de anticorpos para Western Blotting.....	30
Figura 3 -	Efeito do tratamento com AuNPs (0,15 e 1,5 µg /mL) sobre a função pulmonar de camundongos estimulados com bleomicina.....	35
Figura 4 -	Efeito do tratamento com AuNPs (0,15 e 1,5 µg /ml) sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina.....	36
Figura 5 -	Efeito do tratamento com AuNPs (1,5 µg /ml) sobre a deposição de matriz extracelular no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina.....	37
Figura 6 -	Efeito do tratamento com AuNPs (0,15 e 1,5 µg /mL) sobre o padrão de fibrose pulmonar em camundongos estimulados com bleomicina.....	38
Figura 7 -	Efeito do tratamento com AuNPs (0,15 e 1,5 µg /mL) sobre a quantificação de colágeno no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina.....	39
Figura 8 -	Efeito do tratamento com AuNPs (1,5 µg /ml) sobre a expressão de colágeno tipo I e tipo III no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina.....	39
Figura 9 -	Efeito do tratamento com AuNPs (1,5 µg/mL) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio no lavado broncoalveolar de camundongos instilados com bleomicina.....	41
Figura 10 -	Efeito do tratamento com AuNPs (1,5 µg/mL) sobre a atividade de enzimas antioxidantes no pulmão de camundongos instilados com bleomicina.....	41
Figura 11 -	Efeito do tratamento com AuNPs (1,5 µg/mL) sobre os níveis de malondialdeído (MDA) no pulmão de camundongos estimulados	

	com	
	bleomicina.....	42
Figura 12 -	Efeito do tratamento com AuNPs (1,5 µg /mL) sobre NRF2 no pulmão de camundongos estimulados instilados com bleomicina.....	42
Figura 13 -	Efeito do tratamento com AuNPs (1,5 µg/mL) sobre a produção de citocinas e quimiocinas no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEC	3-amino-9-etilcarbazol
ANOVA	Análise de variância
Au	Ouro
AuNPs	Nanopartículas de ouro
LBA	Lavado broncoalveolar (<i>do inglês bronchoalveolar lavage</i>)
BCA	Ácido bicinconínico (<i>do inglês bicinchoninic acid</i>)
BSA	Albumina de soro bovino (<i>do inglês bovine serum albumin</i>)
CAT	Catalase
CD31	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária (<i>do inglês platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)
CEUA	Comissão de ética no uso de animais de laboratório
DCF	Diclorofluoresceína (<i>do inglês dichlorofluorescein</i>)
DCFH-DA	Diacetato de diclorofluoresceína (<i>do inglês dichlorofluorescein diacetate</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>do inglês deoxyribonucleic acid</i>)
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>do inglês ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>do inglês enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EPM	Erro padrão da média
Fe	Ferro
FPI	Fibrose pulmonar idiopática
GSH	Glutathiona reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ BO ₄	Ácido bórico
HCL	Ácido clorídrico
H&E	Hematoxilina e eosina (<i>do inglês hematoxylin and eosin</i>)
HRP	Enzima peroxidase de rabano (<i>do inglês horseradish peroxidase</i>)

INF- γ	Interferon gama
IL- (x)	Interleucina-(x)
KC/IL-8	Quimiocina derivada de queratinócitos/interleucina-8 (<i>do inglês keratinocyte-derived chemokine/interleukin 8</i>)
KOH	Hidróxido de potássio
KPE	Tampão fosfato de potássio
KPO ₄	Fosfato de potássio
LPS	Lipopolissacarídeo (<i>do inglês lipopolysaccharide</i>)
MCP-1	Proteína quimioatrativa para monócitos -1 (<i>do inglês monocyte chemoattractant protein -1</i>)
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófago -1 alfa (<i>do inglês macrophage inflammatory protein – 1 alpha</i>)
NACL	Cloreto de sódio
NAOH	Hidróxido de sódio
NBT	Azul de nitrotetrazolium (<i>do inglês nitrotetrazolium blue salt</i>)
NRF2	Fator nuclear eritróide 2 (<i>do inglês erythroid-derived nuclear factor 2</i>)
O ₂	Oxigênio
PBS	Salina fosfatada tamponada (<i>do inglês phosphate buffer solution</i>)
PH	Potencial hidrogeniônico
PIU	Pneumonia intersticial usual
PS	Picro sirius
RM	Ressonância magnética
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>do inglês reactive oxygen species</i>)
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (<i>do inglês sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SMA	Actina de músculo liso (<i>do inglês smooth muscle actin</i>)
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico (<i>do inglês thiobarbituric acid</i>)
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (<i>do inglês thiobarbituric acid reactive substances</i>)

TBS	Solução salina tamponada com tris (<i>do inglês tris-buffered saline</i>)
T-TBS	Solução salina tamponada com tris
TCAR	Tomografia computadorizada de alta resolução
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta (<i>do inglês transforming growth factor-beta</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>do inglês tumor necrosis fator</i>)
TRIS	Hidroximetil-aminometano (<i>do inglês hidroximetil-aminometano</i>)
UV	Ultravioleta
α - SMA	Alfa actina de músculo liso (<i>do inglês alpha smooth muscle actin</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
α	Alfa
γ	Gama
g	Gramma
Kg/m ²	Quilogramas por metro quadrado
kDa	Quilodalton
L	Litro
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
°C	Graus Celcius
V	Volts
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	25
1.1	Objetivo Geral	25
1.2	Objetivos Específicos	25
2	MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1	Animais	26
2.2	Estimulação com bleomicina	26
2.3	Tratamento com nanopartículas de ouro (AuNPs)	26
2.4	Análise da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas	27
2.5	Lavado broncoalveolar (LBA)	27
2.6	Histologia	27
2.7	Escore	28
2.8	Quantificação de colágeno total	28
2.9	Quantificação de proteína	29
2.10	Western blotting	29
2.11	Quantificação de mediadores inflamatórios	30
2.12	Quantificação de ROS total	31
2.13	Estresse oxidativo	31
2.14	Enzima catalase (CAT)	32
2.15	Enzima superóxido dismutase (SOD)	32
2.16	Quantificação de malondialdeído (MDA)	32
2.17	Análise estatística	33
3	RESULTADOS	34
3.1	Efeito das nanopartículas de ouro (AuNPs) sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos estimulados com bleomicina	34
3.2	Efeito das nanopartículas de ouro (AuNPs) nas alterações morfológicas e a fibrose no tecido pulmonar de camundongos estimulados com bleomicina	36
3.3	Efeito das nanopartículas de ouro (AuNPs) sobre o estresse oxidativo no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina	40

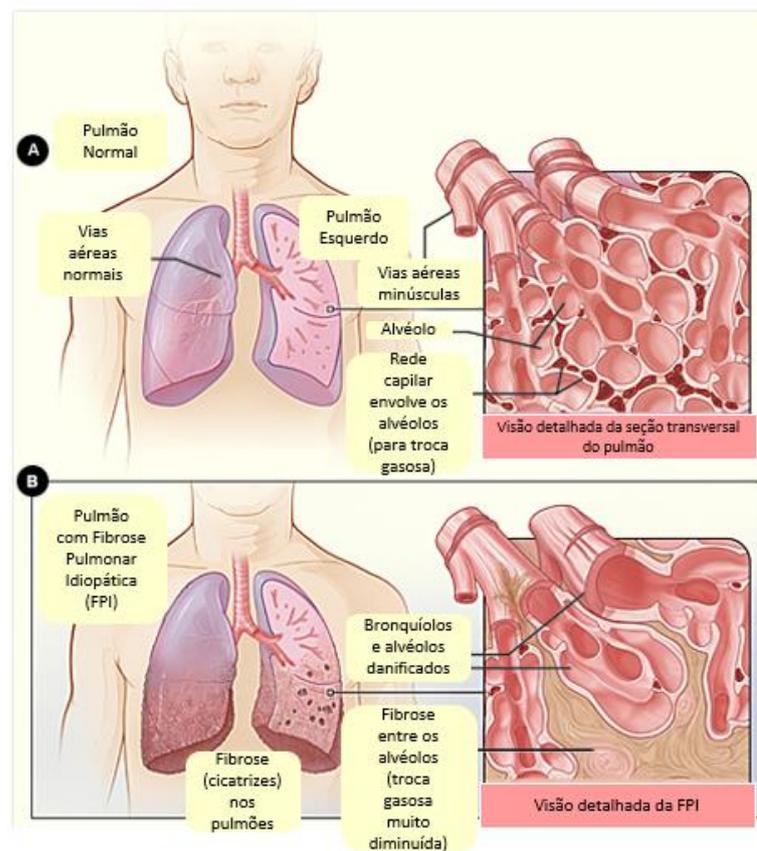
3.4	Efeito das nanopartícula de ouro (AuNPs) sobre a produção de citocinas e quimiocinas no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina.....	43
4	DISCUSSÃO.....	44
	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	ANEXO – Aprovação do comitê de ética.....	59

INTRODUÇÃO

Doenças Pulmonares

As doenças pulmonares podem ser divididas em dois grupos: aquelas de caráter obstrutivo, quando há obstrução total ou parcial das vias aéreas, aumentando a resistência das mesmas como no caso da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e a asma; ou aquelas de caráter restritivo, quando ocorre um dano ao nível de parênquima pulmonar, dificultado sua expansão o que prejudica a capacidade respiratória, como no caso da fibrose pulmonar (Figura 1) (ROBBINS et al., 2015).

Figura 1 – Arquitetura pulmonar na Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI)



Legenda: (A) - pulmão, vias aéreas, alvéolos e redes capilares normais, sem processo inflamatório; (B) - deposição exacerbada de componentes da matriz extracelular, que promove cicatrização do parênquima pulmonar (fibrose) e compromete a troca gasosa.

Fonte: Adaptado de KELLER, (2014).

Todas essas doenças se caracterizam por mudanças que podem interferir na ventilação pulmonar e/ou difusão dos gases respiratórios para a corrente sanguínea, podendo levar a danos em outros órgãos e sistemas.

Fibrose Pulmonar

Dentre as doenças de caráter restritivo, aquelas associadas à fibrose pulmonar são as mais comuns. A fibrose é uma condição debilitante que ocorre devido ao remodelamento tecidual exacerbado, crônico, decorrente de uma resposta inflamatória prévia que persiste por diversos meses, e que pode ser gerada por diversos gatilhos, como por exemplo a exposição a partículas minerais, como no caso das pneumoconioses (BADDINI-MARTINEZ et al., 2015)

A deposição exacerbada de componentes de matriz extracelular, incluindo o colágeno, leva ao enrijecimento e/ou cicatrização do tecido pulmonar saudável o que diminui a complacência, que é a capacidade de distensibilidade do pulmão na inspiração, e aumenta a elastância, uma vez que aumenta a quantidade de fibras elásticas no parênquima, diminuindo sua capacidade de retornar ao estado normal, de repouso, por isso pode levar a falência do órgão e possivelmente a morte do paciente.

Entretanto, muitos casos de fibrose pulmonar não possui uma causa comprovada, por isso é chamada de fibrose pulmonar idiopática (IPF- *Idiopathic Pulmonary Fibrosis*) (DONG et al., 2018; HOWELL, 2014; WYNN, 2008).

Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI)

A fibrose pulmonar idiopática é uma doença crônica, progressiva e de causa não identificável, na qual se observa dispneia progressiva, perda de função pulmonar e conseqüentemente perda da qualidade de vida do paciente portador. Além disso, é a forma de fibrose pulmonar mais comum a ser diagnosticada, mesmo que tardiamente, o que resulta no aumento da incidência de morbidade e mortalidade no mundo inteiro. Muitas são as hipóteses para que essa doença se instale, e estas perpassam pelo âmbito de fatores genéticos e epigenéticos, exposição a fatores ambientais, como à fumaça de cigarro, à agentes infecciosos, entre outros (MANCUZO et al., 2018; SALVATORE et al., 2018; SAULEDA et al., 2018).

Quando há um estímulo constante, as células residentes do tecido pulmonar são constantemente ativadas levando à produção de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas, que por sua vez são responsáveis pelo recrutamento e ativação de outras células tanto do próprio sistema imune, como de células estruturais incluindo os fibroblastos, que quando diferenciados/ativados à miofibroblastos produzem componentes de matriz extracelular (MEC) de maneira exacerbada, levando assim à substituição do tecido pulmonar normal por um tecido conjuntivo/cicatricial, no qual o parênquima se torna mais rígido, dificultando, assim, respiração e a consequente entrada de oxigênio na corrente sanguínea (MEI et al., 2022; WYNN et al., 2012).

A expectativa de vida média dos pacientes com fibrose pulmonar idiopática é de três a cinco anos após o diagnóstico não havendo ainda hoje uma cura. Seu prognóstico depende da gravidade da doença, ou até mesmo do estilo de vida do indivíduo, e, não menos importante, da idade, podendo a progressão da doença variar, levando ao óbito de forma lenta ou rápida (LEE et al., 2019; MALCOM, 2019).

Epidemiologia

A FPI é uma doença, que acomete entre 5 - 6 pacientes por 100.000 mil habitantes ao ano, porém, é considerada uma doença extremamente fatal pelo difícil/raro diagnóstico, o que pode justificar a baixa detecção de pacientes acometidos na epidemiologia, e de baixa expectativa de vida, com uma taxa de 5 anos de sobrevida pós diagnóstico de 30%.

