

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Manuella Lanzetti Daher de Deus

O envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) induzido por elastase

Rio de Janeiro

2012

Manuella Lanzetti Daher de Deus

# O envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) induzido por elastase

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença

Coorientador: Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto

Rio de Janeiro

# CATALOGAÇÃO NA FONTE

## UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

D486	Deus, Manuella Lanzetti Daher de.
	O envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) induzido por elastase / Manuella Lanzetti Daher de Deus. – 2012. 116 f.
	Orientador: Samuel dos Santos Valença. Coorientador: Luis Cristóvão de Moraes Sobrino Porto.
	Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.
	<ol> <li>Doença pulmonar obstrutiva crônica – Teses.</li> <li>Proteases – Teses.</li> <li>Estresse oxidativo – Teses.</li> <li>Inflamação – Teses.</li> <li>Antioxidantes – Teses.</li> <li>Valença, Samuel dos Santos.</li> <li>Porto, Luis Cristovão de Moraes Sobrino.</li> <li>Universidade do Estado do Rio de Janeiro.</li> <li>Instituto de Biologia Roberto Alcântara Braga.</li> <li>IV Título.</li> </ol>
	CDU 616.24

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

Manuella Lanzetti Daher de Deus

# O envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) induzido por elastase

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pósgraduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 2 de outubro de 2012.

Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto (Coorientador) Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Banca examinadora:

Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença (Orientador) Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cláudia Henrique da Costa Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Rieken Macedo Rocco Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC

> Rio de Janeiro 2012

# DEDICATÓRIA

À minha família, por todo amor, cumplicidade, união e incentivo dedicados a mim ao longo da realização desse trabalho e por toda a minha vida.

### AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e sempre agradeço a Deus por essa e todas as conquistas de minha vida. Um Deus presente que me acompanha em todas as situações me mostrando os caminhos certos, me ajudando nos difíceis e me livrando dos errados.

Às minhas saudosas avós, que já não podem torcer por mim, mas que desejaram tanto quanto eu essa vitória. O meu eterno obrigado.

Aos meus pais, Carlos Eduardo e Fábia, que me deram uma base forte para aguentar as lutas e os desafios encontrados. Muito obrigada pelo apoio incondicional, por torcerem por mim em todos os momentos, e depositarem em mim tanto amor, respeito e compreensão. Amo vocês!

Às minhas amadas irmãs Juliana, Marcella e Flávia. Fundamentais na minha vida! Sempre torcendo pelo meu sucesso e mais do que isso, me ajudando a conquistá-lo. Amo muito vocês.

Ao namorado Daniel, por todo incentivo, compreensão, carinho, apoio e paciência que me dedicou ao longo dessa jornada!

Aos meus cunhados Rodrigo e Bráulio que estiveram presentes nessa etapa e tanto torceram pelo meu sucesso.

Ao meu grande mestre, Samuel, sempre pensando à frente dos meus problemas e disposto a me ajudar em todos eles. Obrigada pela confiança, por me mostrar como se trabalha em equipe e por eu sempre ter podido contar com você!

Ao Prof. Cristóvão, que me apoiou em grandes etapas da minha vida e foi fundamental para esse doutorado. Obrigada pela parceria e por viabilizar nossos planos.

À minha incansável amiga Renata, companheira de todas as horas. Muito obrigada pela lealdade, cumplicidade e carinho que me ofereceu. Obrigada por vibrar comigo a cada etapa vencida.

À Marininha, minha aluna tão dedicada. Muito obrigada pela ajuda nos momentos em que eu fui presente e ausente. Essa tese tem sua participação do começo ao fim.

À Karlinha, amiga sempre disposta a ajudar. Obrigada por nos incentivar e apoiar, especialmente no que diz respeito à parte histológica dos estudos.

À minha amiga Vanessinha, peça chave nesse trabalho. Obrigada pela sua amizade, dedicação e técnica.

Aos professores Cláudia Bejamim, Josiane Sabadini, Cláudio Canetti e Rodrigo Tinoco. Meu muito obrigada pelos questionamentos e sugestões sempre pertinentes, que tanto contribuíram para meu crescimento profissional.

Aos amigos da farmacologia, que me receberam de braços abertos na UFRJ e estiveram sempre dispostos a colaborar e me ajudar no que fosse preciso. Meu sincero obrigada à Ari, Paulinha, Leandrinho, Cynthia, Amanda, as "Janas" e o Rafa.

E finalmente, meus agradecimentos ao Professor Vincent Lagente, que me recebeu em seu laboratório na França para um estágio de doutorado e me proporcionou um grande enriquecimento pessoal e profissional. *Merci beaucoup pour tout*!

E sobre tudo, agradeço às agências de fomento que foram fundamentais para a execução dessa tese, contribuindo para o apoio financeiro sem o qual a pesquisa não avança. Especialmente CAPES-COFECUB que arcaram com meus projetos tanto no Brasil quanto na França.

Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros foram.

Alexandre Graham Bell

### RESUMO

LANZETTI, Manuella. *O envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) induzido por elastase*. 2012. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências - Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2012

Esse estudo buscou investigar o papel do estresse oxidativo e nitrosativo no enfisema pulmonar induzido por elastase. Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 submetidos a dois modelos de indução do enfisema por elastase pancreática suína (PPE): intratraqueal (i.t.) e intranasal (i.n.). No modelo intratraqueal a PPE foi instilada nas doses de 0,05 U ou 0,5 U/camundongo para avaliação temporal do enfisema 7, 14 e 21 dias após instilação de PPE. Em outra etapa, o papel da iNOS foi avaliado através da sua inibição farmacológica por aminoquanidina (AMG) 1% na água de beber ou pela sua exclusão genética em camundongos deficientes em iNOS que tiveram o enfisema induzido por 0,5 U PPE i.t. após 21 dias. No modelo intranasal a dose de PPE foi 3 U/camundongo para avaliação temporal do enfisema (1, 7, 14 e 21 dias após PPE). O papel do estresse oxidativo e nitrosativo foi avaliado com diferentes tratamentos antioxidantes na água tempol, apocinina+alopurinol, n-acetilcisteína, vitamina C+E, e de beber: aminoguanidina durante os 21 dias de indução do enfisema. Os grupos controles foram submetidos à instilação de salina. Lavado broncoalveolar, imunoensaios, análises bioquímicas de estresse oxidativo e ensaios morfométricos foram realizados nos pulmões dos animais. O enfisema foi histologicamente alcançado em 21 dias após 0,5 U PPE i.t., evidenciado pelo aumento do diâmetro alveolar médio – Lm e da densidade de volume dos espaços alveolares - Vv<sub>air</sub> em comparação ao grupo controle. TNF-α foi aumentado em 7 e 14 dias após 0,5 U PPE comparados ao controle, concomitante com a redução de IL-10 nos mesmos períodos, comparados ao controle. O estresse oxidativo foi observado na fase inicial do enfisema, com aumento dos níveis de nitrito, TBARS e superóxido dismutase no grupo 7 dias após 0,5 U PPE (i.t.) quando comparados ao controle ao passo que no modelo intranasal as alterações típicas do estresse foram vistas no grupo 1 dia após 3 U de PPE. Atividade da glutationa peroxidase foi aumentada em todos os grupos PPE (i.t.). A exposição à 0,5 U PPE induziu o aumento da iNOS, eNOS e nitrotirosina, sendo revertido no grupo PPE+AMG. Os animais tratados com AMG 1% e os deficientes em iNOS tiveram o enfisema atenuado histologicamente, mantendo o Lm e o Vvair semelhantes ao grupo controle. Os grupos tratados com n-acetilcisteína e aminoguanidina no modelo i.n. tiveram redução do Lm guando comparados ao grupo PPE. Esses resultados sugerem que as vias de estresse oxidativo e nitrosativo são disparadas pela produção de óxido nítrico via iNOS no enfisema pulmonar. A modulação da iNOS parece uma estratégia promissora no estabelecimento do enfisema pulmonar.

Palavras-chave: DPOC. Protease. Estresse oxidativo. Inflamação. iNOS. Antioxidante. Camundongo.

### ABSTRACT

This study investigated the role of oxidative and nitrosative stress in elastaseinduced pulmonary emphysema. C57BL/6 male mice were used submitted to two models of emphysema induced by porcine pancreatic elastase (PPE): intratracheal (i.t.) and intranasal (i.n.). In the intratracheal model PPE was instilled at doses of 0.05 U or 0.5 U/mouse (i.t.) to temporal evaluation of emphysema 7, 14 and 21 days post-PPE instillation. Others sets of experiments, the role of iNOS was evaluated through its pharmacology inhibition by 1% aminoguanidine (AMG) into the drinking water or bt iNOS genetic exclusion in iNOS-deficient mice which had induced emphysema by 0.5 U PPE i.t. after 21 days. In the intranasal model the PPE dose was 3 U/mouse to temporal evaluation of emphysema (1, 7, 14 and 21 days after PPE). The role of oxidative and nitrosative stress was evaluated using different antioxidant treatments into the drinking water: tempol, apocynin+allopurinol, N-acetylcysteine, vitamin C+E and aminoguanidine during the 21 days of emphysema induction. Control groups were instilled with saline. Bronchoalveolar lavage, immunoassays, biochemical analysis of oxidative stress and morphometric tests were performed in the lungs of animals. The emphysema was histologically reached 21 days after 0.5 U PPE, as evidenced by an increase in alveolar diameter - Lm and volume density of the alveolar spaces - Vvair compared to the control group. TNF- $\alpha$  was increased in 7 and 14 days after 0.5 U PPE compared to the control, concomitant with reduction of IL-10 at the same time-points compared to the control. Oxidative stress was observed in the early stages of emphysema, with increased levels of nitrite, TBARS and superoxide dismutase in group 7 days after 0.5 U PPE (i.t.) compared to the control, while in the intranasal model the typical stress alterations were seen in group 1 day after 3 U PPE. Glutathione peroxidase activity was increased in all PPE groups (i.t.). Exposure to 0.5 U PPE induced the increase of iNOS, eNOS and nitrotyrosine, being reversed in the AMG+PPE group. Animals treated with 1% AMG and the iNOS deficient had emphysema histologically attenuated keeping Lm and Vvair similar to the control group. The groups treated with n-acetylcysteine and aminoguanidine in the intranasal model presented reduction of Lm when compared to PPE group. These results suggest that the process of oxidative and nitrosative stress are triggered by nitric oxide production via iNOS in pulmonary emphysema. iNOS modulation seems a promising strategy in the establishment of pulmonary emphysema.

Keywords: COPD. Protease. Oxidative stress. Inflammation. iNOS. Antioxidant. Mouse.

### LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Elastases presentes no parênquima pulmonar
Tabela 2. Prós e contras do modelo de DPOC induzido por fumaça de cigarro25
Tabela 3. Prós e contras do modelo de DPOC induzido por elastase
Tabela 4. Natureza, geração e destino de espécies radicalares (ou seus intermediários) biologicamente importantes30
Tabela 4 (continuação)31
Tabela 5. Avaliação quantitativa da alteração tecidual
Tabela 6. Avaliação quantitativa da alteração tecidual após indução do enfisema e tratamento com aminoguanida55
Tabela 7. Avaliação quantitativa da alteração tecidual após indução do enfisema em animais selvagens e deficientes em iNOS58
Tabela 8. Avaliação quantitativa da alteração tecidual após indução do enfisema por PPE intranasal60
Tabela 9. Avaliação quantitativa da alteração tecidual após indução do enfisema por PPE intranasal e tratamento com drogas antioxidantes63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALO	Alopurinol
AMG	Aminoguanidina
APO	Apocinina
BAL	Lavado Broncoalveolar
CAT	Catalase
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
GPx	Glutationa Peroxidase
GSH	Glutationa Reduzida
HE	Hematoxilina-Eosina
i.n.	Intranasal
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
i.t.	Intratraqueal
KPE	Tampão Fosfato de Potássio
Lm	Diâmetro Alveolar Médio
MEC	Matriz Extracelular
MPO	Mieloperoxidase
NAC	N-acetilcisteína
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OHpro	Hidroxiprolina
PPE	Elastase Pancreática Suína
PTN	Proteína
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
SOD	Superóxido Dismutase
Sv	Densidade de Superfície de Septo Alveolar
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
VIT C	Vitamina C
VIT E	Vitamina E
U	Unidade de enzima

VvairDensidade de Volume de Espaço Aéreo TotalVvseptoDensidade de Volume de Septo Alveolar

# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1. PULMÃO	17
1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)	20
1.1.1 Modelo de enfisema em camundongo	23
1.2 Produção de oxidantes	26
1.2.1 <u>Recrutamento leucocitário e estresse oxidativo</u>	27
1.2.2 Enfisema pulmonar e o desequilíbrio redox	31
1.3 Estratégias antioxidantes na terapêutica da DPOC	33
1.3.1 Estratégias antioxidantes	33
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.1.1 Objetivos Específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Modelo experimental de enfisema pulmonar	35
3.2 Instilação intratraqueal de elastase	35
3.2.1 Modelo dose- e tempo-resposta	35
3.2.2 Modelo de enfisema com 0,5 U de PPE e inibição farmacológica de iNOS	36
3.2.3 Modelo de enfisema com 0,5 U de PPE em animal deficiente em iNOS	37
3.3 Instilação intranasal de elastase	38
3.3.1 Modelo tempo-resposta	38
3.3.2 Modelo de enfisema com 3 U de PPE e administração de drogas antioxidan	tes
	39
3.4 Procedimentos experimentais	40
3.4.1 Lavado broncoalveolar	40
3.4.2 Processamento tecidual	40
3.4.3 Homogeneizado tecidual	41

3.4.4 Morfometria e estereologia41
3.4.5 Dosagem de proteína42
3.4.6 Dosagem de hidroxiprolina42
3.4.7 <u>Atividade de mieloperoxidase</u> 43
3.4.8 Dosagem de citocinas43
3.4.9 Dosagem de nitrito
3.4.10 Atividade de superóxido dismutase44
3.4.11 <u>Atividade de catalase</u> 45
3.4.12 Atividade de glutationa peroxidase45
3.4.13 Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
3.4.14 Dosagem de espécies reativas de oxigênio46
3.4.15 Western blotting47
3.4.16 Análise estatística47
4. RESULTADOS
4.1 Estudo intratraqueal
4.1.1 <u>Modelo de enfisema induzido por elastase intratraqueal é dose e tempo-</u> <u>dependente</u>
4.1.2 O desenvolvimento do enfisema envolve resposta inflamatória precoce51
4.1.3 O desenvolvimento do enfisema envolve estresse oxidativo
4.1.4 Inibição farmacológica da iNOS por Aminoguanidina atenua o enfisema54
4.1.5 Inibição farmacológica da iNOS por Aminoguanidina diminui marcador de estresse nitrosativo – nitrotirosina
4.1.6 <u>Deficiência de iNOS em camundongos geneticamente modificados previne</u> <u>contra o enfisema pulmonar induzido por PPE</u>
4.2 Estudo intranasal
4.2.1 <u>Modelo de enfisema induzido por elastase intranasal é tempo-dependente e</u> mais acelerado que o modelo intratraqueal
4.2.2 Tratamento com drogas antioxidantes atenua o enfisema pulmonar61
5. <b>DISCUSSÃO</b>

6. CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE A – Primeiro artigo da tese: Oxidative and nitrosative stress ar	e involved
in different stages of proteolytic pulmonary emphysema	85
APÊNDICE B – Comprovante de publicação durante o período da tese (2	009 –
2012) - 1	107
APÊNDICE C – Comprovante de publicação durante o período da tese (2	009 —
2012) - 2	108
APÊNDICE D – Comprovante de publicação durante o período da tese (2	009 —
2012) - 3	109
APÊNDICE E – Comprovante de publicação durante o período da tese (2	009 –
2012) - 4	110
APÊNDICE F – Comprovante de publicação durante o período da tese (20	009 –
2012) - 5	111
APÊNDICE G – Comprovante de publicação durante o período da tese (2	009 –
2012) - 6	112
APÊNDICE H – Comprovante de publicação durante o período da tese (2	009 –
2012) - 7	113
APÊNDICE I – Comprovante de publicação durante o período da tese (20 - 8	09 – 2012) 114
APÊNDICE J – Capa de capítulo de livro escrito durante a tese	115
ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética	117

### INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) provoca um grande impacto na saúde pública mundial, uma vez que representa, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a terceira causa de morte em países de renda média<sup>1</sup> e ainda não possui tratamentos capazes de combater as disfunções provocadas com o avanço da doença (BARNES, 2012). A DPOC ocorre com um processo inflamatório das vias aéreas associado, caracterizado pelo acúmulo de células inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos. O enfisema pulmonar é uma das maiores manifestações da DPOC e é patologicamente caracterizado pela quebra da arquitetura pulmonar, com alargamento dos espaços aéreos devido à destruição das paredes alveolares (SNIDER, 1992b; NAGAI *et al.*, 1994).

O desenvolvimento do enfisema pulmonar está associado a um excesso relativo de proteases elastolíticas que degradam o tecido conjuntivo do pulmão e uma relativa escassez de defesas antiproteolíticas, ou seja, dos seus inibidores naturais, teoria essa comumente referida como a hipótese do "desequilíbrio protease/antiprotease", que envolve principalmente proteases serina como elastase de neutrófilos e metaloproteases de matriz (MMPs).

Além disso, estudos têm relacionado o desenvolvimento do enfisema a uma considerável depleção das defesas antioxidantes como glutationa, catalase, superóxido dismutase e as diferentes peroxidases e transferases, caracterizando a teoria do "desequilíbrio entre oxidante/antioxidante", que envolve a depleção de moléculas biológicas eficazes em reduzir compostos oxidados, radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) em conseqüência do aumento da concentração dos mesmos (MACNEE; RAHMAN, 1999; RAHMAN; ADCOCK, 2006). Dessa forma, levanta-se a hipótese de que mecanismos oxidativos nos pulmões de camundongos podem estar ativados mesmo sobre estímulo proteolítico, proveniente da ação de elastases.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> O endereço eletrônico da OMS é: <u>http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html</u>. Acesso em: 04 de agosto de 2012.

### 1 PULMÃO

Os pulmões são órgãos especializados e vitais para os seres humanos, e estão presentes em duas unidades na cavidade torácica, um do lado esquerdo e outro do lado direito e, juntamente com as vias respiratórias, compõe o sistema respiratório. As vias respiratórias são subdivididas em porção condutora, local de fluxo do ar para atingir e sair dos pulmões, e porção respiratória, parte das vias respiratórias na qual ocorre a troca gasosa. A porção condutora abrange as cavidades nasais, e por vezes a oral, a nasofaringe e orofaringe, a laringe, a traqueia e o par de brônquios principais ou primários que adentram pelos pulmões e se ramificam dando origem aos bronquíolos de distribuição. Já a porção respiratória é composta de bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos (Figura 1A) (ROSS; PAWLINA, 2007). Os pulmões são os principais constituintes desse sistema por serem eles os responsáveis pela captação de oxigênio do ar ambiente e pela efetiva troca gasosa que acontece durante a respiração, processo chamado de ventilação. Essa troca gasosa depende de uma estrutura chamada barreira hematoaérea, que é o local exato onde ocorre a troca entre oxigênio (O<sub>2</sub>) e gás carbônico (CO<sub>2</sub>), e é formada pela junção de células endoteliais dos capilares sanguíneos e células epiteliais tipo I dos septos alveolares juntamente com suas respectivas lâminas basais (Figura 1B) (ROSS; PAWLINA, 2007).

Essa conformação levanta indícios de que a preservação dos septos alveolares é imprescindível para o bom funcionamento do órgão, afim de que proporcione uma respiração 100 % eficaz, isto é, a completa detoxicação do CO<sub>2</sub> com a incorporação do O<sub>2</sub>, em volume ideal para suprir as necessidades fisiológicas. Por essa razão os alvéolos são tidos como unidade funcional do pulmão.

No entanto, outros tipos celulares também são encontrados nos pulmões. Além das células epiteliais do tipo I (pneumócitos tipo I), que revestem 95% da superfície dos alvéolos, também estão presentes constitutivamente células epiteliais do tipo II (pneumócitos tipo II) produtoras de surfactante, células bronquiolares não ciliadas (células de clara) nos bronquíolos terminais, macrófagos alveolares e fibroblastos no

interstício da parede alveolar (Figura 1C). Outros tipos celulares também podem ocorrer nos pulmões, especialmente células do tecido conjuntivo, como leucócitos circulantes, células do tecido nervoso e muscular, sem, no entanto, serem tidas como células residentes dos pulmões (ROSS; PAWLINA, 2007).

Além do componente celular, o tecido conjuntivo também está presente nos pulmões, especialmente sob a forma de matriz extracelular que mantém a histoarquitetura pulmonar. A ocorrência dos espaços alveolares arranjados como cachos de uva se deve ao importante componente estrutural presente dentro das paredes septais. Fibras colágenas e elásticas se entrelaçam conferindo ao órgão força tênsil e a capacidade de distensão limitada, a fim de evitar a laceração do tecido a partir do estiramento excessivo, juntamente com a capacidade de retornar a posição original. Portanto esses componentes são fundamentais para a organização do parênquima pulmonar e a sua preservação é de suma importância para que o órgão possa desempenhar plenamente o mecanismo da ventilação pulmonar. Dessa forma, evidencia-se a íntima relação entre os componentes estrutural e funcional do órgão. Sendo assim, a ocorrência de fibras colágenas, especialmente do tipo III, fibras elásticas e proteoglicanos é comum no interstício.



Figura 1. Representação macro e microscópica dos componentes pulmonares. A) Disposição anatômica dos pulmões e sua árvore brônquica. B) Eletromicrografia da barreira hemato-aérea no septo alveolar. C) Esquema histológico identificando os tipos celulares residentes dos pulmões. ma – macrófago alveolar, cf – fibras de tecido conjuntivo, en – núcleo de célula endotelial, epl – núcleo de célula epitelial I, cap – capilar pulmonar, a – espaço alveolar. (BURRI, 2011)

### 1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é caracterizada pela limitação do fluxo de ar geralmente progressiva, alterando a respiração normal e oferecendo risco de vida aos indivíduos, não sendo totalmente reversível (FABBRI *et al.*, 2004; ADCOCK *et al.*, 2011). A DPOC é uma das maiores causas de mortalidade e morbidade em países desenvolvidos e sua prevalência ainda é crescente (PAUWELS, 2000). Dados *online*<sup>2</sup> da OMS estimam que a DPOC foi a quinta causa de morte em 2005 e em 2030 será a quarta causa de morte no mundo. Mas sabe-se que esses dados são subestimados, pois a DPOC só costuma ser diagnosticada quando é aparente clinicamente e já está moderadamente avançada. Por essa razão a OMS recomenda a abordagem dos fenótipos de bronquite crônica, enfisema e obstrução crônica das vias aéreas como um diagnóstico único de DPOC, tornando-se uma abordagem mais abrangente. No entanto, o enfisema pulmonar é a principal manifestação da DPOC.

Diversos fatores de risco contribuem para o seu desenvolvimento, sendo a fumaça de cigarro o principal deles. Outros fatores como poluição ambiental, queima de biomassas e distúrbios genéticos também podem levar ao desenvolvimento dessa doença. Dados da literatura mostram que 15 a 20% dos fumantes desenvolvem enfisema. No entanto, existe um dado relevante que mostra que aproximadamente 25% dos pacientes enfisematosos nunca fumaram (SALVI; BARNES, 2009). Essa estimativa favorece o entendimento da DPOC como uma doença multifatorial, envolvendo fatores intrínsecos e extrínsecos ao indivíduo.

No que tange aos fatores intrínsecos, a alteração genética que acarreta em deficiência na síntese ou secreção de inibidores de protease α1, é o fator chave de embasamento para uma das teorias mais bem estabelecidas sobre a patogênese do enfisema – o desequilíbrio entre protease e antiprotease. Essa teoria começou a ser descrita em 1956 a partir de experimentos feitos em coelhos vivos, onde Lewis Thomas

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> O endereço eletrônico da OMS é: <u>http://www.who.int/topics/chronic\_obstructive\_pulmonary\_disease/en</u>. Acesso em: 04 de agosto de 2012.

mostrou que as orelhas de coelhos poderiam entrar em colapso algumas horas após injeção de papaína, um tipo de protease inespecífica. Esse colapso ocorria em função da degradação de cartilagem e após 3 a 4 dias era completamente revertido através da produção de sulfato de condroitina (THOMAS, 1956; TURINO, 2002). Esses resultados favoreceram estudos com outras proteases, como as elastases e colagenases, específicas para determinados componentes do tecido conjuntivo. O uso dessas enzimas em pulmões de animais demonstrou o rápido potencial em degradar elastina e colágeno, bem como cartilagem, e as consequências dessa degradação sobre parâmetros mecânicos de distensão e rigidez ligados as alterações na morfologia das vias aéreas pulmonares (TURINO et al., 1968). Quando em 1967, Ganrot e Laurell publicaram o clássico artigo que provava que membros de famílias com baixos níveis séricos de a1-antitripsina apresentavam alta prevalência de enfisema pulmonar em indivíduos de ambos os sexos e em idades mais precoces que a população fumante normalmente desenvolve (GANROT et al., 1967). A literatura então apontava dois fatores como importantes causadores do enfisema: a ação de proteases e a deficiência de antiproteases.