A prevalência e a incidência são maiores em indivíduos do sexo masculino, entre 65-70 anos de idade, principalmente aqueles que são fumantes ou ex-fumantes (GLASS et al., 2022; LEE et al., 2019; SAULEDA et al., 2018).

Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico precoce para fibrose pulmonar idiopática é um desafio, pois os sintomas iniciais se assemelham aos de muitas outras doenças, e são totalmente inespecíficos, como tosse e dispneia. Por isso, a alta incidência de diagnósticos tardios resulta em óbito do paciente (GLASS et al., 2022).

Atualmente o diagnóstico se dá através de alguns métodos: o físico como a ausculta respiratória podendo identificar o som de “velcro” no pulmão, muito

característico na FPI; teste de função pulmonar; teste de caminhada de seis minutos que detecta capacidade de exercer algum exercício físico; entre outros. O método mais tradicional de diagnóstico é realizado por imagem através da tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) e a ressonância magnética (RM), através das quais se buscam alguns parâmetros histoanatômicos como o “faveolamento” do tecido, no qual o parênquima pulmonar fica com aspecto do favo de mel, e padrões de pneumonia intersticial usual (PIU) na TCAR, na qual cada padrão indica um nível de fibrose (LEE et al., 2019).

Um outro método bem útil de diagnóstico dessa patologia é a biópsia cirúrgica, porém, como a idade média de diagnóstico desses pacientes é de 65 anos de idade, este método não é muito recomendado para evitar outras complicações (LEE et al., 2019).

Atualmente a terapia tem como base dois medicamentos como, a pifernidona e o nintedanibe. A pifernidona apresenta propriedade antifibrótica, anti-inflamatória e antioxidante, levando à redução da produção de colágeno e retardando o processo fibrótico. Da mesma forma, o nintedanibe atua com propriedade antifibrótica, suprimindo receptores do fator de crescimento de fibroblasto, célula crucial para o desenvolvimento do processo fibrótico (MEI et al., 2022).

Entretanto, já foi destacado na literatura que esses medicamentos podem causar efeitos adversos mais brandos como náuseas e diarreia e também efeitos graves como disfunção hepática grave, necessitando, então, do monitoramento constante daquele paciente, por isso, foram incluídas recomendações para o uso de ambos. Além disso são medicamentos caros e que apresentam a probabilidade de não alterar a progressão da doença e a taxa de mortalidade de 3 a 5 anos, ou seja, não gerando uma expectativa de melhora (GLASS et al., 2022).

Pela natureza da doença que é progressiva e irreversível, o transplante pulmonar também é considerado em pacientes com essa doença de forma moderada a grave, porém, é necessário passar por uma longa fila de espera, que acaba não sendo condizente com a expectativa de vida que a doença apresenta, e é preciso achar um doador que seja compatível com o paciente, o que também demanda um tempo maior (GLASS et al., 2022; LEE et al., 2019; MEI et al., 2022; NIKOLIĆ et al., 2018).

Com isso, a FPI trata-se de uma doença que, até os dias atuais, não tem cura e tratamento que seja eficaz, o que justifica a necessidade pela busca por novas terapias capazes de atuar sobre doenças de caráter fibrótico.

Modelo experimental com a bleomicina

Como mencionado, a fibrose pulmonar idiopática não tem uma causa conhecida, por isso o nome “idiopática”. Diante disso, torna-se um grande desafio reproduzi-la nos laboratórios de pesquisa, em modelos in vivo e in vitro, para estudos acerca desta doença.

A bleomicina é um quimioterápico usado na clínica para o tratamento de pacientes com câncer, porém, apresenta como efeito adverso o desenvolvimento da fibrose pulmonar. Aproveitando-se disso, a comunidade científica tem utilizado a bleomicina como uma ferramenta para induzir e estudar a FPI, uma vez que este quimioterápico está sendo capaz de reproduzir muitos dos aspectos dessa patologia vistos na clínica, e por apresentar muitos mecanismos celulares e moleculares importantes no desenvolvimento da mesma, além de apresentar boa reprodutibilidade e ser de fácil indução, podendo ser administrada localmente ou sistemicamente. Com isso, o modelo murino de indução da FPI com a bleomicina torna-se o mais amplamente utilizado e o melhor caracterizado ultimamente (D’ALESSANDRO-GABAZZA et al., 2022; LIU et al., 2017).

Um dos meios estudados, acerca do mecanismo de ação da bleomicina, é sua relação com o aumento de fibroblastos resistentes a apoptose no parênquima pulmonar (mecanismo também observado pelo TGF- β 1), uma vez que ela aumenta a expressão de proteínas que bloqueiam a propagação e execução de sinais apoptóticos, levando a inibição das caspases e consequentemente inibindo a apoptose dessas células, provocando o acúmulo das mesmas, e produção de forma exacerbada de componentes de matriz extracelular (ASHLEY et al., 2016).

Além disso, a bleomicina é capaz de se ligar a membrana plasmática da célula, onde é endocitada adentrando ao núcleo, e em contato com o ferro (FE) e o oxigênio (O₂) nuclear, pode levar a produção de ROS o que pode levar a peroxidação lipídica, oxidação de várias proteínas, levando a danos de células epiteliais alveolares. Com isso uma cascata de eventos acontece, o aumento do influxo de células inflamatórias e proteínas plasmáticas na parede alveolar, gerando a produção de citocinas pró-

inflamatórias e pró-fibróticas, levando a uma resposta inflamatória aguda intensa, seguido por uma fase inflamatória crônica (fibroproliferativa), transição epitélio-mesenquimal (TEM), corroborando então para o desenvolvimento do processo fibrótico nas primeiras semanas pós administração da bleomicina (HOWELL, 2014; HSU et al., 2017; LIU et al., 2017).

Nas células endoteliais pulmonares, a bleomicina se comportou da mesma forma, fazendo com que aumentem a produção de colágeno, ficando funcionalmente alterada, adquirindo fenótipo semelhante a de miofibroblastos, o que acontece na transição epitélio-mesenquimal, onde elas perdem a expressão de CD31, anticorpo que confere o fenótipo endotelial às células, e aumentam a expressão de alfa actina de músculo liso (α -SMA), componente de matriz produzido pelos miofibroblastos (KATO et al., 2018).

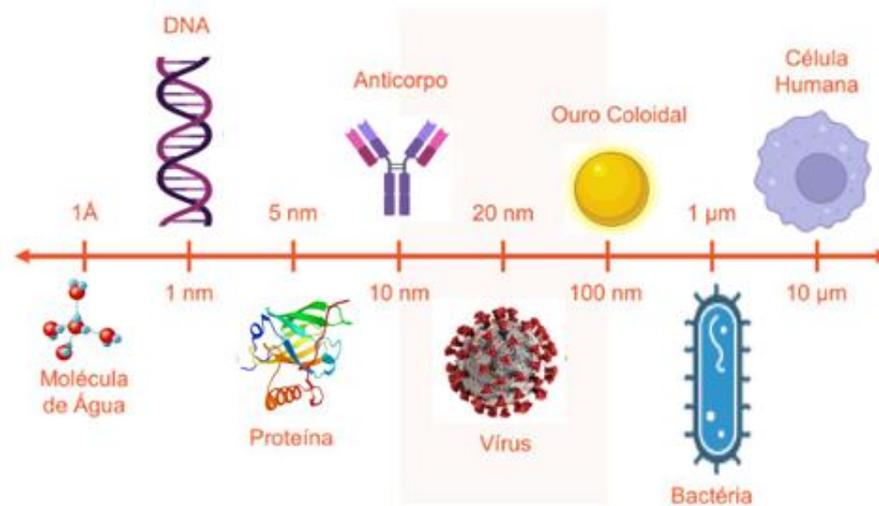
A bleomicina é um composto extremamente versátil, onde pode-se, através da dose utilizada, alcançar intensidades diversas da doença, modelando seus estágios, podendo fazer uma comparação da administração precoce versus tardia, exacerbação, progressão normal, entre outras, perpassando por várias doenças pulmonares intersticiais como a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e a própria FPI (LIU et al., 2017).

Nanotecnologia

A nanotecnologia estuda e cria estruturas em nanoescala, de 0,1 a 100 nanômetros. Por essa razão, e por suas características físico-químicas, possuem uma maior capacidade de atingir células-alvos com maior biocompatibilidade, que podem atuar em vários campos da ciência (NIKALJE, 2015) (Figura 2).

Ela é usada para o tratamento de inúmeras doenças atuando no desenvolvimento e aperfeiçoamento de outras drogas, além de ser muito utilizada para a prevenção, diagnóstico e acompanhamento de diversas doenças como as do trato respiratório, câncer, entre outras (BAHADORI et al., 2012). A nanotecnologia envolve também o projeto, a caracterização e a própria síntese das nanoestruturas ou nanossistemas a serem aplicados para tais fins (GARDNER, 2015).

Figura 2 - Nanoescala e nanoestruturas



Legenda: Comparação da dimensão em nanoescala de algumas estruturas nanométricas como a molécula da água, o DNA, as proteínas, o anticorpo, o vírus SARS-coV-2, o ouro coloidal, uma bactéria e a célula humana.

Fonte: Adaptado de Química Nova, (2023) – web site - https://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=8037.

Outro benefício da nanotecnologia e das nanoestruturas/nanossistemas, é a criação de nanoveículos para a entrega de medicamentos com maior precisão a uma determinada localização do corpo, superando desafios como a toxicidade que a droga pode levar ao organismo, e melhorando a biodisponibilidade do mesmo, podendo com isso refletir na redução da dose e conseqüentemente redução dos efeitos colaterais (GARDNER, 2015).

Comparado com as partículas maiores, as menores apresentam mais átomos em sua superfície e uma maior área, fazendo com que as elas sejam mais reativas que as maiores, uma vez que as reações químicas acontecem na superfície (PISON et al., 2006). Outra vantagem da nanoescala é o fato de que essas nanopartículas e nanodispositivos apresentam aproximadamente o mesmo tamanho de substâncias biológicas naturais as quais irão atuar, e isso facilita a interação com as mesmas na superfície celular ou intracelular (BAHADORI et al., 2012).

Nanopartícula de ouro

O ouro (Au) é um metal bastante versátil, que apresenta alta capacidade de condução de eletricidade, é facilmente moldado, e pode se ligar a outros metais. Foi

um dos primeiros metais a serem descobertos pelo homem, e já no século IV e V era utilizado em aplicações com fins biomédicos. E a partir de então, o ouro passou a ser cada vez mais estudado, quando foi por diversas vezes sugerido para o uso no tratamento de inúmeras doenças, principalmente as de caráter inflamatório, e/ou condições, como o alcoolismo, e para aliviar dores de pacientes com doenças incuráveis, como o câncer (DYKMAN et al., 2012; KING, 2018). No entanto, o uso de compostos de Au tornou-se limitado devido à alta incidência associada de efeitos colaterais.

O desenvolvimento recente de nanomateriais para uso terapêutico melhorou as ações benéficas, reduzindo as propriedades tóxicas do ouro. As nanopartículas de ouro (AuNPs), formadas a partir de sais de ouro e menores que 100 nanômetros, foram comprovadas por possuir propriedades vantajosas como a estabilidade química e afinidade por biomoléculas, sendo, portanto, ótimas carreadoras de medicamentos para locais específicos do organismo. Além disso, seu uso na medicina tem crescido exponencialmente, sendo utilizadas para o diagnóstico de algumas doenças, e terapia em geral (BRANDENBERGER et al., 2010).

Estudos prévios revelaram que as AuNPs apresentam efeito anti-inflamatório associado à atividade antioxidante, propiciando também a diminuição na geração de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina-1 β (IL-1 β), e redução do acúmulo de células no local da inflamação (DKHIL et al., 2015; LEIBFARTH et al., 1981). O tratamento tópico com AuNPs, por aerossol, foi eficaz em inibir a asma alérgica em camundongos, de forma dependente da diminuição do estresse oxidativo, da produção de citocinas tendo como consequência, a clara redução da resposta inflamatória, do remodelamento tecidual e da hiper-reatividade das vias aéreas (BARRETO et al., 2015). Recentemente, demonstramos a atividade inibitória das AuNPs sobre a resposta fibrótica granulomatosa verificada na condição da silicose experimental murina, quando foi observada a desestruturação dos granulomas dispersos no parênquima pulmonar, favorecendo a abertura das vias aéreas e a saída de células do interior do granuloma, favorecendo o “clearance” celular resultando na melhora da função pulmonar (RIBEIRO, 2018). Corroborando nossos achados, foi verificado também o efeito das AuNPs sobre a injúria hepática induzida por etanol em ratos, sendo descrita redução de esteatose, fibrose e necrose tecidual, com inibição de marcadores de lesão

hepática como estresse oxidativo e produção de citocinas pró-inflamatórias (DE CARVALHO et al., 2018).