Em meados dos anos 60, surgiu um novo achado que corroborava para a consolidação dessa teoria. Janoff e Scherer demonstraram que neutrófilos humanos normais contêm uma potente elastase, e que esta pode ganhar os pulmões facilmente através da vasculatura pulmonar e dos constituintes celulares que naturalmente cruzam os pulmões (JANOFF; SCHERER, 1968). Daí em diante os estudos comprovaram que o soro de indivíduos com deficiência de α1-antitripsina não apresentavam defesas antiproteolíticas contra essa elastase (TURINO *et al.*, 1969). Logo, modelos animais que demonstravam os efeitos de elastase neutrofílica e papaína sobre os componentes morfológicos e mecânicos dos pulmões começaram a ser desenvolvidos (SNIDER *et al.*, 1974; SENIOR *et al.*, 1977). A base da teoria do desequilíbrio proteolítico defende que a lesão tecidual pulmonar é resultado do excesso de enzimas proteolíticas liberadas por células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos (JANOFF, 1985; STARCHER; WILLIAMS, 1989; SHAPIRO *et al.*, 1991). A Tabela 1 publicada por Shapiro em 1999 demonstra todas as elastase presentes no parênquima pulmonar humano.

Classe enzimática	Enzima	Massa Molecular* (KD)	Célula de origem	Substratos da MEC além da elastina	Atividade elastolítica relativa, pH 7,5 (%)
Protease serina	Elastase neutrofílica	27 - 31	Neutrófilo (monócito)	componentes da MB <sup>+</sup>	100
	Proteinase 3	28 - 34	Neutrófilo (monócito)	componentes da MB <sup>+</sup>	40
	Catepsina G	27 - 32	Neutrófilo (monócito, mastócito)	componentes da MB†	20
Metaloprotease de matriz	92-KD gelatinase	92 - 95	Macrófago neutrófilo eosinófilo	Colágeno desnaturado, tipos IV, V e VII	30
Protease	Elastase macrofágica	54	Macrófago	componentes da MB† (Inativa em pH	35
cisteína	Catepsina L	29	Macrófago	7,5)	o\$
	Catepsina S	28	Macrófago Célula T	(desconhecido)	80\$

Tabela 1. Elastases presentes no parênquima pulmonar, adaptada de (SHAPIRO, 1999)

Definição da abreviação: MB = membrana basal

\*denota a forma da pré-enzima (zimogênio); † Componentes da membrana basal que incluem fibronectina, laminina, entactina, vitronectina e colágeno tipo IV (domínios não-elicoidais); ‡ Essas enzimas são mais potentes que a elastase neutrofílica em pH 5,5. Parênteses denotam pequenas fontes celulares.

Dados da literatura mostram que existe uma correlação positiva entre o número de macrófagos nos septos alveolares e o estágio enfisematoso de médio a moderado em pacientes com DPOC (TETLEY, 2002). Isso demonstra que o componente inflamatório está intimamente associado a essa doença e é fundamental para perpetuar o desequilíbrio proteolítico. Logo, associar essa alteração com as modificações histológicas evidentes do enfisema parece estabelecer uma forte relação causa-consequência.

O enfisema pulmonar é caracterizado pelo alargamento anormal das regiões respiratórias dos pulmões distais aos bronquíolos terminais, acompanhado de destruição das paredes alveolares, com perda de tecido por unidade de volume, isto é, destruição septal com alargamento dos espaços alveolares (SNIDER, 1985). O enfisema pode ser classificado de acordo com a sua localização nos pulmões (DUNNILL, 1979; SNIDER, 1992b; SNIDER, 1992a). Dentre os tipos existentes dois deles representam os principais tipos de lesões que acometem os humanos. O tipo panacinar que envolve o alargamento do espaço alveolar em todo o ácino e surge geralmente como resultado da deficiência em α1-antitripsina. E o centroacinar, o tipo mais frequente de lesão que se desenvolve nas porções centrais do ácino em íntima proximidade com os bronquíolos respiratórios e é predominantemente associado com a exposição prolongada à fumaça de cigarro (KILBURN; MCKENZIE, 1975; PRYOR *et al.*, 1983; MCCUSKER, 1992).

### 1.1.1 Modelo de enfisema em camundongo

O modelo animal ideal para se investigar o enfisema pulmonar deve induzir as diversas alterações anatômicas típicas da doença em um curto período de tempo. Infelizmente, todos os modelos animais conhecidos abrangem apenas alguns dos critérios possuindo limitações, mas são cientificamente aceitos, visto que existe uma considerável variabilidade no fenótipo da DPOC mesmo entre os humanos (WRIGHT *et al.*, 2008).

Estudos realizados com ratos e camundongos mostraram que ao nascimento esses animais não possuem alvéolos verdadeiros, e assim como os humanos a alveologênese ocorre no período pósnatal (MASSARO; MASSARO, 2007), compreendendo uma reestruturação dos pulmões, com formação dos alvéolos e vias respiratórias (crescimento hiperplástico) e o posterior aumento dessas estruturas (crescimento hiperplástico) (DAVID, 2001). Além disso, alterações estruturais nos pulmões como a segmentação dos lobos e a ramificação da árvore brônquica também confere diferenças entre as espécies. Os humanos possuem o pulmão esquerdo segmentado em dois lobos e o direito em três lobos, com as várias divisões dos

brônquios, começando dos principais, seguido sucessivamente pelos brônquios lobares, segmentares até chegar aos bronquíolos respiratórios. Esse processo de subdivisões compreende cerca de dezesseis segmentações da árvore brônquica (DAVID, 2001). Quanto aos camundongos, o pulmão esquerdo é um lobo único e o pulmão direito possui quatro lobos. Além disso, a sua árvore brônquica é menos extensa que a dos humanos, não compreendendo os bronquíolos respiratórios (HYDE *et al.*, 2009).

No entanto, todas essas diferenças anatômicas não impediram o avanço de estudos com camundongos em modelos de enfisema pulmonar e DPOC em geral. Dada a importância da fumaça de cigarro como principal agente causador de DPOC, muitos modelos animais de enfisema pulmonar foram criados usando esse estímulo. Trabalhos relevantes do nosso grupo e muitos outros da literatura caracterizam bem o enfisema pulmonar instalado, com destruição septal, alargamento dos espaços alveolares (aumento do Lm – medida morfométrica do diâmetro alveolar), aumento de proteases, degradação de componentes da matriz extracelular, comprometimento da função pulmonar e o inevitável desequilíbrio redox gerado pelo estímulo oxidativo da fumaça de cigarro (VALENCA *et al.*, 2004; VALENCA *et al.*, 2006; VALENCA; PORTO, 2008; YAO *et al.*, 2008; ARUNACHALAM *et al.*, 2010; RAJENDRASOZHAN *et al.*, 2010; LANZETTI *et al.*, 2011). Apesar de tudo isso, o modelo com fumaça de cigarro também possui suas limitações. A Tabela 2 adaptada da revisão de Wright (2008) define os prós e os contras do modelo de DPOC induzido por fumaça de cigarro.

Tabela 2. Prós e contras do modelo de DPOC induzido por fumaça de cigarro. Adaptada de (WRIGHT et al., 2008)

Prós:

# Induzido pelo mesmo insulto que nos humanos Produz enfisema, remodelamento das vias aéreas e vascular e hipertensão pulmonar em algumas espécies Produz alterações fisiológicas semelhantes aos humanos **Contras:** Não produz doença incapacitante grave como nos humanos Requer muitos meses de exposição As lesões não parecem progredir depois de cessada a exposição à fumaça

Contudo, a forte fundamentação da teoria do desequilíbrio entre protease e antiprotease estimulou modelos de enfisema induzidos pela administração de enzimas elastolíticas, tanto por instilação intratraqueal quanto por inalação aerosol. Como dito anteriormente, diversas proteases foram testadas, no entanto se descobriu que a atividade elastolítica da papaína depende da sua pureza e da origem (LIEBERMAN, 1976). E assim, por eliminação as enzimas mais utilizadas nos estudos atuais passaram a ser a elastase pancreática suína (PPE) e a elastase neutrofílica. Apesar de essas duas enzimas terem diferenças no espectro de ação sobre a elastina (SENIOR *et al.*, 1976), ambas são capazes de degradar o componente elástico do pulmão comprometendo a sua arquitetura tecidual. Além disso, a PPE possui uma grande vantagem em relação à elastase neutrofílica que é o seu baixo custo.

O uso de elastases torna o processo de indução do enfisema muito mais rápido do que o induzido por fumaça de cigarro. E, além disso, a severidade da doença pode ser controlada pela dose de elastase a ser administrada, facilitando a obtenção de enfisema severo. Mas assim como o modelo de fumaça, a indução do enfisema por elastase também apresenta suas limitações. A Tabela 3 adaptada da revisão de Wright (2008) define os prós e os contras do modelo de DPOC induzido por elastases.

Entretanto, mesmo com todo o avanço nas pesquisas envolvendo o enfisema pulmonar, até hoje perduram muitas questões acerca da sua fisiopatologia,

independentemente do estímulo causador do enfisema. Continuar a investir em estudos que visem compreender o desencadeamento dessa doença pode contribuir enormemente para o surgimento de propostas terapêuticas no futuro.

Tabela 3. Prós e contras do modelo de DPOC induzido por elastase. Adaptada de (WRIGHT et al., 2008)

### Prós:

Único tratamento (dispensa longos períodos de exposição)/ econômico e fácil Início rápido

Pode produzir doença severa dependendo da dose

Progressivo em alguns casos

Fácil de medir alterações funcionais

Boa escolha quando se lida com recursos escassos, pois é muito oneroso executar fumaça por 6 meses

Possivelmente relevante para certos aspectos de regeneração da rede de elastina

### Contras:

Escolha da enzima, espécie animal, idade dos animais, e o protocolo de dose são cruciais para resultados consistentes

Elastase neutrofílica e PPE parecem de alguma forma atuar diferentemente Relevância para os mecanismos que de fato ocorrem com a exposição à fumaça não é clara

Enfisema por elastase não contempla todas as complicações vistas com fumaça Relevância de terapias/intervenções ainda menos clara do que com modelos animais de exposição à fumaça

### 1.2 Produção de oxidantes

A respiração, não é um processo peculiar do sistema respiratório. Ao contrário, ela acontece em todo o corpo do ser humano, mais precisamente nas mitocôndrias das células, no evento chamado de respiração celular. Na cadeia respiratória, no entanto,

ocorrem diversas etapas intermediárias de redução do  $O_2$ , onde são formadas as espécies reativas de oxigênio (ROS), dentre elas o ânion superóxido ( $O_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila (OH). A Figura 2 ilustra o esquema das reações intermediárias de redução do  $O_2$  na ordem cronológica.

### Figura 2. Reações envolvidas na produção de ROS

 $O_2 + 1$  elétron --->  $O_2$ - (ânion superóxido)  $O_2$ - + 1 elétron --->  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio)  $H_2O_2$  + 1 elétron ---> 2 OH- (radical hidroxila) OH- + 1 elétron + 1 H+ --->  $H_2O$ 

Sendo assim, as espécies reativas de oxigênio são, portanto produtos naturais da cadeia transportadora de elétrons. Quando geradas em condições fisiológicas elas não oferecem risco ao organismo por serem neutralizadas por um importante e eficaz sistema antioxidante endógeno enzimático e não enzimático. O equilíbrio entre a produção de oxidantes e antioxidantes mantém o sistema livre da ação oxidativa, evitando o dano às estruturas celulares, como lipídios e proteínas membranares bem como o material genético da célula (BARTOSZ, 2009).

### 1.2.1 <u>Recrutamento leucocitário e estresse oxidativo</u>

Muitas condições patológicas perturbam o equilíbrio redox celular, por aumentarem a produção de oxidantes ou mesmo diminuir a ação das defesas antioxidantes. Sabe-se que a principal fonte endógena de oxidantes lesivos provém de células fagocíticas como macrófagos residentes e neutrófilos recrutados, visto que têm a capacidade de gerar potentes metabólitos tóxicos de oxigênio a partir do sistema NADPH oxidase (NOX2) (WARD, 2010). Apesar das células epiteliais alveolares e células endoteliais serem capazes de liberar ROS, a principal fonte de ROS nos pulmões são as células fagocíticas (JOHNSON *et al.*, 1981; FANTONE; WARD, 1982). Por isso, em condições inflamatórias, quando há um aumento do recrutamento de leucócitos para o local da lesão, há uma tendência natural de elevar a produção de ROS. Isso acontece em função das células disporem de eficientes vias de geração de ânion superóxido. Como por exemplo, o complexo enzimático NADPH oxidase presente nas células fagocíticas como mecanismo de combate a agentes invasores e a enzima xantina oxidase, que produz ânion superóxido quando atua na degradação de hipoxantina à xantina, no processo de isquemia-reperfusão (GOMES *et al.*, 2012). A produção aumentada de superóxido contribui para a formação de outras espécies reativas de oxigênio, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OH<sup>\*</sup>, e consequentemente para o desequilíbrio redox (MILLER *et al.*, 1990; BARTOSZ, 2009).

O eficaz sistema de defesa antioxidante endógeno pode se tornar falho em função do estímulo inflamatório continuado e das suas repercussões sobre a liberação de ROS. Dessa forma, uma desarmonia atinge o equilíbrio entre a produção/atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) e a liberação de ROS no ambiente (VALKO *et al.*, 2007). Esse desequilíbrio pode ocorrer de maneira momentânea, e o organismo ser capaz de reestabelecer as condições ideais. No entanto, com a continuidade dessa condição desequilibrada entre a liberação de oxidantes e as defesas antioxidantes, as estruturas celulares passam a ser alvo de ataque dos oxidantes e sofrerem danos oxidativos em nível de proteínas, lipídios e DNA, estabelecendo então a condição de estresse oxidativo.

No entanto, a inflamação desencadeia outros efeitos no organismo que vão além do estresse oxidativo. A liberação de mediadores inflamatórios pelos leucócitos ativados é inerente desse processo. Contudo, a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) também tem a sua produção aumentada, o que leva ao aumento da liberação de óxido nítrico (NO) na resposta inflamatória (BRINDICCI *et al.*, 2009). O NO em condições fisiológicas desempenha funções benéficas ao organismo, visto que atua como vasodilatador, mensageiro intracelular, e ainda pode ter o papel de eliminar patógenos e células neoplásicas. E em função da sua curta meia vida (aproximadamente 1 s) o NO se difunde pelos tecidos através das hemácias onde é

rapidamente convertido a nitrato pela reação com oxihemoglobina (BUTLER *et al.*, 1998; JOSHI *et al.*, 2002).

Todavia, a sua síntese pode se tornar paradoxalmente lesiva às células sempre que acontecer simultaneamente e próximo do local de síntese do  $O_2^{*}$ . Essa gravidade se dá pela reação do NO com o  $O_2^{*}$  que gera um produto cujo poder oxidante é muito mais lesivo, é o peroxinitrito (ONOO<sup>•</sup>). Sua velocidade de reação com as moléculas biológicas é baixa o suficiente para atacar seletivamente as estruturas celulares. Além disso, ele pode se difundir e percorrer longas distâncias na escala celular e ainda atravessar por canais iônicos (DENICOLA *et al.*, 1998; MACFADYEN *et al.*, 1999). Estima-se que o aumento de 10 vezes na concentração de NO e  $O_2^{*}$  eleva a taxa de formação do peroxinitrito em 100 vezes. Contudo, em condições próinflamatórias, a produção simultânea de NO e  $O_2^{*}$  pode ser fortemente ativada sendo elevada em até 1.000 vezes, significando um aumento de 1.000.000 de vezes na síntese do ONOO<sup>•</sup>. Além disso, a produção dessas duas moléculas não precisa acontecer obrigatoriamente na mesma célula para formarem o peroxinitrito, visto que apesar de uma meia vida curta, o NO pode se mover rapidamente através de membranas e por entre as demais células (PACHER *et al.*, 2007).

Com o peroxinitrito formado e circulando pelo microambiente, as reações de nitração de proteínas ficam facilitadas, implicando em alterações danosas para essas moléculas. Essas reações derivadas do ONOO<sup>-</sup> geram produtos estáveis como a nitrotrirosina e o nitrotriptofano, marcadores do estresse nitrosativo (PACHER et al., 2007). A Tabela 4, publicada na revisão de Vasconcelos e colaboradores em 2007, reúne as principais espécies radicalares derivadas de oxigênio e de nitrogênio que estão presentes em sistemas biológicos.

# Tabela 4. Natureza, geração e destino de espécies radicalares (ou seus intermediários) biologicamente importantes adaptado de (VASCONCELOS *et al.*, 2007)

Espécies derivadas do oxigênio		
Ânion-radical superóxido O₂ <sup>∽</sup>	Gerado continuamente por diversos processos celulares (cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microssomo, através enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase), ou pela redução monoeletrônica de $O_2$ . Rapidamente desaparece em solução aquosa por reação de dismutação: $O_2^{-+} + O_2^{} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ Em solução aquosa é um forte agente redutor. Sua habilidade em reduzir Fe <sup>3+</sup> a Fe <sup>2+</sup> pode acelerar a reação de Fenton: $O_2^{} + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$ Em solução aquosa é um oxidante fraco, porém pode formar ERN: $O_2^{} + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$ Em solução aquosa é um oxidante fraco, porém pode formar ERN: $O_2^{} + NO^- \longrightarrow ONOO^-$ É permeável a membranas. Em fagócitos, como neutrófilos e macrófagos, é um dos microbicidas mais importantes.	
Peróxido de hidrogênio H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Intermediário formado pela reação de dismutação de $O_2^{-}$ catalisada pela enzima SOD, pela redução de 2 e na molécula de $O_2$ e pela ação de diversas enzimas oxidases <i>in vivo</i> , localizadas nos peroxissomas. É muito difusível dentro e entre as células <i>in vivo</i> . É um fraco agente oxidante e um fraco agente redutor, reage lentamente com tióis, com sais de ferro e cobre reduzidos, com proteínas heme e peroxidases para iniciar reações radicalares e peroxidações lipídicas. Em presença de metal de transição gera 'OH, através da reação de Fenton $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH + OH$	
Radical hidroxila 'OH	É o mais reativo e mais lesivo radical conhecido e para o qual, uma vez formado, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa, reage com uma série de endobióticos, causa modificação no DNA (com modificação das bases e quebras das fitas), danos nas proteínas e inativação enzimática, peroxidação lipídica. Âmbito limitado de ação (poucos diâmetros moleculares).	
Radicais peroxila (RO <sub>2</sub> ') alcoxila(RO')	Formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica.	
Oxigênio singlete <sup>1</sup> O <sub>2</sub> *	Estado eletronicamente excitado do oxigênio, produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações; reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídeos da membrana, iniciando processos de peroxidação. ${}^{1}O_{2}^{*}$ pode ser gerado, entre outras reações, por transferência de energia a partir de um sensibilizador S, no estado excitado tripleto ( ${}^{3}S^{*}$ ) (porfirinas, clorofila e riboflavina) para o oxigênio. O sensibilizador S absorve energia e deixa o estado fundamental singlete (S), passando para o estado excitado singlete ( ${}^{1}S^{*}$ ), a partir do qual é convertido, por cruzamento intersistema, para o estado excitado triplete. ( ${}^{3}S^{*}$ ): S $\longrightarrow$ ${}^{1}S^{*} \longrightarrow {}^{3}S^{*}$ ; ${}^{3}S^{*} + {}^{3}O_{2}^{*} \longrightarrow S + {}^{1}O_{2}^{*}$	
Ozônio O <sub>3</sub>	Produzido no ar atmosférico poluído e por fonte de luz intensa de algumas fotocopiadoras e outros equipamentos. É extremamente danoso ao pulmão, oxidando rapidamente proteínas, DNA e lipídeos.	

### Continuação da Tabela 4.

	Espécies derivadas do nitrogênio e cloro
Ácido hipocloroso HOCl	Espécie não radicalar, membrana-permeável, oxida um grande número de compostos biológicos, como tióis e tioéteres, aminas, fenóis e ligações insaturadas, mais seletivo que o radical hidroxila, oxida ferro e proteínas. Produzido por fagócitos ativados, reage com $O_2^{-}$ para formar 'OH HOCl + $O_2^{-}$
Óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio NO	Sintetizado nos organismos vivos pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que converte o aminoácido L-arginina a NO <sup>+</sup> + <i>L</i> -citrulina (outro aminoácido). É um radical abundante que age em uma variedade de processos biológicos, incluindo relaxação muscular, neurotransmissão e regulação imune. Originalmente identificado como fator relaxante derivado do endotélio ("endothelium-derived relaxing factor": EDRF) é um potente vasodilatador, envolvido na regulação da pressão arterial. Difunde-se rapidamente entre e dentro das células. Quando exposto ao ar, reage com oxigênio para formar NO <sub>2</sub> . 2NO <sup>+</sup> + O <sub>2</sub> $\longrightarrow$ 2 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> . Reage rapidamente com O <sub>2</sub> <sup></sup> e produz o intermediário ONOO <sup>-</sup> O <sub>2</sub> <sup></sup> + NO <sup>-</sup> $\longrightarrow$ ONOO <sup>-</sup>
Dióxido de nitrogênio NO <sub>2</sub> ·	Formado a partir da exposição de NO ao ar ou da protonação de peroxinitrito $2NO + O_2 \longrightarrow 2 NO_2$ Potente iniciador da peroxidação lipídica em fluidos biológicos.
Cloreto de nitrila NO <sub>2</sub> Cl	Formado a partir de misturas de $NO_2^-$ e HOCI. Oxidante, agente de cloração e de nitração, pode inibir fosforilação dependente de quinase de resíduos de tirosina, provoca a cloração de resíduos de tirosina (3-clorotirosina é considerada biomarcador).
Peroxinitrito ONOO-	Intermediário formado pela reação $O_2^{-} + NO^{\circ} \longrightarrow ONOO^{-}$ Instável, tempo de vida curto, oxidante potente, propriedades semelhantes ao radical hidroxila, causa danos a muitas moléculas biológicas, inclusive a grupos S-H das proteínas, provoca hidroxilação e nitração de compostos aromáticos. Forma 'OH independente da presença de metal de transição ONOO <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> $\longrightarrow$ 'OH + NO <sub>2</sub> Após protonação, rearranja-se para nitrato (NO <sub>3</sub> ') e interage com bicarbonato (CO <sub>2</sub> /HCO <sub>3</sub> '), com alteração de sua reatividade. ONOOH $\implies$ ['NO <sub>2</sub> 'OH] $\longrightarrow$ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Em presença de CO <sub>2</sub> , o peroxinitrito forma o peroxicarboxilato nitroso, que rapidamente se decompõe, segundo as etapas 1 e 2. O CO <sub>2</sub> está presente em elevada concentração no compartimento intra e extracelular, o que favorece a formação do CO <sub>3</sub> <sup></sup> , em presença de ONOO <sup>-</sup> . ONOO <sup>-</sup> + CO <sub>2</sub> $\longrightarrow$ ONOCO <sub>2</sub> <sup>-</sup> $\longrightarrow$ NO <sub>2</sub> OCO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (1) NO <sub>2</sub> OCO <sub>2</sub> <sup>-</sup> $\longrightarrow$ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + CO <sub>2</sub> (65%) (2) NO <sub>2</sub> OCO <sub>2</sub> <sup>-</sup> $\longrightarrow$ NO <sub>2</sub> + CO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (35%) O ânion radical carbonato formado é mediador de diversas reações de oxidação e nitração
Cloraminas	Oxidantes mais suaves e de vida mais longa que HOCl, reagem com tióis, tioéteres e centros metálicos de ferro. Toxicidade variável, dependendo da polaridade e da permeabilidade da membrana. Cloraminas de α-aminoácidos sofrem degradação para aldeídos potencialmente tóxicos

#### 1.2.2 Enfisema pulmonar e o desequilíbrio redox

A literatura científica vem provando ao longo dos anos a íntima relação entre o enfisema pulmonar e o estresse oxidativo. Muitos parâmetros marcadores de desequilíbrio redox ou dano oxidativo vêm sendo implicados nos diferentes modelos experimentais de DPOC, principalmente porque se sabe que a fumaça de cigarro contem oxidantes que estimulam os macrófagos alveolares a produzirem mais ROS e a liberarem uma série de outros mediadores inflamatórios como quimiocinas para atrair neutrófilos e outras células (RAHMAN; MACNEE, 1996). Dessa forma estudos de enfisema induzido por fumaça de cigarro já mostram provocar redução das atividades

enzimáticas antioxidantes, aumentar marcadores de dano oxidativo e ser agravado em animais deficientes no fator relacionado à eritróide nuclear 2 (Nrf2), que é o fator de transcrição relacionado à ativação dos elementos da resposta antioxidante no núcleo celular (IIZUKA *et al.*, 2005; YAO *et al.*, 2010; BEZERRA *et al.*, 2011; LANZETTI et al., 2011).

Contudo, o questionamento sobre participação do estresse oxidativo no desenvolvimento do enfisema pulmonar permaneceu, a fim de descobrir se a sua ocorrência era devido ao estímulo oxidativo provocado pela fumaça de cigarro ou se era inerente à patogênese do enfisema.

Um estudo *in vitro* publicado em 1984 por Speer e colaboradores evidenciou que macrófagos derivados de monócitos expostos a enzimas proteolíticas, como a elastase neutrofílica, catepsina G, tripsina, quimiotripsina, pronase e papaína liberaram cerca de 2 a 3 vezes mais  $O_2^-$  e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que as células não tratadas (SPEER *et al.*, 1984). Mais tarde outro estudo seguiu esse raciocínio e provou que células epiteliais bronquiolares e fibroblastos humanos submetidos a altas concentrações de elastase neutrofílica, tripsina e pronase liberavam de forma dose- e tempo-dependente maiores níveis de ROS, indicando uma relação entre proteases e estresse oxidativo (AOSHIBA *et al.*, 2001).

Esses dados deram base para que avançassem as pesquisas que buscam a ligação entre o desequilíbrio proteolítico e o desequilíbrio redox. Ishii e colaboradores mostraram em 2005 que o enfisema induzido por elastase foi exacerbado em animais deficientes em Nrf2 (ISHII *et al.*, 2005). Em 2007 Kinoshita et al mostraram que a superexpressão da tioredoxina, um tipo de peroxidase com potente ação redutora devido aos seus dois resíduos de cisteína, atenuou o efeito da elastase prevenindo contra o enfisema. E mesmo a tioredoxina exógena apresentou efeito protetor contra o enfisema (KINOSHITA *et al.*, 2007). Mais tarde Yao e colaboradores mostraram que animais que superexpressavam a isoforma extracelular da enzima superóxido dismutase eram protegidos do enfisema induzido por elastase, ao passo que os animais deficientes nessa mesma isoforma da SOD apresentaram maior destruição tecidual e alargamento alveolar que os animais selvagens (YAO et al., 2010).

Essa modulação de genes ligados a diferentes elementos da resposta antioxidante tem sido o método preferido que os investigadores encontraram para delinear a relação entre o enfisema e o estresse oxidativo. No entanto, estudos que visem observar as reais alterações na resposta redox da célula ainda são escassos. Induzir o enfisema por administração de elastase e acompanhar os seus efeitos como um todo sobre a resposta redox pode ser um bom passo para se descobrir qual o principal fator ligado a patogênese do enfisema, se é que existe realmente apenas um.

### 1.3 Estratégias antioxidantes na terapêutica da DPOC

### 1.3.1 Estratégias antioxidantes

Na tentativa de confirmar os efeitos do estresse oxidativo nos modelos de enfisema elastolíticos, diferentes abordagens antioxidantes podem ser empregadas. Fármacos com efeito "scavenger" ou mesmo com ação mimética as enzimas antioxidantes podem contribuir para elucidar o mecanismo que envolve o estresse oxidativo no desenvolvimento do enfisema pulmonar. Um recente estudo mostrou que a administração de quercetina, um polifenol com potente efeito antioxidante, a animais que tiveram indução de enfisema por um modelo de exposição à elastase e LPS (lipopolissacarídeo – componente da parede celular de bactéria gram negativa) apresentaram melhora nos parâmetros funcionais, morfológicos e bioquímicos (GANESAN *et al.*, 2010).

Dessa forma, mesclar drogas antioxidantes que atuem em diferentes vias da resposta redox celular no modelo de enfisema elastolítico pode ser uma boa estratégia para descobrir o ponto crucial que associa o estresse oxidativo à patogênese do enfisema pulmonar.

### 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar a relação do desequilíbrio redox com o desequilíbrio proteolítico no enfisema pulmonar induzido por elastase em camundongos.

### 2.1.1 Objetivos Específicos

- Determinar o momento no qual o estresse oxidativo contribui para a patogênese do enfisema pulmonar
- Investigar a participação da iNOS no desenvolvimento do enfisema pulmonar por inibição farmacológica e depleção genética
- Investigar estratégias terapêuticas antioxidantes que combatam o enfisema pulmonar induzido por elastase
- Testar um modelo de indução do enfisema por instilação de elastase intratraqueal
- Testar um modelo de indução do enfisema por instilação de elastase intranasal
# **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde (SSC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) cujo número de protocolo é DAHEICB 063 (Anexo).

### 3.1 Modelo experimental de enfisema pulmonar

Camundongos C57BL/6 machos de 8 semanas foram acondicionados em grupos de 5 – 6 animais por caixa, em estante ventilada no Laboratório Compartilhado do CCS – UFRJ. As condições de temperatura e umidade foram controladas (21±2°C, 50±10%, respectivamente), e os animais submetidos aos ciclos invertidos claro/escuro de 12 h com exaustão constante. Água e ração foram oferecidas *ad libitum*.

O desenho experimental de indução do enfisema foi realizado por dois protocolos diferentes, que deram origem a dois estudos distintos.

### 3.2 Instilação intratraqueal de elastase

#### 3.2.1 Modelo dose- e tempo-resposta

Para observar o efeito de duas doses diferentes de elastase e o momento onde as lesões enfisematosas são aparentes no nosso modelo, os animais foram divididos em cinco grupos (n=6), anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (90 mg/kg) e xilasina (1 mg/kg), e através da exposição da traqueia por método de traqueostomia 50 µl foram administrados em cada animal. Os grupos tratados receberam instilação intratraqueal de elastase pancreática suína (PPE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) (KAWAKAMI *et al.*, 2008) diluída em salina estéril em volume total de 50 μl contendo 0,5 U de PPE ou 0,05 U de PPE. O grupo controle recebeu 50 μl de salina estéril. Os grupos foram divididos da seguinte maneira:

- Grupo controle (50 µl de salina)
- Grupo PPE 0,5 U após 7 dias
- Grupo PPE 0,5 U após14 dias
- Grupo PPE 0,5 U após 21 dias
- Grupo PPE 0,05 U após 21 dias

As instilações foram realizadas temporalmente de forma a garantir o sacrifício de todos os animais no mesmo dia, através de deslocamento de cervical (vide Figura 3).



Figura 3. Esquema de instilação temporal e sacrifício simultâneo dos animais.

## 3.2.2 Modelo de enfisema com 0,5 U de PPE e inibição farmacológica de iNOS

A fim de investigar o papel da isoforma induzível da enzima óxido nítrico síntase (iNOS) no desenvolvimento do enfisema, um inibidor seletivo da iNOS, aminoguanidina (AMG) foi usado na dose de 1% adicionado à água de beber dos animais um dia antes da instilação de PPE e permaneceu ao longo dos 21 dias do protocolo de indução do enfisema (OKADA *et al.*, 2006). Os animais foram divididos em quatro grupos (n=5), anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (90 mg/kg) e xilasina (1 mg/kg), e através da exposição da traquéia por método de traqueostomia, 50 µl foram administrados em cada animal. Os grupos tratados receberam instilação intratraqueal de 0,5 U de PPE diluída em salina estéril em volume total de 50 µl. O grupo controle recebeu 50 µl de salina estéril. Os grupos foram divididos da seguinte maneira:

- Grupo controle (50 µl de salina i.t.) recebeu água pura
- Grupo AMG (50 µl de salina i.t.) recebeu água com 1% de aminoguanidina durante 22 dias
- Grupo PPE (0,5 U PPE em 50 µl) recebeu água pura
- Grupo PPE+AMG (0,5 U PPE em 50 µl) recebeu água com 1% de aminoguanidina durante 22 dias





## 3.2.3 Modelo de enfisema com 0,5 U de PPE em animal deficiente em iNOS

Para validar a hipótese de que a iNOS está intimamente associada à fisiopatologia do enfisema, camundongos geneticamente modificados deficientes em iNOS foram usados nesse experimento, excluindo a hipótese que a inibição farmacológica com AMG pudesse não ser seletiva, inibindo também outras isoformas da óxido nítrico sintase. Esses animais foram gentilmente cedidos pela Professora Patrícia Silva Martins da FIOCRUZ. O protocolo de indução do enfisema obedeceu aos mesmos critérios supracitados e os grupos foram distribuídos da seguinte maneira:

• Grupo controle WT – animais selvagens que receberam 50 µl de salina i.t.

- Grupo PPE WT animais selvagens que receberam 0,5 U de PPE em 50µl i.t.
- Grupo controle iNOS<sup>-/-</sup> animais deficientes em iNOS que receberam 50 µl de salina i.t.
- Grupo PPE iNOS<sup>-/-</sup> animais deficientes em iNOS que receberam 0,5 U de PPE em 50 μl i.t.

Os animais foram sacrificados 21 dias após a instilação intratraqueal.

# 3.3 Instilação intranasal de elastase

## 3.3.1 Modelo tempo-resposta

Para uma melhor caracterização da ocorrência do estresse oxidativo nos momentos iniciais do estabelecimento do enfisema pulmonar esse modelo de enfisema induzido por instilação intranasal de PPE contemplou animais avaliados 24 após o estímulo. Além disso, respeitando as diferenças sobre a via de administração, a dose desse modelo foi adaptada para 3 U por animal, assim como foi publicado previamente (COUILLIN *et al.*, 2009). Os animais foram divididos em cinco grupos (n=6), imobilizados e uma única instilação de 15 µl foi feita na cavidade nasal de cada animal. Os grupos tratados receberam instilação intranasal de elastase pancreática suína (PPE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) (KAWAKAMI et al., 2008) diluída em salina estéril em volume total de 15 µl contendo 3 U de PPE. O grupo controle recebeu 15 µl de salina estéril. Os grupos foram divididos da seguinte maneira:

- Grupo controle (15 µl de salina)
- Grupo PPE 3 U após 1 dia
- Grupo PPE 3 U após 7 dias
- Grupo PPE 3 U após 14 dias
- Grupo PPE 3 U após 21 dias

As instilações foram realizadas temporalmente de forma a garantir o sacrifício de todos os animais no mesmo dia, através de deslocamento de cervical, assim como mostrado na Figura 3.

# 3.3.2 Modelo de enfisema com 3 U de PPE e administração de drogas antioxidantes

A fim de investigar o papel do estresse oxidativo/nitrosativo sobre o desenvolvimento do enfisema pulmonar, diferentes drogas antioxidantes foram administradas aos animais submetidos à instilação intranasal de 3 U de PPE para avaliar se há ou não melhora do enfisema. Os animais foram divididos em sete grupos (n=5 à 7), imobilizados e 15 µl foram injetados na cavidade nasal de cada animal. Os grupos tratados receberam instilação intranasal de 3 U de PPE diluída em salina estéril em volume total de 15 µl. O grupo controle recebeu 15 µl de salina estéril. As drogas antioxidantes foram administradas junto à água de beber dos animais, com exceção da vitamina E, que por ser lipossolúvel, teve o azeite de oliva como veículo e sua administração foi feita diariamente através de gavagem orogástrica (100 µl por animal). Os grupos foram divididos da seguinte maneira:

- Grupo controle (15 µl de salina) recebeu água de beber pura
- Grupo PPE 3 U recebeu água de beber pura
- Grupo PPE+Tempol recebeu tempol 1 mM junto à água de beber (FLEENOR *et al.*, 2012)
- Grupo PPE+Alo+Apo recebeu alopurinol 1mM e apocinina 14,4 mM junto à água de beber (STULL *et al.*, 2004; MENG *et al.*, 2011)
- Grupo PPE+NAC recebeu N-acetilcisteína 6,1 mM junto à água de beber (CHEN et al., 2007)
- Grupo PPE+VIT C+VIT E recebeu vitamina C 142 mM junto à água de beber e vitamina E 50 mg/kg diariamente por gavagem (SILVA BEZERRA *et al.*, 2006; TURGEON *et al.*, 2010)
- Grupo PPE+AMG recebeu aminoguanidina (1% ou 90,4 mM) junto à água de beber (OKADA et al., 2006)

Todas as drogas foram oferecidas ao longo dos 21 dias de protocolo experimental de indução do enfisema. Os animais foram sacrificados 21 dias após a instilação intranasal.

## 3.4 Procedimentos experimentais

No momento do sacrifício dos animais, cada material coletado seguiu processamentos específicos a fim de permitir as análises futuras.

#### 3.4.1 Lavado broncoalveolar

Imediatamente após o sacrifício, foi realizado o lavado broncoalveolar (BAL). A traqueia foi exposta e canulada e os pulmões foram lavados com 1,5 ml de solução salina ( $3 \times 500 \mu$ l). As amostras foram mantidas em gelo até o final do procedimento, a fim de evitar lise celular. A contagem total de leucócitos foi realizada simultaneamente por um avaliador treinado usando o microscópio (Nikon Eclipse E200, Tókio, Japão). Após o término de todos os grupos, as amostras foram centrifugadas (Micro centrifuga HETTICH Mycro 120 ZENTRIFUGEN, Alemanha) a 600 g por 10 minutos e o sobrenadante coletado e estocado em freezer. Em alguns experimentos, a fração celular depositada no fundo dos tubos foi utilizada para dosagem de ROS.

#### 3.4.2 Processamento tecidual

Após a realização do BAL, o tórax do animal foi aberto e o ventrículo direito cardíaco perfundido com solução salina para remoção do sangue nos pulmões. Em seguida, o pulmão esquerdo foi removido e um corte transversal foi feito dividindo o lobo em duas partes. A porção contendo o hilo pulmonar foi imersa em solução fixadora por 48 horas (formalina tamponada 10% pH 7,2) para análises histológicas. Após processamento de rotina e inclusão em parafina, foram feitos cortes seriados a 5 µm de

espessura, que foram corados em hematoxilina-eosina (HE) para a análise histopatológica do parênquima pulmonar. A segunda porção do pulmão esquerdo foi estocada no freezer para suprir qualquer eventual necessidade de material para outras análises.

#### 3.4.3 Homogeneizado tecidual

O pulmão direito foi imediatamente removido e armazenado em gelo picado em tubos devidamente etiquetados. Então, o órgão foi homogeneizado (Homogeneizador Novatécnica mod. NT136, Piracicaba, Brasil) em 1 ml de tampão fosfato de potássio pH 7,5 (KPE) e centrifugado a 600 *g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e o volume final de todas as amostras ajustado para 1,5 ml com tampão KPE. Essas amostras foram armazenadas em freezer para posterior análise bioquímica.

### 3.4.4 Morfometria e estereologia

A estrutura do parênquima pulmonar e as quantificações histológicas foram avaliadas contando 10 campos aleatórios por animal dos cortes histológicos corados em HE. Os campos foram observados com a objetiva de 20x através um microscópio ligado a um sistema de vídeo para aquisição de imagens (câmera de vídeo colorida JVC mod. TK-C380, Osaka, Japão e microscópio Carl Zeiss mod. Axiolab, Oberkochen, Alemanha) com área total de 24.640 µm2. Através de um sistema-teste (M42) acoplado ao monitor e da projeção das imagens capturadas, a análise morfométrica permitiu mensurar o diâmetro alveolar médio (Lm = 2Lt/I), onde Lt consiste no comprimento total da grade em micrômetros e I representa o número de intersecções da grade com a parede alveolar (VALENCA; PORTO, 2008). A estereologia foi realizada através do mesmo sistema-teste composto por 42 pontos (M42). O sistema teste foi acoplado a um monitor (tela plana) e através da projeção das imagens capturadas pôde-se realizar os

cálculos estereológicos. A densidade de superfície de septos alveolares (Sv) foi calculada a partir da fórmula Sv:= 2I/Lt (onde I refere-se ao número de intersecções com as linhas testes e Lt refere-se ao comprimento total das linhas testes do sistema M42) A densidade de volume (Vv) foi calculada dividindo-se o número de pontos (Pp) que tocavam os septos alveolares (Pp [septo]) e os espaços alveolares (Pp [air]) pelo número total de pontos do sistema teste (Pt) aplicando-se à fórmula Vv = Pp / Pt (VALENCA et al., 2006; WEIBEL *et al.*, 2007).

#### 3.4.5 Dosagem de proteína

A dosagem de proteínas foi realizada nas amostras de BAL e homogeneizado tecidual pelo Método de Bradford (BRADFORD, 1976). O reagente de Bradford contém como principal componente o corante Coomasie brilhante azul, que em solução ácida se liga as proteínas da amostra, alterando sua absorbância de 465 nm para 595 nm, medida através do leitor de ELISA (Bio-Rad mod. 550, Hercules, EUA). Uma curva padrão foi produzida através de concentrações crescentes da proteína albumina (0,5 – 10 µl) em duplicata. Para dosagem de proteínas no BAL foi utilizado 10 µl de amostra em duplicata enquanto para dosagem de proteínas do homogeneizado de pulmão foi utilizado 1 µl de amostra em duplicata. O resultado foi expresso em mg/ml.

#### 3.4.6 Dosagem de hidroxiprolina

O conteúdo de hidroxiprolina (OHpro) nas amostras de BAL foi determinado por um método colorimétrico previamente descrito (WOESSNER, 1961). Inicialmente, 8 µl de cada amostra foram incubados com 40 µl de cloramina-T 0.05M por 20 min à temperatura ambiente. A mistura foi então incubada com 40 µl de ácido perclórico 3 M por 5 min à temperatura ambiente. Finalmente, a mistura foi incubada com 40 µl de 20% p-dimetilbenzaldeido por 20 min a 60°C. As amostras foram lidas em leitor de ELISA a 550nm.

#### 3.4.7 Atividade de mieloperoxidase

Alíquotas de BAL foram utilizadas para dosar os níveis de mieloperoxidase (MPO), uma enzima pró-oxidante liberada por neutrófilos (SCHMEKEL *et al.*, 1990). A atividade de MPO foi mensurada através da incubação sequencial com TMB (3,3,5,5)-tetrametilbenzidina), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NaOAc (tampão acetato de sódio) sob aquecimento ( $37^{\circ}$ C) em amostras centrifugadas com HTAB (hexadeciltrimetilamonium bromídio). Inicialmente 100 µl da amostra foram centrifugados com 900 µl de HTAB a 14000 *g* por 15 min. Posteriormente 75µl do sobrenadante foi incubado com 5 µl de TMB por 5 min a 37°C. A solução foi então incubada com 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 min a 37° C. A seguir foi adicionado 125 µl de tampão NaOAc. A reação foi lida em leitor de ELISA a 630nm e o resultado expresso em mmol/mg proteína.

#### 3.4.8 Dosagem de citocinas

Alíquotas de BAL foram utilizadas para averiguar os níveis de TNF-α e IL-10, através de kits de ELISA. A realização do imunoensaio seguiu as orientações do fabricante com um limite de detecção de 10 ng/ml (Peprotech, Rocky Hill, New Jersey, USA). Resumidamente, o princípio do método se baseia na especificidade da reação entre antígeno-anticorpo, que através do anticorpo de captura fornecido pelo kit a proteína alvo presente na amostra pode ser reconhecida e se ligar, para posteriormente ser ligada por um secundo anticorpo, o de detecção. Incubação com peroxidase e substrato específico permite a observação da reatividade da reação. Uma curva padrão com a proteína recombinante foi criada em sete concentrações diferentes em duplicata.

#### 3.4.9 Dosagem de Nitrito

A detecção dos níveis de nitrito é uma forma indireta de mensurar óxido nítrico e foi realizado através da reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982; SUN; STENKEN, 2003). Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina formando um composto azo estável de coloração púrpura. Alíquotas de 100 µl de homogeneizado de pulmão foram plaqueadas em duplicata e reagiram por 10 min com 50 µl de solução de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 2,5%. Em seguida 50 µl de solução de naftiletilenodiamina 0,1% em ácido fosfórico 2,5% foram adicionados sobre a mistura. A formação do composto púrpura pode ser observada e lida imediatamente em comprimento de onda de 540 nm. O valor foi expresso em mmol/mg proteína.

#### 3.4.10 Atividade de superóxido dismutase

Alíquotas de homogeneizado de pulmão foram utilizadas no ensaio cinético para mensuração da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), de acordo com o método proposto por Bannister e Calabrese (BANNISTER; CALABRESE, 1987). A SOD constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de radicais livres, catalisando a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. A atividade enzimática da SOD foi estimada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente. A adrenalina quando oxidada pelo ânion superóxido forma um produto róseo adrenocromo.

Alíquotas de cada amostra de homogeneizado de pulmão foram utilizadas em três diferentes volumes 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l e 15  $\mu$ l. A leitura foi feita adicionando-se 965 $\mu$ l de tampão glicina (pH 10,2), 5, 10 ou 15  $\mu$ l de amostra, 20  $\mu$ l de epinefrina e 10  $\mu$ l de catalase. A mistura foi homogeneizada e a absorbância mensurada a 480nm em um

tempo de 180 seg, com intervalos de 10 seg. A atividade enzimática foi expressa em U/mg proteína.

#### 3.4.11 Atividade de catalase

Alíquotas de homogeneizado de pulmão foram utilizadas no ensaio cinético para mensuração da atividade enzimática da catalase (CAT), de acordo com o método proposto por (AEBI, 1984). A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do  $H_2O_2$ . Na reação, uma das moléculas de  $H_2O_2$  é oxidada a oxigênio molecular e a outra é reduzida à água. O método mede a atividade da enzima produzida pelas células e organelas em resposta a quantidade de  $H_2O_2$ . Para cada amostra foi preparada uma mistura de 60 µl de homogeneizado de pulmão e 1940 µl de solução, contendo 25 ml de tampão fosfato de sódio (PBS) e 40 µl de  $H_2O_2$  a 30%. A mistura foi preparada em cubeta de quartzo e o decaimento do  $H_2O_2$ . foi monitorado ao longo de 60 s espectrofotometricamente (240 nm). A atividade enzimática foi expressa em U/mg proteína.

#### 3.4.12 Atividade de glutationa peroxidase

Alíquotas de homogeneizado de pulmão foram utilizadas no ensaio cinético para mensuração da atividade enzimática da glutationa peroxidase (GPx), de acordo com o método proposto por (FLOHE; GUNZLER, 1984). A GPx é uma enzima selêniodependente que catalisa a redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para água e álcool, usando a glutationa (GSH) como doador de elétrons. Ela é encontrada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. Uma solução contendo tampão fosfato, glutationa reduzida (GSH), glutationa redutase [2,4 U/ml] e azida sódica [1 mM] foi adicionada à cubeta no volume de 700 µl por amostra. Alíquotas de 100 µl de homogeneizado de pulmão foram adicionadas à cubeta, onde reagiram por 10 minutos neutralizando os peróxidos existentes. Em seguida 100  $\mu$ l de NADPH [1,5 mM] foi adicionado e o decaimento da NADPH monitorado espectrofotometricamente por um tempo de 3 minutos. Ao final, a amostra estava pronta para receber o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ter a atividade da GPx estimada espectrofotometricamente (340 nm). A atividade enzimática foi expressa em mM/min/mg proteína.

### 3.4.13 Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

O dano oxidativo foi mensurado pela detecção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DRAPER *et al.*, 1993). Amostras de homogeneizado de pulmão (200 µl) foram desproteinizadas com 200 µl de ácido tricloroacético 10% e centrifugado a 2200 *g* por 10 min. Então 200 µl do sobrenadante foi misturado a 200 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. A mistura foi aquecida por 60 min a 100°C e em seguida resfriada à temperatura ambiente. A absorbância da fase orgânica contendo o cromógeno rosa formado foi mensurada espectrofotometricamente a 532 nm. O método foi padronizado com concentrações crescentes de MDA. Os resultados foram expressos in nMol/mg proteína.

#### 3.4.14 Dosagem de espécies reativas de oxigênio

A dosagem das espécies reativas de oxigênio (ROS) foi feita por um método colorimétrico adaptado de (CHOI *et al.*, 2006). O método se baseia na reação do sal azul de nitrotetrazalium (NBT) com espécies reativas de oxigênio. Aproximadamente 90% desse sal reage exclusivamente com anion superóxido. Outras espécies reativas que reagem menos seletivamente com esse sal são: radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, o ácido hipocloroso. As frações celulares do BAL foram resuspendidas em 100 µl de tampão KPE e a 100 µl de solução de NBT [0,1%] foi adicionado. As amostras reagiram por 1 h a 37°C. Após esse tempo, uma série de lavagens foi feita e o pellet foi

resuspendido em solução de KOH 2M com DMSO. O sobrenadante foi pipetado em duplicata em microplaca e lido a 630 nm em leitor de ELISA.

#### 3.4.15 Western blotting

Alíquotas de homogeneizado pulmonar (50 µg da proteína total) foram utilizadas para analisar o nível de proteínas específicas. A transferência foi realizada com utilização de membrana de PVDF através de eletrotransferência realizada por método "semi-dry". Cada membrana foi bloqueada com 5 % de albumina bovina durante 1 h e em seguida foram incubadas "overnight" com anticorpo primário policional na diluição de 1:1.000 anti-iNOS (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan), anti-eNOS, anti-nitrotirosina e anti-tubilina (Santa Cruz Biotechnology, INC, Califórnia). Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado (1:10.000) conjugado a estreptavidina (Invitrogen) seguidas de sucessivas lavagens. Kit de quimioluminescência e filme fotográfico (Kodak) foram utilizados para revelação, feita por raio-X. As bandas foram quantificadas por densitometria utilizando um software de imagem Adobe Photoshop CS2 (Adobe System Incorporated).

### 3.4.16 Análise estatística

Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. As análises dos dados não-paramétricos (morfometria e estereologia) foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn (P < 0,05). As análises dos dados paramétricos (demais análises) foram realizadas pelo teste de variância one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni (P < 0,05). O software Graphpad Prism foi utilizado para realizar as análises estatísticas (GraphPad Prism versão 5.0, São Diego, CA).

## 4 RESULTADOS

O presente trabalho foi dividido em dois estudos. Os dados referentes ao estudo intratraqueal foram redigidos sob a forma de artigo científico (Anexo 1), submetidos e publicados na revista Free Radical Biology and Medicine.

### Manuscript No.: FRBM-D-12-00336R1

Title: Oxidative and nitrosative stress are involved in different stages of proteolytic pulmonary emphysema

#### Article Type: Original Contribution

Corresponding Author: Prof. Samuel Santos ValencaAll Authors: Manuella Lanzetti, M.Sc.; Cristiane A Costa, Ph.D.; Renata T Nesi, M.Sc.; Marina V Barroso, R.D.; Vanessa Martins, M.Sc.; Tatiana Victoni, M.Sc.; Vincent Lagente, Ph.D.; Karla Maria P Pires, Ph.D.; Patricia M e Silva, Ph.D.; Angela C Resende, Ph.D.; Luis C Porto, M.D., Ph.D.; Claudia F Benjamim, Ph.D.; Samuel Santos Valenca, Ph.D.

Submit Date: Apr 04, 2012

#### Dear Prof. Valenca:

We are pleased to inform you that the above-noted paper has been accepted for publication in Free Radical Biology & Medicine. Your article has been forwarded to the typesetter and you will see it online within 5-7 business days.