No entanto, apesar do potencial terapêutico das AuNPs, a segurança de utilização ainda precisa ser melhor determinada, uma vez que o equilíbrio entre as propriedades terapêuticas e o desenvolvimento de efeitos adversos não está ainda bem estabelecido. Diversas variáveis contribuem para risco-benefício, incluindo algumas características físico-químicas incluindo tamanho, forma, área de superfície e química, o que tem sido pouco descritas na literatura. De toda forma, é importante considerar que os estudos relacionados aos aspectos terapêuticos e toxicológicos foram obtidos empregando diferentes protocolos experimentais (espécie animal/tipo de célula, via de administração e o tempo de exposição). Dessa forma, a aplicação eficaz e segura das AuNPs deve ser estabelecida considerando-se a identificação de várias propriedades físico-químicas das AuNPs em estudo, assim como a determinação da cinética e interação do composto com o tecido alvo. Relatos prévios na literatura apontam para a preferência de acúmulo das AuNPs no fígado, sem evidência de comprometimento do funcionamento desse órgão, havendo posterior deslocamento dessas para os rins, caracterizando assim o processo de excreção renal para as AuNPs (LEUNG, 2013). Exames histológicos complementares incluindo vinte e quatro órgãos de camundongos injetados com AuNPs não revelaram evidência de qualquer toxicidade. Corroborando as observações acima, outros estudos confirmaram o acúmulo preferencial das AuNPs em órgãos como fígado, rins e cérebro, também sem detecção de comprometimento da funcionalidade dos referidos órgãos (HAN et al., 2015; YU et al., 2007).

1 OBJETIVO

1.1 Objetivo Geral

A identificação de uma terapia eficaz no caso de doenças inflamatórias fibróticas pulmonares é premente. Tomando por base achados prévios do nosso grupo, quando mostramos o efeito supressor das AuNPs sobre o quadro de fibrose granulomatosa pulmonar associada à silicose murina, neste projeto tivemos por objetivo ampliar o espectro de análise acerca do efeito anti-inflamatório e antifibrótico das AuNps utilizando, para tanto, o modelo de fibrose pulmonar idiopática induzida por bleomicina em camundongos.

1.2 Objetivos Específicos

Neste estudo avaliamos:

- a) O efeito do tratamento terapêutico com aerossol de AuNPs sobre a função pulmonar e a hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos estimulados com bleomicina;
- b) O efeito do tratamento terapêutico com aerossol de AuNPs sobre a morfologia e morfometria do tecido pulmonar de camundongos estimulados com bleomicina;
- c) O efeito do tratamento terapêutico com aerossol de AuNPs sobre o conteúdo de colágeno total e subtipos I e III do tecido pulmonar de camundongos estimulados com bleomicina;
- d) O efeito do tratamento terapêutico com aerossol de AuNPs sobre o estresse oxidativo no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina;
- e) O efeito do tratamento terapêutico com o aerossol de AuNPs sobre a produção de citocinas e quimiocinas no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57Bl/6, fêmeas, pesando entre 18 a 20g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo. Os animais foram mantidos em estantes aclimatizadas em condições de temperatura entre 22 e 25°C, e ciclo de luz claro/escuro de 12h/12h. Todos os procedimentos realizados envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA) da FIOCRUZ (licença L-001/2019).

2.2 Estimulação com bleomicina

Os camundongos foram anestesiados com isoflurano (4%) até sedação completa, e em seguida expostos pela via orofaríngea com bleomicina (0,03 - 0,3U/40µL/animal) (B5507 - Sigma-Aldrich), dissolvida em salina 0,9% estéril, sendo as análises realizadas 21 dias após. Animais expostos apenas à salina foram utilizados como controles.

2.3 Tratamento com nanopartículas de ouro (AuNPs)

As AuNPs em PBS (752584 - Sigma-Aldrich) (0,15 - 1,5 mg/mL), diluídas em salina 0,9% estéril, foram administradas, por aerossol (3 mL em 30 minutos), nos dias 14, 17 e 20 após a estimulação com bleomicina e as análises realizadas 1 dia após a última dose, como indicado no esquema abaixo:



Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (n=6): i) salina; ii) bleomicina; iii) bleomicina tratado com AuNPs (0,15 mg/mL); e iv) bleomicina tratado com AuNPs (1,5 mg/mL).

2.4 Análise da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas

Foi utilizado o sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasiva (DSI), para registro dos parâmetros de resistência (cmH₂O/mL/s) e elastância pulmonar (mL/cmH₂O). Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/Kg, por via intraperitoneal), e em seguida realizada uma incisão na traqueia e inserida uma cânula que se encontra conectada a um ventilador mecânico, sendo os animais curarizados com brometo de pancurônio (2 mg/Kg). A hiper-reatividade das vias aéreas foi realizado mediante aerosolização de de salina tamponada (PBS) e de concentrações crescentes do agente broncoconstrictor metacolina (9 - 81 mg/mL), com a duração de 5 minutos para cada uma.

2.5 Lavado broncoalveolar (LBA)

Após os animais serem eutanasiados com dose letal de pentobarbital sódico (500 mg/kg, i.p.), o pulmão esquerdo, que foi direcionado para as análises histológicas, foi clampeado para não sofrer nenhuma insuflação durante a lavagem, posteriormente os animais foram submetidos a perfusão com uma cânula intracardina uma incisão traqueia, e através de uma cânula foi feita infusão lenta de 1mL de solução salina tamponada contendo EDTA 10mM. As amostras recolhidas foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 min à 4°C, e o precipitado celular foi ressuscitado em uma solução de PBS + EDTA 10mM (250 µL) para a avaliação do infiltrado celular.

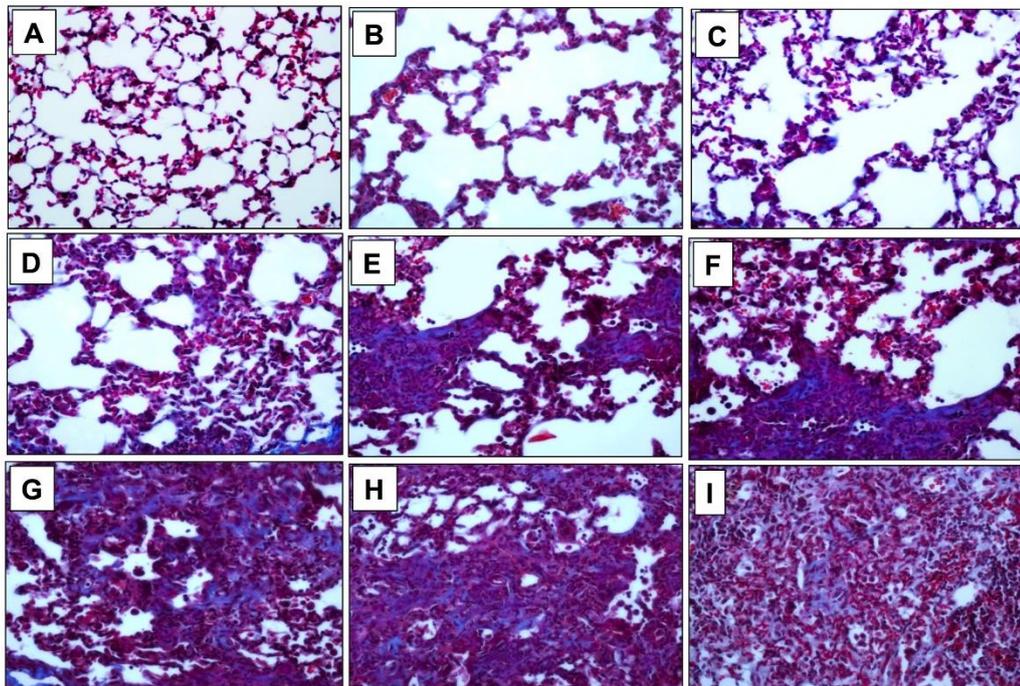
2.6 Histologia

Posteriormente à obtenção do LBA, os pulmões foram perfundidos com solução salina 0,9% contendo EDTA 20mM, através de um escalpe no coração (ventrículo direito). O pulmão direito foi então retirado, congelado e armazenado em freezer -20°C para posterior análises. E o pulmão esquerdo foi extraído e imerso em solução de Millonig para processamento histológico que constou de seis etapas, descritas a seguir: (I) desidratação em concentrações crescentes de etanol (70 a 100%); (II) clarificação com a substituição do etanol pelo xilol; (III) inclusão em parafina; (IV) realização de cortes finos em micrótomo (espessura de 5µm); (V) coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e tricrômico de Gomori (TG) para análise da estrutura do

pulmão e da matriz extracelular, respectivamente; (VI) digitalização das amostras em aparelho 3DHISTECH - Panoramic viewer MIDI.

2.7 Escore

Definição de fibrose de acordo com escala modificada por Hübner et al., fibrose induzida por aspiração orofaríngea de bleomicina (0,06U/animal) em camundongos. (A) Grau 0 – pulmão normal; (B) Grau 1 – alteração fibrótica com septos alveolares com discreto espessamento; (C) Grau 2 – alteração fibrótica com septos alveolares mais espessados; aumento de espaços alveolares sem dano à arquitetura do pulmão; (D) Grau 3 – septos alveolares com paredes fibróticas contíguas, ausência de massa fibrótica; leve a moderado infiltrado linfo-histiocitário; (E) Grau 4 – presença de massas fibróticas únicas, moderada fibrose peribronquiolar e perivascular; (F) Grau 5 – massas fibróticas confluentes; presença de macrófagos espumosos/ativados; (G) Grau 6 – espaços alveolares reduzidos e grandes massas fibróticas contíguas; (H) Grau 7 – obliteração por massas fibrosas, distorção da estrutura da arquitetura do pulmão; (I) Grau 8 – obliteração fibrosa completa.



2.8 Quantificação de colágeno total

O conteúdo de colágeno do pulmão direito foi quantificado através do ensaio colorimétrico de SircolT M (Biocolor). As amostras de pulmão foram maceradas com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (IKA T10 basic) em 1 mL da solução de

TRIS 0.05M, NaCl 1M e do coquetel com inibidores de proteases (COMPLETE-Sigma/Roche) pH=7,5, mantidos por 12 horas a 4°C. Após centrifugação a 15.000 x g a 4°C, por 1 hora, o sobrenadante foi recolhido (20 µL) e, adicionado ao reagente de Sirius Red® (200 µL), e feita incubação por 30 minutos. Após nova centrifugação, foi descartado o sobrenadante e adicionado o reagente de Alkaline (200 µL) ao precipitado celular. As amostras foram adicionadas a placas de 96 poços, e a densidade óptica obtida em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 590 nm. Os resultados foram expressos em µg de colágeno/pulmão direito. Ao final, as amostras foram escaneadas em aparelho 3DHISTECH - Panoramic viewer MIDI.

2.9 Quantificação de Proteína

Foi realizada através do método colorimétrico de ácido bicinconínico (BCA). Amostras de tecido pulmonar foram maceradas em uma solução de PBS 1x contendo Triton 0,1% e o coquetel de inibidores de proteases (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suíça). Após centrifugação a 13.000 x g a 4°C, por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido e, feita diluição em PBS (5 vezes) e adição à placa de 96 poços. Foi adicionada a solução de BCA e Cu^{+2} , e aguardado o tempo de 5 minutos a 60°C. Neste ensaio foi utilizada uma curva padrão que consistiu de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (0,351 mg/mL – 2,0 mg/mL). Após o término da reação, a densidade óptica foi medida em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 540 nm.

2.10 Western Blotting

Técnica utilizada para análise dos subtipos de colágeno (I e III) e do fator de transcrição NRF2. As amostras de tecido pulmonar foram maceradas em 300 µL de solução tampão de lise RIPA, contendo inibidores de protease (1:100) e fosfatase (1:100) e, em seguida, centrifugadas a 13000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e uma alíquota separada para a dosagem de proteínas (subitem 3.9). As amostras foram diluídas com tampão, e aquecidas a 95°C durante 5 minutos, e em seguida submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (sendo o gel de corrida de 9% e o gel de empacotamento de 4%), a uma

voltagem de 80 V por aproximadamente 2 horas. As proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (sistema Trans-Blot Turbo - Bio-Rad) a 25 V- 1,5A durante 1 hora. Em seguida, foi feito o bloqueio com BSA 5% em tampão TRIS-salina contendo Tween-20 0,1% por 1 hora, e incubação com o anticorpo primário sob agitação lenta e refrigeração 4°C por 12 horas. Na sequência, a membrana foi lavada 3 vezes com T-TBS por 5 minutos, sob agitação, e feita a incubação com o anticorpo secundário durante 1 hora, sob agitação lenta à temperatura ambiente. A membrana foi lavada 5 vezes por 5 minutos com T-TBS e depois 1 vez com TBS por 5 minutos e, posteriormente, feita a revelação no aparelho ChemiDoc™ MP Imaging System.

Quadro 1 – Anticorpos utilizados para ensaio de Western Blotting

Anticorpo Primário	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
Anti-colágeno I de camundongos (Millipore)	1:500	Anti-IgG de camundongo (Thermo-Fisher)	1:5000
Anti-colágeno III de coelho (Abcam)	1:2500	Anti-IgG de coelho (R&D)	1:700
Anti-NRF2 de cabra (Santa Cruz)	1:500	Anti-IgG de cabra (Novels)	1:2000
Anti-beta actina de coelho (Cell Signalling)	1:1000	Anti-IgG de coelho (R&D)	1:700

2.11 Quantificação de mediadores inflamatórios

Para a avaliação de citocinas e quimiocinas inflamatórias foi utilizada a técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Inicialmente, foram adicionados a placas de 96 poços os anticorpos de captura, diluídos em tampão (NaCl 1.5M, H3BO4 0,5M e NaOH 1N, pH = 7.4), sendo feita incubação pelo período de 12 horas a 4°C. Em seguida, foram feitas 3 lavagens sucessivas (200 µL/poço) com tampão (timerosal, KPO4 1M e Tween20 0,005%). Após essa etapa para bloqueio de sítios inespecíficos, a placa foi preenchida (200 µL/poço) com PBS e BSA, 1% por 1 hora à 20°C. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com o tampão de lavagem (200

$\mu\text{L/poço}$). As amostras de tecido pulmonar foram maceradas PBS contendo Triton 0,1% e um coquetel de inibidores de proteases (COMPLETE - Sigma/Roche) (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suíça, e posteriormente centrifugadas a $13.000 \times g$ a 4°C , por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido, adicionado a placas preparadas conforme descrição acima. As amostras foram diluídas em solução tampão contendo BSA 2% em PBS e adicionadas $100 \mu\text{L/poço}$ à placa sendo mantidas por 2 horas a 37°C . Após o período de incubação foi feita lavagem por 3 vezes com solução tampão de lavagem. Foram adicionados $50 \mu\text{L/poço}$ do anticorpo detector biotilado ($50 \mu\text{g/mL}$) e feita incubação por 1 hora a 20°C . Na sequência, os poços foram lavados com solução tampão de lavagem ($200 \mu\text{L/poço}$), e feita adição do anticorpo secundário ligado à neutravidina “horseradish peroxidase” (HRP) ($50 \mu\text{L/poço}$) diluído em tampão contendo BSA 2% em PBS durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a última lavagem com solução tampão de lavagem ($200 \mu\text{L/poço}$), foi feita a adição do substrato cromogênico (K-Blue®) ($50 \mu\text{L/poço}$), e após aproximadamente 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de H_2SO_4 0,19M ($50 \mu\text{L/poço}$). A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro em leitora de placa no comprimento de onda de 450 nm e os resultados foram expressos em pg/pulmão direito. Os mediadores analisados incluíram as citocinas (IL-6, IL-1 β , TGF β) e quimiocinas (KC, MCP-1 e MIP-1 α) no pulmão e foram utilizados através de kit comerciais (Duo Set, R&D System, Estados Unidos), seguindo as recomendações do fabricante.

2.12 Quantificação de ROS total

Após obtenção do lavado broncoalveolar, foi realizada uma centrifugação à $1300 \times g$ por 10 minutos e as células foram ressuspendidas em PBS e plaqueadas em uma placa escura de 96 poços. Foi utilizada a sonda intracelular e diacetato de diclorofluorescina – DCF e leitura foi realizada em fluorescência (Ex. 495 Em. 525).

2.13 Estresse oxidativo

Os fragmentos do tecido pulmonar foram em $500 \mu\text{L}$ de tampão fosfato de potássio + EDTA (KPE) (pH 7,5) e, posteriormente, as amostras foram centrifugadas

a 600 g por 10 minutos, a 4° C, o sobrenadante recolhido e o *pellet* descartado. Por fim, as amostras foram armazenadas a -20°C.

2.14 Enzima Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em concentrações conhecidas, a partir do primeiro minuto de reação. Para esse ensaio, foi preparado o “MIX”, contendo 25 mL de água destilada e 40 µL de peróxido de hidrogênio. Posteriormente, foi adicionado 1 µL de amostra para 99 µL do MIX. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro (*SpectraMax M5* – Molecular Devices) em absorvância de 240 nm, utilizando-se placa UV. Os valores foram expressos por U/mg de proteína.

2.15 Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Foi avaliada através do método descrito por Bannister e Calabrese (1987). A determinação da atividade foi feita através da inibição do produto de auto-peroxidação de epinefrina, durante a auto-oxidação. Para a mensuração da atividade de SOD, utilizou-se o tampão glicina (pH 10.2) e as amostras do tecido pulmonar foram dispostas em três volumes diferentes (1 µL, 2 µL e 3 µL). Depois foram adicionados 193 µL de tampão glicina, 2 µL de catalase e 4 µL de epinefrina e a leitura foi feita imediatamente em espectrofotômetro (*SpectraMax M5* – Molecular Devices) a 480 nm. Como controle foi feito o branco onde foi avaliado a livre oxidação da epinefrina sem as amostras. Após a leitura, os valores foram expressos em U/ mg proteína.

2.16 Quantificação de Malondialdeído (MDA)

Foi utilizado o método de TBARS descrito por Draper e colaboradores (1990), como parâmetro de peroxidação lipídica. As amostras de tecido pulmonar (100 µL) foram homogeneizadas em 100 µL de ácido tricloroacético 10% e centrifugadas por 15 minutos, a 3.600 xg em temperatura de 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi recolhido e adicionado 150 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA), as amostras foram

aquecidas em banho-maria a seco a 95 °C, por 10 minutos. Níveis de MDA foram determinados por absorbância a 532 nm (*SpectraMax M5* – Molecular Devices) e expressas como nM/mg de proteína.

2.17 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM,) e analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de Newman-Keuls-Student. Os Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS

3.1 Efeito das nanopartículas de ouro (AuNPs) sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos estimulados com bleomicina

De forma a estabelecermos o modelo experimental de FPI, a ser utilizado neste estudo, inicialmente, avaliamos o efeito de diferentes doses do composto bleomicina (0,03 – 0,1 UI/animal), na indução de alterações morfológicas no tecido pulmonar de camundongos. Em comparação aos animais controles (salina), vimos que a bleomicina (aspiração orofaríngea) induziu um processo inflamatório caracterizado por infiltrado celular difuso, espessamento de septos alveolares e a presença de deposição de matriz extracelular, de forma dose-dependente. A resposta máxima (80% do parênquima pulmonar ocupado por deposição de fibras colágenas) foi observada com a maior dose (0,1 UI/animal), porém foi verificada, em paralelo, uma elevada taxa de mortalidade. Dessa forma, a dose intermediária de bleomicina de 0.06 UI/animal foi a escolhida para utilização no decorrer do estudo. O protocolo experimental utilizado constou da utilização de camundongos desafiados com bleomicina (0.06 UI/animal), e a administração de AuNPs (0,15 e 1,5 µg /mL), por aerossol, nos dias 14, 17 e 20 pós bleomicina, sendo a análise feita 1 dia após a última dose.

Nosso primeiro objetivo foi avaliar os parâmetros de função pulmonar e a hiper-reatividade das vias aéreas dos camundongos. Observamos que os animais estimulados com a bleomicina (controle positivo) não mostraram aumento nos níveis basais de resistência das vias aéreas em comparação ao grupo salina (controle negativo). Porém, frente à aerossolização com o agente broncoconstritor metacolina (9, 27 e 81 mg/mL), vimos um aumento nos níveis de resistência das vias aéreas nos animais do grupo salina, e uma exacerbação dessa resposta no grupo dos animais instilados com a bleomicina, em comparação àqueles estimulados com salina, caracterizando assim um quadro de hiper-reatividade das vias aéreas frente ao agente broncoconstritor utilizado (Figura 3A). O tratamento terapêutico com AuNPs por aerossol, nas doses de 0,15 e 1,5 µg /mL, reverteram as alterações provocadas pela bleomicina, ou seja, o tratamento com ambas as doses reduziu significativamente o quadro de hiper-reatividade das vias aéreas de animais instilados com bleomicina

(Figura 3A). Com relação ao parâmetro de elastância pulmonar, relacionado com a capacidade de expansão do pulmão, novamente não vimos diferença a nível basal entre os animais estimulados com a bleomicina e com salina (Figura 3B). Após a aerossolização com metacolina houve um aumento significativo na intensidade da resposta. O tratamento com as AuNPs, em ambas as doses (0,15 e 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), também reduziu a exacerbação da resposta de elastância pulmonar na condição de estimulação com a bleomicina (Figura 3B). Esses achados foram corroborados pela análise da área sob a curva que mostrou o efeito inibitório das AuNPs sobre o aumento nos níveis de resistência (Figura 3C) e elastância (Figura 3D) pulmonar induzidos pela provocação com bleomicina.

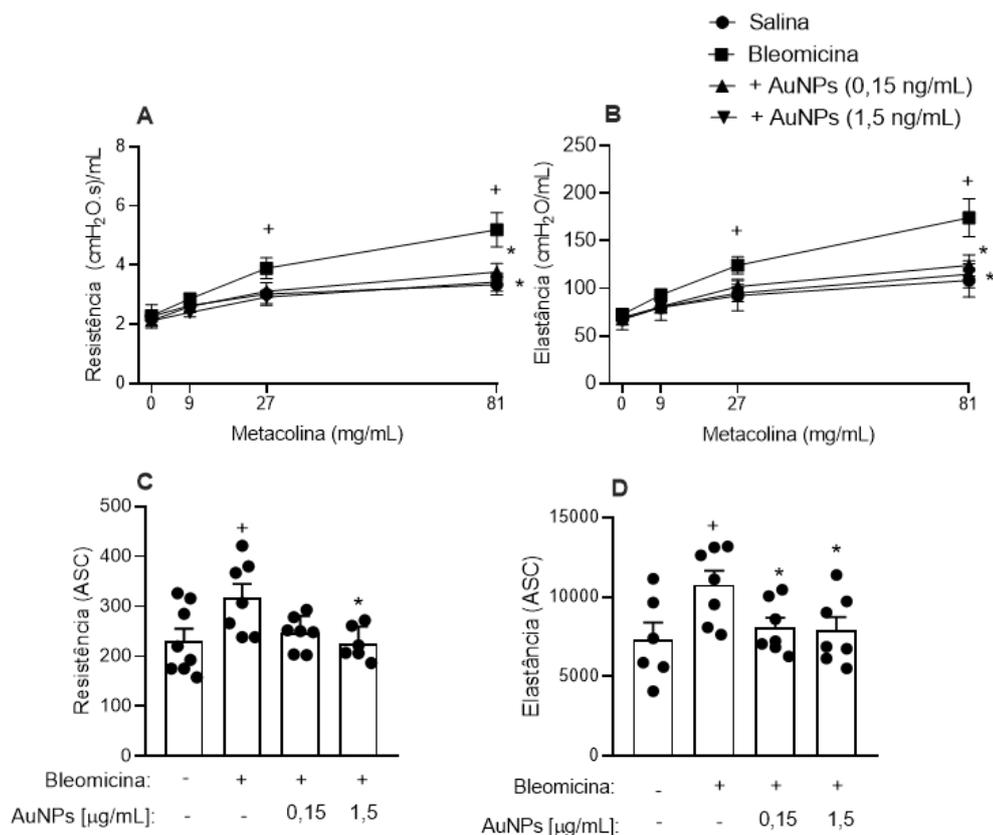


FIGURA 3 - Efeito do tratamento com AuNPs (0,15 e 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre a função pulmonar de camundongos estimulados com bleomicina. Os parâmetros avaliados foram: (A) resistência das vias aéreas; (B) elastância pulmonar; (C) área sob a curva - resistência; e (D) área sob a curva - elastância. As análises foram realizadas 21 dias após desafio com bleomicina (0,06 UI/a). Os valores representam a média \pm erro

padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina; * $p < 0,05$ comparado ao grupo bleomicina.

3.2 Efeito das nanopartículas de ouro (AuNPs) nas alterações morfológicas e a fibrose no tecido pulmonar de camundongos estimulados com bleomicina

Na sequência, avaliamos o efeito do tratamento com AuNPs sob as alterações morfológicas no pulmão dos animais provocados com a bleomicina. Através da coloração por hematoxilina e eosina (HE), para a análise morfológica, verificamos que nos animais controles (salina), o parênquima pulmonar e vias aéreas se mostraram preservados, havendo ausência de infiltrado inflamatório e áreas espaçadas (Figura 4A). No caso dos animais estimulados com a bleomicina, observamos uma expressiva modificação da arquitetura do pulmão, com a presença de marcado infiltrado inflamatório e áreas de adensamento dispersas no parênquima pulmonar (Figura 4B). O tratamento com as AuNPs foi eficaz em reduzir este quadro de alteração tecidual, como efeito inibitório das AuNPs, significativo, sendo observado apenas com a maior dose (1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figuras 4C e 4D).

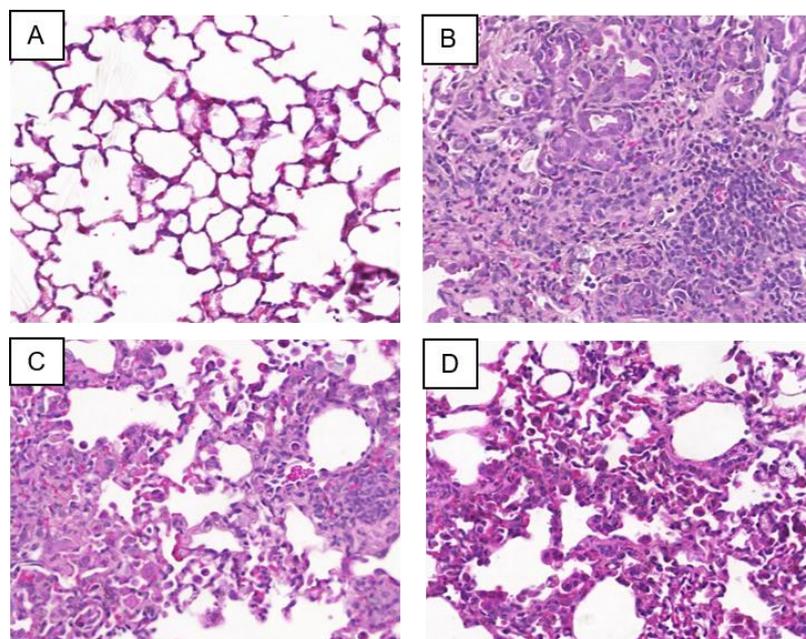


FIGURA 4 - Efeito do tratamento com AuNPs (0,15 e 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais estimulados com (A) salina; (B)

bleomicina; (C) bleomicina e tratados com nanopartículas de ouro ($0,15 \mu\text{g} / \text{mL}$); e (D) bleomicina e tratados com nanopartícula de ouro ($1,5 \mu\text{g} / \text{mL}$). Coloração por hematoxilina e eosina. Barra = $100 \mu\text{m}$.