Your article will also be published in the traditional print journal in the first available scheduled issue.

Shortly, you will receive an acknowledgement letter from our Production Department detailing information regarding proofs, reprints and copyright transfer.

We once again thank you for your contribution to Free Radical Biology & Medicine and hope that you will continue to submit your research articles to the journal.

Yours sincerely,

Phyllis A. Dennery, MD

Associate Editor

Free Radical Biology & Medicine

## 4.1 Estudo intratraqueal

# 4.1.1 <u>Modelo de enfisema induzido por elastase intratraqueal é dose e tempo-</u> <u>dependente</u>

O estabelecimento do enfisema foi evidenciado através de análise histopatológica do parênquima pulmonar. As fotomicrografias apresentadas na Figura 5 ilustram a progressão do enfisema pulmonar ao longo do tempo. A Figura 5A. representa o grupo controle, 21 dias após instilação de salina. O parênquima pulmonar se encontra preservado, com diâmetros alveolares e septos íntegros. A Figura 5B. é representativa do grupo 7 dias após instilação de 0,5 U de PPE e não apresenta alterações morfológicas no parênquima pulmonar. A Figura 5C. já possui indícios de destruição tecidual aumentada, com pequenas áreas de alargamento dos espaços alveolares, enquanto a Figura 5D., representativa do grupo 21 dias após instilação de 0,5 U de PPE, evidencia alterações estruturais típicas do enfisema, com dano tecidual avançado em função da acelerada degradação septal e o consequente aumento dos espaços alveolares. A Figura 5E. não demonstra alterações no tecido, indicando que a dose de 0,05 U de PPE não foi eficaz em induzir o enfisema. A Tabela 5 apresenta as quantificações morfométricas e estereológicas das alterações sofridas pelo tecido pulmonar após estímulo da PPE.

Mediante ao estímulo nocivo da PPE a hidroxiprolina é interpretada como um marcador da quebra de fibras colágenas do tecido. Assim, a Figura 6 sugere uma acelerada e cíclica quebra de colágeno no parênquima pulmonar, com aumento em 7 dias, manutenção dos níveis basais em 14 dias e um novo aumento em 21 dias após 0,5 U de PPE. A dose de 0,05 U de PPE não induziu o aumento de OHpro 21 dias após instilação.



Figura 5. Prancha histológica corada em HE mostra que a indução do enfisema por PPE é dose e tempo-dependente. A) Grupo controle 21 dias após instilação de salina; B-D) Grupos tratados com 0,5 U de PPE 7, 14 e 21 dias após instilação, respectivamente; E) Grupo tratado com 0,05 U de PPE 21 dias após instilação. Setas indicam áreas de alargamento alveolar e destruição septal. (x 20)

Tabela J. Avallação qualititativa da alteração tectudal.	Tabela 5. Aval	iação qua	intitativa da	alteração	tecidual.
--	----------------	-----------	---------------	-----------	-----------

	CTR	PPE 0,5 U			PPE 0,05 U
	OIK	7d	14d	21d	21d
Lm (µm)	48,12 ± 1,25	$52,29 \pm 3,86$	67,19 ± 5,77	89,16 ± 6,75**	51,97 ± 1,30
Sv (µm⁻¹)	$0,083 \pm 0,002$	$0,078 \pm 0,005$	$0,062 \pm 0,006$	$0,046 \pm 0,004^{**}$	$0,077 \pm 0,002$
Vv[septo] %	$53,7 \pm 0,86$	51,6 ± 2,57	45,5 ± 1,83	32,9 ± 3,19**	$47,5 \pm 2,06$
Vv <sub>[air] %</sub>	$46,2 \pm 0,86$	48,4 ± 2,57	54,5 ± 1,83	67,1 ± 3,19**	52,5 ± 2,06

\*representa diferença significativa em relação ao grupo controle. \*\* P < 0,01. Lm, diâmetro alveolar médio; Sv, densidade de superfície de septo alveolar; Vv<sub>septo</sub>, densidade de volume de septo alveolar; Vv<sub>air</sub>, densidade de volume de espaço alveolar.



Figura 6. Níveis de hidroxiprolina detectada no BAL. A barra branca representa o grupo controle observado 21 dias após instilação i.t. de salina; a barra preta representa os animais que receberam 0,5 U de PPE i.t.; a barra cinza representa os animais que receberam 0,05 U de PPE i.t. \*representa diferença estatística em relação ao grupo controle. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01. (n = 4 – 6).

#### 4.1.2 O desenvolvimento do enfisema envolve resposta inflamatória precoce

O enfisema pulmonar é um tipo de doença inflamatória crônica, que depende da resposta inflamatória desde começo do processo. Nesse modelo de enfisema induzido por 0,5 U de PPE i.t. o aumento do recrutamento leucocitário só foi evidenciado quando o enfisema foi completamente estabelecido, isto é, 21 dias após instilação de 0,5 U de PPE. Os demais grupos não foram diferentes do controle Figura 7A. No entanto, foi observado aumento da atividade de mieloperoxidase em todos os grupos estimulados com 0,5 U de PPE Figura 7B. Além disso, a liberação de TNF- $\alpha$  foi aumentada no BAL dos animais após 7 e 14 dias de estímulo, enquanto o grupo 21 dias após 0,5 U de PPE não foi diferente do controle, assim como o grupo 0,05 U de PPE Figura 7C. Esse

aumento dos níveis de citocina próinflamatória foi acompanhado da redução dos níveis de citocina anti-inflamatória, IL-10, nos mesmos grupos observados Figura 7D.



Figura 7. Resposta inflamatória envolvida no estabelecimento do enfisema induzido por PPE. A) Contagem total de leucócitos no BAL; B) Atividade de mieloperoxidase; C) Níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); D) Níveis de interleucina 10 (IL-10). A barra branca representa o grupo controle observado 21 dias após instilação i.t. de salina; a barra preta representa os animais que receberam 0,5 U de PPE i.t.; a barra cinza representa os animais que receberam 0,05 U de PPE i.t. \*representa diferença estatística em relação ao grupo controle. \**P* < 0,05, \*\**P* < 0,01, \*\*\**P* < 0,001. (n = 4 – 6).

#### 4.1.3 O desenvolvimento do enfisema envolve estresse oxidativo

Mediante ao estímulo nocivo da PPE o nitrito é interpretado como um indicativo da presença do óxido nítrico no tecido. Assim, a Figura 8A sugere uma acelerada e cíclica síntese de óxido nítrico, com aumento de nitrito em 7 dias, manutenção dos níveis basais em 14 dias e um novo aumento em 21 dias após 0,5 U de PPE. A dose de

0,05 U de PPE não induziu o aumento de nitrito 21 dias após instilação. Também foi observada alteração na atividade de enzimas antioxidantes induzida pela PPE. A atividade da superóxido dismutase foi aumentada 7 dias após o estímulo da PPE, e se manteve igual ao controle nos demais grupos (Figura 8B). Já a atividade da glutationa peroxidase foi aumentada em todos os grupos que receberam estímulo de PPE (Figura 8C). O aumento do marcador de dano oxidativo, TBARS, foi visto nos grupos 7 e 14 dias após 0,5 U de PPE, enquanto o grupo 21 dias não apresentou diferença. O grupo



21 dias após 0,05 U de PPE também não foi diferente do controle (Figura 8D).

Figura 8. Alterações no estado redox induzidas por PPE. A) Níveis de nitrito; B) Atividade de superóxido dismutase; C) Atividade de glutationa peroxidase; D) Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. A barra branca representa o grupo controle observado 21 dias após instilação i.t. de salina; a barra preta representa os animais que receberam 0,5 U de PPE i.t.; a barra cinza representa os animais que receberam 0,05 U de PPE i.t. \*representa diferença estatística em relação ao grupo controle. \**P* < 0,05, \*\**P* < 0,01. (n = 4 – 6).

## 4.1.4 Inibição farmacológica da iNOS por Aminoguanidina atenua o enfisema

Após ter comprovado o estabelecimento do enfisema com a dose de 0,5 U de PPE, os demais estudos intratraqueais foram realizados com essa mesma dose. Não obstante, analisando as imagens histológicas observa-se que o grupo controle apresentou aspecto normal do parênquima pulmonar, com alvéolos e septos preservados, assim como o grupo AMG, controle positivo para a droga aminoguanidina. Entretanto o grupo PPE evidenciou as alterações típicas do enfisema, como a destruição septal acompanhada pelo alargamento alveolar, ao passo que o grupo PPE+AMG apresentou um parênquima mais estruturado, com septos alveolares mais íntegros e espaços alveolares mais preservados (Figura 9).



Figura 9. Prancha histológica corada em HE mostra que o tratamento com aminoguanidina 1% atenuou o enfisema induzido por PPE. As setas indicam destruição septal e alargamento alveolar. (x 20)

A Tabela 6 apresenta as quantificações morfométricas e estereológicas das alterações sofridas pelo tecido pulmonar após estímulo da PPE e tratamento com aminoguanidina.

Tabela 6. Avaliação quantitativa da alteração tecidual após indução do enfisema e tratamento com aminoguanidina.

	CTR	AMG	PPE	PPE+AMG
Lm (µm)	45,53 ± 1,79	49,96 ± 2,62	68,31 ± 1,55*	56,44 ± 6,97
Sv (µm⁻¹)	$0,088 \pm 0,004$	$0,080 \pm 0,004$	0,059 ± 0,001*	$0,065 \pm 0,008$
Vv[septo] %	49,2 ± 1,53	46,2 ± 1,16	$39,7 \pm 2,60^*$	42,67±2,96
Vv[air] %	50,8 ± 1,53	53,8 ± 1,16	60,3 ± 2,60*	57,33 ± 2,96

\*representa diferença significativa em relação ao grupo controle. \* P < 0,05. Lm, diâmetro alveolar médio; Sv, densidade de superfície de septo alveolar; Vv<sub>septo</sub>, densidade de volume de septo alveolar; Vv<sub>air</sub>, densidade de volume de espaço alveolar.

Comprovando os resultados anteriores, a contagem total de leucócitos também foi aumentada no grupo PPE em relação ao controle. No entanto, o grupo PPE+AMG foi reduzido em relação ao grupo PPE e não foi diferente estatisticamente do grupo controle (Figura 10).



Figura 10. Tratamento com aminoguanidina reduziu o recrutamento inflamatório. \*representa diferença estatística em relação ao grupo controle e <sup>#</sup> em relação ao grupo PPE. \*\*\*<sup>/###</sup>P < 0,001. (n = 4 – 5).

4.1.5 Inibição farmacológica da iNOS por Aminoguanidina diminui marcador de estresse nitrosativo – nitrotirosina

A fim de comprovar a inibição farmacológica da iNOS pelo tratamento com AMG 1%, foi feito o western blotting para avaliar o conteúdo de iNOS. A expressão proteica da iNOS foi observada no grupo controle e foi drasticamente, porém não totalmente, diminuída no grupo AMG. O seu conteúdo foi muito aumentado no grupo PPE ao passo que o grupo PPE+AMG permaneceu sem o aumento induzido pela PPE e ainda teve o conteúdo reduzido quase que completamente (Figura 11). O conteúdo da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) não foi modificado no grupo AMG quando comparado ao grupo controle, porém foi aumentado no grupo PPE. O tratamento com AMG impediu o aumento da eNOS provocado pela PPE, observado no grupo PPE+AMG. Quanto ao marcador do estresse nitrosativo, observou-se aumento de nitrotirosina no grupo PPE, enquanto o grupo PPE+AMG diminuiu em relação ao grupo PPE (Figura11).



Figura 11. Enfisema induzido por PPE aumenta expressão proteica de iNOS, eNOS e nitrotirosina e tratamento com aminoguanidina impede esse aumento.

# <u>4.1.6 Deficiência de iNOS em camundongos geneticamente modificados previne contra</u> <u>o enfisema pulmonar induzido por PPE</u>

Para melhor caracterizar o papel da iNOS no desenvolvimento do enfisema, o estímulo proteolítico da PPE foi dado à camundongos deficientes apenas nessa isoforma da NOS. Então os grupos de animais selvagens foram instilados com salina (CTR WT) e com 0,5 U de PPE (PPE WT) e os grupos de animais deficientes em iNOS foram instilados com salina (CTR KO) e 0,5 U de PPE (PPE KO). Análise das imagens histológicas mostra um enfisema bastante avançado no grupo PPE WT em relação ao grupo CTR WT. O grupo CTR KO não apresenta alterações morfológicas na histoarquitetura pulmonar. O grupo PPE KO se mostrou resistente ao enfisema, uma vez que inibiu os efeitos proteolíticos derivados da ação da PPE (Figura 12).



Figura 12. Prancha histológica corada em HE mostra que animais deficientes em iNOS são resistente ao enfisema induzido por PPE. (x 40)

A Tabela 7 apresenta as quantificações morfométricas e estereológicas das alterações sofridas pelo tecido pulmonar após estímulo da PPE nos animais selvagens e deficientes em iNOS.

Tabela 7. Avaliação quantitativa da alteração tecidual após indução do enfisema em animais selvagens e deficientes em iNOS

	CTR WT	PPE WT	CTR KO	PPE KO
Lm (µm)	42,55 ± 1,41	77,36 ± 4,90**	41,96 ± 1,48 <sup>##</sup>	49,01 ± 2,73
Sv (µm⁻¹)	$0,094 \pm 0,003$	0,053 ± 0,003**	$0,096 \pm 0,003^{\#\#}$	$0,083 \pm 0,005$
Vv[septo] %	61,7 ± 2,21	$36,7 \pm 2,34^*$	$66,3 \pm 1,60^{\#\#}$	$53,9 \pm 3,18$
Vv[air] %	38,3 ± 2,21	63,3 ± 2,34*	33,7 ± 1,60 <sup>###</sup>	46,1 ± 3,18

<sup>\*</sup>representa diferença significativa em relação ao grupo CTR WT e <sup>#</sup> em relação ao grupo PPE WT. \* P < 0,05; \*\*<sup>/##</sup> P < 0,01; <sup>###</sup> P < 0,001. Lm, diâmetro alveolar médio; Sv, densidade de superfície de septo alveolar; Vv<sub>septo</sub>, densidade de volume de septo alveolar; Vv<sub>air</sub>, densidade de volume de espaço alveolar.

A Figura 13 demonstra ainda que o animais deficientes em iNOS tiveram redução do recrutamento leucocitário e da liberação de ROS induzida por PPE. Os grupos deficientes em iNOS não apresentaram diferenças entre si, mesmo com o estímulo da PPE.



Figura 13. Ausência de iNOS impede aumento de leucócitos totais e ROS induzidos por PPE. \*representa diferença estatística em relação ao grupo CTR WT e <sup>#</sup> em relação ao grupo PPE WT. \*\* P < 0,01; <sup>###</sup>P < 0,001. (n = 5 – 9).

#### 4.2 Estudo intranasal

A partir do estudo intratraqueal, observou-se que as alterações da resposta redox envolvidas no enfisema tendiam a acontecer durante o processo de desenvolvimento da doença, e não com a doença já instalada. Por essa razão, foi feita a inclusão do grupo observado 1 dia após a instilação intranasal de PPE.

# 4.2.1 <u>Modelo de enfisema induzido por elastase intranasal é tempo-dependente e mais</u> <u>acelerado que o modelo intratraqueal</u>

A progressão da lesão enfisematosa nos animais instilados com 3 U de PPE intranasal tendeu a ocorrer de forma mais rápida. O grupo 1 dia após 3 U de PPE não apresenta qualquer variação em relação ao grupo controle. Alguma destruição tecidual já é aparente no grupo 7 dias após 3 U de PPE com espaços alveolares um pouco aumentados em comparação ao grupo controle, porém sem enfisema aparente. A partir de 14 dias após o estímulo intranasal da PPE, a destruição tecidual já é mais considerável, provocando alargamento dos alvéolos, ao passo que no grupo 21 dias após PPE o enfisema está completamente estabelecido, com muitas areas de alargamento alveolar e destruição tecidual evidentes no parênquima pulmonar (Figura 14).

A Tabela 8 apresenta as quantificações morfométricas e estereológicas das alterações sofridas pelo tecido pulmonar após estímulo intranasal da PPE.



Figura 14. Prancha histológica corada em HE mostra que a indução do enfisema por PPE intranasal é tempo-dependente e mais acelerada que a intratraqueal. A) Grupo controle 21 dias após instilação de salina; B-E) Grupos tratados com 3 U de PPE 1, 7, 14 e 21 dias após instilação, respectivamente. Setas indicam áreas de alargamento alveolar e destruição septal. (x 20)

	CTR	PPE			
		1d	7d	14d	21d
Lm (µm)	47,48 ± 1,79	52,05 ± 2,55	58,17 ± 2,32	63,74 ± 4,87	70,8 ± 2,58**
Sv (µm <sup>-1</sup> )	$0,085 \pm 0,003$	$0,078 \pm 0,004$	$0,069 \pm 0,003$	$0,064 \pm 0,005$	0,057 ± 0,002**
Vv <sub>[septo]</sub> %	$55,6 \pm 2,46$	50,4 ± 1,21	51,4 ± 1,12	44,8 ± 1,43*	43,8 ± 2,22*
Vv <sub>[air]</sub> %	$44,4 \pm 2,46$	49,6 v 1,21	48,6 ± 1,12	55,2 ± 1,43*	56,2 ± 2,22*

Tabela 8. Avaliação quantitativa da alteração tecidual após indução do enfisema por PPE intranasal

\*representa diferença significativa em relação ao grupo CTR. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01. Lm, diâmetro alveolar médio; Sv, densidade de superfície de septo alveolar; Vv<sub>septo</sub>, densidade de volume de septo alveolar; Vv<sub>air</sub>, densidade de volume de espaço alveolar. A variação do modelo implicou em antecipação da resposta redox no pulmão. A Figura 15 demonstra como o grupo 1 dia após 3 U de PPE foi mais afetado em comparação aos demais grupos estimulados com PPE e mesmo em comparação ao controle. A Figura 15A apresenta os elevados níveis de nitrito no grupo 1 dia após 3U de PPE em relação ao grupo controle, enquanto os demais grupos tratados com PPE tiveram os níveis de nitrito reduzidos em relação ao grupo 1 dia. A Figura 15B refere à atividade de SOD aumentada apenas no grupo 1 dia após 3 U de PPE. Os demais grupos tratados com PPE não apresentaram diferença em relação ao controle. A Figura 15C demonstra a atividade de CAT diminuída no grupo 1 dia após 3 U de PPE e inalterada nos demais grupos tratados com PPE quando comparados ao grupo controle.



Figura 15. Alterações no estado redox induzidas por PPE intranasal. A) Níveis de nitrito; B) Atividade de superóxido dismutase; C) Atividade de catalase. A barra branca representa o grupo controle observado 21 dias após instilação i.n. de salina; a barra preta representa os animais observados 1, 7, 14 e 21 dias após instilação de 3 U de PPE i.n. \*representa diferença estatística em relação ao grupo controle, e <sup>#</sup> em relação ao grupo PPE 1 dia. \*\*P < 0,01, \*\*\*<sup>/###</sup>P < 0,001. (n = 4 – 6).

#### 4.2.2 Tratamento com drogas antioxidantes atenua o enfisema pulmonar

A confirmação do envolvimento do estresse oxidativo/nitrosativo na patogênese do enfisema se deu através da melhora na histoarquitetura pulmonar de animais estimulados com PPE e concomitantemente tratados com diferentes drogas antioxidantes. A Figura 16A representa o grupo controle, com parênquima pulmonar preservado. A Figura 16B representa o grupo 3 U de PPE i.n. característico do enfisema, com aumento dos espaços alveolares e uma considerável destruição septal. A Figura 16C. é representativa do grupo PPE+Tempol, e mostra que o tratamento com essa droga não foi capaz de prevenir a degradação tecidual, porém nota-se que o alargamento alveolar ocorreu em menor proporção. Os grupos PPE+APO+ALO e PPE+Vit C+Vit E (Figura 16 D e F, respectivamente) em contrapartida, apresentaram um parênquima mais preservado que o grupo PPE, porém com algum grau de alargamento alveolar. No entanto, os grupos PPE+NAC e PPE+AMG (Figura 16 E e G, respectivamente) apresentaram um parênquima pulmonar bastante preservado, com septos e alvéolos íntegros, assemelhando-se com o grupo controle.

A Tabela 9 apresenta as quantificações morfométricas e estereológicas das alterações sofridas pelo tecido pulmonar após estímulo intranasal da PPE e mostra o perfil protetor de drogas antioxidantes usadas para prevenir o enfisema. Os grupos PPE+NAC e PPE+AMG foram os mais protegidos contra a ação da PPE, uma vez que o diâmetro alveolar foi reduzido em relação ao grupo PPE e a densidade de superfície de septo alveolar aumentada em relação ao grupo PPE.



Figura 16. Prancha histológica corada em HE mostra que o tratamento com drogas antioxidantes previne o enfisema. A) Grupo controle 21 dias após instilação de salina; B) Grupo tratado com 3 U de PPE 21 dias após instilação; C) Grupo PPE+TEMPOL; D) Grupo PPE+APOCININA+ALOPURINOL; E) Grupo PPE+N-ACETILCISTEÌNA; F) Grupo PPE+Vitamina C+Vitamina E; G) Grupo PPE+AMINOGUANIDINA. (x 20)

Grupos	Lm (µm)	Sv (µm⁻¹)
CTR	61,17 ± 4,30	$0,067 \pm 0,005$
PPE	88,85 ± 3,61*	0,045 ± 0,002*
PPE+TEMPOL	76,83 ± 5,68	$0,053 \pm 0,004$
PPE+APO+ALO	66,35 ± 4,01	0,061 ± 0,004
PPE+NAC	$60,95 \pm 1,50^{\#}$	$0,066 \pm 0,001^{\#}$
PPE+VITC+E	65,34 ± 3,68	$0,062 \pm 0,003$
PPE+AMG	52,08 ± 2,77 <sup>###</sup>	$0,078 \pm 0,004^{\#\#}$

Tabela 9. Avaliação quantitativa da alteração tecidual após indução do enfisema por PPE intranasal e tratamento com drogas antioxidantes

\*representa diferença significativa em relação ao grupo CTR, e <sup>#</sup> em relação ao grupo PPE. \*<sup>/#</sup> P < 0.05; <sup>###</sup> P < 0.001. Lm, diâmetro alveolar médio; Sv, densidade de superfície de septo alveolar.

## 5 DISCUSSÃO

Os dados apresentados no presente trabalho sugerem o envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo na patogênese do enfisema pulmonar. As diferentes vias de administração de elastase pancreática suína, isto é, intratraqueal e intranasal, provaram ser capazes de levar às alterações histológicas típicas do enfisema e de desencadear alterações no estado redox do pulmão durante o estágio inicial do processo de estabelecimento da doença. Isso mostra que ambos os modelos testados foram capazes de levar ao enfisema proteolítico. E mais do que isso, reforçaram as bases teóricas da patologia do enfisema, relacionando as teorias do desequilíbrio entre proteases-antiproteases e do desequilíbrio entre oxidantes-antioxidantes.

Esse estudo buscou desmistificar a origem do estresse oxidativo que ocorre no enfisema pulmonar. Através dos dados obtidos ficou evidente que o estresse oxidativo não é decorrente apenas do estímulo causador do enfisema, como foi feito por muito tempo culpando a fumaça de cigarro. Dessa forma, sugere-se que os estresses oxidativo e nitrosativo sejam consequências dos efeitos da resposta inflamatória e inerentes ao processo patológico do modelo estudado.

O modelo intratraqueal de indução de enfisema utilizado foi de grande valor científico, por apontar uma importante via que contribui para o estabelecimento da doença. Trabalhar com inibição farmacológica e deficiência genética da isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e observar melhora do quadro enfisematoso, propõe um achado sobre a fisiopatologia do enfisema. Além disso, através desse estudo, demonstrou-se uma importante interação entre diferentes vias envolvidas no enfisema pulmonar proteolítico, como a inflamação, o estresse oxidativo e o nitrosativo.

A ocorrência do estresse oxidativo nesse contexto pode ser explicada com base no seguinte raciocínio. Quando a elastase é instilada e atinge as vias respiratórias, o processo de destruição tecidual é iniciado. As células inflamatórias são então ativadas, e migram para os espaços alveolares a fim de neutralizarem o estímulo nocivo da elastase (ANTUNES; ROCCO, 2011). No entanto, a liberação de proteases e ROS são inerentes dos leucócitos ativados e contribuem para a resposta inflamatória e a destruição do parênquima (RAHMAN; MACNEE, 1996; BARNES, 2004; RAHMAN; ADCOCK, 2006). Além disso, o aumento direto do "burst respiratório" gerado pela liberação aumentada de radicais de oxigênio por neutrófilos e macrófagos ativados contribuem para o estabelecimento do estresse oxidativo (MACNEE, 2000). Mesmo um único contato com a PPE, é o suficiente para disparar um processo de degradação tecidual continuado, visto que peptídeos derivados da quebra de componentes da matriz extracelular (MEC) são quimiotáticos para células inflamatórias, sugerindo que a destruição da MEC pode ser um processo que se perpetua por si só (HOGG; SENIOR, 2002).

O protocolo adotado no estudo intratraqueal efetivamente mostrou que o enfisema induzido por PPE é dose-dependente, visto que a baixa dose de PPE utilizada (0,05 U) não provocou alterações estruturais no pulmão. Por outro lado, os camundongos que receberam 0,5 U de PPE sofreram destruição tecidual enfisematosa típica, como foi indicado pelos diferentes parâmetros morfométricos e estereológicos. Lm e Vv<sub>air</sub> aumentados acompanhados por Sv e Vv<sub>septo</sub> diminuídos são medidas bem estabelecidas que caracterizam o enfisema pulmonar (VALENCA et al., 2006; LANZETTI et al., 2011).