De forma adicional, utilizamos o corante tricrômico de Gomori para identificação de componentes de matriz extracelular, com especial ênfase para fibras colágenas. A estimulação com bleomicina (Figura 5B) induziu claro aumento na deposição colágeno, em comparação ao grupo controle (salina) (Figura 5A), e o tratamento com as AuNPs atuou inibindo a resposta fibrogênica notada no grupo provocado (Figuras 5C e 5D). Como mostrado na Figura 6, quando o tecido pulmonar foi avaliado semiquantitativamente através do sistema de escore, variando de 0 a 8, o efeito supressor das AuNPs sobre componente fibrótico tecidual foi confirmado.

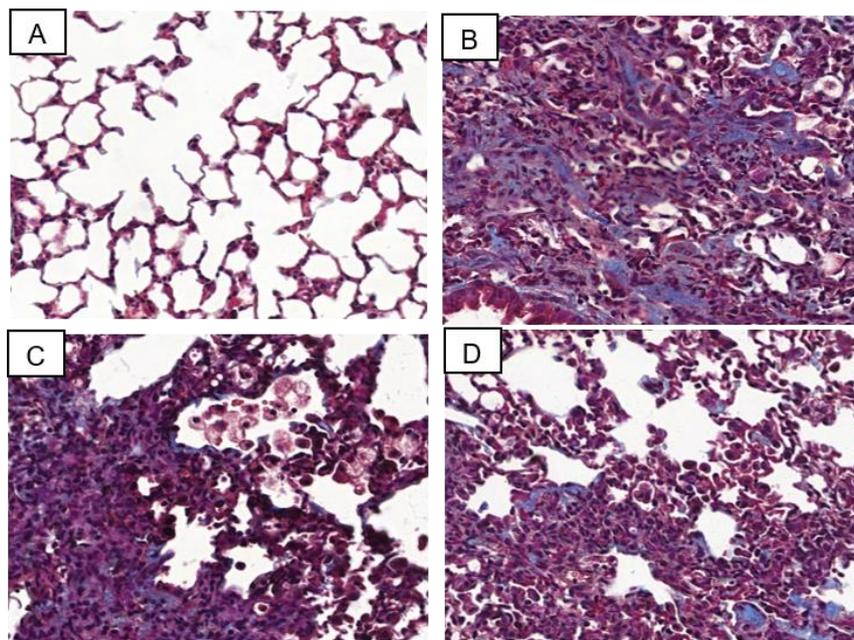


FIGURA 5 - Efeito do tratamento com AuNPs ($1,5 \mu\text{g} / \text{mL}$) sobre a deposição de matriz extracelular no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais estimulados com (A) salina; (B) bleomicina; (C) bleomicina e tratados com AuNPs ($0,15 \mu / \text{ml}$); (D) bleomicina e tratados com AuNPs. Coloração por tricrômico de Gomori. Barra = $100 \mu\text{m}$.

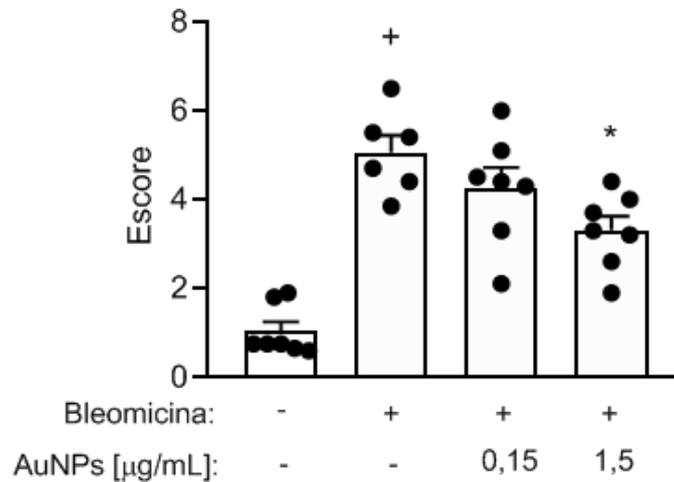


FIGURA 6 - Efeito do tratamento com AuNPs (0,15 e 1,5 µg /mL) sobre o padrão de fibrose pulmonar em camundongos estimulados com bleomicina. Análise do escore no pulmão de animais estimulados com salina; bleomicina; bleomicina e tratados com AuNPs. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. + $p < 0,05$ comparado ao grupo salina; * $p < 0,05$ comparado ao grupo bleomicina.

O colágeno é considerado como o principal componente do tecido fibrótico, sendo assim, na próxima etapa avaliamos de forma mais detalhada o efeito das AuNPs sobre este parâmetro. Verificamos aumento no conteúdo de colágeno total no pulmão dos animais estimulados com a bleomicina, em comparação aos controles (salina), e que o tratamento com AuNPs inibiu esta resposta de forma significativa, em ambas as doses testadas (Figura 7). Mais ainda, avaliamos os principais tipos de colágeno envolvidos em processos fibróticos, tipos I e III, através da técnica de western blotting. Verificamos o aumento em ambos os tipos de colágeno, no pulmão dos animais estimulados com bleomicina, em comparação aos controles (salina) (Figuras 8A e 8B, respectivamente). O tratamento com AuNPs inibiu a produção do colágeno tipo I, de forma significativa com a maior dose (Figura 8A), enquanto que não interferiu com a produção de colágeno do tipo III (Figuras 8B).

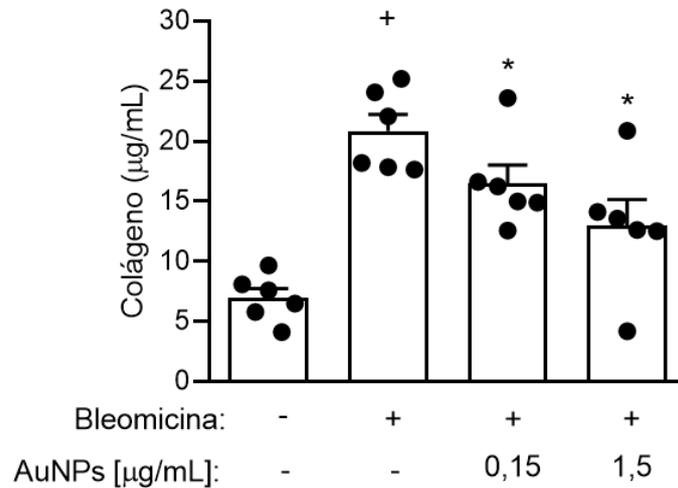


Figura 7 - Efeito do tratamento com AuNPs (0,15 e 1,5 µg /mL) sobre a quantificação de colágeno no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina. Análise do conteúdo de colágeno no pulmão de animais estimulados com salina; bleomicina; bleomicina e tratados com AuNPs (0,15 e 1,5 µg /ml). Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. +p<0,05 comparado ao grupo salina; *p<0,05 comparado ao grupo bleomicina.

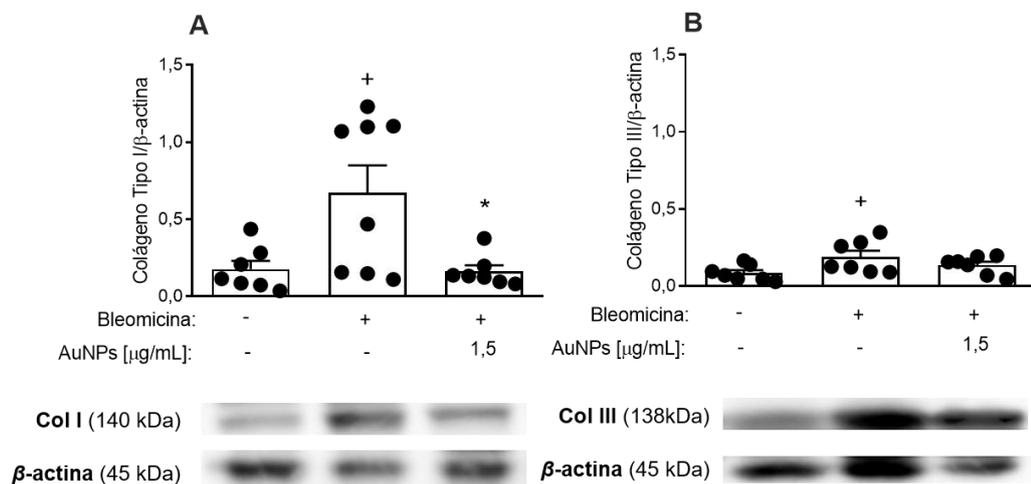


FIGURA 8 - Efeito do tratamento com AuNPs (1,5 µg /ml) sobre a expressão de colágeno tipo I e tipo III no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina. Análise da expressão de (A) colágeno tipo I; e (B) colágeno tipo III no pulmão de animais estimulados com salina; bleomicina; bleomicina e tratados com AuNPs (0,15 e 1,5 µg /mL). Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) de no

mínimo 5 animais. +p<0,05 comparado ao grupo salina; *p<0,05 comparado ao grupo bleomicina

3.3 Efeito das nanopartículas de ouro (AuNPs) sobre o estresse oxidativo no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina

Estudos mostram que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese da FPI (OTOUPALOVA et al., 2020). Neste sentido, analisamos o efeito antioxidante das AuNPs na condição de desafio com a bleomicina. Para avaliação das espécies reativas de oxigênio (do inglês “reactive oxygen species” – ROS) foi utilizado sistema de células recuperadas a partir do lavado broncoalveolar. Detectamos um aumento significativo nos níveis de ROS no pulmão dos animais estimulados com bleomicina, e o tratamento com AuNPs inibiu em sua maior dose (1,5 µg/mL) (Figura 9). Em seguida, analisamos o efeito das AuNPs sobre a atividade de enzimas antioxidantes, tendo como primeira enzima, a catalase (CAT), vimos que o tratamento com AuNPs, na maior dose (1,5 µg /mL), se mostrou efetivo em recuperar a atividade desta enzima, que estava reduzida nos animais estimulados com a bleomicina (Figura 10A). Posteriormente a isso verificamos a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Observamos uma redução significativa na atividade desta enzima, no pulmão dos animais estimulados com a bleomicina, e que a administração das AuNPs não foi eficaz em restabelecer os níveis de atividade da SOD (Figura 10B). Avaliamos, também, a produção de malondialdeído (MDA), um produto de peroxidação lipídica. Através da técnica colorimétrica de TBARS mostramos um aumento significativo nos níveis de MDA nos pulmões dos animais estimulados com a bleomicina, comparados aos controles, e AuNPs, na maior dose (1,5 µg /mL), reduziu significativamente os níveis deste produto de dano oxidativo (Figura 11).

O fator de transcrição nuclear derivado de eritróide (NRF2) é uma proteína que atua como um fator de transcrição de genes que codificam para enzimas antioxidantes (BOUTTEN et al., 2010; HYBERTSON et al., 2011), sendo considerado um regulador chave na defesa do organismo. Verificamos um aumento da proteína NRF2 no tecido pulmonar após estimulação com bleomicina, e que de forma interessante a administração das AuNPs levou a um quadro de potenciação da proteína NRF2 no pulmão dos animais previamente estimulados com bleomicina (Figura 12).

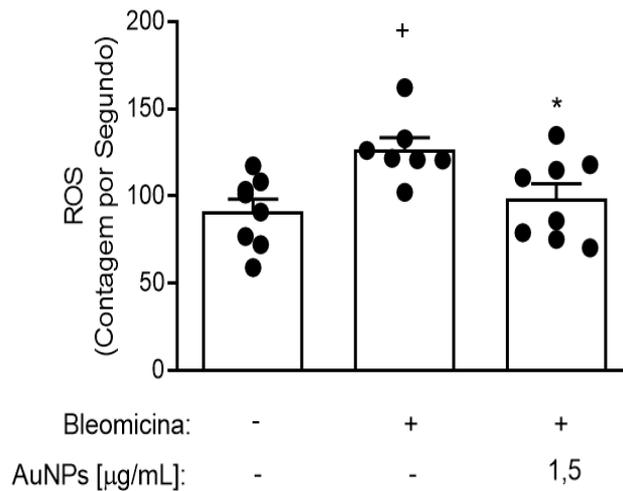


FIGURA 9 - Efeito do tratamento com AuNPs (1,5 μg/mL) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio no lavado broncoalveolar de camundongos instilados com bleomicina. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio no lavado broncoalveolar de animais estimulados com salina; bleomicina; bleomicina e tratados com AuNPs (1,5 μg /mL). Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. +p<0,05 comparado ao grupo salina; *p<0,05 comparado ao grupo bleomicina.