Associado a essas alterações histológicas, o elevado recrutamento de leucócitos foi observado no BAL do grupo 21 dias após instilação de 0,5 U de PPE, ou seja, no grupo enfisematoso, demonstrando que a presença de células inflamatórias está associada ao enfisema (YAO et al., 2010). Entretanto, o infiltrado de leucócitos não foi observado 7 e 14 dias após PPE, embora um aumento na secreção da citocina TNF- α tenha sido observado nesse mesmos grupos. A esse achado é atribuída a ação de células residentes, como as células epiteliais alveolares ou mesmo os macrófagos, neutrófilos e linfócitos residentes, os quais iniciam o processo inflamatório no pulmão por liberarem citocinas Th1. Embora essas células não tenham aumentado em número, é possível que elas estivessem mais ativadas após estímulo da PPE. No mesmo momento, uma redução nos níveis de citocina IL-10 foi observada, indicando um perfil

próinflamatório com aumento de citocina estimulatória e diminuição de citocina modulatória no ambiente pulmonar. Em condições fisiológicas, a IL-10 inibe a secreção de citocinas próinflamatórias como TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , suprimindo a proliferação de células T, células natural killer e macrófagos alveolares (BINGISSER; HOLT, 2001). Entretanto, sobre condições estimulatórias, a IL-10 não pode realizar esses efeitos imunomodulatórios, favorecendo assim a secreção de TNF- $\alpha$  e contribuindo para a inflamação.

Considerando que poucas células migraram para os espaços alveolares em 7 dias, como mostrado na Figura 7A, é provável que as células presentes estavam mais ativadas, isto é, secretavam mais TNF- $\alpha$ . Essa hipótese faz sentido quando analisada juntamente com a atividade da mieloperoxidase, que foi aumentada a partir de 7 dias após PPE. Atividade aumentada de MPO indica a presença de atividade neutrofílica que é considerada também um fator agravante para o estresse oxidativo, devido a sua reação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que gera ácido hipocloroso, o qual pode reagir com o ânion superóxido para formar o radical hidroxila, uma das espécies mais agressivas dentre os ROS (VALKO et al., 2007).

O perfil da hidroxiprolina é especialmente interessante. Os níveis de OHpro foram elevados em 7 dias, retornaram aos níveis basais em 14 dias e voltaram a subir em 21 dias após 0,5 U de PPE. A detecção de OHpro no BAL é uma forma indireta de mensurar a quebra da MEC/tecido conjuntivo no pulmão (LANZETTI *et al.*; CHURG *et al.*, 2002). Assim, os níveis elevados de OHpro no BAL após estímulo elastolítico da PPE sugerem que a quebra do tecido septal foi acelerada em determinados momentos, comprometendo a arquitetura pulmonar. Isso poderia ser causado pela liberação de proteases das células epiteliais e inflamatórias ou através da ação quimiotática de peptídeos derivados da MEC, contribuindo para a destruição tecidual (HOGG; SENIOR, 2002).

O mesmo perfil de resposta evidenciado nos níveis de OHpro foi observado nos níveis de nitrito, que foram aumentados em 7 dias, reduzidos aos níveis do controle em 14 dias e tornaram a aumentar em 21 dias após instilação de 0,5 U de PPE. Esse padrão de comportamento sugere que uma resposta cinética está envolvida durante o

estabelecimento do enfisema. Aparentemente, uma resposta inicial é desencadeada pelo estímulo da PPE e seus efeitos associados, seguida por uma fase de adaptação contra os efeitos da PPE, porém finaliza com um aumento rebote de determinados marcadores durante a fase de enfisema. O envolvimento do óxido nítrico em diferentes estágios do enfisema sugere que ele desempenha um papel central na patogênese dessa doença e encoraja os estudos que explorem as vias compreendidas no seu metabolismo. Contudo, esse dado não pode ser interpretado independentemente, devido a provável interação do NO com outras moléculas. Sob condições fisiológicas, o ânion superóxido é rapidamente removido por altas concentrações de enzimas detoxificantes, chamada superóxido dismutase (SOD), e o NO é rapidamente difundido através dos tecidos dentro das hemácias (BUTLER et al., 1998; JOSHI et al., 2002), onde é convertido a nitrato/nitrito. No entanto, em condições próinflamatórias, a produção simultânea de superóxido e NO é fortemente ativada, aumentando a produção de ambas as moléculas em até 1000 vezes (PACHER et al., 2007). Essas condições favorecem a formação de um forte oxidante, o peroxinitrito, que é produzido pela reação de NO com o superóxido.

Uma elevação na SOD e nos níveis de nitrito foi observada 7 dias após PPE, indicando indiretamente um aumento paralelo na produção de superóxido e óxido nítrico, com consequente dismutação e conversão, respectivamente. Em contrapartida, ambos foram diminuídos em 14 dias após instilação de PPE, sugerindo o envolvimento da formação de peroxinitrito, com superóxido e NO reagindo tão rapidamente que a atividade da SOD não foi necessária. Entretanto, em 21 dias após PPE, quando o enfisema estava estabelecido, a elevação dos níveis de nitrito voltou a ser observada, mas agora sem elevação da atividade da SOD, sugerindo uma possível falência do sistema antioxidante e a livre síntese de peroxinitrito. Além disso, esse aumento de nitrito pode ser produto da decomposição de nitrotirosina, visto que sua degradação gera tirosina e nitrito (PACHER et al., 2007).

O estresse oxidativo foi evidente na fase inicial do desenvolvimento do enfisema, quando a doença de fato não estava estabelecida. Como mostrado pelo modelo temporesposta de instilação de PPE, a SOD foi aumentada em 7 dias, a GPx foi aumentada em 7, 14 e 21 dias, e o TBARS, um reconhecido marcador de dano oxidativo por peroxidação lipídica, foi aumentado em 7 e 14 dias. Esses resultados esclarecem um importante aspecto do enfisema proteolítico, mostrando que o estresse oxidativo está, de fato, envolvido no estabelecimento e progressão dessa doença. Além disso, esses dados ressaltam diversos parâmetros que deviam ser considerados marcadores de estresse oxidativo no enfisema proteolítico.

Além do estabelecimento da inflamação e da condição de estresse oxidativo, a PPE disparou uma nova via de interação. A estimulação da iNOS favorece a aumentada produção de NO, que é envolvido na resposta inflamatória. Esse aumento nos níveis de NO pode facilitar a síntese de peroxinitrito a perigosos níveis, o qual pode reagir com resíduos de tirosina para formar nitrotirosina (MACNEE, 2000; TSOUMAKIDOU et al., 2005). Pelo fato do NO se mover tão rapidamente por entre as membranas e as células, ele pode reagir com o superóxido mesmo sem ter sido produzido dentro da mesma célula (PACHER et al., 2007). Para compreender a participação do NO e seu potencial de reação com superóxido em formar peroxinitrito durante o desenvolvimento do enfisema, animais que receberam PPE foram simultaneamente tratado com aminoguanidina, um inibidor seletivo da iNOS. Os dados desse experimento mostrou que a PPE induziu reações de nitração, como foi mostrado pelo conteúdo aumentado de nitrotirosina, que também é observado em pacientes com DPOC (TSOUMAKIDOU et al., 2005). Esses dados corroboram um estudo recente, que usou outro inibidor seletivo da iNOS, o L-NIL, para mostrar que a iNOS desempenha um papel crucial no enfisema induzido por fumaça de cigarro (TSOUMAKIDOU et al., 2005).

O presente trabalho reforça o importante papel da atividade da iNOS durante o desenvolvimento do enfisema proteolítico e ressalta a aminoguanidina como uma boa estratégia terapêutica. A baixa expressão da iNOS observada em ambos os grupos tratados com AMG sugere uma inibição parcial da enzima, indicando que a modulação da atividade da iNOS talvez seja o melhor caminho para combater a progressão do enfisema, visto que mesmo com inibição parcial, AMG inibiu efetivamente a nitração e melhorou a histoarquitetura pulmonar. Essa inibição farmacológica pode ter modulado

também a eNOS, visto que o grupo PPE teve o conteúdo de eNOS aumentado, e o grupo PPE+AMG teve manteve níveis basais. Além da melhora na morfologia pulmonar, o tratamento com AMG preveniu o infiltrado inflamatório.

De acordo com Laszlo 1995, AMG é um duplo inibidor das isoformas constitutiva e induzível da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (LASZLO *et al.*, 1995). Entretanto, uma revisão publicada em 2001 (ALDERTON *et al.*, 2001) comparou diferentes inibidores das isoformas da NOS e mostrou que a AMG tem uma ação parcialmente seletiva entre iNOS e eNOS, sendo 11 vezes mais seletiva para iNOS do que para eNOS. Além disso, os autores propuseram a quebra do paradigma, afirmando que a atividade das isoformas constitutivas neuronal e endotelial da NOS podem ser reguladas por diferentes fatores. Assim, acredita-se que o tratamento proposto com AMG 1% inibiu parcialmente a iNOS e evitou o aumento da isoforma constitutiva eNOS, subitamente elevada pela PPE.

Um estudo recente publicado por Boyer et al (2011) contradiz esses dados, concluindo que nem a eNOS e nem a iNOS são necessárias para o estabelecimento do enfisema pulmonar induzido por elastase (BOYER et al., 2011). Embora eles tenham encontrado um considerável número de células positivas para 3-nitrotirosina no pulmão de animais selvagens instilados com PPE, eles não encontraram qualquer melhora do parênquima nem em animais geneticamente deficientes em iNOS ou eNOS e nem em animais selvagens tratados com outro inibidor seletivo de iNOS, o 1400W. Talvez esses dados contraditórios sejam justificados por discrepâncias fundamentais entre os modelos experimentais de enfisema. Esse estudo prévio induziu o enfisema com uma dose 10 vezes mais concentrada de PPE oriunda da empresa Elastin Products. Mesmo com essa dose elevada (5 U de PPE/camundongo), o aumento observado no parâmetro Lm (P < 0.05) foi menor do que o obtido no presente trabalho com 0.5 U de PPE/camundongo oriunda da empresa Sigma (P < 0,01). Quanto à inibição farmacológica estabelecida pelo 1400W, é possível que tenha inibido completamente a iNOS, visto que é 30 vezes mais seletivo para iNOS do que para eNOS (GARVEY et al., 1997), e que de alguma forma essa inibição total tenha sido prejudicial para a resposta pulmonar. Os resultados obtidos no presente estudo, a partir do experimento com animais geneticamente deficientes em iNOS corroboram os dados anteriores, mostrando que animais deficientes em iNOS estimulados com PPE apresentaram preservação de parâmetros morfométricos com o LM, Sv e Vv de espaço alveolar e septo além de evitar o aumento de leucócitos e de ROS induzidos pela PPE. Assim, sugere-se que a modulação da iNOS em processos inflamatórios e crônicos como a DPOC tem um papel fundamental em atenuar os seus efeitos.

A Figura 17 esquematiza os eventos envolvidos na patogênese do enfisema induzido por elastase, e sugere de forma simplificada a ordem cronológica dos acontecimentos. A liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) por leucócitos ativados contribui para inativação de proteases (BARNES, 2004) e para o desequilíbrio redox, culminando com danos estruturais e bioquímicos, caracterizando o enfisema pulmonar associado ao estresse oxidativo/nitrosativo.


Figura 17. Representação esquemática dos eventos inflamatórios e oxidativos envolvidos na patogênese do enfisema pulmonar. iNOS – óxido nítrico sintase induzível; ROS – espécies reativas de oxigênio; RNS – espécies reativas de nitrogênio.

O protocolo adotado no estudo intranasal comprovou que independentemente da via de administração, o modelo de enfisema pulmonar induzido por elastase leva ao estresse oxidativo. O diferencial desse modelo foi a dose de 3 U de PPE, uma dose seis vezes maior do que a utilizada no estudo intratraqueal. A escolha dessa dose se deu pelo fato de acreditarmos que o alcance da droga seria prejudicado, por ter que percorrer as vias aéreas superiores. Por essa razão, preferiu-se concentrar mais a elastase para garantir seus efeitos proteolíticos nos pulmões. Além disso, essa dose havia sido previamente publicada por um colaborador do grupo (COUILLIN et al., 2009).

A diferença entre os modelos utilizados gerou alterações no perfil da resposta pulmonar. O desequilíbrio na atividade das enzimas antioxidantes, por exemplo, indicador de estresse oxidativo, foi alterado no grupo 7 dias após instilação intratraqueal de PPE, ao passo que no modelo intranasal, esse desequilíbrio foi antecipado, ocorrendo no grupo 1 dia após instilação i.n. de PPE. Os dados apresentados nesse modelo configuram uma condição de estresse oxidativo precoce, evidenciada 1 dia após o estímulo. Mas essa condição parece ser tão precoce quanto passageira, uma vez que nenhuma outra alteração no perfil redox foi observada nos demais tempos. O que não torna o estresse oxidativo menos importante para a doença. A confirmação do envolvimento do estresse oxidativo no enfisema se deu através dos resultados obtidos com os tratamentos por diferentes drogas antioxidantes. Usar alvos terapêuticos com propriedades conhecidamente antioxidantes, e não anti-inflamatória, e obter melhora na morfologia pulmonar faz do estresse oxidativo uma via relacionada no desenvolvimento do enfisema.

Todas as drogas utilizadas atenuaram o efeito da PPE sobre o parênquima, diminuindo o grau de comprometimento dos alvéolos, visto através do Lm. A Figura 18 esquematiza a atuação das drogas em vias cruciais relacionadas com o estresse oxidativo/nitrosativo. O tempol, droga que mimetiza a ação da enzima superóxido dismutase foi o de menor eficácia em se tratando de evitar o alargamento alveolar, mesmo não tendo sido diferente estatisticamente do grupo controle (Tabela 9). Esse dado pode ser interpretado de duas maneiras distintas. Ou pode sugerir que aumentar a taxa de dismutação do ânion superóxido não basta como estratégia terapêutica de combate ao enfisema. Ou ao contrário, que a dose de tempol administrada (1 mM) pode ter sido subestimada e por isso não obteve dados mais relevantes no combate ao enfisema.

O efeito encontrado com o tratamento simultâneo de apocinina+alopurinol, foi similar ao efeito gerado pela associação das vitaminas C e E. Muitas áreas de parênquima preservado ao longo do pulmão, com áreas de alargamento alveolares intercaladas. O efeito do tratamento antioxidante observado nesses dois grupos foi um pouco mais eficaz que o tempol, porém não suficientemente capaz de manter o diâmetro alveolar significativamente reduzido em comparação ao grupo PPE. Isso indica que diminuir a taxa de síntese de ânion superóxido inibindo as vias da NADPH oxidase por ação da apocinina, e da xantina oxidase por ação do alopurinol, não reflete uma prevenção eficaz contra o enfisema, ao menos nas doses testadas. Esse resultado pode ter sido influenciado pela ação duvidosa da apocinina, que apesar de ser

72

considerada antioxidante por inibir a migração do componente citosólico p47phox do complexo NADPH oxidase (CASTOR *et al.*, 2010), do citoplasma para a membrana, alguns estudos têm mostrado seu perfil pró-oxidante (RIGANTI *et al.*, 2006; RIGANTI *et al.*, 2008; CASTOR et al., 2010). Contudo, as vitaminas que se mostraram eficazes em prevenir e tratar o enfisema induzido por fumaça de cigarro (VALENCA *et al.*, 2008), agora mostraram apenas a capacidade de atenuar o enfisema proteolítico, visto que também não foram capazes de reduzir significativamente o diâmetro alveolar em comparação ao grupo PPE.



Figura 18. Vias de atuação das drogas antioxidantes.

Dois dos tratamentos propostos tiveram resultados bastante promissores, por conseguirem a redução do Lm em relação ao grupo PPE. O tratamento com aminoguanidina 1% já havia demonstrado benefícios para o pulmão no estudo intratraqueal, e confirmou a sua ação preventiva contra o enfisema nesse modelo intranasal. Mais uma vez a teoria de inibição da iNOS indica uma via relacionada na patogênese do enfisema. Além disso, já foi mostrado em outro modelo experimental (ratos diabéticos) que a aminoguanidina possui a propriedade de inibir reações de glicação não-enzimáticas, permitindo o aumento da atividade de enzimas antioxidantes como catalase, glutationa peroxidase e glutationa redutase (STOPPA *et al.*, 2006).

Embora esse tipo de reação não esteja relacionado ao enfisema, já se sabe que a aminoguanidina além de ser inibidora da iNOS pode em algum aspecto preservar o sistema antioxidante endógeno.

O outro grupo que apresentou resultados encorajadores foi o que recebeu tratamento com N-acetilcisteína, um antioxidante de ação bastante conhecida. Esse fármaco atua como precursor da molécula de glutationa (GSH), um tripeptídeo de ação antioxidante por conter grupamento tiol, de grande importância para o pulmão (RAHMAN; MACNEE, 2000). No entanto, Failli e colaboradores mostraram em 2002 que macrófagos alveolares de pacientes com esclerose sistêmica apresentaram aumento da atividade de iNOS e aumento na formação de peroxinitrito, mas o tratamento com N-acetilcisteína foi capaz de diminuir a síntese de peroxinitrito (FAILLI *et al.*, 2002). Esse dado fortalece o motivo pelo qual a NAC foi uma das terapêuticas mais bem sucedidas, uma vez que já foi demonstrado o aumento do peroxinitrito no enfisema e a melhora do parênquima pulmonar dos animais tratados com NAC.

Talvez existam muitas explicações ainda ocultas acerca dos resultados obtidos, o que nos encoraja a explorar mais os mecanismos compreendidos na ação específica de cada antioxidante testado. Mas vale lembrar que apesar de não terem sido feitas curvas de dose-resposta para cada droga utilizada, as doses estipuladas foram baseadas em publicações prévias que usaram a via oral para administração das mesmas. Esse foi um ponto relevante na escolha da literatura a ser seguida, visto que havia preferência pela via oral pela aproximação com a via utilizada nos humanos.

Infelizmente, não dispomos ainda hoje de uma terapia convencional eficaz no controle da inflamação pulmonar que ocorre na DPOC (CHUNG; ADCOCK, 2008; COSTA *et al.*, 2009). Sugerir terapia com antioxidantes para o tratamento da DPOC ainda é um passo largo, com muitas lacunas a serem preenchidas. Mas o presente estudo vem colaborar para a consolidação de uma nova perspectiva nesse contexto. Talvez a associação dessa terapia promissora com corticoides usados na prática convencional possa favorecer o advento da terapêutica da DPOC.

74

### 6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou uma tríade envolvida na patogênese do enfisema pulmonar induzido pelo distúrbio proteolítico. Inflamação, estresse oxidativo e estresse nitrosativo parecem ser importantes variáveis que contribuem para o desenvolvimento do enfisema. Uma nova descoberta deste estudo é que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na fase inicial da doença, enquanto o marcador de estresse nitrosativo parece ser indicativo do enfisema totalmente instalado. A via da iNOS desempenha importante efeito na patogênese do enfisema, visto que a sua inibição farmacológica e depleção gênica protegeram contra o enfisema proteolítico. Outras drogas antioxidantes também foram capazes de atenuar o efeito da PPE intranasal, porém a N-acetilcisteína e a aminoguanidina foram as mais eficazes. Os nossos resultados sugerem que os estresses oxidativo e nitrosativo provenientes da produção aumentada de óxido nítrico via iNOS são cruciais para a patogênese do enfisema pulmonar.

# REFERÊNCIAS

Adcock, I. M.; Caramori, G.; Barnes, P. J. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: new molecular insights. Respiration. 81(4): 265-284. 2011.

Aebi, H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 105: 121-126. 1984.

Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J. 357(Pt 3): 593-615. 2001.

Antunes, M. A.; Rocco, P. R. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. An Acad Bras Cienc. 83(4): 1385-1396. 2011.

Aoshiba, K.; Yasuda, K.; Yasui, S.; Tamaoki, J.; Nagai, A. Serine proteases increase oxidative stress in lung cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 281(3): L556-564. 2001.

Arunachalam, G.; Sundar, I. K.; Hwang, J. W.; Yao, H.; Rahman, I. Emphysema is associated with increased inflammation in lungs of atherosclerosis-prone mice by cigarette smoke: implications in comorbidities of COPD. J Inflamm (Lond). 7(34. 2010.

Bannister, J. V.; Calabrese, L. Assays for superoxide dismutase. Methods Biochem Anal. 32(279-312. 1987.

Barnes, P. J. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. Pharmacol Rev. 56(4): 515-548. 2004.

Barnes, P. J. Development of New Drugs for COPD. Curr Med Chem. 2012.

Bartosz, G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? Biochem Pharmacol. 77(8): 1303-1315. 2009.

Bezerra, F. S.; Valenca, S. S.; Pires, K. M.; Lanzetti, M.; Pimenta, W. A.; Schmidt, A. C.; Porto, L. C.; Zin, W. A. Long-term exposure to cigarette smoke impairs lung function and increases HMGB-1 expression in mice. Respir Physiol Neurobiol. 177(2): 120-126. 2011.

Bingisser, R. M.; Holt, P. G. Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells. Swiss Med Wkly. 131(13-14): 171-179. 2001.

Boyer, L.; Plantier, L.; Dagouassat, M.; Lanone, S.; Goven, D.; Caramelle, P.; Berrehar, F.; Kerbrat, S.; Dinh-Xuan, A. T.; Crestani, B.; Le Gouvello, S.; Boczkowski, J. Role of nitric oxide synthases in elastase-induced emphysema. Lab Invest. 91(3): 353-362. 2011.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72(248-254. 1976.

Brindicci, C.; Ito, K.; Torre, O.; Barnes, P. J.; Kharitonov, S. A. Effects of aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on nitric oxide production and its metabolites in healthy control subjects, healthy smokers, and COPD patients. Chest. 135(2): 353-367. 2009.

Burri, P. H. Comprehensive Physiology. Wiley-Blackwell, 2011.

Butler, A. R.; Megson, I. L.; Wright, P. G. Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature. Biochim Biophys Acta. 1425(1): 168-176. 1998.

Castor, L. R.; Locatelli, K. A.; Ximenes, V. F. Pro-oxidant activity of apocynin radical. Free Radic Biol Med. 48(12): 1636-1643. 2010.

Chen, C. M.; Yin, M. C.; Hsu, C. C.; Liu, T. C. Antioxidative and anti-inflammatory effects of four cysteine-containing agents in striatum of MPTP-treated mice. Nutrition. 23(7-8): 589-597. 2007.

Choi, H. S.; Kim, J. W.; Cha, Y. N.; Kim, C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. J Immunoassay Immunochem. 27(1): 31-44. 2006.

Chung, K. F.; Adcock, I. M. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. Eur Respir J. 31(6): 1334-1356. 2008.

Churg, A.; Zay, K.; Shay, S.; Xie, C.; Shapiro, S. D.; Hendricks, R.; Wright, J. L. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 27(3): 368-374. 2002.

Costa, C. H. d.; Rufino, R.; Silva, J. R. L. e. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC. Rev Assoc Med Bras. 55(3): 347-354. 2009.

Couillin, I.; Vasseur, V.; Charron, S.; Gasse, P.; Tavernier, M.; Guillet, J.; Lagente, V.; Fick, L.; Jacobs, M.; Coelho, F. R.; Moser, R.; Ryffel, B. IL-1R1/MyD88 signaling is critical for elastase-induced lung inflammation and emphysema. J Immunol. 183(12): 8195-8202. 2009.

David, C. M. Ventilação Mecânica. Da fisiologia à prática clínica. Revinter, 2001. Denicola, A.; Souza, J. M.; Radi, R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(7): 3566-3571. 1998.

Draper, H. H.; Squires, E. J.; Mahmoodi, H.; Wu, J.; Agarwal, S.; Hadley, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. Free Radic Biol Med. 15(4): 353-363. 1993.

Dunnill, M. S. Aetiology of emphysema. Bull Eur Physiopathol Respir. 15(5): 1015-1029. 1979.

Fabbri, L.; Pauwels, R. A.; Hurd, S. S. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary updated 2003. COPD. 1(1): 105-141; discussion 103-104. 2004.

Failli, P.; Palmieri, L.; D'Alfonso, C.; Giovannelli, L.; Generini, S.; Rosso, A. D.; Pignone, A.; Stanflin, N.; Orsi, S.; Zilletti, L.; Matucci-Cerinic, M. Effect of N-acetyl-L-cysteine on peroxynitrite and superoxide anion production of lung alveolar macrophages in systemic sclerosis. Nitric Oxide. 7(4): 277-282. 2002.

Fantone, J. C.; Ward, P. A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. Am J Pathol. 107(3): 395-418. 1982.

Fleenor, B. S.; Seals, D. R.; Zigler, M. L.; Sindler, A. L. Superoxide-lowering therapy with TEMPOL reverses arterial dysfunction with aging in mice. Aging Cell. 11(2): 269-276. 2012.

Flohe, L.; Gunzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 105(114-121. 1984.

Ganesan, S.; Faris, A. N.; Comstock, A. T.; Chattoraj, S. S.; Chattoraj, A.; Burgess, J. R.; Curtis, J. L.; Martinez, F. J.; Zick, S.; Hershenson, M. B.; Sajjan, U. S. Quercetin prevents progression of disease in elastase/LPS-exposed mice by negatively regulating MMP expression. Respir Res. 11(131. 2010.

Ganrot, P. O.; Laurell, C. B.; Eriksson, S. Obstructive lung disease and trypsin inhibitors in alpha-1-antitrypsin deficiency. Scand J Clin Lab Invest. 19(3): 205-208. 1967.

Garvey, E. P.; Oplinger, J. A.; Furfine, E. S.; Kiff, R. J.; Laszlo, F.; Whittle, B. J.; Knowles, R. G. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. J Biol Chem. 272(8): 4959-4963. 1997.

Gomes, E. C.; Silva, A. N.; de Oliveira, M. R. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. Oxid Med Cell Longev. 2012(756132. 2012.

Green, L. C.; Wagner, D. A.; Glogowski, J.; Skipper, P. L.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 126(1): 131-138. 1982.

Hogg, J. C.; Senior, R. M. Chronic obstructive pulmonary disease - part 2: pathology and biochemistry of emphysema. Thorax. 57(9): 830-834. 2002.

Hyde, D. M.; Hamid, Q.; Irvin, C. G. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. J Allergy Clin Immunol. 124(6 Suppl): S72-77. 2009.

lizuka, T.; Ishii, Y.; Itoh, K.; Kiwamoto, T.; Kimura, T.; Matsuno, Y.; Morishima, Y.; Hegab, A. E.; Homma, S.; Nomura, A.; Sakamoto, T.; Shimura, M.; Yoshida, A.; Yamamoto, M.; Sekizawa, K. Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. Genes Cells. 10(12): 1113-1125. 2005.

Ishii, Y.; Itoh, K.; Morishima, Y.; Kimura, T.; Kiwamoto, T.; Iizuka, T.; Hegab, A. E.; Hosoya, T.; Nomura, A.; Sakamoto, T.; Yamamoto, M.; Sekizawa, K. Transcription factor Nrf2 plays a pivotal role in protection against elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema. J Immunol. 175(10): 6968-6975. 2005.

Janoff, A. Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. Am Rev Respir Dis. 132(2): 417-433. 1985.

Janoff, A.; Scherer, J. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. J Exp Med. 128(5): 1137-1155. 1968.

Johnson, K. J.; Fantone, J. C., 3rd; Kaplan, J.; Ward, P. A. In vivo damage of rat lungs by oxygen metabolites. J Clin Invest. 67(4): 983-993. 1981.

Joshi, M. S.; Ferguson, T. B., Jr.; Han, T. H.; Hyduke, D. R.; Liao, J. C.; Rassaf, T.; Bryan, N.; Feelisch, M.; Lancaster, J. R., Jr. Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(16): 10341-10346. 2002.

Kawakami, M.; Matsuo, Y.; Yoshiura, K.; Nagase, T.; Yamashita, N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. Biol Pharm Bull. 31(7): 1434-1438. 2008.

Kilburn, K. H.; McKenzie, W. Leukocyte recruitment to airways by cigarette smoke and particle phase in contrast to cytotoxicity of vapor. Science. 189(4203): 634-637. 1975.

Kinoshita, T.; Hoshino, T.; Imaoka, H.; Ichiki, H.; Okamoto, M.; Kawayama, T.; Yodoi, J.; Kato, S.; Aizawa, H. Thioredoxin prevents the development and progression of elastase-induced emphysema. Biochem Biophys Res Commun. 354(3): 712-719. 2007.

Lanzetti, M.; Lopes, A. A.; Ferreira, T. S.; de Moura, R. S.; Resende, A. C.; Porto, L. C.; Valenca, S. S. Mate tea ameliorates emphysema in cigarette smoke-exposed mice. Exp Lung Res. 37(4): 246-257. 2011.

Laszlo, F.; Evans, S. M.; Whittle, B. J. Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in rat intestinal microvasculature in vivo. Eur J Pharmacol. 272(2-3): 169-175. 1995.

Lieberman, J. Elastase, collagenase, emphysema, and alpha1-antitrypsin deficiency. Chest. 70(1): 62-67. 1976.

Macfadyen, A. J.; Reiter, C.; Zhuang, Y.; Beckman, J. S. A novel superoxide dismutasebased trap for peroxynitrite used to detect entry of peroxynitrite into erythrocyte ghosts. Chem Res Toxicol. 12(3): 223-229. 1999.

MacNee, W. Oxidants/antioxidants and COPD. Chest. 117(5 Suppl 1): 303S-317S. 2000.

Macnee, W.; Rahman, I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 160(5 Pt 2): S58-65. 1999.

Massaro, D.; Massaro, G. D. Developmental alveologenesis: longer, differential regulation and perhaps more danger. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 293(3): L568-569. 2007.

McCusker, K. Mechanisms of respiratory tissue injury from cigarette smoking. Am J Med. 93(1A): 18S-21S. 1992.

Meng, R.; Zhu, D. L.; Bi, Y.; Yang, D. H.; Wang, Y. P. Anti-oxidative effect of apocynin on insulin resistance in high-fat diet mice. Ann Clin Lab Sci. 41(3): 236-243. 2011.

Miller, D. M.; Buettner, G. R.; Aust, S. D. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. Free Radic Biol Med. 8(1): 95-108. 1990.

Nagai, A.; Inano, H.; Matsuba, K.; Thurlbeck, W. M. Scanning electronmicroscopic morphometry of emphysema in humans. Am J Respir Crit Care Med. 150(5 Pt 1): 1411-1415. 1994.

Okada, F.; Tazawa, H.; Kobayashi, T.; Kobayashi, M.; Hosokawa, M. Involvement of reactive nitrogen oxides for acquisition of metastatic properties of benign tumors in a model of inflammation-based tumor progression. Nitric Oxide. 14(2): 122-129. 2006.

Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev. 87(1): 315-424. 2007.

Pauwels, R. COPD: the scope of the problem in Europe. Chest. 117(5 Suppl 2): 332S-335S. 2000.

Pryor, W. A.; Hales, B. J.; Premovic, P. I.; Church, D. F. The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. Science. 220(4595): 425-427. 1983.

Rahman, I.; Adcock, I. M. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. Eur Respir J. 28(1): 219-242. 2006.

Rahman, I.; MacNee, W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. Free Radic Biol Med. 21(5): 669-681. 1996.

Rahman, I.; MacNee, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. Eur Respir J. 16(3): 534-554. 2000.

Rajendrasozhan, S.; Chung, S.; Sundar, I. K.; Yao, H.; Rahman, I. Targeted disruption of NF-{kappa}B1 (p50) augments cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice: a critical role of p50 in chromatin remodeling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 298(2): L197-209. 2010.

Riganti, C.; Costamagna, C.; Bosia, A.; Ghigo, D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovanillone) induces oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol. 212(3): 179-187. 2006.

Riganti, C.; Costamagna, C.; Doublier, S.; Miraglia, E.; Polimeni, M.; Bosia, A.; Ghigo, D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol. 228(3): 277-285. 2008.

Ross, M. H.; Pawlina, W. Histologia. Texto e Atlas. Em correlação com biologia celular e molecular. Guanabara Koogan, 2007.

Salvi, S. S.; Barnes, P. J. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. Lancet. 374(9691): 733-743. 2009.

Schmekel, B.; Karlsson, S. E.; Linden, M.; Sundstrom, C.; Tegner, H.; Venge, P. Myeloperoxidase in human lung lavage. I. A marker of local neutrophil activity. Inflammation. 14(4): 447-454. 1990.

Senior, R. M.; Bielefeld, D. R.; Starcher, B. C. Comparison of the elastolytic effects of human leukocyte elastase and porcine pancreatic elastase. Biochem Biophys Res Commun. 72(4): 1327-1334. 1976.

Senior, R. M.; Tegner, H.; Kuhn, C.; Ohlsson, K.; Starcher, B. C.; Pierce, J. A. The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase. Am Rev Respir Dis. 116(3): 469-475. 1977.

Shapiro, S. D. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 160(5 Pt 2): S29-32. 1999.

Shapiro, S. D.; Campbell, E. J.; Welgus, H. G.; Senior, R. M. Elastin degradation by mononuclear phagocytes. Ann N Y Acad Sci. 624(69-80. 1991.

Silva Bezerra, F.; Valenca, S. S.; Lanzetti, M.; Pimenta, W. A.; Castro, P.; Goncalves Koatz, V. L.; Porto, L. C. Alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. Nutrition. 22(11-12): 1192-1201. 2006.

Snider, G. L. The definition of emphysema. Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute, Division of Lung Diseases workshop. Am Rev Respir Dis. 132(1): 182-185. 1985.

Snider, G. L. Emphysema: the first two centuries--and beyond. A historical overview, with suggestions for future research: Part 1. Am Rev Respir Dis. 146(5 Pt 1): 1334-1344. 1992a.

Snider, G. L. Emphysema: the first two centuries--and beyond. A historical overview, with suggestions for future research: Part 2. Am Rev Respir Dis. 146(6): 1615-1622. 1992b.

Snider, G. L.; Hayes, J. A.; Franzblau, C.; Kagan, H. M.; Stone, P. S.; Korthy, A. L. Relationship between elastolytic acitivity and experimental emphysema-induced properties of papain preparations. Am Rev Respir Dis. 110(3): 254-262. 1974.

Speer, C. P.; Pabst, M. J.; Hedegaard, H. B.; Rest, R. F.; Johnston, R. B., Jr. Enhanced release of oxygen metabolites by monocyte-derived macrophages exposed to proteolytic enzymes: activity of neutrophil elastase and cathepsin G. J Immunol. 133(4): 2151-2156. 1984.

Starcher, B.; Williams, I. The beige mouse: role of neutrophil elastase in the development of pulmonary emphysema. Exp Lung Res. 15(5): 785-800. 1989.

Stoppa, G. R.; Cesquini, M.; Roman, E. A.; Ogo, S. H.; Torsoni, M. A. Aminoguanidine prevented impairment of blood antioxidant system in insulin-dependent diabetic rats. Life Sci. 78(12): 1352-1361. 2006.

Stull, L. B.; Leppo, M. K.; Szweda, L.; Gao, W. D.; Marban, E. Chronic treatment with allopurinol boosts survival and cardiac contractility in murine postischemic cardiomyopathy. Circ Res. 95(10): 1005-1011. 2004.

Sun, L.; Stenken, J. A. Quantitation of nitric oxide-derived nitrite from activated macrophages using microdialysis sampling. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 796(2): 327-338. 2003.

Tetley, T. D. Macrophages and the pathogenesis of COPD. Chest. 121(5 Suppl): 156S-159S. 2002.

Thomas, L. Reversible collapse of rabbit ears after intravenous papain, and prevention of recovery by cortisone. J Exp Med. 104(2): 245-252. 1956.

Tsoumakidou, M.; Tzanakis, N.; Chrysofakis, G.; Siafakas, N. M. Nitrosative stress, heme oxygenase-1 expression and airway inflammation during severe exacerbations of COPD. Chest. 127(6): 1911-1918. 2005.

Turgeon, J.; Dussault, S.; Haddad, P.; Groleau, J.; Menard, C.; Michaud, S. E.; Maingrette, F.; Rivard, A. Probucol and antioxidant vitamins rescue ischemia-induced neovascularization in mice exposed to cigarette smoke: potential role of endothelial progenitor cells. Atherosclerosis. 208(2): 342-349. 2010.

Turino, G. M. The origins of a concept: the protease-antiprotease imbalance hypothesis. Chest. 122(3): 1058-1060. 2002.

Turino, G. M.; Lourenco, R. V.; McCracken, G. H. Role of connective tissues in large pulmonary airways. J Appl Physiol. 25(6): 645-653. 1968.

Turino, G. M.; Seniorrm; Garg, B. D.; Keller, S.; Levi, M. M.; Mandl, I. Serum elastase inhibitor deficiency and alpha 1-antitrypsin deficiency in patients with obstructive emphysema. Science. 165(3894): 709-711. 1969.

Valenca, S. S.; Bezerra, F. S.; Romana-Souza, B.; Paiva, R. O.; Costa, A. M.; Porto, L. C. Supplementation with vitamins C and E improves mouse lung repair. J Nutr Biochem. 19(9): 604-611. 2008.

Valenca, S. S.; Castro, P.; Pimenta, W. A.; Lanzetti, M.; Silva, S. V.; Barja-Fidalgo, C.; Koatz, V. L.; Porto, L. C. Light cigarette smoke-induced emphysema and NFkappaB activation in mouse lung. Int J Exp Pathol. 87(5): 373-381. 2006.

Valenca, S. S.; da Hora, K.; Castro, P.; Moraes, V. G.; Carvalho, L.; Porto, L. C. Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. Toxicol Pathol. 32(3): 351-356. 2004.

Valenca, S. S.; Porto, L. C. Immunohistochemical study of lung remodeling in mice exposed to cigarette smoke\*. J Bras Pneumol. 34(10): 787-795. 2008.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 39(1): 44-84. 2007.

Vasconcelos, S. M. L.; Goulart, M. O. F.; Moura, J. B. F.; Benfato, V. M. M. S.; Kubota, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. Química Nova. 30(5): 1323 - 1338. 2007.

Ward, P. A. Oxidative stress: acute and progressive lung injury. Ann N Y Acad Sci. 1203(53-59. 2010.

Weibel, E. R.; Hsia, C. C.; Ochs, M. How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry. J Appl Physiol. 102(1): 459-467. 2007.

Woessner, J. F., Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. Arch Biochem Biophys. 93(440-447. 1961.

Wright, J. L.; Cosio, M.; Churg, A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 295(1): L1-15. 2008.

Yao, H.; Arunachalam, G.; Hwang, J. W.; Chung, S.; Sundar, I. K.; Kinnula, V. L.; Crapo, J. D.; Rahman, I. Extracellular superoxide dismutase protects against pulmonary emphysema by attenuating oxidative fragmentation of ECM. Proc Natl Acad Sci U S A. 107(35): 15571-15576. 2010.

Yao, H.; Edirisinghe, I.; Yang, S. R.; Rajendrasozhan, S.; Kode, A.; Caito, S.; Adenuga, D.; Rahman, I. Genetic ablation of NADPH oxidase enhances susceptibility to cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice. Am J Pathol. 172(5): 1222-1237. 2008.

**APÊNDICE A –** Primeiro artigo da tese: Oxidative and nitrosative stress are involved in different stages of proteolytic pulmonary emphysema

# TITLE PAGE

# Oxidative and nitrosative stress are involved in different stages of proteolytic

### pulmonary emphysema

**Manuella Lanzetti**<sup>a</sup>, Cristiane Aguiar da Costa<sup>b</sup>, Renata Tiscoski Nesi<sup>c</sup>, Marina Valente Barroso<sup>c</sup>, Vanessa Martins<sup>c</sup>, Tatiana Victoni<sup>d</sup>, Vincent Lagente<sup>d</sup>, Karla Maria Pereira Pires<sup>a</sup>, Patrícia Machado Rodrigues e Silva<sup>e</sup>, Angela Castro Resende<sup>b</sup>, Luis Cristóvão Porto<sup>a</sup>, Cláudia Farias Benjamim<sup>c</sup>, Samuel Santos Valenca<sup>c</sup>.

a) Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; b) Departmento de
Farmacologia e Psicobiologia – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; c) Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; d) INSERM U991 – Université de Rennes, Rennes, France; e) Laboratório de Inflamação - Instituto Oswaldo Cruz.

# **Corresponding author**

Prof. Dr. Samuel Santos Valença – ICB/CCS/UFRJ. Av. Carlos Chagas Filho 373 Bloco F / sala 14. Ilha do fundão, Rio de Janeiro, R.J. CEP 21.941-902. Tel: 55 21 25 62 64 60. Fax: 55 21 25 62 67 34. E-mail: <u>samuelv@ufrj.br</u>

## ABSTRACT

Our aim was to investigate the role of oxidative stress in elastase-induced pulmonary emphysema. C57BL/6 mice were subjected to pancreatic porcine elastase (PPE) instillation (0.05 U or 0.5 U) per mouse (i.t.) to induce pulmonary emphysema. Lungs were collected on days 7, 14 and 21 after PPE instillation. The control group was shaminjected. Also, mice treated with 1% aminoguanidine (AMG) and iNOS knockout mice received 0.5 U PPE (i.t.) and lungs were analyzed 21 days after. We performed BAL, biochemical analyses of oxidative stress, and lung stereology and morphometry assays. Emphysema was observed histologically at 21 days after 0.5 U PPE treatment; tissues from these mice exhibited increased alveolar linear intercept and airspace volume density in comparison with the control group. TNF- $\alpha$  was elevated at 7 and 14 days after 0.5 U PPE treatment, concomitant with a reduction in the IL-10 levels at the same timepoints. Myeloperoxidase was elevated in all groups treated with 0.5 U PPE. Oxidative stress was observed during early stages of emphysema, with increased nitrite levels and malondialdehyde and superoxide dismutase activity at 7 days after 0.5 U PPE treatments. Glutathione peroxidase activity was increased in all groups treated with 0.5 U PPE. The emphysema was attenuated when iNOS was inhibited using 1% AMG and in iNOS knockout mice. Furthermore, proteolytic stimulation by PPE enhanced the expression of nitrotyrosine and iNOS, while the PPE+AMG group showed low expression of iNOS and nitrotyrosine. PPE stimulus also induced eNOS expression, while AMG reduced eNOS. Our results suggest that the oxidative and nitrosative stress pathways are triggered by nitric oxide production via iNOS expression in pulmonary emphysema.

Keywords: oxidative stress; emphysema; elastase; aminoguanidine; nitrotyrosine.

### INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by chronic bronchitis and pulmonary emphysema. Emphysema is the major cause of chronic morbidity and mortality in COPD patients worldwide [1]. Emphysema is characterized by airspace enlargement, accompanied by the destruction of parenchymal structure. The breakdown of the extracellular matrix in the parenchymal tissues occurs due to the inflammatory response, in which inflammatory cells are recruited to the lungs. There, the inflammatory cells release a large quantity of proteinases, exceeding the proteinase inhibitor defenses of the lung; this phenomenon is the basis of the well-described proteinase-antiproteinase hypothesis [2]. Beyond proteinase release, neutrophils and activated macrophages also release reactive oxygen species due to the respiratory burst that occurs during the inflammatory process. These cells also secrete cytokines, potentiating further inflammation. It is known that both proteolytic stimulus and oxidative stress are involved in the pathogenesis of pulmonary emphysema.

Cigarette smoking, the main risk factor for the development of emphysema, has long been considered responsible for the oxidative stress involved in this process. However, recent studies have demonstrated that endogenous oxidative stress is involved in proteolytic emphysema in several rodent models. Most of these studies have investigated genes that are related to the cellular antioxidant response, such as Nrf2 (NF-E2-related factor 2) [3], TRX1 (thioredoxin 1) [4], and SOD3 (extracellular superoxide dismutase, or ECSOD) [5]. In contrast, our study focused on evaluating the antioxidant response in the lungs after porcine pancreatic elastase stimulation, at different time-points of emphysema establishment. We also investigated the participation of the nitrosative stress pathway as an aggravator of protease-induced pulmonary emphysema. A very recent study has demonstrated that inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibition reverses the pulmonary emphysema induced by cigarette smoke [6]. However, we hypothesized that the peroxynitrite synthesis, from the nitric oxide and superoxide anion reaction, contributes to the development of pulmonary emphysema, disturbing the antioxidant defenses and generating oxidative damage at the cellular level.

# MATERIAL AND METHODS

All procedures were approved by the Institutional Ethics Committee of the Federal University of Rio de Janeiro (DAHEICB 063).

Study I

Five groups of C57BL/6 mice (n = 6) were used. Mice were anesthetized and subjected to an intratracheal instillation of either 0.05 U or 0.5 U of porcine pancreatic elastase (PPE – Sigma-Aldrich) or saline (control group). Animals were sacrificed at 7, 14 and 21 days after treatment to better comprehend the moment of the appearance of the emphysematous lesions and in which moment the oxidative stress is crucial for the emphysema development.

Study II

To assay the role of nitric oxide in the pathogenesis of emphysema, we inhibited inducible nitric oxide synthase (iNOS) by treating the animals with 1% aminoguanidine (AMG), provided in the drinking water. AMG treatment began one day before emphysema induction and continued throughout the entire emphysema time-course (to

21 days after 0.5 U of PPE). Mice were randomized into four groups (n = 5): control, AMG, PPE and PPE+AMG.

Study III

In order to study the role of inducible nitric oxide synthase in the pathogenesi of mphysema, C57BL/6 wild-type and iNOS knockout mice were subjected to an intratracheal instillation of 0.5 U of PPE and sacrificed 21 days after the treatment. Mice were randomized into four groups (n = 5): control, PPE, control iNOS KO and PPE iNOS KO.

Lung histology and quantification of emphysema

Mice were sacrificed by cervical displacement. Left lungs were removed and fixed with 4% paraformaldehyde. The tissue was embedded in paraffin, and 5 µm thick sections were stained with H&E. Airspace enlargement was quantified by the mean linear intercept length of the distal airspaces (Lm) in 30 randomly chosen fields of tissue sections per group [7]. The surface density of alveolar septa (Sv[alvsept]), volume density of alveolar septa (Vv[alvsept]) and airspace volume density (Vv[airspaces]) were calculated by counting the number of structures that were intersected by the test-system (partial points [Pp]) in 30 randomly chosen fields per group [8].

Measurements in BAL

Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed immediately after sacrifice (3 × 0.5 mL saline). The trachea was exposed and cannulated to allow access to the airway. The BAL fluid was kept on ice. Aliquots were reserved for cell counts (performed under a microscope), and the remaining BAL was centrifuged (600 g). Aliquots of the supernatant were subjected to ELISA to measure secreted TNF- $\alpha$  and IL-10; Bradford assays to measure protein content [9]; myeloperoxidase (MPO) assay [10]; and a colorimetric hydroxyproline assay (OHpro) [11, 12]. Outlining of MPO and OHpro can be visualized in Table 1. ROS detection was performed in BAL cells following the adapted NBT protocol [13]. Briefly, ROS produced by cells reacted with nitro blue tetrazolium chloride (NBT) generating blue formazan. Optical density (OD) was read in a microplate reader (Bio-Rad model 550; Hercules, CA, USA) at 630 nm. All assays were conducted as previously described.

Measurements in lung homogenates

Right lungs were removed and homogenized in potassium phosphate buffer. The homogenate was centrifuged (600 g) and the supernatant was removed. Protein concentration was estimated using the Bradford method [9]. Outlining of biochemical analyses can be visualized in Table 1. Nitrite levels were determined by a method based

on the Griess reaction [14]. Superoxide dismutase (SOD) activity was determined as described by Bannister and Calabrese [15]. Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured as described by Flohe [16]. Lipid peroxidation was measured using a thiobarbituric acid-reactive substances assay (TBARS) as a marker of oxidative damage [17]. Western blots were used to analyze the expression of iNOS, eNOS and nitrotyrosine. The antibodies against iNOS (Cayman Chemical Company, Michigan, USA), eNOS and nitrotyrosine (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) were diluted 1/1000. Tubulin (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) was used as an internal control. Equal loading of the samples was ensured by protein quantification prior to SDS-PAGE; membranes were also re-probed for tubulin to confirm equal loading.

### Statistical analyses

The data were compared using one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test (mean ± SEM, p<0.05). Statistical analyses were performed in GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### RESULTS

#### Lung emphysema induced by PPE is time and dose dependent

To evaluate the different stages of emphysema development and determine whether it is PPE dose-dependent, we exposed mice to 0.5 U and 0.05 U of PPE and observed the lung histology at 7, 14 and 21 days after instillation. For the lowest dose (0.05 U of PPE), we analyzed only the 21 day time-point. H&E-stained histological sections revealed normal lung structure in the control group. At 7 days post-PPE instillation (0.5 U), no changes in the lung parenchyma were observed. At 14 days post-PPE, some alveolar increase was observed, and at 21 days, complete emphysema had occurred, enlargement of alveolar spaces distributed throughout with the significant the parenchyma (Figure 1A-E). To further characterize the establishment of emphysema, histological findings were quantified in the lung slices. As shown in Table 2, all histological abnormalities typical of emphysema were observed in the tissues collected at 21 days post-PPE 0.5 U instillation, including increased mean linear intercept length of distal airspaces (Lm) and airspace volume density (Vv[airspaces]) accompanied by decreased surface density of alveolar septa (Sv[alvsept]) and volume density of alveolar septa (Vv[alvsept]).

# PPE (0.5 U) triggers chronic inflammatory response with early cytokine modulation in BAL

Cell counts were conducted in BAL to evaluate leukocyte migration; increased numbers of cells were found only at 21 days post-PPE 0.5 U instillation (Figure 2A). However, the response at the cytokine secretion level occurred at earlier time-points. The pro-inflammatory TNF- $\alpha$  was elevated at 7 and 14 days post-PPE 0.5 U instillation, while the anti-inflammatory IL-10 was reduced at the same time-points (Figure 2B-C). An increase in myeloperoxidase was observed at 7 days (p<0.001) and persisted at 14 and 21 days after the instillation of 0.5 U of PPE (Figure 2D, Table 1), characterizing a high number of activated neutrophils into the airways. In contrast, the hydroxyproline levels detected in the BAL were increased at 7 days (p<0.01), reduced to baseline (i.e., levels similar to those of the control group) at 14 days, and increased again (p<0.001) at 21 days after instillation of 0.5 U of PPE (Figure 2E, Table 1), showing a cyclic extracellular matrix remodeling by turnover of collagen. None of the evaluated parameters were altered in the group treated with 0.05 U of PPE for 21 days.

# Proteolytic stimulation by PPE triggers oxidative stress in early lung injury

Nitrite levels can be used as an indirect measurement of nitric oxide, a physiologic molecule that can be enhanced in the inflammatory process and contribute to oxidative and nitrosative stress. Nitrite levels were increased at 7 days after the instillation of 0.5 U of PPE (p<0.05), returned to baseline at 14 days, and increased again (p<0.01) at 21 days (Figure 3A, Table 1). Meanwhile, antioxidant enzymes exhibited different temporal response patterns. Superoxide dismutase activity was increased only at 7 days after instillation of 0.5 U of PPE (p<0.05 – Figure 3B, Table 1), while glutathione peroxidase was enhanced at all time-points tested (p<0.001 - Figure 3C, Table 1). Further demonstrating that oxidative stress is more evident at early time-points, the groups 7 and 14 days after instillation of 0.5 U of PPE exhibited elevated levels of TBARS (p<0.05 - Figure 3D), a marker of oxidative damage.