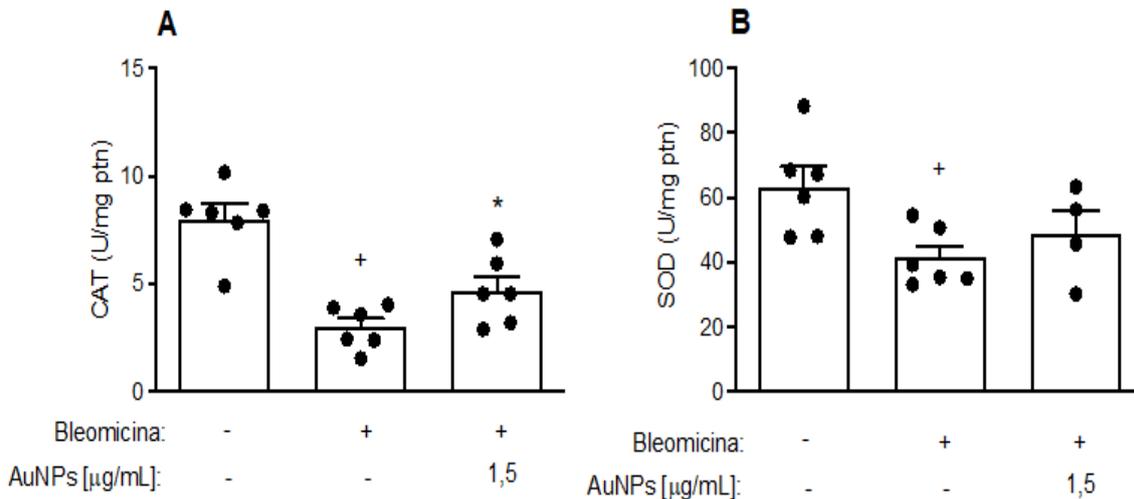


FIGURA 10 - Efeito do tratamento com AuNPs (1,5 μg/mL) sobre a atividade de enzimas antioxidantes no pulmão de camundongos instilados com bleomicina. As enzimas analisadas foram (A) catalase (CAT); e (B) superóxido dismutase (SOD) no pulmão de animais estimulados com salina; bleomicina; bleomicina e tratados com AuNPs (1,5 μg /mL). Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. +p<0,05 comparado ao grupo salina; *p<0,05 comparado ao grupo bleomicina.

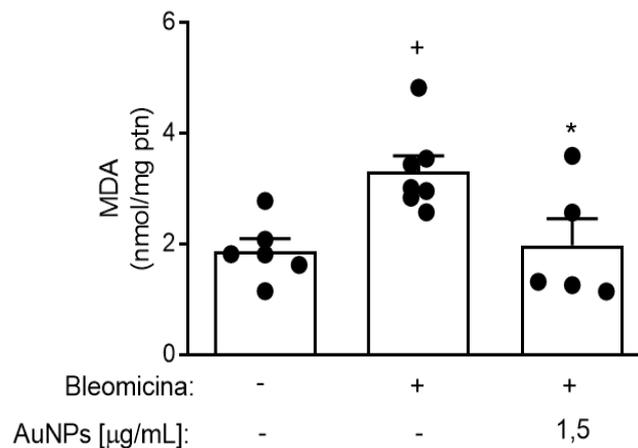


Figura 11 - Efeito do tratamento com AuNPs (1,5 µg/mL) sobre os níveis de malondialdeído (MDA) no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina. Análise quantitativa do produto de peroxidação lipídica malondialdeído no tecido pulmonar de camundongos estimulados com salina; bleomicina; bleomicina e tratados com AuNPs (1,5 µg /mL). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. ⁺p<0,05 comparado ao grupo salina; ^{*}p<0,05 comparado ao grupo bleomicina.

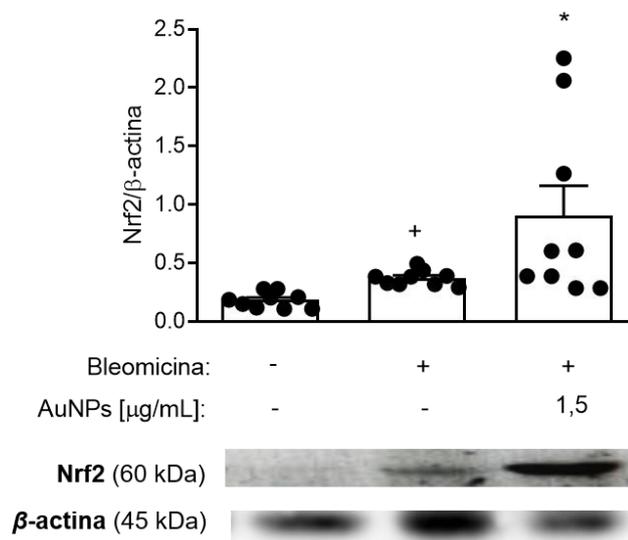


FIGURA 12 - Efeito do tratamento com AuNPs (1,5 µg /mL) sobre NRF2 no pulmão de camundongos estimulados instilados com bleomicina. Análise da expressão de NRF2 no tecido pulmonar de animais estimulados com salina; bleomicina; bleomicina e tratados com AuNPs (1,5 µg /mL). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. ⁺p<0,05 comparado ao grupo salina; ^{*}p<0,05 comparado ao grupo bleomicina.

3.4 Efeito das AuNPs sobre a produção de citocinas e quimiocinas no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina

A participação das quimiocinas e citocinas no desenvolvimento da fibrose pulmonar é crucial, podendo contribuir de forma importante para a perpetuação da doença (PHAN et al., 2021). Dessa forma, visando aprofundar acerca do mecanismo de ação associado ao efeito supressor das AuNPs, avaliamos a produção de mediadores proteicos importantes no processo inflamatório e fibrótico. Detectamos aumento nos níveis das citocinas IL-6 (Figura 13A), IL-1 β (Figura 13B) e TGF- β (Figura 13C) e das quimiocinas KC (Figura 13D), MIP-1 α (Figura 13E) e MCP-1 (Figura 13F) no pulmão dos animais estimulados com a bleomicina, em comparação aos do grupo controle. Na condição do tratamento com as AuNPs, vimos redução na produção de IL-6 (Figura 13A), IL-1 β (Figura 13B) e TGF- β (Figura 13C), enquanto que no caso das quimiocinas apenas KC (Figura 13D) e MCP-1 (Figura 13F) foram sensível às AuNPs. Os níveis de MIP-1 α (Figura 13E) não se mostraram alterados na condição da provocação com bleomicina.

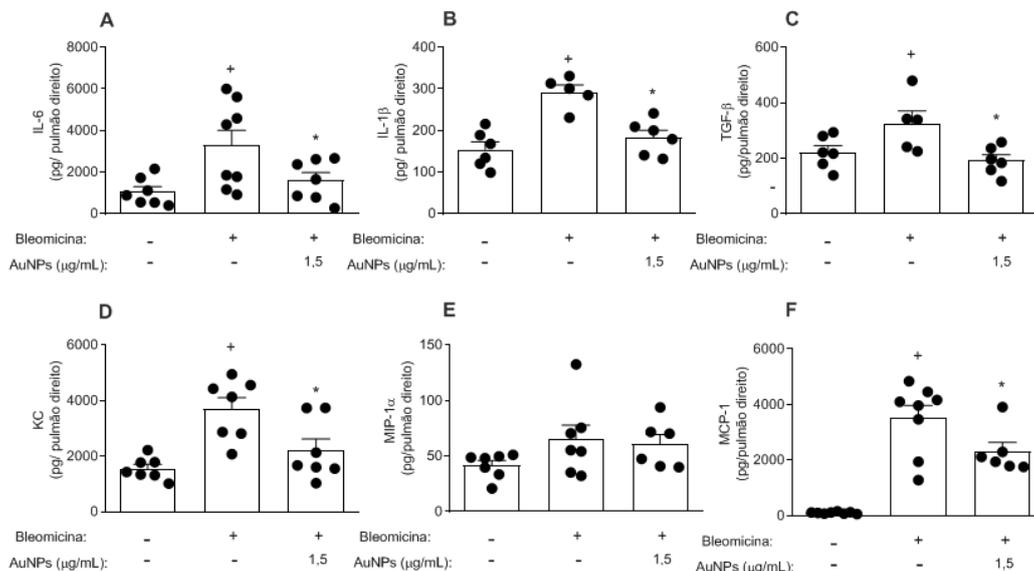


FIGURA 13 - Efeito do tratamento com AuNPs (1,5 µg/mL) sobre a produção de citocinas e quimiocinas no pulmão de camundongos estimulados com bleomicina. Análise da produção de citocinas (A) IL-6; (B) IL-1 β ; (C) TGF- β ; quimiocinas (D) KC; (E) MIP-1 α ; e (F) MCP-1 no pulmão de animais estimulados com salina; bleomicina; bleomicina e tratados com AuNPs (1,5 µ /mL). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. +p<0,05 comparado ao grupo salina; *p<0,05 comparado ao grupo bleomicina.

4 DISCUSSÃO

A fibrose pulmonar idiopática é uma doença de grande importância clínica, negligenciada, e, também, relevante sob o ponto de vista socioeconômico, uma vez que compromete a força de trabalho dos pacientes em estágio avançado da doença. Doença frequentemente fatal, com tempo de vida de pacientes de 3 a 5 anos. Tem como característica a presença de componente inflamatório inicial decorrente do acúmulo de células do sistema imune, inato e adaptativo, que leva a um processo de reparo tecidual, quando se verifica a ativação de fibroblastos seguida da deposição exacerbada de componentes da MEC, caracterizando um quadro de fibrose tecidual (WYNN, 2008). Estudos demonstram que com a fibrose instalada, e conseqüente redução da luz alveolar, o pulmão apresenta perda da capacidade de distensibilidade, menor quantidade de ar total, refletindo um declínio da função pulmonar e comprometimento na troca gasosa em pacientes portadores de fibrose pulmonar idiopática (CARRINGTON et al., 2018; DELLA LATTA et al., 2015; ZHOU et al., 2017).

Na literatura são descritos alguns modelos experimentais de FPI, que buscam reproduzir as alterações morfológicas observadas na doença humana. Tendo em vista a dificuldade em transpor o modelo de FPI humano para modelo em animais, com fins de testagem na pesquisa, no nosso laboratório foi estabelecido o modelo de FPI experimental murino, induzido mediante aspiração orofaríngea de bleomicina, caracterizado por intenso infiltrado inflamatório, deposição de fibras colágenas no parênquima pulmonar e conseqüente comprometimento da função respiratória (YU et al., 2022). Estudos apontam que a bleomicina se distribui pelo organismo como um todo, incluindo pulmão e pele, sendo inativada por uma enzima hidrolase que cliva retirando grupo amônia da molécula. Pelo fato de que nestes órgãos há pouca quantidade dessa enzima, a bleomicina não é inativada tendo como conseqüência concentrações aumentadas no pulmão e na pele, o que justifica a toxicidade cutânea e pulmonar quando uso deste composto (LIU et al., 2017).

Doenças inflamatórias de caráter fibrótico, como a FPI, não têm um tratamento eficaz até o presente momento, havendo apenas terapias que visam aliviar os sintomas, tanto quanto possível, e retardar sua progressão. Há alguns anos, a aprovação do nitendanibe e da pirfenidona, marcou o início de uma nova era para os pacientes com FPI. No entanto, há questões ainda não respondidas como o benefício

terapêutico dos compostos nos vários estágios da doença, se mantêm eficácia ao longo do tempo e efeitos colaterais (BARBOSA et al., 2020; GLASS et al., 2022). Neste sentido, estudos adicionais se fazem necessários para obtenção de mais evidências acerca dos benefícios destes compostos, e, também, para a identificação de novas terapias eficazes em retardar a progressão da doença com consequente melhoria da qualidade de vida.

Neste contexto, destaca-se o ouro, considerado um metal pouco corrosivo, dos mais inertes, cujas propriedades têm sido exploradas desde os tempos antigos, destacando-se o potencial antioxidante e anti-inflamatório. Com o desenvolvimento das AuNPs, foram verificadas baixa citotoxicidade, biocompatibilidade, e facilidade em atingir células alvo. Mais ainda, estudos mostraram que sua utilização não promove nenhum tipo de alteração morfológica que caracterize um dano tecidual, bem como não foram identificadas alterações de marcadores bioquímicos indicativos comprometimento hepático ou renal (CHEN et al., 2013; HAN et al., 2015; RAMBANAPASI et al., 2016).

Em estudos prévios do nosso grupo foi avaliado o efeito das AuNPs em modelos de inflamação pulmonar crônica, sendo evidenciadas as propriedades anti-inflamatória e antifibrótica dessas partículas quando administradas topicamente (BARRETO et al., 2015). No presente estudo, analisando o efeito do tratamento terapêutico com as AuNPs sobre o quadro de fibrose pulmonar, induzida por bleomicina, observamos, através do sistema de pletismografia de corpo inteiro invasiva, que a resposta exacerbada dos parâmetros de resistência das vias aéreas e elastância pulmonar, verificada na condição de exposição ao agonista broncoconstrictor metacolina, foi sensível ao tratamento com as AuNPs. Esses resultados confirmaram dados prévios que mostraram o restabelecimento da função pulmonar em modelos experimentais de asma aguda (BARRETO et al., 2015), asma resistente aos glicocorticóides (SERRA et al., 2022) e silicose em camundongos (RIBEIRO, 2018) na condição de tratamento com as AuNPs. De forma contrária, Hussain et al., descreveram o agravamento, pelas AuNPs, da resposta inflamatória pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas em modelo de asma alérgica, induzida por agentes químicos, apenas na condição sensibilização e de forma associada ao dano epitelial e ao aumento de edema (HUSSAIN et al., 2011). De fato, na literatura são descritos alguns efeitos tóxicos pelas AuNPs, como a ação indutora de dano ao DNA no córtex cerebral de ratos

(CARDOSO et al., 2014). De forma geral, estudos voltados para a toxicidade das AuNPs têm discrepância em seus relatos, fato este que pode estar relacionado às propriedades intrínsecas das partículas como o tamanho, além de diferenças relacionadas aos modelos experimentais, às doses, às vias de administração e aos protocolos de tratamento utilizados (UCHIYAMA et al., 2014).