# Aminoguanidine treatment attenuates lung emphysema

To verify that nitric oxide is involved in the elastolytic model of emphysema, mice subjected to the instillation of 0.5 U of PPE were treated with 1% AMG for 22 days, beginning one day prior to the PPE treatment. Lung histology showed that mice treated with 1% AMG alone were indistinguishable from those in the control group (Figure 4A), with normal alveolar spaces and preserved septa (Figure 4B). PPE-treated mice exhibit lesions typical of emphysema, with increased alveolar spaces and evident septal destruction (Figure 4C), as described above. However, the PPE+AMG-treated mice showed relatively well-preserved lung parenchyma, with better maintained alveolar septa and consequently better preserved alveolar spaces than the PPE group (Figure 4D). As shown in Table 3, all histological alterations typical of emphysema were observed at 21 days post-PPE 0.5 U instillation, including increased mean linear intercept length of distal airspaces (Lm) and airspace volume density (Vv[airspaces]),

accompanied by decreased surface density of alveolar septa (Sv[alvsept]) and density of alveolar septa (Vv[alvsept]). However, treatment with 1% aminoguanidine effectively attenuated the effects of PPE on the lungs, and the PPE+AMG group was indistinguishable from the control group.

# AMG decreased inflammatory infiltrate and protein nitration induced by PPE

BAL cell counts showed that PPE induced an increase in leukocyte migration (p<0.001) compared to the control group. In contrast, the cell counts in the PPE+AMG group were similar to those in the control and reduced (p<0.001) compared to the PPE group (Figure 5). Western blotting analysis showed that treatment with 1% aminoguanidine partially inhibited iNOS expression (Figure 6). Nevertheless, AMG effectively prevented PPE-induced iNOS over expression in the PPE+AMG group. Surprisingly, the PPE+AMG group also exhibited a reduction in eNOS expression compared to the PPE group. As a consequence of iNOS and eNOS over expression, the PPE group exhibited elevated nitrotyrosine, a marker of nitrosative stress, while AMG treatment effectively prevented protein nitration; lower nitrotyrosine expression was observed in the PPE+AMG group compared to the PPE group.

## iNOS deficiency protected against PPE-induced emphysema

To better characterize the role of iNOS in the progression of emphysema a separate group of C57BL/6 wild-type and iNOS-/- mice were exposed to PPE. Lung histology and morphometry/stereology were assayed to evaluate the pulmonary architecture. Total leukocyte numbers were quantified and ROS levels were analyzed as a parameter of oxidative stress. Lung histology showed that control iNOS-/- mice were similar to control WT group (Figure 7A), with normal alveolar spaces and preserved septa (Figure 7B). PPE-treated mice exhibited lesions typical of emphysema, with increased alveolar spaces and evident septal destruction (Figure 7C), as described above. However, PPE iNOS-/- mice showed intact alveolar septa and consequently better preserved alveolar spaces than the PPE group (Figure 7D). Table 4 confirms all the typical changes in PPE WT group with a significant improvement in PPE iNOS-/- group. The phenotype is better in PPE iNOS-/- mice than in PPE WT group, because this group presented a reduction in total leukocyte numbers (p< 0.01) and ROS levels (p< 0.001) (Figure 7E-F).

### DISCUSSION

Our results demonstrate a critical interaction between different pathways involved in pulmonary emphysema, whereas proteolytic stimuli induced by elastase leads to oxidative stress and inflammation at different time-points during the establishment of emphysema. An interesting fact i observed at 21 days after stimulation; at this time-point

the emphysema is completely installed and any changes linked to antioxidant enzyme activities are observed. The changes in antioxidant enzyme activities were observed at the initial stage of emphysema establishment, when the final lesions have yet to be developed. This demonstrates that oxidative stress participates in the evolution of pulmonary emphysema, even in a proteolytic model. We also demonstrate that intervention in nitric oxide synthesis may be a promising strategy for the treatment of emphysema because mice exposed to proteolytic stimuli suffered nitrosative stress and presented enhanced nitrotyrosine expression, a marker of nitrosative damage. Aminoguanidine treatment inhibited this process, thus preventing this complication and attenuating septal tissue destruction.

There is a rationale explaining the relationship between inflammation and oxidative stress in this model. When elastase is instilled and reaches the airways, tissue destruction processes are initiated. Then, inflammatory cells are activated and migrate to the alveolar spaces to neutralize the harmful stimulus [18]. However, the release of proteases and reactive oxygen species (ROS) is an inherent byproduct of activated leukocytes and contributes to the inflammatory response and parenchyma destruction [19-21]. Additionally, the direct increase in the oxidative burden produced by the release of oxygen radicals from inflammatory neutrophils and macrophages contributes to the establishment of a oxidative stress [22]. Even a single exposure to PPE is sufficient to trigger a continuous degradation process because peptides derived from the extracellular matrix (ECM) are chemotactic for inflammatory cells, suggesting that ECM destruction may be a self-perpetuating process [23].

The protocol used in this study effectively produced emphysematous lesions in a dosedependent manner; a low dose of 0.05 U of PPE did not induce structural lung alterations. On the other hand, mice exposed to 0.5 U of PPE underwent typical emphysematous tissue destruction, as indicated by several morphological/stereological parameters. Increased Lm and decreased Sv and Vv[alvsept] demonstrate accelerated tissue destruction, increasing Vv[airspaces] to produce enlarged alveolar spaces. All of these histological measures are well-established features of pulmonary emphysema [24, 25]. Associated with these histological changes, elevated leukocyte recruitment was observed in the BAL of the group 21 days after PPE instillation (0.5 U), i.e., the emphysema group, demonstrating that the presence of inflammatory cells is linked to emphysema [5]. However, leukocyte infiltration was not observed at 7 and 14 days after PPE instillation, even though an increase in TNF- $\alpha$  cytokine secretion was observed at these time-points. This finding is attributed to the actions of resident cells, such as alveolar epithelial cells or even resident macrophages, neutrophils and lymphocytes, which initiated the inflammatory process by releasing the Th1 cytokine. Although these cells were not obviously increased in number, it is possible that they were more activated after PPE instillation. At the same time, a reduction in IL-10 cytokine levels was observed, indicating a pro-inflammatory profile with an increase in stimulatory cytokines and decrease in modulatory cytokines in the lung environment. Under normal physiological conditions, IL-10 inhibits the secretion of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$ , suppressing the proliferation of T-cells, NK cells, and alveolar macrophages [26]. However, under stimulatory conditions, IL-10 cannot carry out these immunomodulatory effects, favoring increased secretion of TNF- $\alpha$  and contributing to inflammation. Considering that few cells migrated to the alveolar spaces at 7 days, as shown in Figure 2A, it is likely that the cells present were more active, i.e., secreted more TNF- $\alpha$ . This rationale is consistent with the myeloperoxidase activity, which was increased beginning at 7 days after PPE instillation. Increased myeloperoxidase activity indicates the presence of neutrophil activity and is also a considerable aggravating factor for oxidative stress because its reaction with H2O2 generates hypochlorous acid, which can react with the superoxide anion to form a hydroxyl radical, one of the strongest ROS [27]. It is surprising that variation in inflammatory mediators and oxidative stress markers occurring at 7d after induction of emphysema, while the leukocytes in the BAL do not increase until 21d. Especially when at this time when increasing the number of leukocytes, the markers: TNF-α, IL-10, SOD and TBARS had returned to control values. But inflammation first occur in alveolar septa and after in alveolar space. Inflammatory mediators and redox markers were performed in lung homogenates while leukocyte numbers were quantified in BAL. So, we suggest a temporal response between parenchyma and BAL which is proportional to variation observed in our study. Thus TNF- $\alpha$ , IL-10, SOD and TBARS were reduced in lung homogenates because major leukocyte numbers were found at this time in BAL.

The hydroxyproline profile is especially interesting. Hydroxyproline levels were elevated at 7 days, returned to baseline levels at 14 days and increased again at 21 days after PPE instillation. The detection of OHpro in BAL is an indirect way to assess connective tissue/extracellular matrix breakdown [12, 28]. Thus, the elevated levels of OHpro in BAL after PPE stimuli suggest that the breakdown of septal tissue was accelerated at specific time-points, compromising the pulmonary architecture. This could be caused by protease release from inflammatory and epithelial cells or through the chemotactic action of peptides derived from the extracellular matrix (ECM), contributing to continuous tissue destruction [23]. The hydroxyproline response profile was paralleled by nitrite levels, which were increased at 7 days, reduced to control levels at 14 days and increased again at 21 days after PPE instillation. This pattern of behavior suggests that a kinetic response is involved during the establishment of emphysema. Apparently, an initial response is triggered by PPE stimulation and associated effects, followed by a more stable stage featuring a "pseudo-effective" combating of the PPE effects and ending with a rebound elevation of specific markers during the emphysema phase. The NO involvement at different stages of emphysema suggests that it plays a pivotal role in the pathogenesis of emphysema and encouraged us to explore the underlying

pathways. However, this data cannot be interpreted independently because NO is likely to interact with other molecules. Under physiological conditions, the superoxide anion is rapidly removed by high concentrations of scavenging enzymes, called superoxide dismutases (SOD), and NO is rapidly removed by diffusion through tissues into red blood cells [29, 30], where it is converted to nitrate/nitrite. However, under pro-inflammatory conditions, the production of superoxide and NO are simultaneously strongly activated, increasing the production of both molecules by 1,000-fold [31]. These conditions favor the formation of the strong oxidant peroxynitrite, which is produced by the collision of NO and superoxide.

Elevated SOD and nitrite levels were observed at 7 days post-PPE, indirectly indicating a parallel increase in O2- and NO production with consequent dismutation and conversion, respectively. In contrast, both are decreased at 14 days after PPEinstillation, suggesting the involvement of peroxynitrite formation, with NO and superoxide reacting so quickly that SOD activity was not required. However, at 21 days, when emphysema is established, nitrite elevation is observed again but not accompanied by elevation in SOD activity, suggesting a possible failure of the antioxidant system and free peroxynitrite synthesis.

Oxidative stress is more evident at the initial phase of the establishment of emphysema than when the emphysema is fully developed. As shown by the time-course after PPE instillation, SOD was elevated at 7 days, GPx was elevated at 7, 14 and 21 days, and TBARS, a recognized marker of oxidative damage by lipid peroxidation, was elevated at 7 and 14 days. These results clarify an important aspect of proteolytic emphysema, showing that oxidative stress is in fact involved in its establishment and progression. Additionally, these data highlight several parameters that should be considered markers of oxidative stress in proteolytic emphysema. Beyond the establishment of inflammation and oxidative stress condition, PPE triggered additional interacting pathways. The stimulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression favors the enhanced production of NO, which is involved in inflammatory responses. These increases in NO levels could facilitate dangerous levels of peroxynitrite synthesis, which can react with tyrosine residues to form nitrotyrosine [22, 32]. Because NO moves so readily through membranes and between cells, it can react with superoxide even if it has not been produced within the same cell [31]. To understand the participation of nitric oxide and its potential to react with superoxide anion to form peroxynitrite during the development of emphysema, animals were co-treated with aminoguanidine, a selective inhibitor of iNOS. The data from these experiments show that PPE induced nitration reactions, as demonstrated by the elevated nitrotyrosine expression, which is also observed in COPD patients [32]. Our data corroborates that of a recent study, which used another iNOS-selective inhibitor, L-NIL, to show that iNOS plays a crucial role in tobacco-smoke-induced emphysema [32]. Our data reinforce the critical role of iNOS activity during the development of proteolytic emphysema and highlights aminoguanidine as a good therapeutic strategy. A previous study from our group showed that an inhibitor (L-NAME) and a substrate (L-arginine) for NO synthesis play different effects on the emphysema caused by cigarette smoke, a source of oxidants [33]. The mechanism of action of the inhibitor used before is non-selective, because L-NAME is analogous to L-arginine, implying in a competition for NO synthesis [34].

However, the mechanism of action of aminoguanidine is different because it acts preferentially on the inducible isoform of nitric oxide synthase [35]. Thus, a specific inhibition enables a better characterization of the pathway involved in the pathogenesis of emphysema. Nevertheless, in the present study we used an elastase model of emphysema, which is not a source of oxidants, to prove that the oxidative and nitrosative pathways are involved in the process of induction of emphysema per se, regardless of the causative stimulus. The low iNOS expression observed in both groups treated with 1% AMG suggests that the inhibition of iNOS was incomplete. Nevertheless, 1% AMG effectively inhibited nitration and may also have modulated eNOS expression in response to PPE. According to Laszlo 1995, AMG is a dual constitutive and inducible nitric oxide synthase (NOS) inhibitor [36]. However, a review published at 2001 [37] compared different inhibitors of NOSs and showed that AMG play a partial selective action between iNOS and eNOS, being 11 times more selective for iNOS than for eNOS. Furthermore, they proposed the broke of the paradigm, affirming that the activity of constitutive neuronal and endothelial NOSs can be regulated by different factors. Thus, we suggest that the proposed treatment (1% AMG) partially inhibited iNOS expression and avoided the over expression of the constitutive isoform eNOS, lightly increased by PPE. Above all, treatment with 1% AMG improved the pulmonary histoarchitecture, preventing alveolar damage and inflammatory infiltration.

Compared to our study, a recent study published by Boyer et al showed contradictory results, concluding that neither eNOS nor iNOS are required for the development of elastase-induced emphysema [38]. Although they found increased number of 3-nitrotyrosine positive cells in lung from PPE WT mice, they didn't find any improvement on lung parenchyma neither of iNOS or eNOS deficient mice nor 1400W treated-mice, an important iNOS-selective inhibitor. Perhaps these contradictory data are justified by crucial discrepancies between both emphysema models. The previous one induced emphysema with a 10 times higher dose of PPE from elastin products when compared to our study. Even with this elevated dose (5 U of PPE/mice), our results regarding Lm parameter were more significant than the ones presented in that study (p<0.01 and p<0.05, respectively). About the pharmacologic inhibition established with 1400W, it is possible that it has done a total iNOS inhibition because it is 30 times more selective for iNOS than fore NOS [39]. We suggest that AMG 1% partially inhibited iNOS, as we showed in western blotting. Maybe this modulation has a crucial role in progression of

proteolytic pulmonary emphysema. Surprisingly, our results from PPE iNOS-/- mice corroborates our previous data showing that iNOS deficient mice instilled with PPE showed preservation of morphometric parameters such as Lm, Sv and Vv of airspace and septa; and also avoided increase in leukocyte numbers and ROS levels, which were increased in PPE wild-type group. Thus, we suggest that a modulation of iNOS in both inflammatory and chronic process like COPD plays a fundamental role to attenuate yours effects.

In conclusion, we have found a trio of pathways involved in the pathogenesis of pulmonary emphysema induced by proteolytic perturbation. Inflammation, oxidative stress and nitrosative stress seem to be important variables that affect the development of emphysema. A limitation of our study was that we did not perform shorter time-points of elastase stimulus, which could provide more information about the initial oxidative stress response to the development of emphysema. But one novel finding of this study is that oxidative stress plays a pivotal role at the initial phase of this disease. Nitrosative stress was observed at 21 days after PPE treatment, when emphysema has been fully installed, and aminoguanidine treatment concomitant with emphysema induction attenuated the proteolytic effects induced by PPE. Our results suggest that oxidative and nitrosative stresses generated by nitric oxide production via iNOS expression are critical in elastase-induced emphysema.

Author Disclosure: None of the authors has a financial relationship with any commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by FAPERJ, CAPES and CNPq. The authors ML, TV, VL, LCP and SSV are grateful to the CAPES-COFECUB for funding and bilateral agreement (Brazil – France).

#### REFERENCES

[1] Lopez, A. D.; Murray, C. C. The global burden of disease, 1990-2020. Nat Med 4:1241-1243; 1998.

[2] Owen, C. A. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 3:253-268; 2008.

[3] Ishii, Y.; Itoh, K.; Morishima, Y.; Kimura, T.; Kiwamoto, T.; Iizuka, T.; Hegab, A. E.; Hosoya, T.; Nomura, A.; Sakamoto, T.; Yamamoto, M.; Sekizawa, K. Transcription factor Nrf2 plays a pivotal role in protection against elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema. J Immunol 175:6968-6975; 2005.

[4] Kinoshita, T.; Hoshino, T.; Imaoka, H.; Ichiki, H.; Okamoto, M.; Kawayama, T.; Yodoi, J.; Kato, S.; Aizawa, H. Thioredoxin prevents the development and progression of elastase-induced emphysema. Biochem Biophys Res Commun 354:712-719; 2007.

[5] Yao, H.; Arunachalam, G.; Hwang, J. W.; Chung, S.; Sundar, I. K.; Kinnula, V. L.; Crapo, J. D.; Rahman, I. Extracellular superoxide dismutase protects against pulmonary emphysema by attenuating oxidative fragmentation of ECM. Proc Natl Acad Sci U S A 107:15571-15576; 2010.

[6] Seimetz, M.; Parajuli, N.; Pichl, A.; Veit, F.; Kwapiszewska, G.; Weisel, F. C.; Milger, K.; Egemnazarov, B.; Turowska, A.; Fuchs, B.; Nikam, S.; Roth, M.; Sydykov, A.; Medebach, T.; Klepetko, W.; Jaksch, P.; Dumitrascu, R.; Garn, H.; Voswinckel, R.; Kostin, S.; Seeger, W.; Schermuly, R. T.; Grimminger, F.; Ghofrani, H. A.; Weissmann, N. Inducible NOS Inhibition Reverses Tobacco-Smoke-Induced Emphysema and Pulmonary Hypertension in Mice. Cell 147:293-305; 2011.

[7] Knudsen, L.; Weibel, E. R.; Gundersen, H. J.; Weinstein, F. V.; Ochs, M. Assessment of air space size characteristics by intercept (chord) measurement: an accurate and efficient stereological approach. J Appl Physiol 108:412-421; 2010.

[8] Mandarim-de-Lacerda, C. A. Stereological tools in biomedical research. An Acad Bras Cienc 75:469-486; 2003.

[9] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254; 1976.

[10] Hill, A. T.; Bayley, D. L.; Campbell, E. J.; Hill, S. L.; Stockley, R. A. Airways inflammation in chronic bronchitis: the effects of smoking and alpha1-antitrypsin deficiency. Eur Respir J 15:886-890; 2000.

[11] Woessner, J. F., Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. Arch Biochem Biophys 93:440-447; 1961.

[12] Churg, A.; Zay, K.; Shay, S.; Xie, C.; Shapiro, S. D.; Hendricks, R.; Wright, J. L. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice. Am J Respir Cell Mol Biol 27:368-374; 2002.

[13] Choi, H. S.; Kim, J. W.; Cha, Y. N.; Kim, C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. J Immunoassay Immunochem 27:31-44; 2006.

[14] Green, L. C.; Wagner, D. A.; Glogowski, J.; Skipper, P. L.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem 126:131-138; 1982.

[15] Bannister, J. V.; Calabrese, L. Assays for superoxide dismutase. Methods Biochem Anal 32:279-312; 1987.

[16] Flohe, L.; Gunzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol 105:114-121; 1984.

[17] Draper, H. H.; Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol 186:421-431; 1990.

[18] Antunes, M. A.; Rocco, P. R. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. An Acad Bras Cienc 83:1385-1396; 2011.

[19] Rahman, I.; MacNee, W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. Free Radic Biol Med 21:669-681; 1996.

[20] Barnes, P. J. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. Pharmacol Rev 56:515-548; 2004.

[21] Rahman, I.; Adcock, I. M. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. Eur Respir J 28:219-242; 2006.

[22] MacNee, W. Oxidants/antioxidants and COPD. Chest 117:303S-317S; 2000.

[23] Hogg, J. C.; Senior, R. M. Chronic obstructive pulmonary disease - part 2: pathology and biochemistry of emphysema. Thorax 57:830-834; 2002.

[24] Valenca, S. S.; Castro, P.; Pimenta, W. A.; Lanzetti, M.; Silva, S. V.; Barja-Fidalgo, C.; Koatz, V. L.; Porto, L. C. Light cigarette smoke-induced emphysema and NFkappaB activation in mouse lung. Int J Exp Pathol 87:373-381; 2006.

[25] Lanzetti, M.; Lopes, A. A.; Ferreira, T. S.; de Moura, R. S.; Resende, A. C.; Porto,
L. C.; Valenca, S. S. Mate tea ameliorates emphysema in cigarette smoke-exposed mice. Exp Lung Res 37:246-257; 2011.

[26] Bingisser, R. M.; Holt, P. G. Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells. Swiss Med Wkly 131:171-179; 2001.

[27] Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 39:44-84; 2007.

[28] Lanzetti, M.; Lopes, A. A.; Ferreira, T. S.; de Moura, R. S.; Resende, A. C.; Porto, L. C.; Valenca, S. S. Mate tea ameliorates emphysema in cigarette smoke-exposed mice. Exp Lung Res 37:246-257.

[29] Butler, A. R.; Megson, I. L.; Wright, P. G. Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature. Biochim Biophys Acta 1425:168-176; 1998.

[30] Joshi, M. S.; Ferguson, T. B., Jr.; Han, T. H.; Hyduke, D. R.; Liao, J. C.; Rassaf, T.; Bryan, N.; Feelisch, M.; Lancaster, J. R., Jr. Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. Proc Natl Acad Sci U S A 99:10341-10346; 2002.

[31] Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev 87:315-424; 2007.

[32] Tsoumakidou, M.; Tzanakis, N.; Chrysofakis, G.; Siafakas, N. M. Nitrosative stress, heme oxygenase-1 expression and airway inflammation during severe exacerbations of COPD. Chest 127:1911-1918; 2005.

[33] Valenca, S. S.; Rueff-Barroso, C. R.; Pimenta, W. A.; Melo, A. C.; Nesi, R. T.; Silva, M. A.; Porto, L. C. L-NAME and L-arginine differentially ameliorate cigarette smokeinduced emphysema in mice. Pulm Pharmacol Ther 24:587-594; 2011.

[34] Porsti, I.; Paakkari, I. Nitric oxide-based possibilities for pharmacotherapy. Ann Med 27:407-420; 1995.

[35] Holstad, M.; Jansson, L.; Sandler, S. Inhibition of nitric oxide formation by aminoguanidine: an attempt to prevent insulin-dependent diabetes mellitus. Gen Pharmacol 29:697-700; 1997.

[36] Laszlo, F.; Evans, S. M.; Whittle, B. J. Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in rat intestinal microvasculature in vivo. Eur J Pharmacol 272:169-175; 1995.

[37] Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J 357:593-615; 2001.

[38] Boyer, L.; Plantier, L.; Dagouassat, M.; Lanone, S.; Goven, D.; Caramelle, P.; Berrehar, F.; Kerbrat, S.; Dinh-Xuan, A. T.; Crestani, B.; Le Gouvello, S.; Boczkowski, J.

Role of nitric oxide synthases in elastase-induced emphysema. Lab Invest 91:353-362; 2011.

[39] Garvey, E. P.; Oplinger, J. A.; Furfine, E. S.; Kiff, R. J.; Laszlo, F.; Whittle, B. J.; Knowles, R. G. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. J Biol Chem 272:4959-4963; 1997.

# FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** HE-stained lung parenchyma. The tissues shown are from (A) mice in the saline control group, at 21 days; (B-D) mice treated with 0.5 U of PPE, at 7, 14 and 21 days post-instillation, respectively; and (E) mice treated with 0.05 U of PPE, at 21 days post-instillation. Arrows represent septal wall tissue destruction and consequent alveolar enlargement. The scale bar represents 100  $\mu$ m.

**Figure 2.** Inflammatory parameters involved in the establishment of emphysema. BAL samples were used to detect (A) total leukocytes; (B) TNF- $\alpha$  cytokine levels; (C) IL-10 cytokine levels; (D) myeloperoxidase activity; and (E) hydroxyproline levels. The symbols in the figure denote significant differences compared to the control: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001. n = 6/group

**Figure 3.** Markers of oxidative stress involved in the establishment of emphysema. (A) Nitrite levels; (B and C) SOD and GPx activity; and (D) TBARS were measured in lung tissue samples. The symbols in the figure denote significant differences compared to the control: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001. n = 6/group

**Figure 4.** HE-stained lung parenchyma after 1% AMG treatment. The tissues shown are from (A) mice in the saline group, at 21 days post-instillation; (B) mice treated with 1% AMG in the drinking water; (C) mice treated with 0.5 U of PPE, at 21 days post-instillation; (D) mice treated with 0.5 U of PPE and treated with 1% AMG in the drinking water, at 21 days post-instillation. Arrows represent septal wall tissue destruction and consequent alveolar enlargement. The scale bar represents 100  $\mu$ m.

**Figure 5.** The inhibition of iNOS by aminoguanidine treatment prevented inflammatory infiltration. Total leukocyte detection. The symbols in the figure denote \* significant difference when compared to the control and # significant difference when compared tto the PPE group. \*\*\* p<0.001, ### p<0.001. n = 5/group.

**Figure 6.** The inhibition of iNOS by aminoguanidine treatment prevented nitrosative stress. Western blots were used to detect iNOS, eNOS and nitrotyrosine. Each Western blot had its own tubulin loading control. Densitometry of bands were calculated and normalized by loading control. The symbols in the figure mean: \* statistical

difference when compared to the control and # significant difference when compared to the PPE group \* p<0.05, # p<0.05. n = 3 – 4/group

**Figure 7.** iNOS deficient mice are more protected against emphysema than wild-type. Lung parenchyma HE-stained sections 21 days post-instillation (A) Wild-type control group (B) Wild-type PPE group (C) iNOS-/- control group (D) iNOS-/- PPE group. (E) Total leukocytes (F) ROS detection. Scale bar represents 100  $\mu$ m. Symbols in the figure mean: \* statistically different when compared to control WT group and # statistically different when compared to PPE WT group. \*\* p<0.01, ## p<0.01, ### p<0.001. (n = 5/group).

Analyses	Scope	7d	14d	21d HD	21d LD
MPO	Lung injury related to neutrophils	$\uparrow\uparrow\uparrow$	î	††	-
OH-pro	Collagen breakdown	$\uparrow\uparrow$	-	$\uparrow\uparrow\uparrow$	-
Nitrite	Nitric oxide	Ť	-	††	-
SOD	Antioxidant defense, mainly against superoxide anion	Ť	-	-	
GPx	Antioxidant defense, mainly against hydroperoxides	$\uparrow\uparrow\uparrow$	111	†††	ttt
TBARS	Lipid peroxidation	î	î	-	-

Table 1: Outlining of biochemical analyses

MPO – myeloperoxidase; OH-pro – hydroxyproline; SOD – superoxide dismutase; GPx – glutathione peroxidase; TBARS – thiobarbituric acid reactive substances. 21d HD – high dose of PPE, like 7d and 14d. 21d LD – low dose of PPE. All comparisons are relative to control group.

	Control	PPE 0.5 U			PPE 0.05 U	
	Control	7d	7d 14d 21d		21d	
Lm (µm)	153.8 ± 4.01	167.1 ± 12.33	214.7 ± 18.45	285.0 ± 21.59**	166.1 ± 4.16	
Sv (µm <sup>-1</sup> )	0.026 ± 0.001	0.024 ± 0.001	0.019 ± 0.002	0.014 ± 0.001**	0.024 ± 0.001	
Vv[alvsept] %	0.54 ± 0.01	$0.52 \pm 0.02$	0.45 ± 0.02	0.33 ± 0.03**	0.47 ± 0.02	
Vv[airspaces] %	0.46 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.67 ± 0.03**	$0.5250 \pm 0.02$	

Table 2: Lung morphological and stereological quantifications after PPE-induced emphysema

Lm - mean linear intercept length of distal airspaces; Sv - surface density of alveolar septa; Vv[alvsept] - volume density of alveolar septa; Vv[airspaces] - volume density of airspaces; PPE - porcine pancreatic elastase. The results shown represent the mean ± SEM. \*\* p<0.01 when compared with control group. n = 6/group

	Control	AMG	PPE	PPE+AMG
Lm (µm)	45.53 ± 1.79	49.96 ± 2.65	68.31 ± 1.55*	57.24 ± 6.47
Sv (µm <sup>-1</sup> )	0.088 ± 0.004	0.080 ± 0.004	0.059 ± 0.001*	0.065 ± 0.008
Vv[alvsept] %	49.20 ± 1.53	46.20 ± 1.16	39.67 ± 2.60*	42.67 ± 2.96
Vv[airspaces] %	50.80 ± 1.53	53.80 ± 1.16	62.00 ± 2.60*	57.33 ± 2.96

Table 3: Lung morphological and stereological quantifications after PPE-induced emphysema and AMG treatment

Lm - mean linear intercept length of distal airspaces; Sv - surface density of alveolar septa; Vv[alvsept] - volume density of alveolar septa; Vv[airspaces] - volume density of airspaces; PPE - porcine pancreatic elastase; AMG - aminoguanidine. The results represent the mean ± SEM. \* p<0.05 when compared with control group. n = 5/group

Table 4: Lung morphological and stereological quantifications in WT and iNOS" mice instilled or not with PPE

	CTR WT	PPE WT	CTR INOS**	PPE iNOS"
Lm (µm)	42.55 ± 1.41	77.36 ± 4.90**	41.96 ± 1.48##	49.01 ± 2.73
Sv (µm <sup>•1</sup> )	0.094 ± 0.003	0.053 ± 0.003**	0.096 ± 0.003##	0.083 ± 0.005
Vv[alveolar septa] %	61.7 ± 2.21	36.7 ± 2.34*	66.3 ± 1.60###	53.9 ± 3.18
Vv[airspaces] %	38.3 ± 2.21	63.3 ± 2.34*	33.7 ± 1.60###	46.1 ± 3.18

Definition of abbreviations: Lm, mean linear intercept length of distal airspaces; Sv, surface density of alveolar septa; Vv[alvsept], volume density of alveolar septa; Vv[alvsept], volume density of airspaces; PPE, porcine pancreatic elastase. The results represent the mean ± SEM. \* p < 0.05, \*\* p< 0.01 vs wild-type control mice. ## p< 0.01, ### P < 0.001 vs wild-type PPE mice. n = 5/group.

#### Figure 1.











Figure 4.



# Figura 5.



# Figure 6.






**APÊNDICE B –** Comprovante de publicação durante o período da tese (2009 – 2012) - 1

#### Food Research International 48 (2012) 798-801



Short communication

Ready-to-drink matte® tea shows anti-inflammatory and antioxidant properties on a cigarette smoke exposure model

Manuella Lanzetti <sup>a,b</sup>, Marina Valente Barroso <sup>b</sup>, Renata Tiscoski Nesi <sup>b</sup>, Alan Aguiar Lopes <sup>a</sup>, Eduardo Tavares Lima Trajano <sup>a</sup>, Jackson Nogueira Alves <sup>a</sup>, Ariane Rennó Brogliato <sup>b</sup>, Paula Alvarenga Borges <sup>b</sup>, Cláudia Farias Benjamim <sup>b</sup>, Luís Cristóvão Porto <sup>a</sup>, Samuel Santos Valenca <sup>b,\*</sup>

\* Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. Prof. Manuel de Abreu, 444, 3 andar, CEP: 20.550-170, Maracanã, Brazil <sup>b</sup> Instituto de Clências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Ilha do Fundão, CEP: 21.941-902, Brazil

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 9 October 2011 Accepted 21 June 2012 Available online 2 July 2012

Keywords: Mate tea Acute lung inflammation Antioxidant Polyphenol Cigarette smoke

#### ABSTRACT

The herbal mate tea (*llex paraguariensis*) is a very popular drink in South America, and its consumption has increased worldwide. The toasted herb produces an infusion known as mate tea, which contains many antioxidant compounds such as polyphenols. Cigarette smoke (CS) is rich in oxidant compounds that trigger an acute inflammatory response in the lungs. In a previous study we showed mate tea infusion as a resource against cigarette smoke-induced acute lung inflammation. Our objective here was to investigate whether ready-to-drink matte® tea (RTDMT) could have both a prophylactic and therapeutic effect against the acute inflammation and oxidative stress generated by CS. C578L/6 mice were exposed to CS and were administered RTDMT (*da libitum*) before, during and after acute exposure to CS. RTDMT was able to prevent, reduce and reverse the influx of leukocytes into the lungs as well as the expression of proinflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-13, ROS production and oxidative damage (malondialdehyde and carbonyl) compared to the vehicle group exposed to CS. We conclude that RTDMT is an effective antioxidant against acute inflammation and redox imbalance caused by CS in mice, preventing oxidative damage that could otherwise occur.

**APÊNDICE C –** Comprovante de publicação durante o período da tese (2009 – 2012) - 2

Toxicology in Vitro 25 (2012) 791-798			
ELSEVIER	Contents lists available at SciVerse ScienceDirect Toxicology in Vitro journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit	Textendor	
Oxidative damage in alveolar macrophages exposed to cigarette smoke extract and participation of nitric oxide in redox balance			
Karla Maria Pereira Pires <sup>a</sup> , Manuella Lanzetti <sup>a</sup> , Carlos Romualdo Rueff-Barroso <sup>b</sup> , Paulo Castro <sup>c</sup> , Agessandro Abrahão <sup>c</sup> , Vera Lúcia Gonçalves Koatz <sup>c</sup> , Samuel Santos Valença <sup>d,*</sup> , Luís Cristóvão Porto <sup>a</sup> <sup>a</sup> Programa de Pés-graduação em Biologia Humana e Experimental - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida 28 de setembro 87, CEP: 20551-030, Rio de Janeiro, Brazil <sup>b</sup> Instituto Biologia Humana e Experimental - Universidade Federal Fluminene. Rua Professor Emant Melio 10, CEP: 2421-150, Niterdi Rinzul <sup>c</sup> Instituto de Bioguímica Médica - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Carlos Chagas Filho nº 373, CEP: 21941-902, Rio de Janeiro, Brazil			
A R T I C L E I N Arricle history: Received 4 December 20 Accepted 24 May 2012 Available online 1 June 2 Keywords: Cigarette smoke Alveolar macrophages Oxidative stress Nitric oxide	1 C L E I N F O       A B S T R A C T         httory:       d 4 December 2011         dd 2 May 2012       Ite conline 1 June 2012         de molter 1 June 2012       Ite conline 1 June 2012         de:       te conline 1 June 2012         de:       te smake         rmacrophages       vector december 2011 and glutathione peroxidase activities, reduced glutathione (LN), L-arginine (LA), N-acetyltysteir (NAC) and both LN and NAC. RAM cultured only with medium was considered as control group. Bit chemical analysis were performed to measure cellular metabolism (MTT), nitrite levels, superoxid is stress (SOD) and glutathione peroxidase activities, reduced glutathione (CSSC), malondialdehyde and myeloperoxidase activity. During exposure to CSE, increased NO leve were not only associated with an increase of cell activation, but also affected MTT levels in RAM. CS administration affected SOD anticox dant profile regardless NO levels; however nitrite values were associated with CSH/CSSC ratio. I addition, lipid peroxidation appeared to be intric-oxide dependent. Furthermore, the use of NAC sig inficiantly reduced the expression of NFkB normally observed in RAM exposed to CSE. The presei results show that NO appeared to be involved in RAM activation, oxidative status maintemance ar		
	lipid peroxidation process during exposure to CSE.	maintenance and	

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 108

**APÊNDICE D –** Comprovante de publicação durante o período da tese (2009 – 2012) - 3

INTERNATIONAL JOURNAL OF

L JOURNAL OF Experimental Pathology

### ORIGINAL ARTICLE

Int. J. Exp. Path. (2012), 93, 269-278

# Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs

Akinori C. Nagato\*, Frank S. Bezerra<sup>†</sup>, Manuella Lanzetti\*, Alan A. Lopes\*, Marco Aurélio S. Silva\*, Luís Cristóvão Porto\* and Samuel S. Valença<sup>‡</sup>

\*Laboratório de Reparo Tecidual, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>†</sup>Laboratório de Immopatologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil and <sup>+</sup>Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

## INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY

doi: 10.1111/j.1365-2613.2012.00823.x

Received for publication: 4 September 2011 Accepted for publication: 30 March 2012

#### Correspondence:

Samuel Santos Valença Laboratório Compartilhado Instituto de Ciências Biomédicas Universidade Federal do Rio de Janeiro Arbor Av. Carlos Chagas Filho 373 CEP 21.941-902 Rio de Janeiro, RJ Brazil Tel.: (55 21) 2562 6460 Fax: (55 21) 2562 6734 E-mail: samuelv@ufrj.br

In this study our aim was to investigate the time courses of inflammation, oxidative stress and tissue damage after hyperoxia in the mouse lung. Groups of BALB/c mice were exposed to 100% oxygen in a chamber for 12, 24 or 48 h. The controls were subjected to normoxia. The results showed that IL-6 increased progressively after 12 (P < 0.001) and 24 h (P < 0.001) of hyperoxia with a reduction at 48 h (P < 0.01), whereas TNF-α increased after 24 (P < 0.001) and 48 h (P < 0.001). The number of macrophages increased after 24 h (P < 0.001), whereas the number of neutrophils increased after 24 h (P < 0.01) and 48 h (P < 0.001). Superoxide dismutase activity decreased in all groups exposed to hyperoxia (P < 0.01). Catalase activity increased only at 48 h (P < 0.001). The reduced glutathione/oxidized glutathione ratio decreased after 12 h (P < 0.01) and 24 h (P < 0.05). Histological evidence of lung injury was observed at 24 and 48 h. This study shows that hyperoxia initially causes an inflammatory response at 12 h, resulting in inflammation associated with the oxidative response at 24 h and culminating in histological damage at 48 h. Knowledge of the time course of inflammation and oxidative stress prior to histological evidence of acute lung injury can improve the safety of oxygen therapy in patients.

#### Keywords

Summary

hyperoxia, inflammation, lung, mouse, oxidative stress

**APÊNDICE E –** Comprovante de publicação durante o período da tese (2009 – 2012) - 4



# Low tidal volume mechanical ventilation and oxidative stress in healthy mouse lungs<sup>\*, \*\*</sup>

Ventilação mecânica com baixo volume corrente e estresse oxidativo em pulmões saudáveis de camundongos

Karla Maria Pereira Pires, Adriana Correa Melo, Manuella Lanzetti, Natália Vasconcelos Casquilho, Walter Araújo Zin, Luís Cristóvão Porto, Samuel Santos Valença

### Abstract

**Objective:** Mechanical ventilation (MV) itself can directly contribute to lung injury. Therefore, the aim of the present study was to investigate early biomarkers concerning oxidant/antioxidant balance, oxidative stress, and inflammation caused by short-term MV in healthy mouse lungs. **Methods:** Twenty male C57BL/6 mice were randomly divided into two groups: MV, submitted to low tidal volume ( $V_{\rm p}$  6 mL/kg) MV for 30 min; and spontaneous respiration (SR), used as controls. Lung homogenate samples were tested regarding the activity of various antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and TNF- $\alpha$  expression. **Results:** In comparison with the SR group, the MV group showed a significant decrease in the activity of superoxide dismutase ( $\approx$ 359b; p < 0.05), together with an increase in the activity of catalase (40%; p < 0.01), glutathione peroxidaze (500%; p < 0.001), and myeloperoxidase (260%; p < 0.001), as well as a reduction in the glutathione/oxidized glutathione ratio ( $\approx$ 50%; p < 0.05) and an increase in TNF- $\alpha$  expression in the MV group. Oxidative damage, assessed by lipid peroxidation, was also greater in the MV group (45%; p < 0.05). **Conclusions:** Our results show that short-term low V<sub>T</sub> MV can directly contribute to lung injury, generating oxidative stress and inflammation in healthy mouse lungs.

Keywords: Ventilator-induced lung injury; Respiration, artificial; Oxidative stress; Inflammation; Mice.

#### Resumo

**Objetivo:** A ventilação mecânica (VM) por si própria pode contribuir diretamente para a lesão pulmonar. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar biomarcadores precoces relacionados ao equilíbrio oxidantes/ antioxidantes, estresse oxidativo e inflamação causados por VM de curta duração em pulmões de camundongos saudáveis. **Métodos:** Vinte camundongos C57BL/6 machos foram randomicamente divididos em dois grupos: VM, submetidos a VM com baixo volume corrente ( $V_{\rm T}$ , 6 mL/kg) por 30 min; e respiração espontânea (RE), utilizados como controles. Amostras de homogeneizados de pulmão foram testadas quanto à atividade de enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica e expressão de TNF- $\alpha$ . **Resultados:** Comparados ao grupo RE, houve uma redução significativa na atividade de superóxido dismutase ( $\approx$ 35%; p < 0,05) e aumento da atividade de catalase (40%; p < 0,01), glutationa peroxidase (500%; p < 0,001) e mieloperoxidase (260%; p < 0,001), ao passo que a razão glutationa reduzida/glutationa oxidada foi menor ( $\approx$ 50%; p < 0,05), e houve um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  no grupo VM. O dano oxidativo, analisado como peroxidação lipídica, também aumentou no grupo VM (45%; p < 0.05). **Conclusões:** Nossos resultados demostraram que VM de curta duração em pulmões de camundongos Saudáveis.

Descritores: Lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica; Respiração artificial; Estresse oxidativo; Inflamação; Camundongos.

Tel. 55 21 2562-6460. Fax: 55 21 2562-6734. E-mail: samuelv@ufrj.br

Submitted: 24 May 2011. Accepted, after review: 1 December 2011.

\*\*A versão completa em português deste artigo está disponível em www.jornaldepneumologia.com.br

<sup>\*</sup> Study carried out under the auspices of the Graduate Program in Experimental and Human Biology, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ, Rio de Janeiro State University); Laboratory of Respiration Physiology at the Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Federal University of Rio de Janeiro); and Institute of Biomedical Sciences, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Federal University of Rio de Janeiro); and Institute of Biomedical Sciences, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Federal University of Rio de Janeiro), Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence to: Samuel Santos Valença, LABCUM/ICB/CCS/UFRJ, Avenida Carlos Chagas Filno, 373, Bloco F, Sala 14, Ilha do fundão, CEP 21.941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Financial support: This study received financial support from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Rio de Janeiro Research Foundation), Coardenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES, Office for the Advancement of Higher Education), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, National Council for Scientific and Technological Development).

APÊNDICE F - Comprovante de publicação durante o período da tese (2009 - 2012) -5

Respiratory Physiology & Neurobiology 179 (2011) 129-136



Effects of oleanolic acid on pulmonary morphofunctional and biochemical variables in experimental acute lung injury

Raquel S. Santos<sup>a</sup>, Pedro L. Silva<sup>a</sup>, Gisele P. Oliveira<sup>a</sup>, Fernanda F. Cruz<sup>a</sup>, Débora S. Ornellas<sup>a,b</sup>, Marcelo M. Morales<sup>b</sup>, Janaina Fernandes<sup>c</sup>, Manuella Lanzetti<sup>d</sup>, Samuel S. Valença<sup>d</sup>, Paolo Pelosi<sup>e</sup>, Cerli R. Gattass<sup>c</sup>, Patricia R.M. Rocco<sup>a,\*</sup>

\* Laboratory of Pulmonary Investigation, Carlos Chagas Filho Institute of Blophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rj, Brazil <sup>b</sup> Laboratory of Cellular and Molecular Physiology, Carlos Chagas Filho Institute of Blophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Cellular Immunology, Carlos Chagas Filho Institute of Blophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil <sup>d</sup> Laboratory of Inflammation, Oxidative Stress and Cancer, Biomedical Institute of Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

\* Department of Surgical Sciences and Integrated Diagnostics, University of Genoa, Genoa, Italy

ARTICLE INFO Article history

#### ABSTRACT

Accepted 13 July 2011 Keywords: Dexamethasone Cytokines Chemokines Histopathology Lung mechanics Oxidative stress

We analysed the effects of oleanolic acid (OA) on lung mechanics and histology and its possible mechanisms of action in experimental acute lung injury (ALI). BALB/c mice were randomly divided into Control (saline, ip) and ALI (paraquat, 25 mg/kg, ip) groups. At 1 h, both groups were treated with saline (SAL, 50 µl ip), OA (10 mg/kg ip), or dexamethasone (DEXA, 1 mg/kg ip). At 24 h, lung static elastance, viscoelastic pressure, and alveolar collapse reduced more after OA compared to DEXA administration. Tumour necrosis factor-α, macrophage migration inhibitory factor, interleukin-6, interferon-γ, and transforming growth factor-β mRNA expressions in lung tissue diminished similarly after OA or DEXA. Conversely, only OA avoided reactive oxygen species generation and yielded a significant decrease in nitrite concentration. OA and DEXA restored the reduced glutathione/oxidized glutathione ratio and catalase activity while increasing glutathione peroxidase induced by paraquat. In conclusion, OA improved lung morphofunction by modulating the release of inflammatory mediators and oxidative stress.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

**APÊNDICE G –** Comprovante de publicação durante o período da tese (2009 – 2012) - 6

#### Respiratory Physiology & Neurobiology 177 (2011) 120-126



# Long-term exposure to cigarette smoke impairs lung function and increases HMGB-1 expression in mice

Frank Silva Bezerra<sup>a,b</sup>, Samuel Santos Valença<sup>c</sup>, Karla Maria Pereira Pires<sup>a</sup>, Manuella Lanzetti<sup>a</sup>, Wagner Alves Pimenta<sup>a</sup>, Aline Cunha Schmidt<sup>b</sup>, Luís Cristóvão Porto<sup>a</sup>, Walter Araujo Zin<sup>b,\*</sup>

<sup>4</sup> Laboratory of Tissue Repair, Histology and Embryology Department, Roberto Alcantara Gomes Institute of Biology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil <sup>b</sup> Laboratory of Respiration Physiology, Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil <sup>c</sup> Laboratory of Inflammation, Oxidative Stress and Cancer, Biomedical Sciences Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

#### ARTICLE INFO

## ABSTRACT

Article history: Accepted 23 March 2011

Keywords: Cigarette smoke Lung inflammation Oxidative stress HMGB-1 expression Mice Cigarette smoke (CS)-induced emphysema is caused by a continuous inflammatory response in the lower respiratory tract. The development of the condition is believed to be mediated by oxidant-antioxidant imbalance. This paper describes the effects of long-term CS exposure on alveolar cell recruitment, antioxidant defense systems, activity of extracellular matrix metalloelastases, expression of metalloelastase MMP-12, and high mobility group box-1 protein (HMGB-1). Ten C57BI/6 mice were exposed to 12 cigarettes-a-day for 60 consecutive days, while 10 control animals were exposed to ambient air. After sacrifice, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was removed, and lung tissue underwent biochemical and histological analyses. In CS-exposed animals influx of alveolar macrophages and neutrophils into BALF, lung static elastance, and expression of MMP-12 and HMGB-1 were significantly increased while the activity of antioxidant enzyme was significantly reduced in comparison with control group. Thus, we demonstrated for the first time that long-term CS exposure decreased antioxidant defenses concomitantly with impaired lung function, which was associated with HMGB-1 expression.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

**APÊNDICE H –** Comprovante de publicação durante o período da tese (2009 – 2012) - 7

Experimental Lung Research, 37, 246–257, 2011 Copyright © Informa Healthcare USA, Inc. ISSN: 0190-2148 print / 1521-0499 online DOI: 10.3109/01902148.2010.535092

informa healthcare

# Mate tea ameliorates emphysema in cigarette smoke-exposed mice

Manuella Lanzetti,<sup>1</sup> Alan A. Lopes,<sup>1</sup> Thiago S. Ferreira,<sup>1</sup> Roberto Soares de Moura,<sup>2</sup> Angela C. Resende,<sup>2</sup> Luis Cristovao Porto,<sup>1</sup> and Samuel Santos Valenca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Histology and Embryology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil
<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

#### ABSTRACT

Exposure to cigarette smoke (CS) is associated with lung inflammation, oxidative stress, and emphysema. The aim of this work was to study Mate tea as a possible natural antioxidant resource against emphysema development. C57BL/6 mice were distributed into 4 groups: exposed to ambient air (control), exposed to the smoke of 12 cigarettes (CS), exposed to ambient air and treated with Mate (500 mg/kg/day diluted in 100  $\mu$ L) (Mate), and exposed to CS and treated with Mate (CS+Mate). All mice were treated for 60 days. On day 61 the mice were killed. Right and left lungs were removed for histology and biochemical analysis, respectively. Emphysematous lesions and inflammatory cell influxes in the CS group were evident by histological analysis. Cells showed higher 4-hydroxynonenal labeling in the CS group. Superoxide dismutase and catalase activities were significantly higher in the CS+Mate group compared to the CS group. The ratio of reduced to oxidized glutathione was greater in the CS+Mate group than in the CS group. CS-induced emphysema in C57BL/6 mice was prevented by Mate in association with a reduction in inflammatory and oxidative stress parameters.

KEYWORDS cigarette smoke, emphysema, mate tea, oxidative stress

APÊNDICE I - Comprovante de publicação durante o período da tese (2009 - 2012) - 8

© Med Sci Monit, 2010; 16(7): BR218-226 PMID: 20581770

Received: 2010.01.19

Accepted: 2010.03.10 Published: 2010.07.01

Authors' Contribution:

D Data Interpretation E Manuscript Preparation F Literature Search

G Funds Collection

A Study Design

B Data Collection
 C Statistical Analysis

WWW.MEDSCIMONIT.COM

# Organ-related cigarette smoke-induced oxidative stress is strain-dependent

Carlos Romualdo Rueff-Barroso<sup>100303</sup>, Eduardo Tavares Lima Trajano<sup>1003</sup>, Jackson Nogueira Alves<sup>1033</sup>, Rojane Oliveira Paiva<sup>1003</sup>, Manuella Lanzetti<sup>100</sup>, Karla Maria Pereira Pires<sup>1003</sup>, Frank Silva Bezerra<sup>10038</sup>, Ricardo Aurino Pinho<sup>20038</sup>, Samuel Santos Valenca<sup>10038</sup>, Luis Cristóvão Porto<sup>10038</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Tissue Repair, Department of Histology and Embryology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil
<sup>2</sup> Exercise Biochemistry and Physiology Laboratory, Health Sciences Unit, Universidade do Extremo Sul

Exercise biochemistry and Physiology Laboratory, Health Sciences Unit, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Brazil

Source of support: This work was supported by grants from FAPERJ and CNPq. ML had a bursary from CAPES. SSV was supported by a Visiting Professor Program of UERJ



# APÊNDICE J - Capa de capítulo de livro escrito durante a tese

# ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética



Prezado professor Samuel dos Santos Valença

A Comissão de Ética com uso de animais em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado: "Investigação do Papel da elastase frente ao desequilibro redox estabelecido no processo inflamatório e no remodelamento tecidual em pulmão de camundongos", onde é previsto protocolo com utilização de animais, foi aprovado por esta comissão, sob número de referência DAHEICB 063.

Atenciosamente,

Marcos dias