A lesão pulmonar observada após a bleomicina compreende ocorrência de edema intersticial com influxo de células inflamatórias e do sistema imune, o que pode levar ao desenvolvimento de fibrose pulmonar, caracterizada pelo aumento da produção e deposição de colágeno e outros componentes da matriz (LIU et al., 2017). Verificamos, através da coloração por H&E, a presença de um perfil inflamatório nos pulmões dos camundongos estimulados com bleomicina, na dose previamente selecionada de 0,6UI/animal e no tempo de 21 dias. Através da coloração com tricrômico de Masson, detectamos a deposição de componentes de matriz extracelular dispersa no parênquima pulmonar, coincidentes às áreas de adensamento tecidual verificadas quando usada coloração com H&E. Através da análise semiquantitativa de escore, de acordo com os critérios descritos por Hübner et al., confirmamos a presença de fibrose pulmonar nos camundongos estimulados com bleomicina (HÜBNER et al., 2008). A administração terapêutica das AuNPs reduziu de forma significativa a resposta fibrótica induzida pela bleomicina. Esses achados foram consistentes com aqueles descritos por Barreto et al., que demonstram em duas cepas de camundongos, Swiss-Webster (não isogênica) e A (isogênica), que o tratamento com as AuNPs inibiu a resposta pulmonar desencadeada pela estimulação antigênica (BARRETO et al., 2015). No caso específico dos camundongos A/J, reconhecidos como geneticamente propensos à asma, foi descrita a redução da fibrose peribronquiolar, além da produção de muco, pelas AuNPs. Camundongos A/J quando sensibilizados e desafiados antígenicamente, apresentam um quadro de fibrose peribronquiolar extenso, refratário ao tratamento com glucocorticóides. A nebulização com as AuNps inibiu este fenômeno (SERRA et al., 2022). De forma original, demonstramos o efeito supressor das AuNPs sobre o componente fibrótico granulomatoso pulmonar associado à silicose, uma doença de caráter ocupacional grave e sem tratamento. De forma interessante foi verificada a desestruturação do granuloma, através do rompimento de fibras colágenas e elásticas, havendo consequente saída de células e melhora função pulmonar e favorecimento de

“clearance” pulmonar (RIBEIRO, 2018). Importante ressaltar que o protocolo utilizado para administração das AuNPs em camundongos (similar ao utilizado neste estudo), não causou qualquer efeito ao nível do parênquima pulmonar, hepático ou renal, tanto em animais salina como em animais bleomicina, ou seja, não houve alterações nos perfis bioquímicos, hematológicos e morfológicos de ambos os órgãos (RIBEIRO, 2023). Alinhado com nossos achados, a literatura mostra a redução da resposta granulomatosa hepática, na esquistossomose murina, reforçando os achados indicativos da regulação negativa das AuNPs sobre o desenvolvimento de granulomas em doenças de caráter fibrótico (DKHIL et al., 2015), reforçando e ampliando a potencialidade das partículas no caso de processos fibróticos.

Um mecanismo central na patogênese da FPI é o acúmulo de proteínas da matriz extracelular (MEC), formando tecido fibrótico nos pulmões, e um desequilíbrio no remodelamento e reparo tecidual. Os colágenos constroem a estrutura do corpo humano e são os principais constituintes da matriz extracelular (MEC) (BIRCH, 2018). O equilíbrio entre a degradação e a produção de colágeno é fortemente regulada em tecidos normais. Evidências indicam que as enzimas que degradam o colágeno e a renovação do colágeno também aumentam na condição da FPI, embora o resultado final seja a deposição abundante de colágeno tipo I. Os colágenos tipo I e III estão localizados na matriz intersticial e são componentes essenciais de um pulmão saudável, fornecendo resistência à tração ao interstício alveolar. A FPI resulta do aumento dos níveis de colágeno intersticial, alterando a arquitetura dos espaços aéreos nos pulmões, e a renovação elevada do colágeno tipo I e III demonstrou estar relacionada à progressão da doença em pacientes com FPI (JESSEN et al., 2021; STAHL et al., 2013).

Vimos que a exposição orofaríngea com a bleomicina levou a um aumento no conteúdo total de colágeno total, no tecido pulmonar de camundongos, identificado pela técnica de sircol, 21 dias após o desafio. A análise através de western blotting revelou níveis aumentados de ambos os tipos, I e III, do colágeno, com claro predomínio do primeiro, reproduzindo o quadro descrito para a condição da FPI (D ISAACSON, J L MUELLER et al., 2006; MCKLEROY et al., 2013; NAOMI et al., 2021). Nossos dados estão em concordância com relatos prévios que descreveram o colágeno tipo III como o primeiro a ser sintetizado nos estágios iniciais da cicatrização, sendo, portanto, crucial para a gênese do colágeno tipo I, onde o colágeno tipo III é

substituído pelo colágeno tipo I como parte do remodelamento da MEC no processo de cicatrização do tecido (MCKLEROY et al., 2013). A administração das AuNPs por aerossol modulou negativamente o conteúdo de colágeno tipo I no pulmão dos animais estimulados com bleomicina, enquanto no caso do tipo III do colágeno foi verificada apenas uma tendência de redução. No quadro de fibrose pulmonar, a degradação do colágeno não acompanha a sua produção, resultando em acúmulo extracelular de colágeno fibrilar. A degradação do colágeno ocorre por vias extracelulares e intracelulares. A via extracelular envolve a clivagem das fibrilas de colágeno por enzimas proteolíticas, incluindo as metaloproteinases (MCKLEROY et al., 2013) e as catepsinas (SPESHOCK et al., 2012). A via intracelular, menos bem descrita, envolve a ligação e captação de fragmentos de colágeno por fibroblastos e macrófagos para degradação lisossômica (MCKLEROY et al., 2013). Poderíamos, então, especular que as AuNPs poderiam exercer um papel importante para a degradação do colágeno na regulação da fibrose tecidual verificada quando da estimulação com bleomicina.

Partimos, então, para compreender, pelo menos parte do mecanismo de ação associado ao efeito antifibrótico das AuNPs. Como primeiro ponto, focamos no estresse oxidativo que é descrito como um desequilíbrio bioquímico que ocorre quando os antioxidantes intracelulares são incapazes de neutralizar as espécies pró-oxidantes, e incluem as enzimas catalase e superóxido dismutase (YAHYAPOUR et al., 2018). O sistema de defesa antioxidante mantém o equilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e a capacidade antioxidante, no entanto, os níveis de radicais livres são desregulados na patogênese de muitas doenças (FILOMENI et al., 2015; OUTOPALOVA et al., 2020; SIES, 2015). Estudos mostram que essas moléculas estão presentes no pulmão de pacientes com fibrose pulmonar idiopática, onde apresentam níveis elevados de marcadores de dano oxidativo e um desbalanço redox, uma vez que há uma regulação negativa de várias enzimas antioxidantes. Logo, a restauração desse desequilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio (“reactive oxygen species” - ROS) e antioxidantes, sendo inclusive sugerida como estratégia potencial de tratamento para FPI (CHERESH et al., 2013). Nesse estudo, verificamos que animais estimulados com bleomicina mostraram níveis aumentados de ROS no lavado broncoalveolar, em comparação aos controles que receberam salina, e que o tratamento com AuNPs reduziu de forma significativa os níveis do

mediador. Esses dados se colocam interessantes uma vez que foi relatado que a superprodução crônica de ROS pode estimular a superexpressão de colágeno tipo I, e iniciar a reação inflamatória (LIANG et al., 2016). Como consequência da ativação de mediadores inflamatórios, os fibroblastos tornam-se ativados em miofibroblastos, que por sua vez são a principal fonte de deposição de colágeno (GRYGIEL-GÓRNIAK et al., 2015).

Nossa análise incluiu também as enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) que são cruciais no equilíbrio redox, e funcionam como barreira de defesa para a proteção do organismo contra os impactos negativos de agentes tóxicos e radicais livres derivados do oxigênio altamente reativos (JING et al., 2020; MICHIELS et al., 1994). Vimos que ambas SOD e CAT mostraram atividade reduzida no pulmão dos animais estimulados com bleomicina, e o tratamento com as AuNPs restaurou os níveis de CAT, porém não os de SOD. Este efeito diferencial sobre as enzimas CAT e SOD, poderia ser explicado por um processo de saturação enzimática, no qual a atividade enzimática da SOD poderia estar saturada diante da grande quantidade de ROS gerado. Mais ainda, estudos prévios mostraram que as AuNPs não são capazes de reduzir os níveis do ânion superóxido (DE PRÁ et al., 2020; MATSUOKA et al., 2019). Esse achado se mostra coerente com que observamos neste estudo, uma vez que a SOD é a enzima responsável pela conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Observamos que as AuNPs não foram capazes de restaurar a atividade da SOD no contexto da fibrose desencadeada pela bleomicina. Poderíamos sugerir que, em uma situação de deficiência na resposta sobre o ânion superóxido, os níveis elevados de peróxido de hidrogênio poderiam ser controlados pela enzima CAT, sendo assim possível observar a redução do dano oxidativo (redução nos níveis de malondialdeído) nos animais expostos a bleomicina e tratados com AuNPs. Evidências existem indicativas da atividade de restabelecimento da SOD pelas AuNPs, conforme verificado em modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS. Neste caso, entretanto, deve ser considerado o fato de ser este um processo agudo, no qual a atividade da SOD deve não estar saturada (DOS SANTOS HAUPENTHAL et al., 2020)

A bleomicina induz a formação de radicais livres, é um agente intercalante que pode também causar dano celular independente de seu efeito no DNA através de indução da peroxidação lipídica. Isso pode ser particularmente importante no pulmão

e, em parte responsável por sua capacidade de causar danos às células alveolares e subsequente inflamação pulmonar. Ao analisar a quantificação de malonodialdeído (MDA), que é considerado como um bom indicador de peroxidação lipídica, observamos níveis aumentados no pulmão de camundongos desafiados com bleomicina e que a administração das AuNPs reduziu significativamente este fenômeno. Dados similares foram observados em modelo experimental de artrite reumatóide (KHAN et al., 2018) e de asma resistente ao corticóide (SERRA et al., 2022), quando o tratamento com as AuNPs suprimiu a geração de MDA na articulação de ratos e no pulmão de camundongos, respectivamente.

Ainda no contexto do estresse oxidativo, merece destaque o fator nuclear eritróide-2 (NRF2), uma proteína que atua como um fator de transcrição, atuando na regulação da expressão genética, e na transcrição de outras proteínas em especial de defesa antioxidante e desintoxicação. Vimos que no pulmão dos animais que receberam a bleomicina houve aumento discreto dos níveis de NRF2, resposta que se mostrou exacerbada na condição do tratamento com as AuNPs. Estes achados foram um tanto surpreendentes. Uma possível explicação poderia ser que a condição de aumento da produção de ROS e ativação do estresse oxidativo, visto após a estimulação com bleomicina, poderia estar ativando mecanismos antioxidantes, no microambiente inflamatório, na tentativa de neutralizar a resposta inflamatória/fibrótica pulmonar. Dando suporte a nossa hipótese, estudos prévios descreveram que na condição experimental de enfisema induzido por exposição à fumaça de cigarro, houve ativação do NRF2 e, o consequente disparo do processo de transcrição antioxidantes e citoprotetores (BOUTTEN et al., 2010; HYBERTSON et al., 2011; TONELLI et al., 2018). Estes achados sugerem, então, que o NRF2 se coloca como alvo terapêutico relevante na condição de doenças inflamatórias pulmonares crônicas.

A literatura indica que vários são os mediadores envolvidos na FPI, incluindo aqueles de natureza proteica com propriedades inflamatória e prófibrótica, com destaque para as citocinas e as quimiocinas (MEI et al., 2022). Avaliamos as citocinas IL-6, indutora de proliferação de fibroblastos, a IL-1 β , participante do processo inflamatório e de reparo, e o TGF- β considerado o fator central no desenvolvimento fibrose, por causar a diferenciação e proliferação de miofibroblastos - células produtoras de componentes de MEC, condição fundamental para o processo de reparo tecidual (PHAN et al., 2021). Como quimiocinas, analisamos KC, MIP-1 α e

MCP-1, que atuam na ativação e recrutamento de leucócitos, além de contribuir para a resposta fibrogênica e remodelamento tecidual (KOLAHIAN et al., 2016). Verificamos aumento nos níveis de citocinas e de quimiocinas, no pulmão dos camundongos desafiados com bleomicina, e inibição pelo tratamento com as AuNPs, à exceção da quimiocina MIP-1 α que não foi modificada pela bleomicina. Achados similares foram obtidos em modelos experimentais de asma alérgica (BARRETO et al., 2015) asma resistente ao corticoide (SERRA et al., 2022), além da silicose murina (RIBEIRO, 2018), com destaque para a ação supressora das AuNPs sobre remodelamento e fibrose. Em conjunto nossos achados revelam a potencialidade ação ampla das AuNPs no controle de doenças inflamatórias crônicas pulmonares de caráter fibrótico.

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram a eficiência do tratamento terapêutico com as AuNPs, por aerossol, em restabelecer a função pulmonar (resistência e elastância), e reduzir o processo inflamatório/fibrótico no pulmão de camundongos desafiados com a bleomicina. Este efeito se mostrou dependente da ação das AuNPs em: i) suprimir a produção de componentes da MEC, com destaque para o colágeno do tipo I; ii) inibir a geração de citocinas/quimiocinas inflamatórias e prófibróticas; iii) inibir componentes do processo de estresse oxidativo, favorecendo a ativação fator de transcrição para proteínas antioxidantes, NRF2. No conjunto, esses achados revelam que o tratamento com as AuNPs se coloca como promissor para uma futura aplicação no caso doenças pulmonares crônicas como a FPI. Estudos adicionais se fazem ainda necessários para melhor compreensão acerca do mecanismo ação associado ao efeito inibitório das AuNPs sobre o quadro de fibrose pulmonar.

REFERÊNCIAS

- ASHLEY, S. L. et al. Targeting inhibitor of apoptosis proteins protects from bleomycin-induced lung fibrosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 54, n. 4, p. 482–492, 2016.
- BADDINI-MARTINEZ, J. et al. Quantos pacientes com fibrose pulmonar idiopática existem no Brasil? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 6, p. 560–561, 2015.
- BAHADORI, M. et al. Nanomedicine for respiratory diseases. **Tanaffos**, v. 11, n. 4, p. 18–22, 2012.
- BARBOSA, A. et al. Eficácia, segurança e custo-efetividade de Pirfenidona ou Nintedanibe para Fibrose Pulmonar Idiopática: revisão rápida de evidências. **Rev. Cient. da Esc. Estadual de Saúde Pública de Goiás "Candido Santiago"**, v. 6, n. 1, p. 77–98, 2020.
- BARRETO, E. et al. Local administration of gold nanoparticles prevents pivotal pathological changes in murine models of atopic asthma. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 6, p. 1038–1050, 2015.
- BIRCH, H. L. Extracellular matrix and ageing. **Subcellular Biochemistry**, v. 90, p. 169–190, 2018.
- BOUTTEN, A. et al. Oxidative stress targets in pulmonary emphysema: Focus on the Nrf2 pathway. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 14, n. 3, p. 329–346, 2010.
- BRANDENBERGER, C. et al. Effects and uptake of gold nanoparticles deposited at the air-liquid interface of a human epithelial airway model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 242, n. 1, p. 56–65, 2010.
- CARDOSO, E. et al. Acute and chronic administration of gold nanoparticles cause DNA damage in the cerebral cortex of adult rats. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 766–767, p. 25–30, 2014.
- CARRINGTON, R. et al. Use of animal models in IPF research. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 51, p. 73–78, 2018.
- CHEN, H. et al. In Vivo Study of Spherical Gold Nanoparticles: Inflammatory Effects and Distribution in Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.
- D’ALESSANDRO-GABAZZA, C. N. et al. Inhibition of lung microbiota-derived proapoptotic peptides ameliorates acute exacerbation of pulmonary fibrosis. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 2022.

- D ISAACSON, J. et al. Dense type I collagen matrices that support cellular remodeling and microfabrication for studies of tumor angiogenesis and vasculogenesis in vitro. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2006.
- DE CARVALHO, T. G. et al. Spherical neutral gold nanoparticles improve anti-inflammatory response, oxidative stress and fibrosis in alcohol-methamphetamine-induced liver injury in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 548, n. 1, p. 1–14, 2018.
- DE PRÁ, M. et al. Efeito De Nanopartículas De Ouro Em Parâmetros Inflamatórios Energéticos E Metabolismo Em Ratos Obesos. **ACINNET Journal**, v. 10, 2020.
- DELLA LATTA, V. et al. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. **Pharmacological Research**, v. 97, p. 122–130, 2015.
- DKHIL, M. A. et al. Antioxidant and hepatoprotective role of gold nanoparticles against murine hepatic schistosomiasis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 7467–7475, 2015.
- DONG, J. et al. Type 2 immune mechanisms in carbon nanotube-induced lung fibrosis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, 2018.
- DOS SANTOS HAUPENTHAL, D. P. et al. Effects of treatment with gold nanoparticles in a model of acute pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 108, n. 1, p. 103–115, 2020.
- DYKMAN, L. et al. Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspectives. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 6, p. 2256–2282, 2012.
- FILOMENI, G. et al. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 377–388, 2015.
- GARDNER, J. Nanotechnology in medicine and healthcare: Possibilities, progress and problems. **South African Journal of Bioethics and Law**, v. 8, n. 2, p. 50, 2015.
- GLASS, D. S. et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Current and future treatment. **Clinical Respiratory Journal**, v. 16, n. 2, p. 84–96, 2022.
- GRYGIEL-GÓRNIAK, B. et al. Oxidative Damage and Antioxidative Therapy in Systemic Sclerosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, n. 2, 2015.
- HAN, S. G. et al. Size-dependent clearance of gold nanoparticles from lungs of Sprague–Dawley rats after short-term inhalation exposure. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 7, p. 1083–1094, 2015.

- HOWELL, D. C. J. **The role of thrombin and protease activated receptor-1 in the pathogenesis of pulmonary fibrosis.** [s.l.] University of London, 2014.
- HSU, H. S. et al. Involvement of ER stress, PI3K/AKT activation, and lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- HÜBNER, R. H. et al. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. **BioTechniques**, v. 44, n. 4, p. 507–517, 2008.
- HUSSAIN, S. et al. Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. **European Respiratory Journal**, v. 37, n. 2, p. 299–309, 2011.
- HYBERTSON, B. M. et al. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 32, n. 4–6, p. 234–246, 2011.
- JESSEN, H. et al. Turnover of type I and III collagen predicts progression of idiopathic pulmonary fibrosis. **Respiratory Research**, v. 22, n. 1, p. 1–8, 2021.
- JING, M. et al. Catalase and superoxide dismutase response and the underlying molecular mechanism for naphthalene. **Science of the Total Environment**, v. 736, p. 139567, 2020.
- KATO, S. et al. Changes in pulmonary endothelial cell properties during bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Respiratory Research**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2018.
- KELLER, K. **National Heart, Lung, and Blood Institute.** Disponível em: <<https://www.nhlbi.nih.gov/health/interstitial-lung-diseases>>. Acesso em: 24 mar. 2022.
- KHAN, M. et al. Nano-gold displayed anti-inflammatory property via NF-κB pathways by suppressing COX-2 activity. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. sup1, p. 1149–1158, 2018.
- KING, H. M. **Uses of Gold in Industry, Medicine, Computers, Electronics, Jewelry.** Disponível em: <<https://geology.com/minerals/gold/uses-of-gold.shtml>>.
- KOLAHIAN, S. et al. Immune mechanisms in pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 55, n. 3, p. 309–322, 2016.
- LEE, J. et al. Korean Guidelines for Diagnosis and Management of Interstitial Lung Diseases: Part 2. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 82, n. 4, p. 277–284, 2019.
- LEIBFARTH, J. H. et al. Review: Mechanisms of action of gold. **Agents and Actions**,

v. 11, n. 5, p. 458–472, 1981.

LEUNG, K. Gold nanoparticles Related Resource Links : In Vitro Studies : Testing in Cells and Tissues Animal Studies Rodents. n. Md, p. 2004–2006, 2013.

LIANG, S. et al. The Role of NADPH Oxidases (NOXs) in Liver Fibrosis and the Activation of Myofibroblasts. v. 7, n. February, p. 1–10, 2016.

LIU, T. et al. The Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis. **Methods in Molecular Biology**, 2017.

MALCOM, E. **12 fatos sobre o prognóstico da fibrose pulmonar e a expectativa de vida**. Disponível em: <<https://pulmonaryfibrosisnews.com/2019/08/16/twelve-facts-about-pulmonary-fibrosis-prognosis-and-life-expectancy/>>. Acesso em: 19 ago. 2019.

MANCUZO, E. V. et al. Six-minute walk distance and survival time in patients with idiopathic pulmonary fibrosis in Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 4, p. 267–272, 2018.

MATSUOKA, K. et al. Superoxide scavenging activity of gold, silver, and platinum nanoparticles capped with sugar-based nonionic surfactants. **Journal of Oleo Science**, v. 68, n. 9, p. 847–854, 2019.

MCKLEROY, W. et al. Always cleave up your mess: Targeting collagen degradation to treat tissue fibrosis. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 304, n. 11, 2013.

MEI, Q. et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Update on Pathogenesis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. January, p. 1–14, 2022.

MICHIELS, C. et al. Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, n. 3, p. 235–248, 1994.

NAOMI, R. et al. Current insights into collagen type i. **Polymers**, v. 13, n. 16, p. 1–19, 2021.

NG, C. T. et al. The induction of epigenetic regulation of PROS1 gene in lung fibroblasts by gold nanoparticles and implications for potential lung injury. **Biomaterials**, v. 32, n. 30, p. 7609–7615, 2011.

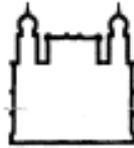
NIKALJE, A. P. Nanotechnology and its Applications in Medicine. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 81–89, 2015.

NIKOLIĆ, M. Z. et al. Human lung development: Recent progress and new challenges. **Development (Cambridge)**, v. 145, n. 16 Special.

- OTOUPALOVA, E. et al. Oxidative stress in pulmonary fibrosis. **Comprehensive Physiology**, v. 10, n. 2, p. 509–547, 2020.
- PHAN, T. H. G. et al. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 2031–2057, 2021.
- PISON, U. et al. Nanomedicine for respiratory diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n. 1–3, p. 341–350, 2006.
- Química Nova**. Disponível em: <<https://quimicanova.sbq.org.br/default.asp>>.
- RAMBANAPASI, C. et al. Bioaccumulation and subchronic toxicity of 14 nm gold nanoparticles in rats. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 1–12, 2016.
- RIBEIRO, N. **Efeito do tratamento com nanopartículas de ouro sobre a fibrose pulmonar induzida por sílica em camundongos**. [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz, 2018.
- RIBEIRO, N. **No Efeitos do tratamento com nanopartículas de ouro em modelo experimental de silicose murina**. [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz, 2023.
- SALVATORE, M. et al. Is it idiopathic pulmonary fibrosis or not? **Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 31, n. 1, p. 151–162, 2018.
- SAULEDA, J. et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Epidemiology, Natural History, Phenotypes. **Medical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 110, 2018.
- SERRA, M. F. et al. Gold Nanoparticles Inhibit Steroid-Insensitive Asthma in Mice Preserving Histone Deacetylase 2 and NRF2 Pathways. **Antioxidants**, v. 11, n. 9, 2022.
- SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.
- SPESHOCK, J. L. et al. Silver and gold nanoparticles alter cathepsin activity in vitro. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, p. 1–7, 2012.
- STAHL, M. et al. Lung collagens perpetuate pulmonary fibrosis via CD204 and M2 macrophage activation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–10, 2013.
- TONELLI, C. et al. Transcriptional Regulation by Nrf2. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 29, n. 17, p. 1727–1745, 2018.
- TSAI, Y. S. et al. TGF- β 1 conjugated to gold nanoparticles results in protein conformational changes and attenuates the biological function. **Small**, v. 9, n. 12, p. 2119–2128, 2013.
- UCHIYAMA, M. K. et al. In vivo and In vitro toxicity and anti-inflammatory properties of

- gold nanoparticle bioconjugates to the vascular system. **Toxicological Sciences**, v. 142, n. 2, p. 497–507, 2014.
- WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **Journal of Pathology**, n. Table 1, p. 231–241, 2008.
- WYNN, T. A. et al. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 7, p. 1028–1040, 2012.
- YAHYAPOUR, R. et al. Radiation-induced inflammation and autoimmune diseases. **Military Medical Research**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2018.
- YU, L. E. et al. Translocation and effects of gold nanoparticles after inhalation exposure in rats. **Nanotoxicology**, v. 1, n. 3, p. 235–242, 2007.
- YU, W. K. et al. Nintedanib Inhibits Endothelial Mesenchymal Transition in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis via Focal Adhesion Kinase Activity Reduction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, 2022.
- ZHOU, Y. et al. Aucubin Alleviates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in a Mouse Model. **Inflammation**, v. 40, n. 6, p. 2062–2073, 2017.

ANEXO - Aprovação do comitê de ética



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC



LICENÇA ADITIVA

L-001/2019- A2

A Comissão CEUA/IOC, em atenção à solicitação da pesquisadora **PATRICIA MACHADO RODRIGUES E SILVA MARTINS**, responsável pela licença (L-001/2019) e licença aditiva (L-001/2019-A1) do protocolo (CEUA/IOC-037/2018), intitulado, "**Farmacologia do Processo Inflamatório Pulmonar**", que atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), autoriza o presente aditivo. A referida licença aditiva não exime a observância das Leis e demais exigências legais na legislação nacional.

Esta licença aditiva altera a validade da licença de 28/01/2023 para **28/01/2024** e inclui:

- Alteração no item 5 – membros da equipe: inclui Lucas Eliseu Santos Martins, Gabriella da Costa Ferreira, Hozana Beatriz da Silva Santos, Milena Tiengo da Silva, Maria Eduarda de Castro Guedes, Brenda Daumas Ferreira Santos, Lucas Mota de Souza e exclui Thamis Andrade Lima de Oliveira, Yago Amigo Pinho Jannini de Sá, Maria Talita Pacheco de Oliveira e Hyasmin da Silva Gomes.

Observações:

- Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 21 de novembro de 2022

Tânia Zaverucha do Valle
Matrícula SIAPE 1362665
Coordenadora da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz