



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

Eduardo Tavares Lima Trajano

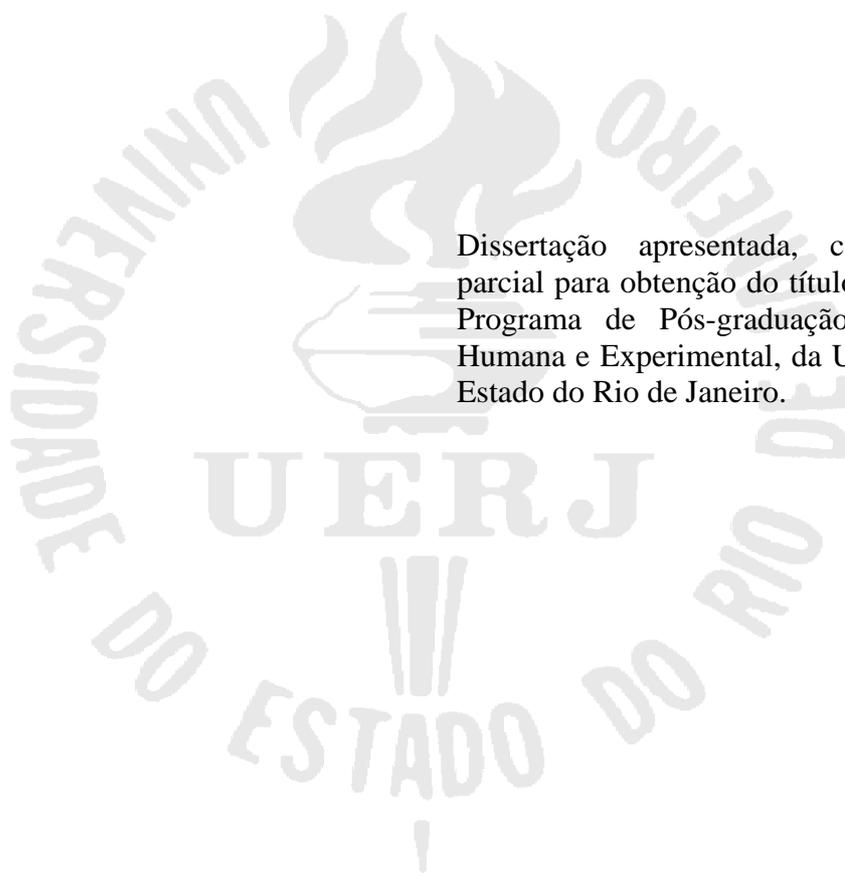
Participação do estresse oxidativo na lesão pulmonar induzida por lipopolissacarídeo: repercussões inflamatórias, estruturais e funcionais

Rio de Janeiro

2011

Eduardo Tavares Lima Trajano

**Participação do estresse oxidativo na lesão pulmonar induzida por lipopolissacarídeo:
repercussões inflamatórias, estruturais e funcionais**



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

Orientador: Prof. Dr. Luis Cristóvão de Moraes Sobrinho Porto

Coorientador: Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença

Rio de Janeiro

2011

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

T768 Trajano, Eduardo Tavares Lima.
Participação do estresse oxidativo na lesão pulmonar induzida por lipopolissacarídeo : repercussões estruturais, funcionais e inflamatórias / Eduardo Tavares Lima Trajano. - 2011.
56f. : il.

Orientador : Luís Cristóvão Porto.
Coorientador : Samuel dos Santos Valença.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Lesão pulmonar aguda - Teses. 2. Estresse oxidativo - Teses. 3. Inflamação - Teses. I. Porto, Luís Cristóvão. II. Valença, Samuel dos Santos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.24

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

Assinatura

Data

Eduardo Tavares Lima Trajano

**Participação do estresse oxidativo na lesão pulmonar induzida por lipopolissacarídeo:
repercussões inflamatórias, estruturais e funcionais**

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

Aprovada em 17 de fevereiro de 2011.

Coorientador:

Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^ª. Dra. Ângela de Castro Resende
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof. Dr. Rodrigo Tinoco Figueiredo
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Tavares e Elizonete; pelo esforço, dedicação, compreensão e acreditarem em mim, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem ele, nada seria possível e não estaríamos aqui reunidos, desfrutando, juntos, destes momentos que nos são tão importantes.

Aos meus pais Tavares e Elizonete; pelo esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Aos meus grandes amigos, Marco Aurélio e Jackson. Por estar sempre a meu lado apoiando nos bons e maus momentos.

A minha namorada Larissa, por sua compreensão; pelo apoio em todos os momentos desta importante etapa em minha vida.

Ao meu ex-professor Frank Silva Bezerra, que me iniciou no mundo da pesquisa no meu quinto período de faculdade quando entrei para a monitoria de Anatomia.

Aos meus professores orientadores, Samuel Santos Valença e Luis Cristóvão Porto que me possibilitaram estar realizando um dos meus sonhos, o mestrado e agora o doutorado.

A equipe do Laboratório Compartilhado (UFRJ) e Laboratório de Reparo Tecidual (UERJ), desde os alunos de iniciação científica aos de pós-doutorado. Sem eles nada disso seria possível.

Não tentes ser bem sucedido, tenta antes ser um homem de valor.

Albert Einstein

RESUMO

TRAJANO, Eduardo Tavares Lima. *Participação do estresse oxidativo na lesão pulmonar induzida por lipopolissacarídeo: repercussões inflamatórias estruturais e funcionais*. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O objetivo do presente estudo foi investigar o envolvimento do estresse oxidativo na lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e as repercussões inflamatórias, estruturais e funcionais, através de análises bioquímicas de estresse oxidativo, prova de função pulmonar, análise histológica e RT-PCR para citocinas e fatores de transcrição pró-inflamatórios. Na primeira etapa foram utilizados camundongos machos C57BL6 foram divididos em sete grupos: Grupo controle (CTR) (50 μ L de solução fisiológica) administrados via intratraqueal [it], LPS 6 horas (10 μ L de LPS) [it], LPS 12 horas (10 μ L de LPS) [it], LPS 24 horas (10 μ L de LPS) [i], LPS 48 horas (10 μ L de LPS). Para verificar que as alterações observadas eram estresse oxidativo dependentes camundongos machos C57BL6 foram pré-tratados com N-acetilcisteína (NAC) 1 hora antes do estímulo com LPS e sacrificados 24 horas depois do estímulo com LPS. Os animais foram divididos da seguinte forma: Grupo LPS 24 horas (10 μ L) [it], grupo NAC 40 mg/kg (gavagem) + LPS (10 μ L) [it] e grupo NAC 100 mg/kg (gavagem) + LPS (10 μ L) [it]. O sistema antioxidante enzimático protegeu o pulmão do estresse oxidativo nas primeiras 12 horas. O estresse oxidativo foi caracterizado em 24 horas e em 48 horas observou-se falência do sistema antioxidante enzimático. Parâmetros de função pulmonar se mostraram alterados nos grupo estimulados com LPS principalmente no grupo LPS. A elastância ($p < 0,001$), resistência de via aérea periférica (ΔP_2) ($p < 0,001$), resistência de via aérea central (ΔP_1) ($p < 0,001$) e resistência de via aérea total (ΔP_{tot}) ($p < 0,001$) se mostraram principalmente alteradas no grupo LPS 24 horas. O pré-tratamento com NAC impediu o aumento dos parâmetros de elastância ($p < 0,001$), resistência de via aérea periférica (ΔP_2) ($p < 0,001$) resistência de via aérea central (ΔP_1) ($p < 0,05$) e resistência de via aérea total (ΔP_{tot}) ($p < 0,001$) comparado com o grupo LPS 24 horas. As alterações histológicas como espessamento de septo alveolar, influxo de células inflamatórias e hemorragia mostraram-se tempo dependentes. O pré-tratamento NAC impediu as alterações observadas nos grupo estimulados com LPS. Alterações inflamatórias foram observadas no grupo estimulado com LPS como IL-6 ($p < 0,001$), iNOS ($p < 0,001$), COX2 ($p < 0,05$), TNF- α ($p < 0,001$) e NF κ B ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo controle. O pré-tratamento com NAC impediu o aumento desses parâmetros como IL-6 ($p < 0,001$), iNOS ($p < 0,001$), COX2 ($p < 0,05$), TNF- α ($p < 0,05$) e NF κ B ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo LPS 24 horas. Nossos resultados sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel importante nas respostas inflamatórias, estruturais e funcionais no modelo de LPA induzido por LPS e que essas alterações são estresse oxidativo dependentes.

Palavras-chave: Lipopolissacarídeo. Lesão pulmonar aguda. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the involvement of oxidative stress in acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS) and inflammatory effects, structural and functional, through biochemical analysis of oxidative stress, pulmonary function test, histological and RT-PCR for cytokines and transcription factors pro-inflammatory. In the first stage were used C57BL6 male mice were divided into seven groups: control group (CTR) (50 μ L saline) administered via intratracheal [it], LPS 6 hours (10 μ L of LPS) [it], LPS 12 hours (10 μ L of LPS) [it], LPS 24 hours (10 μ L of LPS) [it], LPS 48 hours (10 μ L of LPS). To confirm that the observed changes were dependent on oxidative stress in C57BL6 male mice were pretreated with N-acetylcysteine (NAC) 1 hours before stimulation with LPS and sacrificed 24 hours after stimulation with LPS. The animals were divided as follows: LPS group 24 hours (10 μ L) [it], NAC group 40 mg / kg (gavage) + LPS (10 μ L) [it] NAC group and 100 mg / kg (gavage) + LPS (10 μ L) [it]. The enzymatic antioxidant system protected the lungs against oxidative stress in the first 12 hours. Oxidative stress was characterized in 24 hours and 48 hours there was failure of the enzymatic antioxidant system. Pulmonary function parameters were shown in the altered group stimulated with LPS mainly in the LPS group. Elastance ($p < 0,001$), peripheral airway resistance (ΔP_2) ($p < 0,001$), central airway resistance (ΔP_1) ($p < 0,001$) and total airway resistance (ΔP_{tot}) ($p < 0,001$) if especially in the group showed altered LPS 24 hours. Pretreatment with NAC prevented the increase in elastance parameters ($p < 0,001$), peripheral airway resistance (ΔP_2) ($p < 0,001$) central airway resistance (ΔP_1) ($p < 0,05$) and resistance total airway (ΔP_{tot}) ($p < 0,001$) compared with the LPS group 24 hours. Histological changes such as thickening of alveolar septa, inflammatory cells and hemorrhage proved to be time dependent. The NAC pretreatment prevented the changes observed in the group stimulated with LPS. Inflammatory changes were observed in the group stimulated with LPS and IL-6 ($p < 0,001$), iNOS ($p < 0,001$), COX2 ($p < 0,05$), TNF- α ($p < 0,001$) and NF κ B ($p < 0,001$) compared with the control group. Pretreatment with NAC prevented the increase of these parameters as IL-6 ($p < 0,001$), iNOS ($p < 0,001$), COX2 ($p < 0,05$), TNF- α ($p < 0,05$) and NF κ B ($p < 0,001$) when compared with LPS 24 hours. Our results suggest that oxidative stress plays an important role in inflammatory responses, structural and functional model of ALI induced by LPS and that these changes are dependent oxidative stress.

Keywords: Lipopolysaccharide. Acute lung injury. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Esquema dos eventos que ocorrem na lesão pulmonar aguda.....	15
Figura 2.	Esquema da formação dos radicais livres.....	17
Figura 3.	Esquema da atuação dos antioxidantes sob os radicais livres.....	18
Figura 4.	Esquema caracterizando o estresse oxidativo.....	19
Figura 5	Esquema das principais fontes de EROS, formação dos radicais livres e atuação dos antioxidantes.....	20
Figura 6	Esquema do desenho experimental do modelo de LPA induzida por LPS.....	23
Figura 7.	Esquema do desenho experimental do pré-tratamento com NAC associado ao modelo de LPA por LPS.....	24
Figura 8.	Análise bioquímica da atividade da catalase no pulmão.....	29
Figura 9.	Análise bioquímica da atividade da superóxido-dismutase no pulmão.....	30
Figura 10.	Análise bioquímica da concentração de GSH no pulmão.....	30
Figura 11.	Análise bioquímica da concentração de malondialdeído no pulmão.....	31
Figura 12.	Análise bioquímica da concentração carbonilação de proteínas no pulmão.....	31
Figura 13.	Contagem de leucócitos no lavado broncoalveolar.....	32
Figura 14.	Contagem de neutrófilos no lavado broncoalveolar.....	33
Figura 15.	Contagem de macrófagos no lavado broncoalveolar.....	34
Figura 16.	Análise bioquímica da atividade da mieloperoxidase no pulmão.....	35
Figura 17.	Análise bioquímica da concentração de nitrito no pulmão.....	36
Figura 18.	Zimografia de metaloproteinase 2 no tecido pulmonar.....	36
Figura 19.	Análise da elastância do pulmão após modelo de LPA.....	37
Figura 20.	Análise da $\Delta P2$ do pulmão após modelo de LPA.....	37

Figura 21.	Análise da ΔP_{tot} do pulmão após modelo de LPA.....	38
Figura 22.	Análise da elastância do pulmão com pré-tratamento com NAC associado a LPA.....	39
Figura 23.	Análise da ΔP_{tot} do pulmão com pré-tratamento com NAC associado a LPA.....	39
Figura 24.	Análise da ΔP_2 do pulmão com pré-tratamento com NAC associado a LPA.....	40
Figura 25.	Análise da ΔP_1 do pulmão após modelo com pré-tratamento com NAC associado à LPA.....	40
Figura 26.	Análise histológica do pulmão (Hematoxila & Eosiona) após modelo de LPA.....	41
Figura 27.	Análise histológica do pulmão (Hematoxila & Eosiona) com pré-tratamento com NAC associado a LPA.....	42
Figura 28.	Análise de IL-6 por RT-PCR com pré-tratamento com NAC associado a LPA.....	43
Figura 29.	Análise de iNOS por RT-PCR com pré-tratamento com NAC associado a LPA.....	43
Figura 30.	Análise de COX2 por RT-PCR com pré-tratamento com NAC associado a LPA.....	44
Figura 31.	Análise de TNF- α por RT-PCR com pré-tratamento com NAC associado a LPA.....	44
Figura 32.	Análise de NF κ B por RT-PCR com pré-tratamento com NAC associado a LPA.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
ANOVA	Análise de variância
CAT	Catalase
CuZnSOD	Superóxido dismutase cobre/zinco
LPA	Lesão pulmonar aguda
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EcSOD	Superóxido dismutase extracelular
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
H	Hidrogênio
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
LBA	Lavado Bronco-Alveolar
MMPs	Metaloproteinase de matriz
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2
MnSOD	Superóxido Dismutase Manganês
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NO	Óxido Nítrico
O₂[°]	Ânion superóxido
OH[°]	Radical hidroxil
NFκB	Fator nuclear kappa B
COX2	Ciclooxigenase-2
iNOS	Óxido nítrico induzida
LPS	Lipopolissacarídeo
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteases

TNF-α	Fator de necrose tumoral – α
XO	Xantina oxidase
$\Delta P1$	Resistência de via aérea central
$\Delta P1$	Resistência de via aérea periférica
ΔP_{tot}	Resistência de via aérea total
GSH-Rd	Glutationa-redutase
HO₂	Hidroperoxila
TRL4	Toll-like 4
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 β
MDA	Malondialdeído
CTR	Controle

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1 OBJETIVOS	22
1.1 Objetivos gerais	22
1.2 Objetivos específicos	22
2 MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1 Animais	23
2.2 Desenho experimental	23
2.3 Lavado broncoalveolar	24
2.4 Superóxido dismutase, catalase e glutathiona reduzida	24
2.5 TBARS e carbonil	25
2.6 Ensaio de nitrito	25
2.7 Ensaio de mieloperoxidase	25
2.8 Perfil histológico do pulmão	25
2.9 Zimografia	26
2.10 Função pulmonar	26
2.11 RT-PCR	27
2.12 Estatística	28
3 RESULTADOS	29
3.1 Análises de estresse oxidativo	29
3.2 Análise de dano oxidativo	31
3.3 Contagem de células no BAL	32
3.4 Ensaio de mieloperoxidase	34
3.5 Ensaio de nitrito	35
3.6 Zimografia	35
3.7 Função pulmonar	35
3.8 Histologia	40
3.8 RT-PCR	41
4 DISCUSSÃO	45
5 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO A - Comitê de ética	53

INTRODUÇÃO

Desde a primeira descrição da Síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) há mais de 30 anos, cientistas têm buscado esclarecer os mecanismos que participam da patogênese da lesão pulmonar aguda (LPA) com o objetivo de desenvolver estratégias terapêuticas e novas drogas para estes pacientes. Agentes infecciosos (bactérias gram-negativas) levam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Há poucas evidências experimentais que suportam o papel de oxidantes e injúria oxidativa na patogênese da LPA.

A dissertação está organizada da seguinte forma: Introdução, objetivos, materiais e métodos, resultados, discussão, conclusão e por fim as referências.

Epidemiologia

A LPA é um grave problema de saúde pública, apresentado uma mortalidade que pode variar de 30 a 90% [Johnson 2010]. Pacientes com LPA e sua condição mais grave, a SARA, geram altos custos, pois uma importante parcela desses pacientes necessita de suporte ventilatório avançado, o que eleva ainda mais o custo do tratamento desses pacientes [Johnson 2010].

Apesar disso, alguns estudos mostram que a mortalidade da LPA/SARA vem diminuindo [MacCallum 2005]. Um estudo americano investigou pacientes acima de 15 anos de idade em 21 hospitais no período de 1999 a 2000 e concluíram que a incidência da LPA era de 86,2 por cada 100 mil habitantes [Frutos 2006]. Já os estudos retrospectivos selecionaram 34 pacientes elegíveis para LPA e que necessitaram de ventilação mecânica no período de 1996 a 2005. Outro estudo mostrou que no período de 2004-2005 a mortalidade caiu de 35% para 26%. [Rubinfeld 2007].

Segundo critérios do Consenso Americano-Europeu, no período de 1999 a 2000. A mortalidade para LPA foi de 44% e SARA 46,7%. A grande maioria dos estudos aponta queda na mortalidade dos pacientes com LPA/SDRA possivelmente pela melhoria no entendimento da patologia e medidas de suporte como a ventilação mecânica.

Lesão pulmonar aguda

A lesão pulmonar aguda (LPA) é o termo usado para descrever a resposta pulmonar a injúria que ocorre diretamente nos pulmões ou como consequência da lesão ou inflamação em outros locais do organismo. A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) representa o evento final mais grave do espectro desta condição no qual é amplo o processo inflamatório

nos pulmões e que geralmente é acompanhada por uma agressiva fibrose [Frutos-Vivar 2006].

Pacientes com lesão pulmonar aguda (LPA) ou síndrome do desconforto respiratório agudo (SARA) são influenciados por diversos fatores. Um dos mais importantes mecanismos que determinam a gravidade da lesão pulmonar é a magnitude da lesão à barreira epitélio alveolar [Matuschak 2010]. A possibilidade de reparo da lesão epitelial no estágio inicial é o maior determinante da recuperação. Tratamentos específicos para acelerar o reparo epitelial não existem. A maioria das modalidades de tratamentos testados recentemente é baseada na diminuição da resposta inflamatória dos pulmões no sentido de minimizar a lesão inicial [Perl 2009].

No aspecto pulmonar, dois componentes distintos constituem a barreira alvéolo capilar: o endotélio microvascular e o epitélio alveolar. Para a normalidade da função pulmonar, há necessidade de alvéolos intimamente associados a capilares adequadamente perfundidos [Manicone 2009]. O capilar pulmonar normal apresenta endotélio seletivamente permeável, onde as proteínas permanecem no intravascular, enquanto os fluídos atravessam as membranas como resultado do balanço entre as forças hidrostáticas e gradientes oncóticos [Chacko 2009]. O equilíbrio entre essas forças permite, habitualmente, que pequenas quantidades de proteínas extravasem para o espaço intersticial pulmonar [Ahmed 2009]. Porém existem três mecanismos para impedir a formação de edema intersticial: proteínas intravasculares mantêm gradiente osmótico favorável à reabsorção de líquido; os linfáticos intersticiais podem drenar grande quantidade de líquido para a circulação, junções intercelulares firmes, entre as células epiteliais alveolares, previnem o enchimento dos espaços aéreos [Eckle 2009].

Os pulmões são particularmente vulneráveis a lesões inflamatórias, porque os mediadores são liberados na circulação e os pulmões recebem a totalidade do débito cardíaco [Gordo-Vidal 2009]. Como consequência, os neutrófilos são atraídos, tornam-se ativados liberando mediadores inflamatórios, como oxidantes e proteases que lesam diretamente o epitélio alveolar e o endotélio vascular, propagando o processo inflamatório [Bauer 2009]. Desse modo, as barreiras habitualmente responsáveis por impedir o edema alveolar são perdidas, havendo escape de proteínas do espaço intravascular em direção ao espaço intersticial, edema intersticial e alveolar. O influxo de líquido rico em proteínas para o interior dos alvéolos altera a integridade do surfactante pulmonar, com lesão adicional ao tecido pulmonar e colapso alveolar [Maybauer 2009] [figura1].

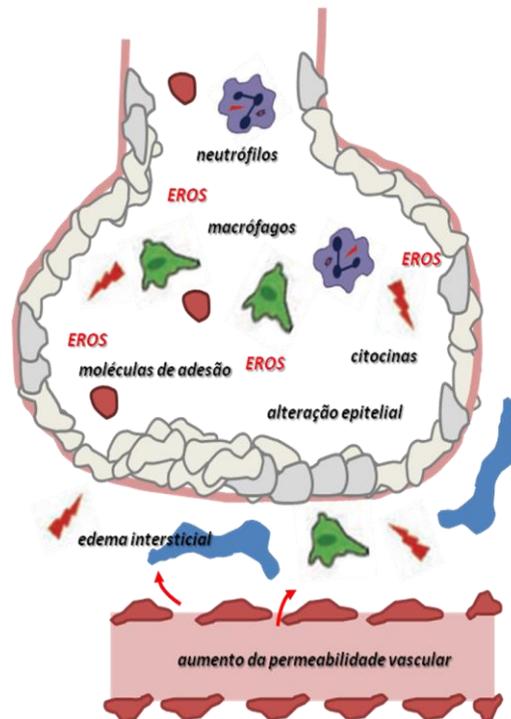


Figura 1 - Esquema dos eventos que ocorrem na lesão pulmonar aguda. Imagem de própria autoria.

Citocinas e pulmão

Citocinas inflamatórias têm um papel crucial no processo inflamatório pulmonar, que parecem determinar a natureza da resposta inflamatória, orientando o recrutamento seletivo e ativação de células inflamatórias dentro dos pulmões [D'Alessio 2009]. Em estudos *in vitro*, utilizando macrófagos alveolares mostraram causar a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- α após estímulo com LPS. O estresse oxidativo gerado pelo epitélio das vias aéreas e macrófagos alveolares também podem induzir o aumento de citocinas como TNF- α , que, por sua vez, pode ativar as células epiteliais das vias aéreas para ativar citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, COX2, iNOS e NF κ B [Tsushima 2009].

Os genes do processo inflamatório são regulados por fatores de transcrição como NF κ B e AP-1 (ativador de proteína 1). A acetilação das histonas tem sido associada com a transcrição de uma série de mediadores inflamatórios, incluindo, IL-8, a eotaxina, IL-1 β , MIP-2 e IL-6. A acetilação ocorre especificamente nos locais promotores destes genes, como mostrado por ensaios de imunoprecipitação de cromatina de IL-8 [Liu 2009].

A via de sinalização NF κ B foi descrita inicialmente há mais de 20 anos (Pasparakis 2009). Em seu modelo clássico, NF κ B se encontra no citoplasma inativo associado a uma proteína I κ B formando um complexo inativo [Gong 2009]. Em resposta a um estímulo

celular, I κ B é fosforilado por I κ B quinase, I κ B se solta do complexo e é degradado pelo proteossoma 26S e NF κ B se transloca para o núcleo da célula para ativar a transcrição gênica e dar início a uma cascata de eventos inflamatórios como ativação de citocinas como IL-6, KC e TNF- α e recrutando células inflamatórias. Hoje se sabe que a cascata de sinalização de NF κ B é bem mais complexa que o modelo clássico. Esta complexidade e diversidade são evidentes em vários níveis, começando com a existência de vários membros da família NF κ B. Estudos sugerem que as EROS possam agir no processo de fosforilação com complexo inativo de NF κ B em algumas das diferentes famílias de I κ B intensificando a resposta imunológica [Chopra 2009].

Modelos experimentais

Modelos animais são importantes porque fornecem uma ponte entre o paciente e a bancada do laboratório. Hipóteses geradas em estudos humanos podem ser testadas diretamente em modelos animais e os resultados *in vitro* podem ser testados em modelos animais *in vivo* para avaliar sua relevância [Redl 1993].

Modelos animais de LPA podem reproduzir os mecanismos e consequências da lesão pulmonar em humanos, incluindo mudanças fisiológicas e patológicas que ocorrem. Devido à resposta dos pulmões a injúria mudarem com o tempo, a evolução e o reparo também podem ser reproduzidos no modelo, ainda que seja em um curto período de tempo. Nos últimos anos a reprodução de modelos de LPA tem se utilizado a administração de LPS [Soda 2010].

Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS) é composto de uma bicamada lipídica (lipídeo A) que pode ser tetra, penta, hexa ou heptacilado e está ligado em uma cadeia de dissacarídeo fosforilado, isso forma o lipídeo A. O lipídeo A está ligado a uma região polissacarídica conservada, o core, seguida de uma cadeia extremamente variável de bactéria, o antígeno O, que define o sorotipo do LPS. A administração intratraqueal de LPS é acompanhada por um aumento de polimorfonucleares no espaço aéreo [Piazza 2010].

O LPS é utilizado com o modelo para estudar os efeitos da bactéria gram-negativa tanto em animais quanto em humanos. O LPS é facilmente administrado e os resultados tendem ser reproduzidos em experimentos [Bowyer 2010]. LPS é um potente ativador da resposta inata imune via receptor Toll like 4 (TRL4) e tem pouca toxicidade direta às células *in vitro*. O uso de LPS fornece informações sobre os efeitos da resposta inflamatória no hospedeiro, que sofre com a infecção bacteriana. O LPS já foi administrado via intravenosa e intratraqueal em

humanos que teve como resultados inflamação sistêmica [Sharma 2010]. A utilização de LPS pode evoluir para LPA e necessitar de suporte ventilatório devido à falência respiratória, uma das características importantes desta patologia [Zhao 2010].

Radical livre

O termo radical livre refere-se a átomos ou moléculas altamente reativos, que apresentem um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas [Weissmann 2010]. Os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução, ou seja, ou cede o elétron solitário, oxidando-se, ou recebe outro, reduzindo-se. Portanto, os radicais livres ou provocam ou resultam dessas reações de óxido-redução [Magder 2006] [figura2].

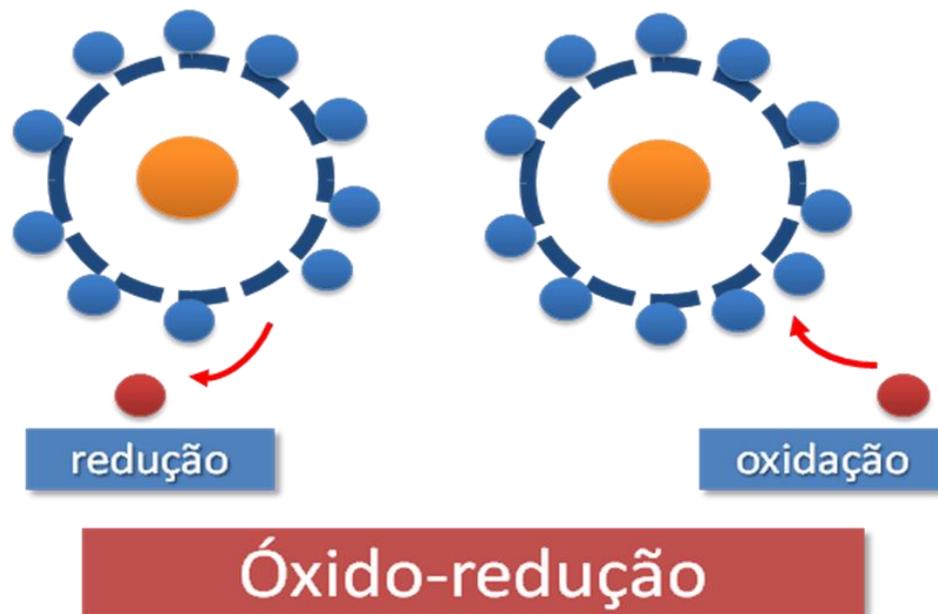


Figura 2; Esquema da formação dos radicais livres. Imagem de própria autoria

O termo radical livre não é o ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, como o H_2O_2 , que atua como um substrato [Kostikas 2003]. Como em sua maioria é derivado do metabolismo do O_2 , o termo mais correto é “espécies reativas de oxigênio” (EROS) para referirmo-nos a eles [Loukides 2011].

EROS são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2° (ânion superóxido) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O [Aitken 2008]. Durante esse

processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila ($HO_2\cdot$) e hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [Buffenstein 2008].

Sistema de defesa antioxidante (oxidação e redução)

Em situações patológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de O_2 e produção de EROS. Para se proteger destas EROS, as células possuem um sistema de defesa antioxidante que pode atuar em duas linhas [Tsang 2009]. Uma delas atua como detoxificadora antes que as EROS cause lesão. Esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GPx) e vitamina E (α -tocoferol). A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px entre outros [Bhardwaj 2008] [figura 3].

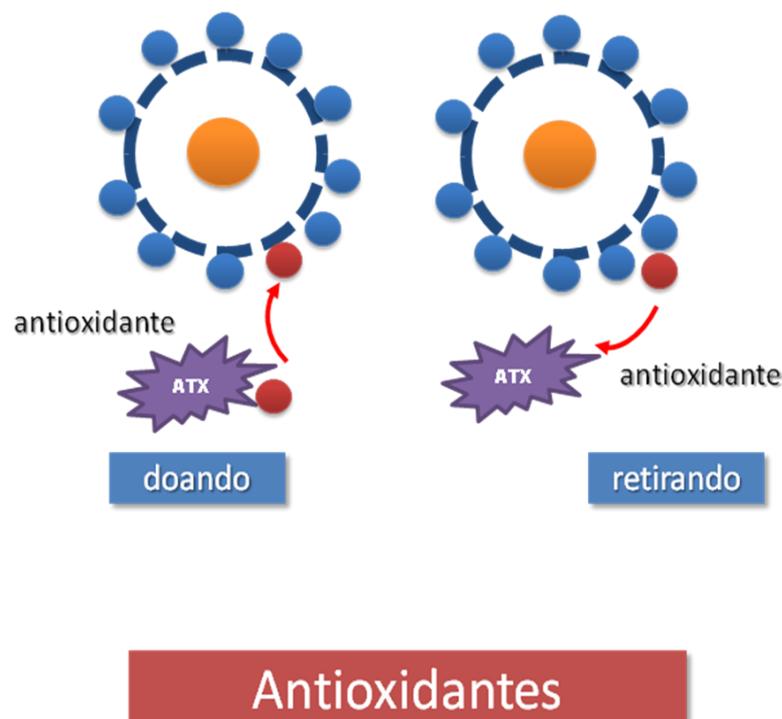


Figura 3; Esquema da atuação dos antioxidantes sob os radicais livres. Imagem de própria autoria.

Estresse oxidativo

Em condições fisiológicas, EROS estão presente em todos os sistemas biológicos, havendo um equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Em condições patológicas, por exemplo, na LPA, ocorre uma situação onde há uma produção excessiva de EROS. Para restabelecer o equilíbrio e impedir os efeitos negativos do mesmo, o organismo dispõe de um

sistema antioxidante. Nas situações de desequilíbrio entre os sistemas pró- e antioxidantes, com predomínio dos oxidantes, é caracterizado o estresse oxidativo [Mendes 2009].

O estresse oxidativo leva a lesões biológicas como peroxidação de lipídeos, dano de DNA e a carbonilação de proteínas. Além de a própria lesão levar a produção de EROS, as células inflamatórias que serão recrutadas para o local da lesão, principalmente neutrófilos, também são uma fonte importante de EROS. Dessa forma, o estresse oxidativo se torna um “ciclo vicioso” [Singh 2009] [figura 4].

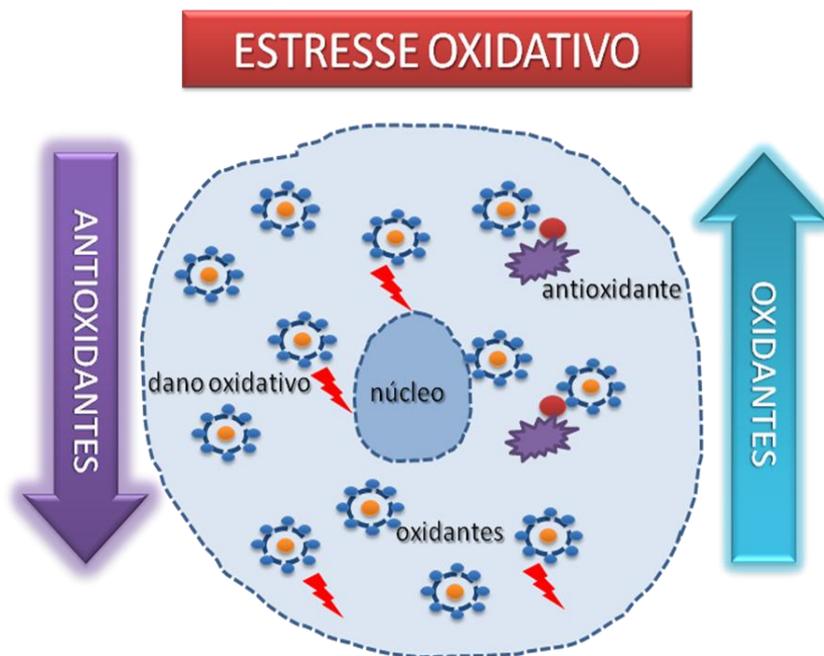


Figura 4; Esquema caracterizando o estresse oxidativo. Imagem de própria autoria.

Oxidantes e lesão pulmonar

No contexto da LPA, há muitas potenciais fontes de EROS, incluindo leucócitos residentes (neutrófilos, monócitos e macrófagos), células do parênquima (células endoteliais, epiteliais, fibroblastos e miócitos), enzimas circulantes gerando oxidantes (xantina oxidase), e dos gases inalados com altas concentrações de O_2 que são frequentemente utilizados durante a ventilação mecânica [Ward 2011]. Para neutralizar os radicais livres e neutralizar os efeitos negativos das EROS gerados durante o metabolismo normal, células expressam uma série de antioxidantes endógenos, como SOD, catalase e GPx. No entanto, estes antioxidantes são rapidamente sobrecarregados durante uma resposta inflamatória aguda [Cross 2004].

Fontes de oxidantes

Leucócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos, são geralmente considerados como a maior fonte geradora de EROS. Leucócitos expressam duas enzimas sistemas, a NADPH (fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) oxidase e óxido nítrico sintases (NOS) que são precursores de EROS [Roberts 2003]. Diversos compostos pró-inflamatórias, incluindo LPS, citocinas, quimiocinas, fragmentos de coagulação, e mediadores lipídicos que são elevados em pacientes com LPA, são responsáveis pela ativação de neutrófilos para gerar EROS. É também evidente que, além dos neutrófilos, endotélio, epitélio, fibroblastos, e células musculares lisas expressam oxidases capazes de gerar fisiologicamente quantidades importantes de EROS [Chow 2003]. Outras fontes de EROS incluem o transporte de elétrons mitocondrial oxidase em cadeia, citocromo P450, e xantina. Finalmente, oxidantes inalados, incluindo concentrações elevadas de oxigênio utilizado na ventilação mecânica podem contribuir a formação de EROS [Yang 2003] [figura5].

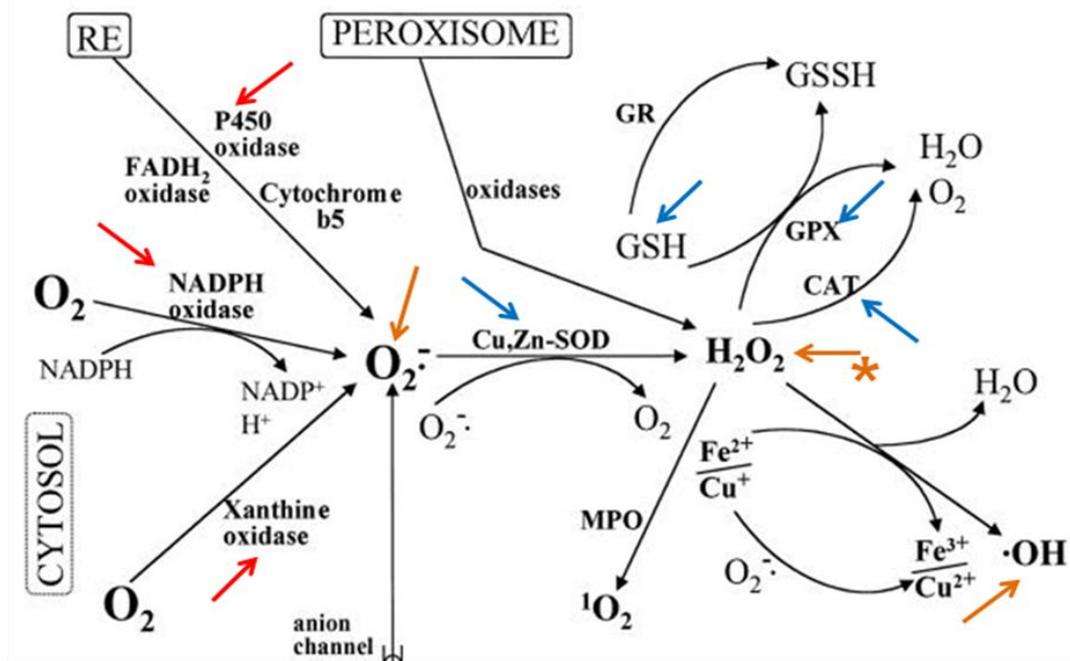


Figura 5; Esquema das principais fontes de EROS (setas em vermelho), formação dos radicais livres (setas em laranja) e atuação dos antioxidantes (setas em azul). A seta em laranja com asterisco indica o peróxido de hidrogênio como substrato para formação de outro radical e não como um radical livre.

N-acetilcisteína (NAC)

A N-acetilcisteína é um dos antioxidantes mais utilizados nos estudos que investigam a associação do estresse oxidativo com diversas doenças. A NAC, um derivado acetilado da cisteína, tem mostrado melhor biodistribuição e metabolismo hepático, sendo um método

viável de reabastecimento da GSH por via oral [Geudens 2007]. Modelos animais confirmaram a hipótese de que a NAC protege contra a depleção de GSH [Davreux 1997].

É bem conhecida como precursora artificial de glutatona e utilizada clinicamente como droga mucolítica e no tratamento da intoxicação por paracetamol, com raros efeitos adversos. NAC é um scavenger de H_2O_2 , ácido hipocloroso e radical hidroxila e por estas ações inibe a liberação de $TNF-\alpha$, a ativação de citocinas pró-inflamatórias e apoptose celular [Bridgeman 1994]. As evidências sugerem que a expressão do gene $TNF-\alpha$ é controlada pela transcrição do $NF\kappa B$, cuja atividade pode ser induzida pelo H_2O_2 . NAC mostrou inibir a atividade do $NF\kappa B$ em várias linhagens celulares, inclusive em macrófagos peritoneais de ratos. O H_2O_2 diretamente ou indiretamente através de sua redução a radical hidroxila via reação de Fenton, age como mensageiro na síntese e ativação de mediadores inflamatórios. NAC como scavenger destes radicais mostrou inibir a liberação destes mediadores [Berend 2006].

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Caracterizar o estresse oxidativo na lesão pulmonar induzido por lipopolissacarídeo em modelo murino e investigar as repercussões estruturais, funcionais e inflamatórias.

1.2 Objetivos específicos

- Investigar o perfil oxidativo do pulmão através de ensaios para estresse oxidativo (catalase, superóxido dismutase, glutathiona reduzida, mieloperoxidase) e dano oxidativo (malondialdeído e carbonilação de proteínas);
- Investigar as alterações funcionais do pulmão através da ventilação mecânica após modelo de LPA e modelo de pré-tratamento com NAC;
- Investigar as estruturais do parênquima pulmonar através da histologia (Hematoxilina & Eosina) após modelo de LPA e modelo de pré-tratamento com NAC;
- Investigar o perfil inflamatório de transcrição de fatores de transcrição e citocinas envolvidas na inflamação como NFκB, IL-6, COX2, TNF-α e iNOS, através de RT-PCR após modelo de LPA e modelo de pré-tratamento com NAC;
- Investigar a atividade gelatinolítica da protease MMP-2 e 9, envolvida no processo de remodelamento da LPA, através da zimografia;

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL6 de 10 semanas, acondicionados, em grupos de 5 animais por caixa, no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia (UERJ) com temperatura e umidade controladas ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$, $50\pm 10\%$, respectivamente), submetidos aos ciclos invertidos claro/escuro de 12 h (luzes artificiais, 19:00-07:00h) e exaustão 15 min/h. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

2.2 Desenho experimental

Na primeira etapa (sem tratamento), foram utilizados 108 camundongos. Os animais foram anestesiados com sevoflurano (inalação), uma incisão foi feita para a exposição da traquéia, em seguida, uma solução de LPS ($10\mu\text{g}$ de LPS dissolvido em 50 uL de soro fisiológico) foi injetado com uma agulha de insulina ou o mesmo volume total de solução salina na grupo controle (CTR). Os animais foram sacrificados 6, 12, 24 e 48 horas após o estímulo com LPS ou [Figura 6] salina. Na segunda etapa (tratado), foram utilizados 60 camundongos machos C57BL6. Os animais foram pré-tratados com N-Acetilcisteína (NAC) (gavagem) 1 h antes do estímulo com LPS e sacrificados 24 horas depois. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: CTR (salinas), LPS ($10\mu\text{g}$ de LPS dissolvido em 50 uL de soro fisiológico), LPS NAC + 40 ($10\mu\text{g}$ de LPS NAC + 40 mg/kg) e LPS + NAC 100 ($10\mu\text{g}$ de LPS + NAC 100 mg/kg) [Figura 7].

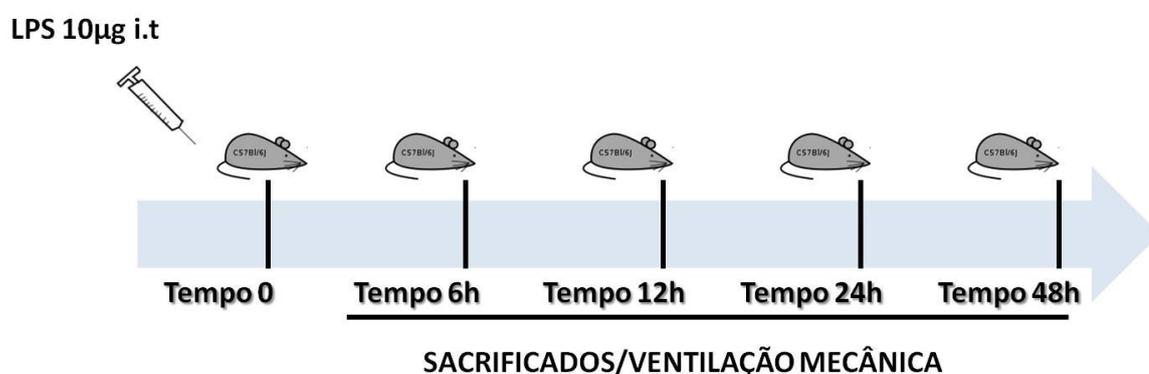


Figura 6; Esquema do desenho experimental do modelo de LPA induzida por LPS. Imagem de própria autoria.

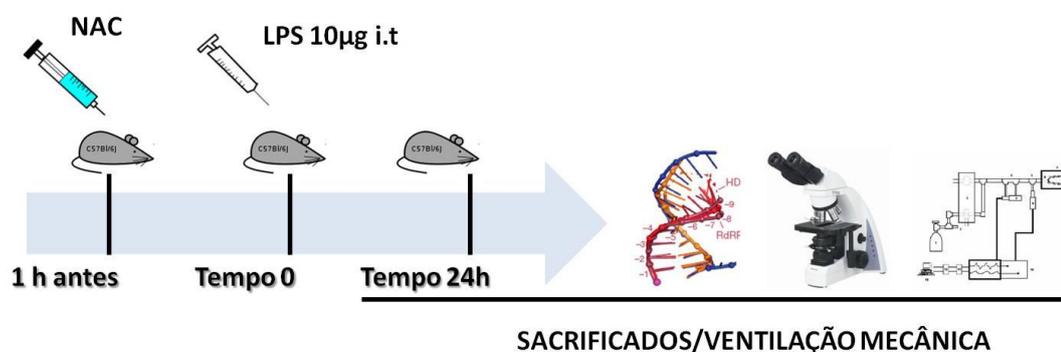


Figura 7; Esquema do desenho experimental do pré-tratamento com NAC associado ao modelo de LPA por LPS. Imagem de própria autoria.

2.3 Lavado broncoalveolar (BAL)

Para observar o perfil de células inflamatórias foi realizado um BAL, canulando-se a traquéia do animal e lavando com 1,5 mL de solução salina os pulmões do animal. Após obtenção do total de células por camundongo, um kit de coloração para leucócitos será utilizado nas lâminas cito-centrifugadas e um total de 200 células por lâmina foi analisado como contagem diferencial [Valença 2009].

2.4 Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) E glutathiona reduzida (GSH)

Alíquotas de homogeneizados pulmonares foram utilizadas nos ensaios bioquímicos para parâmetros de estresse oxidativo por métodos de espectrofotometria. A concentração de catalase (CAT) produzida pelas células foi mensurada em resposta a quantidade de H_2O_2 administrado durante a análise e foi lida em um comprimento de onda de 240 nm [Aebi 1984]. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi estimada através da inibição da auto-oxidação da adrenalina e lida em um comprimento de onda de 480 nm [Bannister 1987]. A atividade de GSH foi medida baseada na reação com 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), que produz o 2-nitro-5-tiobenzoate (TNB) cromóforo. A taxa de formação de TNB, medido em 412 nm, é proporcional à concentração de GSH na amostra. A concentração de uma amostra desconhecida é determinada pelo cálculo da equação linear ou a curva de regressão gerada a partir de várias normas de GSH. O resultado final é apresentado como

GSH (nM / mg de proteína). O teor de proteína total em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford [Bradford 1976].

2.5 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e carbonilação de proteínas

Como índice de peroxidação lipídica foi utilizado o TBARS durante uma reacção ácido-aquecimento como descrito por Draper e Hadley [Draper 1990]. TBARS foram determinadas por absorbância a 535 nm e foram expressos como equivalentes de malondialdeído (MDA nM/mg de proteína). O dano oxidativo das proteínas foi avaliada pela determinação de grupos carbonil baseados na reacção com dinitrophenylhydrazine (DNPH), como descrito anteriormente por Levine et al. O conteúdo de carbonilação de proteína foi determinada com a absorvância a 370 nm usando um coeficiente de absorção molar de 220.000 M⁻¹ e foram expressos como derivados carbonílicos (carbonila nM / mg de proteína) [Levine 1990].

2.6 Ensaio de nitrito

Níveis de nitrito na LBA foram determinados por um método baseado na reacção de Griess. Um total de 100 µL de amostra foi misturada com 100 µL do reagente de Griess (sulfanilamida 1% em 5% de ácido fosfórico e água dihydrochloridein naphthylenediamide 0,1%) e incubadas em temperatura ambiente por 10 min seguido por leitura da absorvância a 550 nm (Bio-Rad Microplaca Reader modelo 680, CA, EUA). Concentrações de nitrito nas amostras foram determinadas a partir de uma curva padrão gerada por diferentes concentrações de nitrito de sódio [Green 1982].

2.7 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

As alterações inflamatórias foram examinados pela atividade de MPO no sobrenadante de homogeneizados de pulmão. Absorvâncias foram determinadas a 655 nm usando um leitor de placa (modelo 550, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) [Kuebler 1996].

2.8 Perfil histológico do pulmão

O pulmão esquerdo será fixado com formalina tamponada (10%). Após toracotomia, o pulmão será removido e imerso em solução fixadora, processado e incluído de modo a se obter fragmentos do ápice, terço médio e base. Cortes de 5 μm serão corados em Hematoxilina & Eosina para a análise histopatológica [Valença 2004].

2.9 Zimografia

Alíquotas de homogeneizados de pulmão (50 mg de proteína) foram submetidas à eletroforese em acrilamida do gel de empilhamento a 4% / 8% de acrilamida separando gel contendo 1 mg / mL de gelatina na presença de dodecilsulfato de sódio sob condições não redutoras. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes com 2,5% Triton X-100, lavados com água e incubadas a 37 ° C durante a noite em 50 mM Tris-HCl, 5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, e 2 mM ZnCl_2 , pH 8,4. Os géis foram corados com Coomassie Blue 0,25% e descorados em solução de etanol a 50%, ácido acético 10% e 40% de água destilada. Atividades gelatinase apareceu como bandas claras contra um fundo azul. O peso molecular da banda gelatinolítica foi estimada a partir de uma amostra da placenta (50 mg de proteína) (Pan 2010).

2.10 Função pulmonar

Os animais foram sedados com diazepam (1 mg i.p.) e anestesiados com pentobarbital sódico (20 mg/kg de peso i.p.). A traquéia foi canulada e os animais paralisados (brometo de pancurônio, 1.3 mg. kg^{-1} i.p.) e ventilados com uma frequência de 100 ciclos por minuto, fluxo ventilatório constante de 10 ml/s e volume corrente de 2 ml por meio de um ventilador artificial (Samay VR15). Um pneumotacógrafo foi conectado à cânula traqueal para as mensurações de fluxo respiratório. Foi determinada através de um transdutor de pressão referencial, pneumotacógrafo (Voldyne MP45-2), a gradiente de pressão e a pressão transpulmonar. A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração que permite analisar separadamente os componentes elástico, viscoso e viscoelástico do sistema respiratório (Burburan 2007).

A resistência do pulmão (ΔP_1) e viscoelástico / heterogêneos (ΔP_2), assim como queda de pressão total após a interrupção do fluxo ($\Delta P_{\text{tot}} = \Delta P_1 + \Delta P_2$), pulmão estática (Est) e dinâmica (Edyn) elastâncias, bem como ΔE (Edyn - EST) foram calculada pelo método da

oclusão ao final. $\Delta P1$ seletivamente reflete a resistência das vias aéreas e $\Delta P2$ reflete relaxamento da tensão, ou propriedades viscoelásticas do pulmão. Mecânica pulmonar foram medidos 10-15 vezes em cada animal [Faffe 2000].

2.11 RT-PCR para citocinas inflamatórias

RNA total foi isolado utilizando RNeasy kit tecido ® (QIAGEN). O DNA de fita simples foi sintetizada a partir de um kit de cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. PCR quantitativa foi realizada através de um 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e o número de ciclos foi determinado utilizando RQ Estudo Software (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em triplicata. A mistura de reação 50 μ L foi preparada como segue: 25 μ L de Platinum ® SYBR Green PCR quantitativa Supermix-UDG (Invitrogen™ Life Technologies, Alameda, CA, EUA), 10 mM de cada primer (Tabela 1) e 10 μ L de cDNA (100 ng). As reações dos ciclos com UDG recebeu um tratamento preliminar por 2 min a 50 ° C e uma desnaturação de 2 min a 95 ° C, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95 ° C por 15 s, anelamento por 15 s, e primer extensão a 72 ° C por 15 s. Este foi seguido por análise de ponto de fusão da dupla amplicons enalchado composto de 40 ciclos de decremento de 1 ° C (15 s cada), começando a 95 ° C. A primeira derivada desta trama, dF / dT é a taxa de variação da fluorescência da reação, e uma mudança significativa na fluorescência acompanha a curva de fusão dos produtos do PCR. O TNF- α (*Sense* TAGCCAGGAGGGAGAACAGA *Antisense* TTTTCTGGAGGGAGATGTGG), IL-6 (*Sense* CCGGAGAGGAGACTTCACAG *Antisense* TCCACGATTTCCCAGAGAAC), iNOS (*Sense* TGGTGGTGACAAGCACATTT *Antisense* AAGGCCAAACACAGCATACC), COX-2 (*Sense* GGCCATGGAGTGGACTTAAA *Antisense* CTCTCCACCGATGACCTGAT) e NF κ B expressão (*Sense* AGCTCAATCTCCCTGGGACTT *Antisense* AGCTCAATCTCCCTGGGACTT) foram examinados e normalizado para um gene constitutivo (β -actina), e calculado de acordo com a fórmula 2 ($-\Delta\Delta Ct$) [Livak 1995].

2.12 Estatística

Os dados foram expressos como média \pm SEM e analisados estatisticamente por ANOVA com pós-teste de Bonferroni, considerando $p < 0,05$ diferença significativa. GraphPad Prism 5 foi utilizado o software de análise estatística (GraphPad Prism versão 5.0, em San Diego, CA, EUA).

3 RESULTADOS

3.1 Análises de estresse oxidativo

A atividade da catalase no grupo LPS 6 horas se apresentou aumentada ($p < 0,001$) e diminuída no grupo LPS 24 horas ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo CTR [figura 8]. A SOD se apresentou aumentada nos grupos LPS 6 horas ($p < 0,05$), LPS 12 horas ($p < 0,05$), LPS 24 horas ($p < 0,001$) e LPS 48 horas ($p < 0,01$) quando comparados ao grupo CTR [figura 9]. A GSH se apresentou diminuída do grupo LPS 6 horas ($p < 0,05$) e aumentada no grupo LPS 24 horas ($p < 0,001$) quando comparadas ao grupo CTR [figura 10].

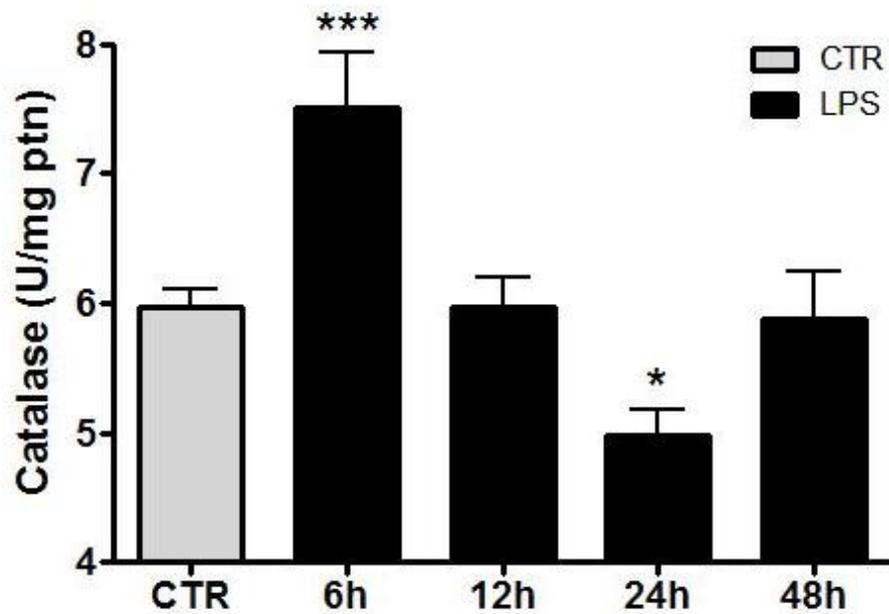


Figura 8- Análise bioquímica da atividade da catalase no pulmão Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

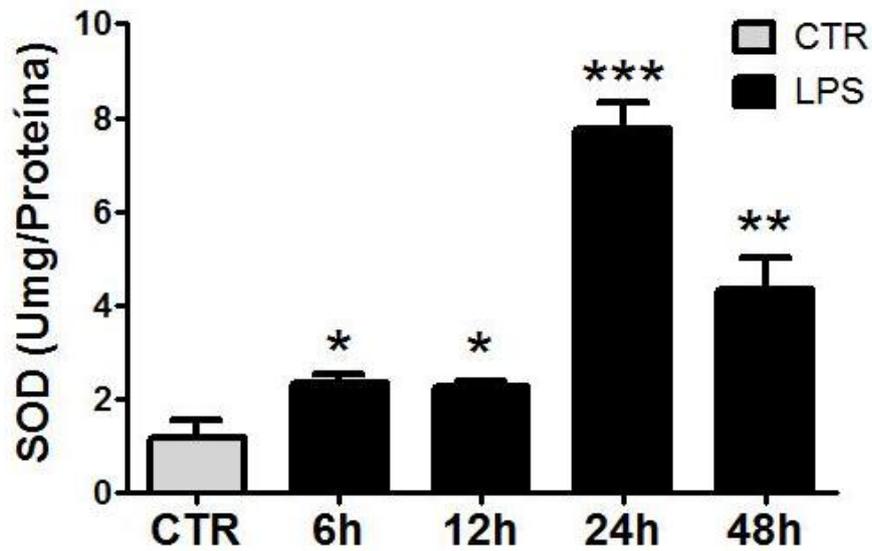


Figura 9- Análise bioquímica da atividade da superóxido-dismutase no pulmão. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

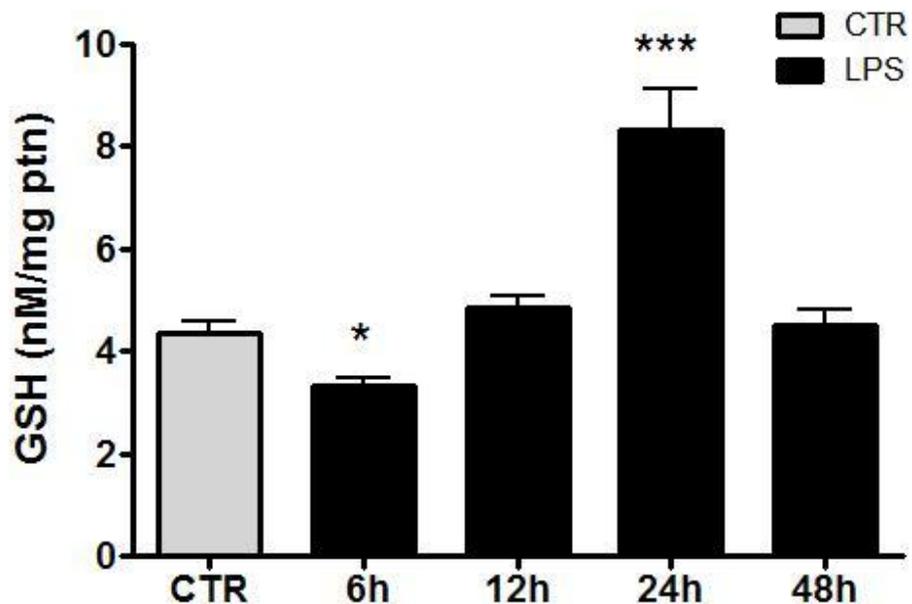


Figura 10- Análise bioquímica da concentração de GSH no pulmão. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

3.2 Análises do dano oxidativo

O MDA se apresentou diminuído no grupo LPS 6 horas ($p < 0,05$) e aumento nos grupos LPS 24 horas ($p < 0,001$) e 48 horas ($p < 0,05$) em quando comparados ao CTR [figura 11]. Os níveis de carbonilação de proteínas, se apresentaram diminuídos nos grupos LPS 6 e 12 horas e aumentos nos grupos LPS 24 horas ($p < 0,001$) e LPS 48 horas ($p < 0,01$) quando comparados ao grupo CTR [figura 12].

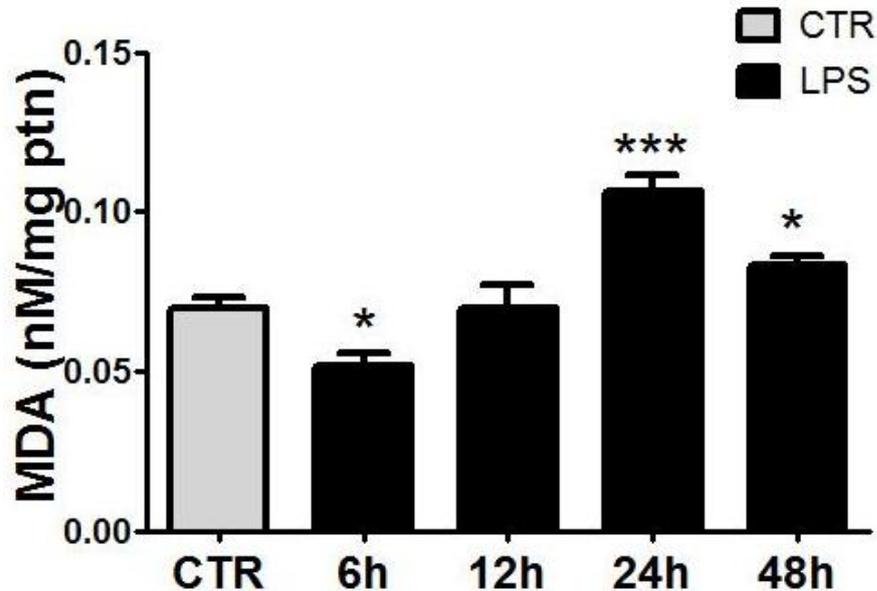


Figura 11- Análise bioquímica da concentração de malondialdeído no pulmão. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

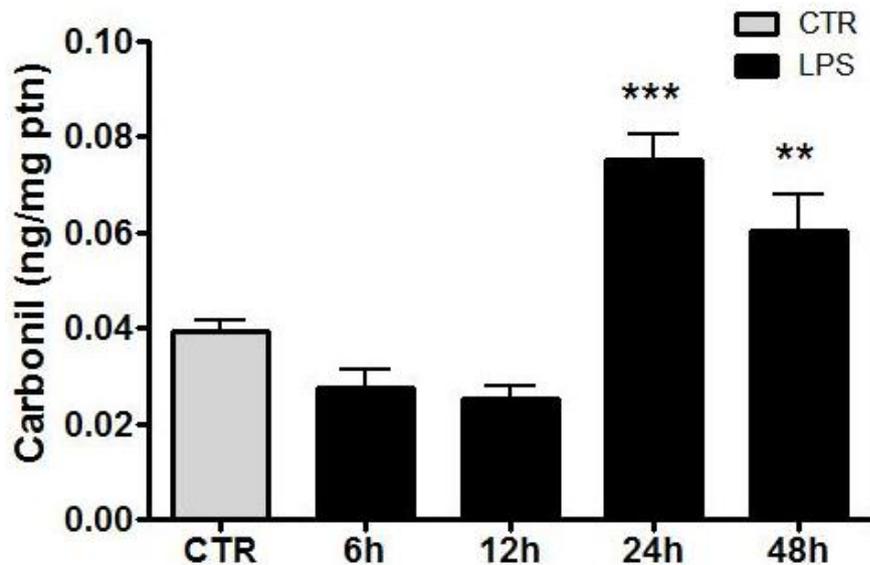


Figura 12- Análise bioquímica da concentração carbonilação de proteínas no pulmão. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-

way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

3.3 Contagem de células do BAL

O número de leucócitos totais mostrou-se aumentado nos grupos LPS 6 horas ($p < 0,05$), LPS 12 horas ($p < 0,01$), LPS 24 horas ($p < 0,01$) e LPS 48 horas ($p < 0,01$) comparadas ao grupo CTR [figura 13]. O número de neutrófilos mostrou-se aumentado nos grupos LPS 12 horas ($p < 0,01$), LPS 24 horas ($p < 0,01$) e LPS 48 horas ($p < 0,01$) comparados ao grupo CTR [figura 14]. O número de macrófagos mostrou-se aumentado no grupo LPS 24 horas ($p < 0,01$) e diminuído no grupo LPS 48 horas ($p < 0,001$) comparados ao grupo CTR [figura 15].

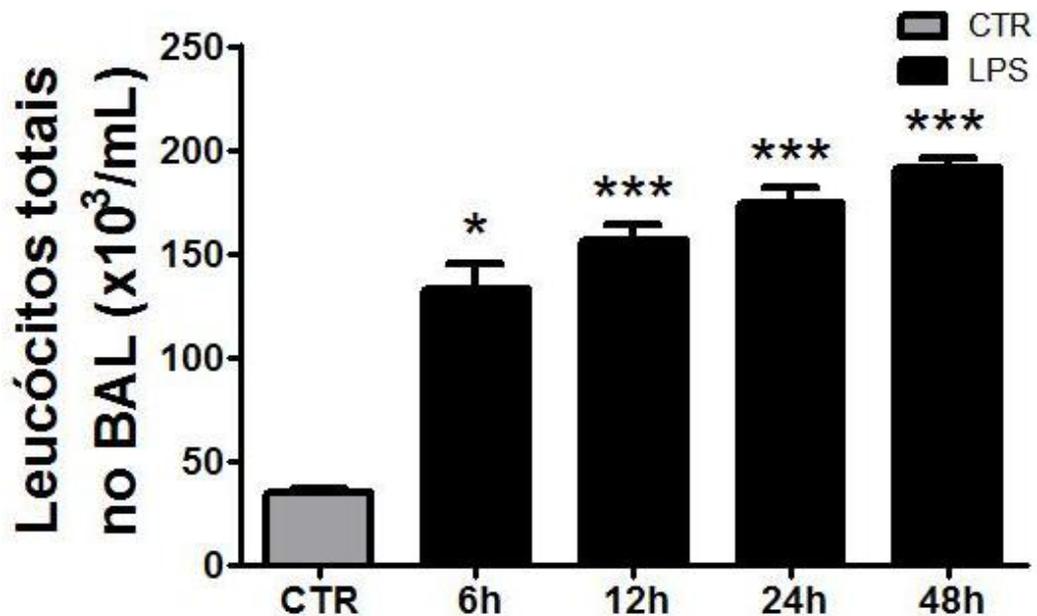


Figura 13- Contagem de leucócitos no lavado broncoalveolar. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

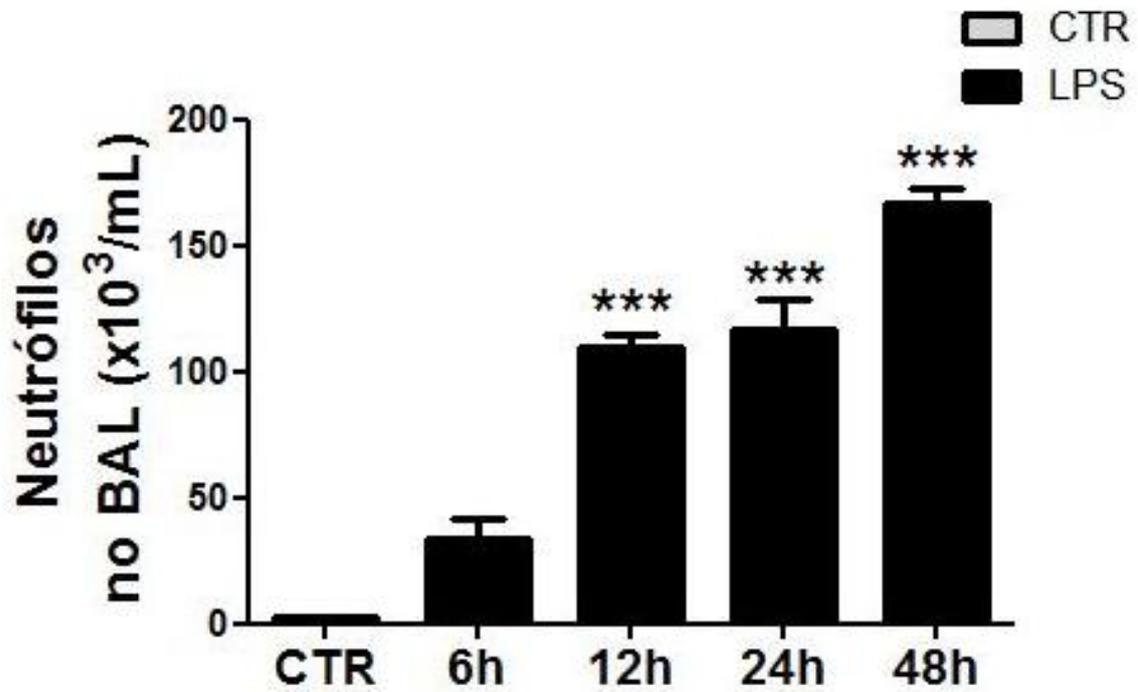


Figura 14- Contagem de neutrófilos no lavado broncoalveolar. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

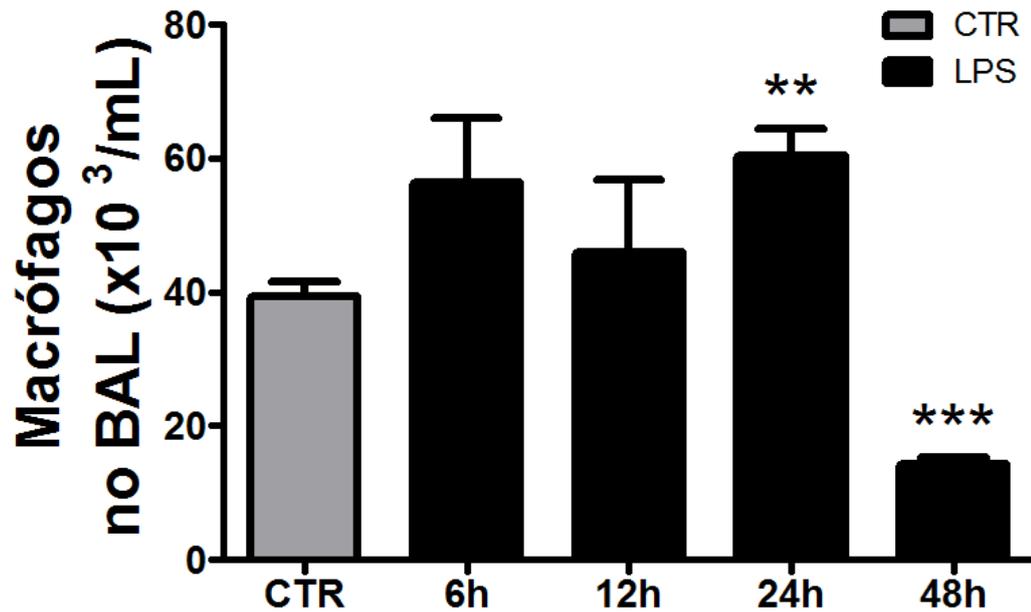


Figura 15- Contagem de macrófagos no lavado broncoalveolar. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

3.4 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

O nível de MPO mostrou-se aumentado nos grupos LPS 6 horas ($p < 0,01$), LPS 12 horas ($p < 0,001$), LPS 24 horas ($p < 0,001$) e LPS 48 horas ($p < 0,001$) comparados ao grupo CTR [figura 16].

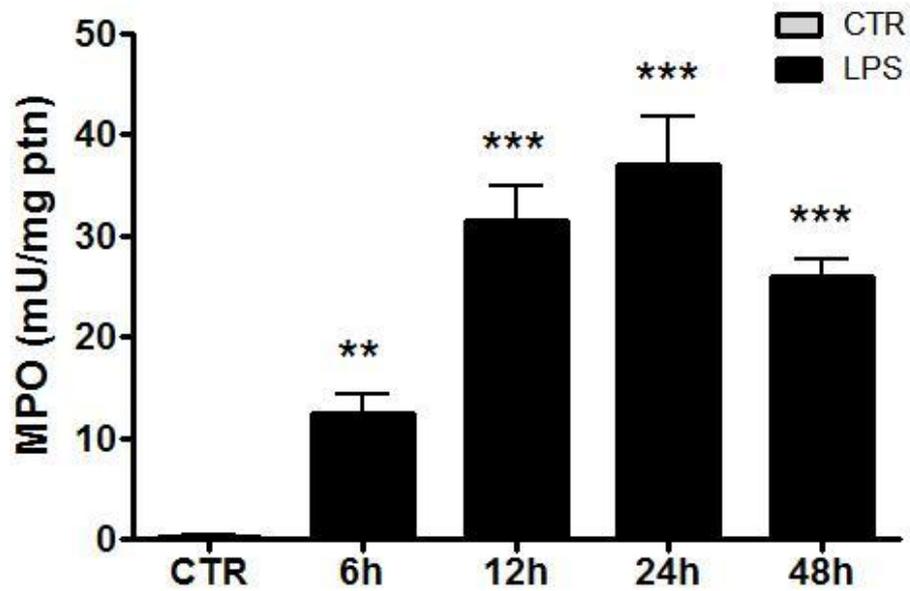


Figura 16- Análise bioquímica da atividade da mieloperoxidase no pulmão. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

3.5 Ensaio de nitrito

O nível de nitrito mostrou-se aumentado nos grupos LPS 6 horas ($p < 0,01$), LPS 24 horas ($p < 0,05$) e LPS 48 horas ($p < 0,01$) comparados ao grupo CTR [figura 17].

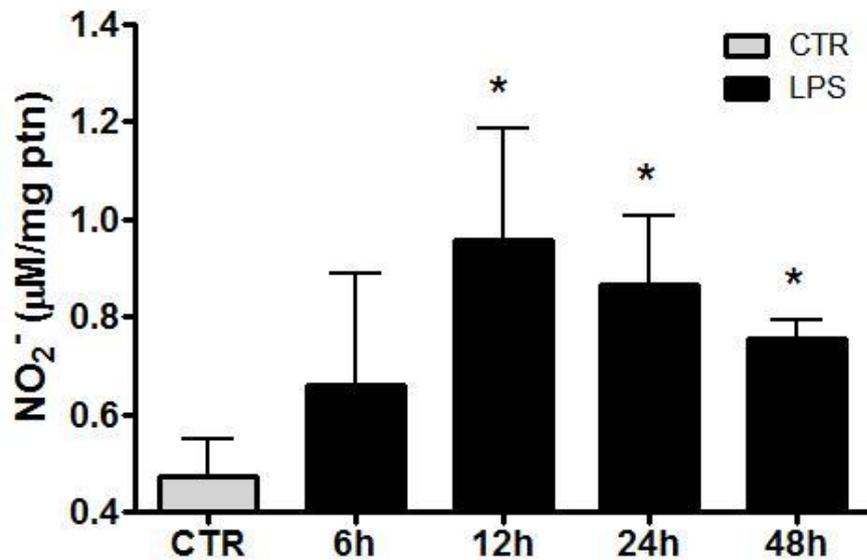


Figura 17- Análise bioquímica da concentração de nitrito no pulmão. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

3.6 Zimografia

Na zimografia observou-se aumento da atividade da MMP-2 no grupo LPS 6, 24 e 48 horas em relação ao grupo CTR [figura 18].

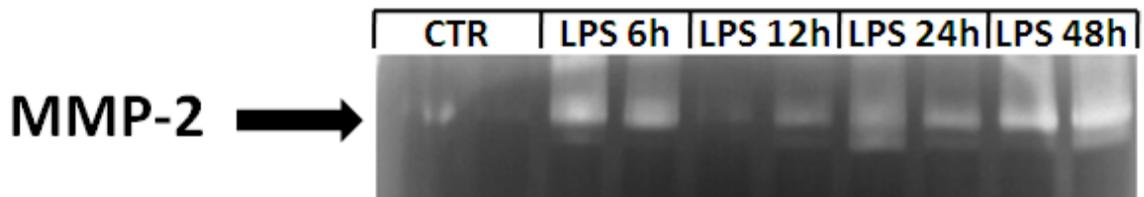


Figura 18- Zimografia de metaloproteinase 2 no tecido pulmonar. O sinal negativo corresponde aos animais estimulados com salina. Já as bandas positivas correspondem aos animais estimulados com LPS e sacrificados em diferentes tempos. A amostra utilizada foi homogeneizado de pulmão.

3.7 Função pulmonar

A elastância mostrou-se aumentado nos grupos LPS 6 horas ($p < 0,001$), LPS 12 horas ($p < 0,05$), LPS 24 horas ($p < 0,001$) e LPS 48 horas ($p < 0,001$) comparadas ao grupo CTR [figura 19]. A $\Delta P2$ mostrou-se aumentada nos grupos LPS 6 horas ($p < 0,001$), LPS 12 horas ($p < 0,01$), LPS 24 horas ($p < 0,001$) e LPS 48 horas ($p < 0,01$) comparadas ao grupo CTR [figura

20]. A ΔP_{tot} mostrou-se aumentada nos grupos LPS 6 horas ($p < 0,01$), LPS 12 horas ($p < 0,01$), LPS 24 horas ($p < 0,001$) e LPS 48 horas ($p < 0,01$) comparadas ao grupo CTR [figura 21].

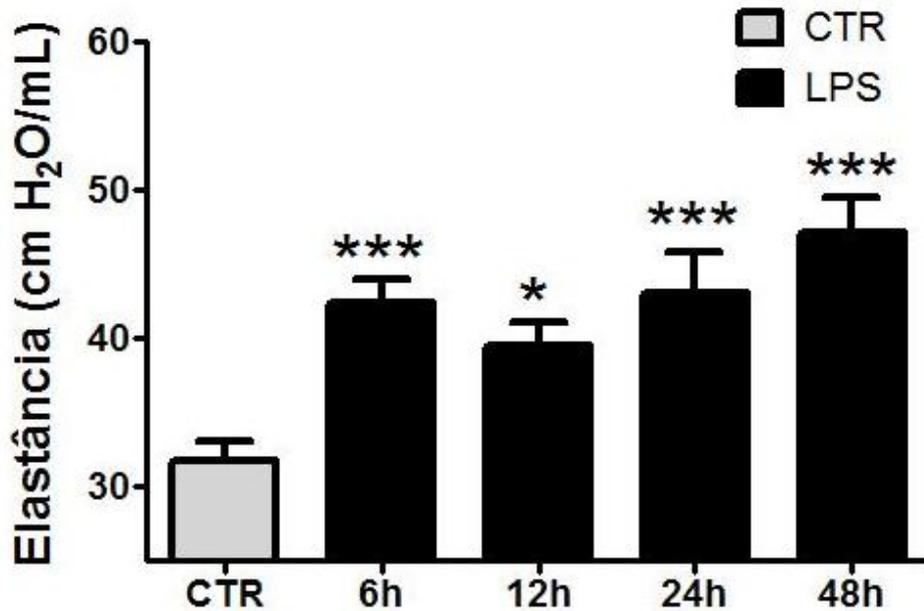


Figura 19- Análise da elastância do pulmão após modelo de LPA. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

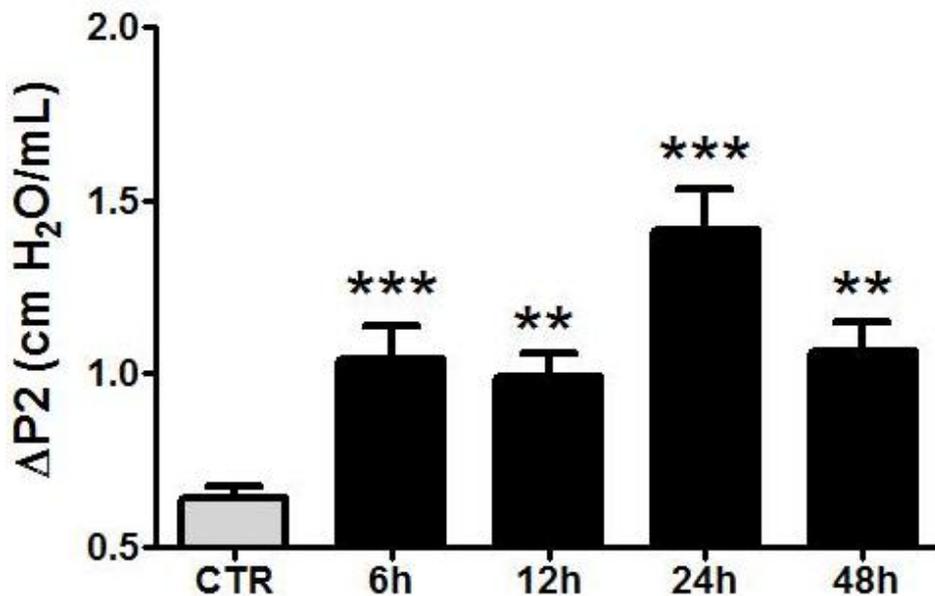


Figura 20- Análise da $\Delta P2$ do pulmão após modelo de LPA. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

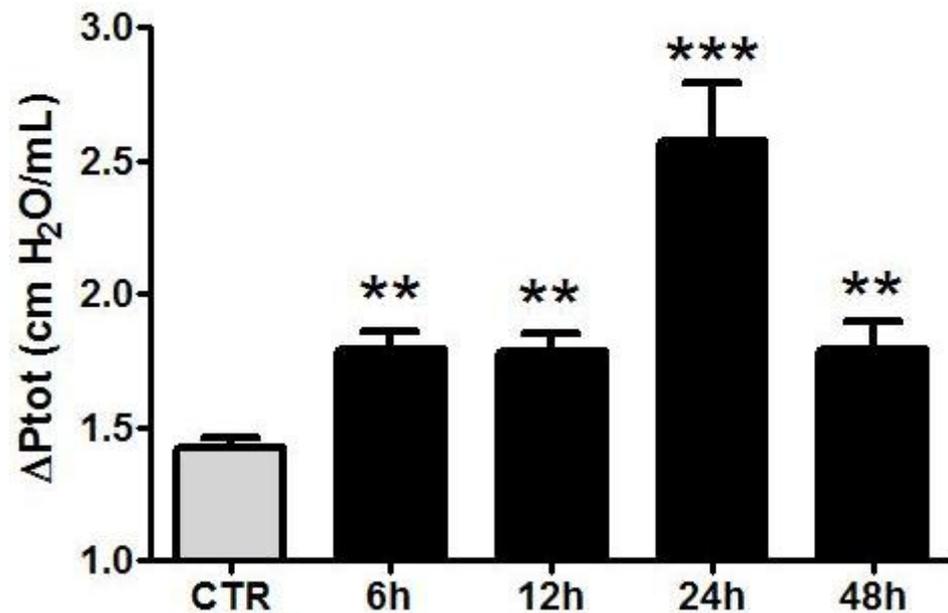


Figura 21- Análise da ΔP_{tot} do pulmão após modelo de LPA. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Foi realizada uma nova mecânica ventilatória agora com animais pré-tratados com NAC associados há LPA. A elastância aumentou nos grupo LPS ($p < 0,001$) comparado ao grupo CTR e reduziu nos grupos LPS+NAC 40 ($p < 0,001$) e LPS+NAC100 ($p < 0,05$) comparados ao grupo LPS [figura 22]. A ΔP_1 aumentou no grupo LPS ($p < 0,001$) comparado ao grupo CTR e reduziu nos grupos LPS+NAC 40 ($p < 0,05$) e LPS+NAC100 ($p < 0,05$) comparados ao grupo LPS [figura 23]. A ΔP_2 aumentou no grupo LPS ($p < 0,05$) comparado ao grupo CTR e reduziu nos grupos LPS+NAC 40 ($p < 0,001$) e LPS+NAC100 ($p < 0,05$) comparados ao grupo LPS [figura 24]. A ΔP_{tot} aumentou no grupo LPS ($p < 0,05$) comparado ao grupo CTR, e reduziu no grupo LPS+NAC 40 ($p < 0,05$) comparados ao grupo LPS [figura 25].

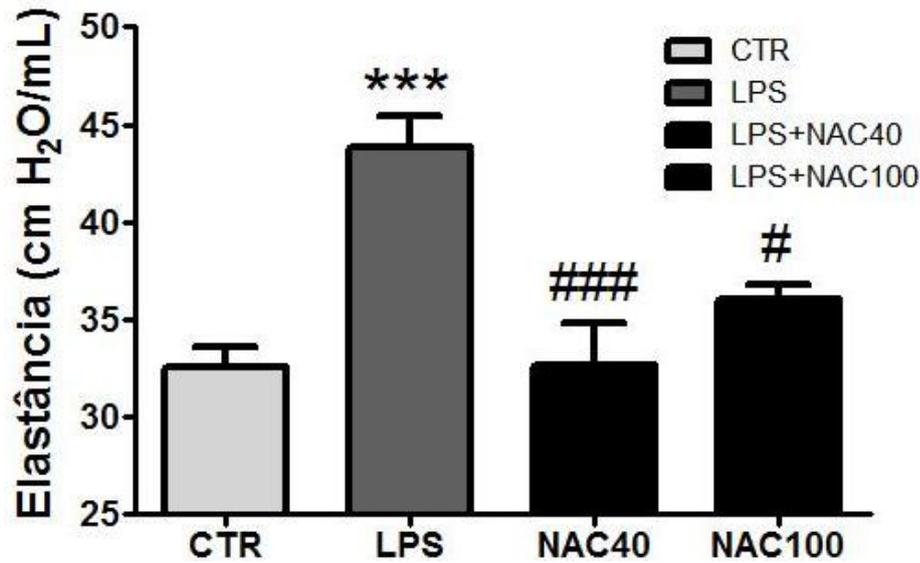


Figura 22- Análise da elastância do pulmão com pré-tratamento com NAC associado à LPA. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$. O símbolo * compara o grupo CTR com o grupo LPS e o símbolo # compara o grupo LPS com os grupos NAC40 e NAC100.

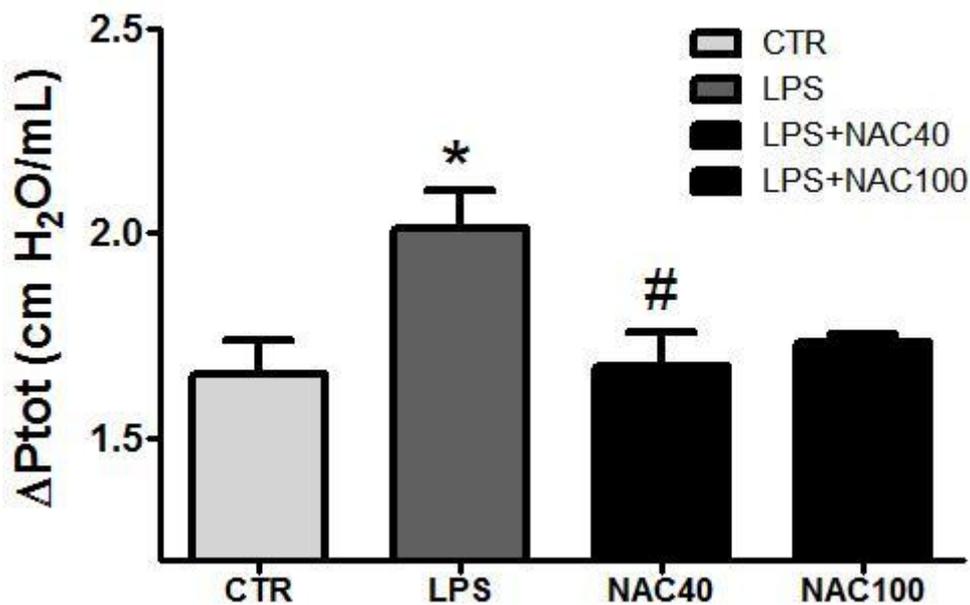


Figura 23- Análise da ΔP_{tot} do pulmão com pré-tratamento com NAC associado à LPA. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$. O símbolo * compara o grupo CTR com o grupo LPS e o símbolo # compara o grupo LPS com os grupos NAC40 e NAC100.

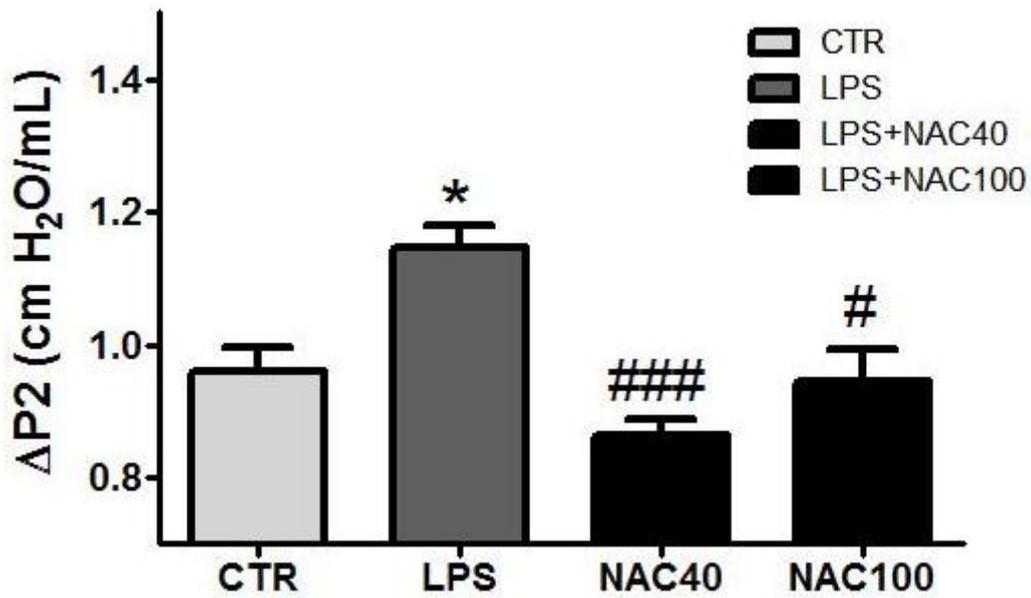


Figura 24- Análise da ΔP_2 do pulmão com pré-tratamento com NAC associado a LPA. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa $***p < 0,001$, $**p < 0,01$ e $*p < 0,05$. O símbolo * compara o grupo CTR com o grupo LPS e o símbolo # compara o grupo LPS com os grupos NAC40 e NAC100.

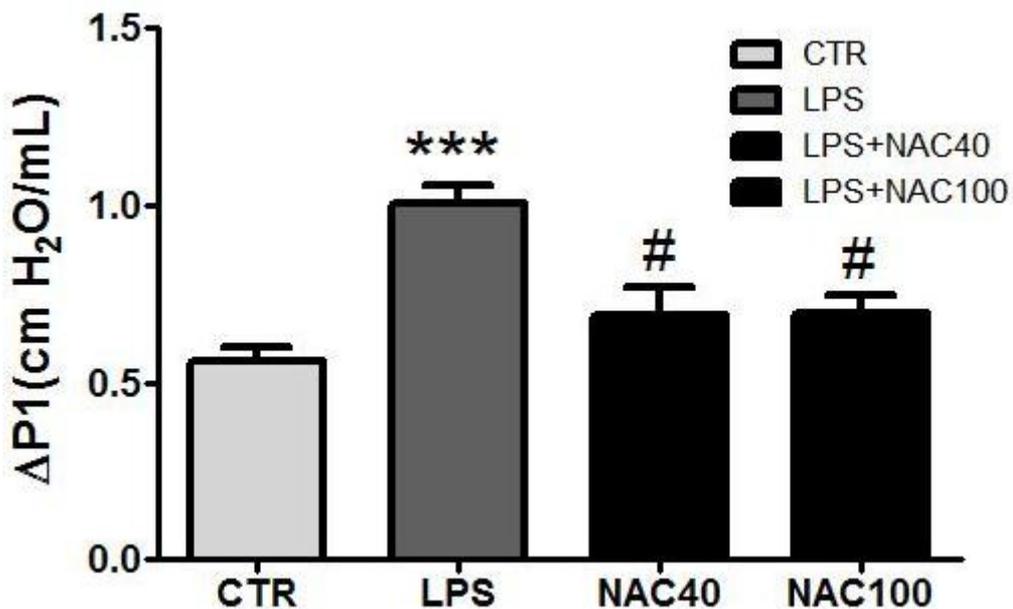


Figura 25- Análise da ΔP_1 do pulmão após modelo com pré-tratamento com NAC associado à LPA. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa $***p < 0,001$, $**p < 0,01$ e $*p < 0,05$. O símbolo * compara o grupo CTR com o grupo LPS e o símbolo # compara o grupo LPS com os grupos NAC40 e NAC100.

3.8 Perfil histológico do pulmão

Na histologia do pulmão nos grupos tratados com LPS se observou em 6 e 12 horas a presença de células inflamatórias. Em 24 horas, além da presença de células inflamatórias, observou-se espessamento de septos alveolares. Em 48 horas, além do intenso influxo de células inflamatórias e espessamento de células inflamatórias, observou-se a presença de hemácias no espaço alveolar sugerindo hemorragia (figura 26).

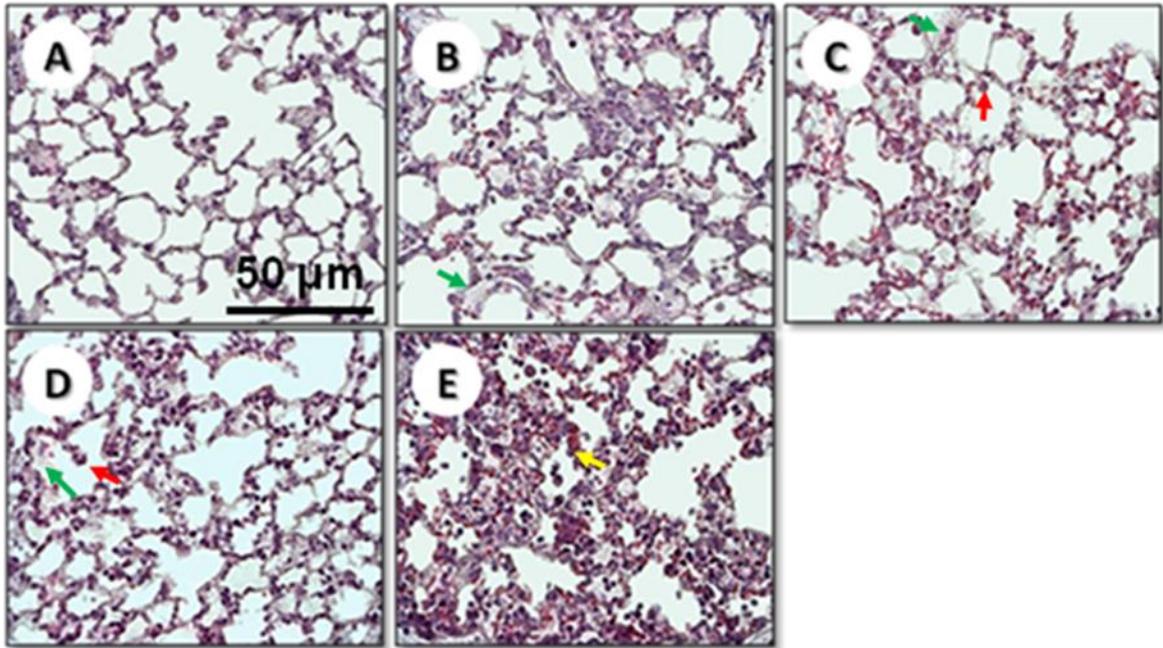


Figura 26- Análise histológica do pulmão (Hematoxila & Eosiona) após modelo de LPA Grupo CTR (A), LPS 6 horas (B), LPS 12 horas (C), LPS 24 horas (D) e LPS 48 horas (E). Setas verdes (espessamento de septo), setas vermelhas (células inflamatórias), setas amarelas (hemorragia). Aumento de 40X.

Quando os camundongos foram pré-tratados com NAC, observou-se diminuição do influxo de células inflamatórias e espessamento de septos alveolares em ambas as doses, principalmente na dose de 40 mg/kg comparadas ao grupo LPS (figura 27).

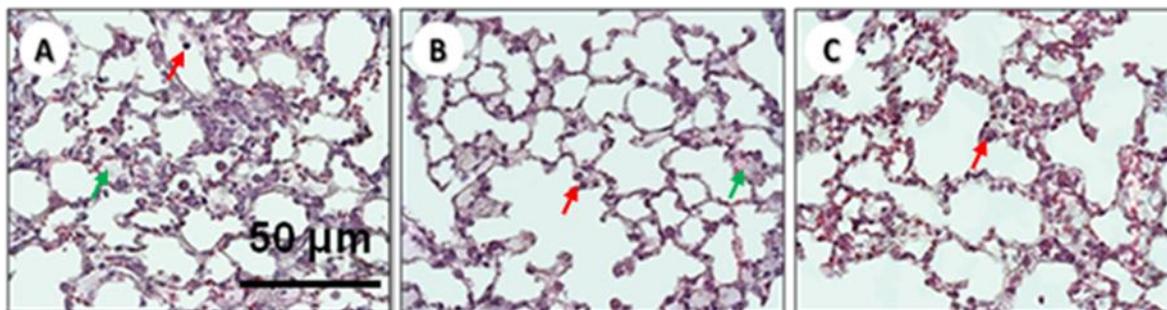


Figura 27- Análise histológica do pulmão (Hematoxila & Eosiona) com pré-tratamento com NAC associado a LPA. Grupo LPS (A), LPS+NAC40mg/kg (B), LPS+NAC100mg/kg (C). Setas verdes (espessamento de septo), setas vermelhas (células inflamatórias). Aumento de 40X.

3.9 RT-PCR

A IL-6 mostrou-se aumentada no grupo LPS ($p < 0,001$) comparada ao grupo CTR e diminuídos nos grupos LPS+NAC 40mg/kg ($p < 0,001$) e LPS+NAC 100 mg/kg ($p < 0,001$) comparadas ao grupo LPS [28]. A iNOS mostrou-se aumentada no grupo LPS ($p < 0,001$) comparada ao grupo CTR e diminuída nos grupos LPS+NAC 40mg/kg ($p < 0,001$) e LPS+NAC 100 mg/kg ($p < 0,001$) comparadas ao grupo LPS [29]. A COX2 mostrou-se aumentada no grupo LPS ($p < 0,05$) comparada ao grupo CTR e diminuída nos grupos LPS+NAC 40mg/kg ($p < 0,001$) e LPS+NAC 100 mg/kg ($p < 0,001$) comparadas ao grupo LPS [30]. O TNF- α mostrou-se aumentada no grupo LPS ($p < 0,001$) comparada ao grupo CTR e diminuída nos grupos LPS+NAC 40mg/kg ($p < 0,05$) e LPS+NAC 100 mg/kg ($p < 0,001$) comparados ao grupo LPS [31]. O NF κ B mostrou-se aumentada no grupo LPS ($p < 0,001$) comparada ao grupo CTR e diminuída nos grupos LPS+NAC 40mg/kg ($p < 0,001$) e LPS+NAC 100 mg/kg ($p < 0,001$) comparados ao grupo LPS [32].

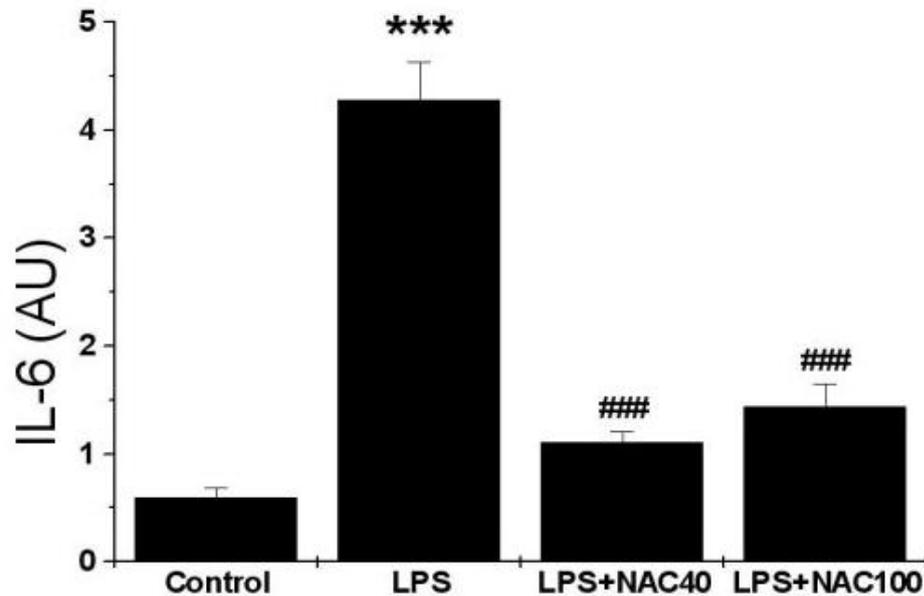


Figura 28- Análise de IL-6 por RT-PCR com pré-tratamento com NAC associado à LPA. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$. O símbolo * compara o grupo CTR com o grupo LPS e o símbolo # compara o grupo LPS com os grupos NAC40 e NAC100.

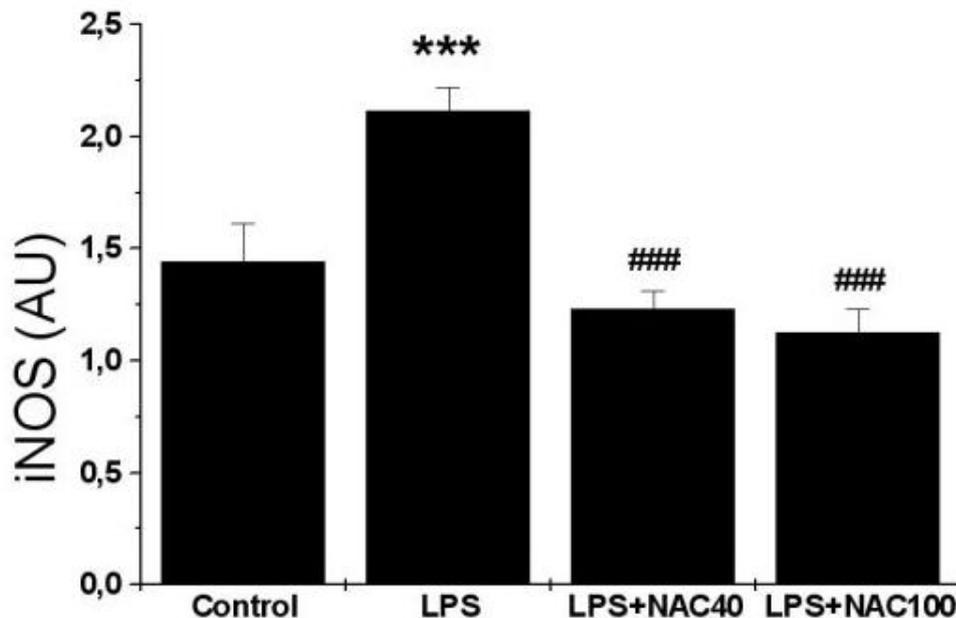


Figura 29- Análise de iNOS por RT-PCR com pré-tratamento com NAC associado a LPA. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$. O símbolo * compara o grupo CTR com o grupo LPS e o símbolo # compara o grupo LPS com os grupos NAC40 e NAC100.

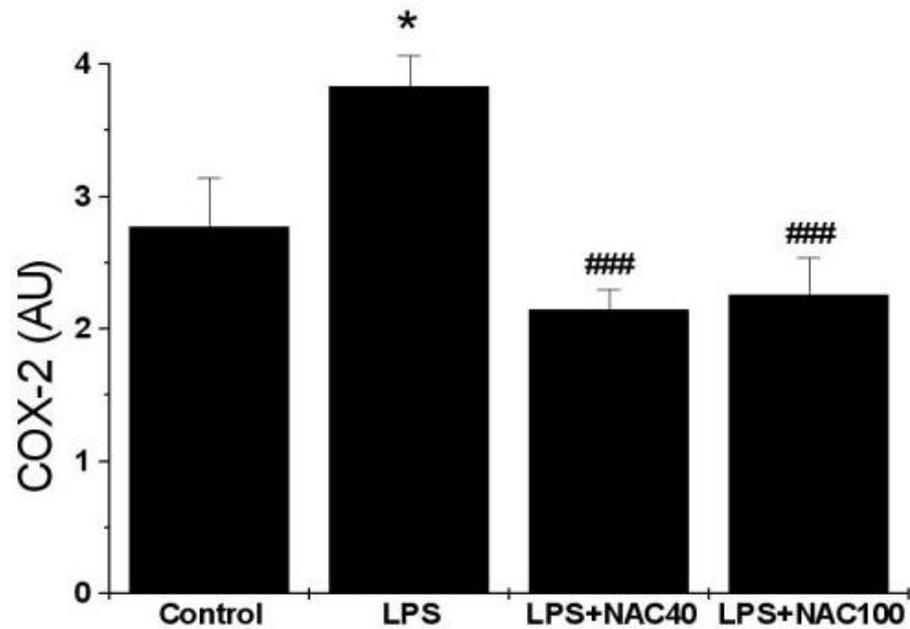


Figura 30- Análise de COX2 por RT-PCR com pré-tratamento com NAC associado à LPA Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$. O símbolo * compara o grupo CTR com o grupo LPS e o símbolo # compara o grupo LPS com os grupos NAC40 e NAC100.

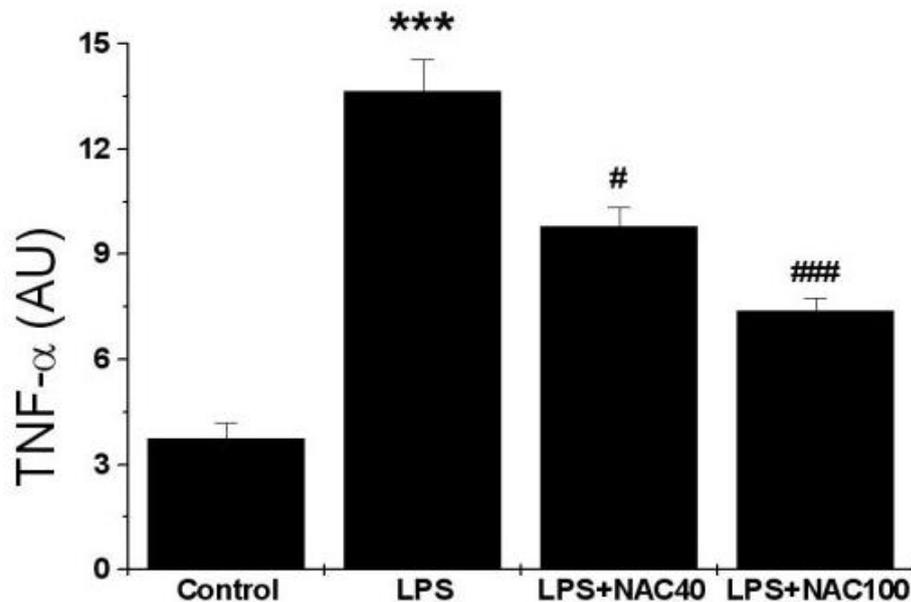


Figura 31- Análise de TNF- α por RT-PCR com pré-tratamento com NAC associado à LPA Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$. O símbolo * compara o grupo CTR com o grupo LPS e o símbolo # compara o grupo LPS com os grupos NAC40 e NAC100.

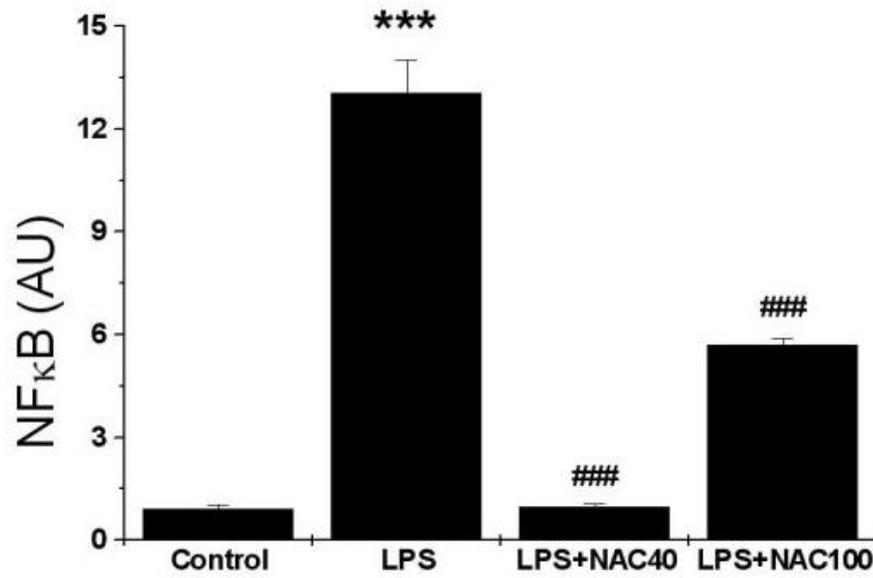


Figura 32- Análise de NFκB por RT-PCR com pré-tratamento com NAC associado à LPA. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O símbolo na figura significa *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$. O símbolo * compara o grupo CTR com o grupo LPS e o símbolo # compara o grupo LPS com os grupos NAC40 e NAC100.

4 DISCUSSÃO

O estresse oxidativo tem uma parece ter uma participação importante na patogênese da LPA, não só pelos efeitos diretos como peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, mas também pelo envolvimento nos mecanismos celulares e moleculares que controlam a inflamação pulmonar como ativação de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células inflamatórias [Rahman 2006]. Estresse oxidativo consiste em uma condição de desequilíbrio entre componentes oxidante e antioxidante; um excesso de oxidantes e depleção de antioxidantes. Além disso, a LPA caracteriza-se por uma inflamação persistente, dano de células epiteliais do parênquima pulmonar, aumento da permeabilidade vascular e influxo de células inflamatórias, o que leva a uma produção de oxidantes. Estes oxidantes por sua vez agravam mais a lesão intensificando a resposta inflamatória que acaba liberando mais oxidantes como um “ciclo vicioso” [van der Vaart 2004]. O estresse oxidativo não é claro em modelos experimentais e estudos clínicos de LPA [Matthay 1994]. Entretanto, alguns estudos mostram que pacientes com LPA apresentam níveis elevados de H_2O_2 no ar exalado condensado. O lavado broncoalveolar de pacientes com LPA contém um excesso de proteínas oxidadas em combinação com uma deficiência relativa de moléculas antioxidantes, como a glutatona [Gole 2000].

Neste estudo, nós mostramos que o estresse oxidativo é tempo-dependente a partir de 24 horas. Mostramos também que a LPA induzida por LPS leva a alterações estruturais, funcionais e inflamatórias e que o estresse oxidativo tem sim uma participação importante nas mesmas, visto que uma vez pré-tratados com antioxidante todas as alterações vista nos grupos tratados com LPS foram impedidas pelo uso da NAC. Nossos resultados mostram que o estresse oxidativo é tempo-dependente, onde nas primeiras 6 horas após LPS, o sistema antioxidante protege o pulmão do estresse e dano oxidativo com o aumento da atividade da CAT e da SOD e diminuição do MDA e carbonilação de proteínas. Em 12 horas, a atividade da CAT está semelhante ao grupo CTR; o MDA e a carbonilação de proteínas está semelhante ao grupo CTR, sugerindo que o sistema antioxidante enzimático está ativo em proteger o sistema biológico do estresse oxidativo. Em 24 horas fica caracterizado o estresse oxidativo e dano oxidativo justo pelo aumento do MDA e carbonilação de proteínas. Em 48 horas há aumento de MDA e carbonilação de proteínas sem resposta das enzimas antioxidantes, com exceção da SOD; isso sugere uma espécie de falência do sistema antioxidante enzimático.

No lavado broncoalveolar observou-se um aumento progressivo do número de leucócitos (neutrófilos e macrófagos). Leucócitos ativados produzem citocinas pró-

inflamatórias via NF κ B [Pasparakis et al 2009]. Leucócitos ativados podem também produzir e liberar EROS causando um excesso de oxidantes no pulmão. Se o sistema antioxidante (enzimático e não enzimático) do pulmão não aumentar concomitante e proporcionalmente aos oxidantes, temos então a condição de estresse oxidativo [Rahman 2002]. Como consequência do estresse oxidativo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos podem ser danificados, sendo detectados como subprodutos de dano oxidativo [Haddad 2003]. Nós sugerimos que o estresse oxidativo observado nesse estudo é em parte devido ao aumento do número de leucócitos no pulmão, uma vez que o BAL e o homogeneizado dos pulmões controles não apresentaram os mesmos valores ou condições.

As EROS também têm sido implicadas no processo de fosforilação do complexo inativo do NF κ B. O NF κ B se encontra no citoplasma inativo associado a uma proteína I κ B formando um complexo inativo. Em resposta a um estímulo celular, I κ B é fosforilado por I κ B quinase, I κ B se solta do complexo e é degradado pelo proteossoma 26S e então NF κ B se transloca para o núcleo da célula promovendo a transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias como com posterior recrutamento de células inflamatórias [Mohamed 2009]. Hoje se sabe que a cascata de sinalização de NF κ B é bem mais complexa que o modelo clássico. O estudo sugere que a NAC como estratégia antioxidante reduziu os níveis de EROS, EROS que atuam intensificando o processo de fosforilação do complexo de NF κ B. Assim, menos NF κ B translocado para o núcleo menor seria a resposta inflamatória com ativação de Il-6, TNF- α , COX2, e iNOS [Sow 2010].

Uma característica importante da LPA é o comprometimento da função pulmonar. Pacientes com diagnóstico de LPA apresentam edema intersticial e redução da complacência pulmonar, aumento da resistência ao fluxo aéreo e déficit nas trocas gasosas [Magalhães 2010]. Em modelos experimentais de LPA induzida por LPS em camundongos pode ser observado alterações semelhantes às observadas na clínica [Passaro 2009]. Acreditamos que o aumento de ΔP_1 , ΔP_2 , e ΔP_{tot} seja pela presença de edema intersticial e intenso influxo de células inflamatórias. A lesão tecidual contribui para essas repercussões funcionais [Burchardi 1996]. Acreditamos que a elastância aumentada seja pelo aumento de MMP2. A MMP2 degrada colágeno, assim acreditamos que o pulmão se tornou mais elástico e por isso observamos a elastância aumentada.

Na histologia do pulmão observaram-se alterações na histoarquitetura já nas primeiras horas. Nos grupos tratados com LPS se observou em 6 e 12 horas a presença de células inflamatórias. Em 24 horas, além da presença de células inflamatórias, observou-se

espessamento de septos alveolares. Em 48 horas, além do intenso influxo de células inflamatórias e espessamento de células inflamatórias, observou-se a presença de hemácias no espaço alveolar sugerindo hemorragia. O intenso influxo de células inflamatórias aumenta ainda mais a quantidade de EROS no sistema biológico agravando ainda mais a lesão.

Para confirmar se as alterações observadas eram estresse oxidativo dependentes realizamos um modelo de LPA associado a um protocolo de pré-tratamento com NAC. A NAC é o antioxidante mais estudado entre os vários antioxidantes. É bem conhecida como precursora artificial de glutathione e um scavenger de H_2O_2 , ácido hipocloroso e radical hidroxila [Bernard 1993]. A NAC é o Nosso estudo não sugere a administração de NAC como estratégia terapêutica. A NAC foi utilizada como estratégia antioxidante para desvendar o mecanismo do estresse oxidativo no modelo de LPA. Assim, mostramos que o estresse oxidativo tem uma participação importante nas alterações estruturais, funcionais e inflamatórias, visto que a administração de NAC impediu todas as alterações. Assim, nós sugerimos que o estresse oxidativo tenha um papel preponderante na fisiopatologia da LPA.

Apesar das ROS terem um papel importante na morte de bactérias, o tempo de ação e o momento da terapêutica antioxidante podem ser estratégias eficazes para reduzir as repercussões teciduais e funcionais da LPA. Assim, nosso estudo sugere que o estresse oxidativo é uma condição importante na LPA, sendo tempo-dependente e com repercussões de dano tecidual e funcional a partir de 24 horas.

5 CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou que ficou caracterizado o estresse oxidativo no modelo de LPA induzida por LPS a partir de 24 horas de forma tempo-dependente e uma falência do sistema antioxidante em 48 horas. Mostrou também que ocorrem alterações estruturais, funcionais e inflamatórias e que o estresse oxidativo tem uma participação importante nesses processos, visto que a administração de NAC como estratégia antioxidante impediu todas as alterações.

Uma vez definido o papel do estresse oxidativo na LPA e mais especificamente as respostas biológicas de enzimas antioxidantes e de dano oxidativo conforme apresentado nesse estudo, torna-se promissor o desenho de drogas antioxidantes específicas para a redução dos oxidantes gerados pelas células inflamatórias e conseqüente redução do dano tecidual e funcional.

REFERÊNCIAS

- Frutos-Vivar, F. Ferguson, N. D. Esteban, A. **Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome.** *Semin Respir Crit Care Med*, 2006,**27**: 327-33
- Rubinfeld, G. D. Herridge, M. S. **Epidemiology and outcomes of acute lung injury.** *Chest* , 2007, **131**: 554-62
- Wind, J. Versteegt, J. Twisk, J. van der Werf, T. S. Bindels, A. J. Spijkstra, J. J. Girbes, A. R. Groeneveld, A. B. **Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in The Netherlands: a survey.** *Respir Med*,2007, **101**:2091-8
- Johnson, E. R. Matthay, M. A. **Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment.** *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 2010, **23**:243-52
- Matuschak, G. M. Lechner, A. J. **Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: pathophysiology and treatment.** *Mo Med*, 2010, **107**:252-8
- Diaz, J. V. Brower, R. Calfee, C. S. Matthay, M. A. **Therapeutic strategies for severe acute lung injury.** *Crit Care Med*, 2010, **38**:1644-50
- Xu, N. Yuan, J. Xiao, G. Zheng, J. Qin, X. **An experimental study of the LPS release from gram-negative bacteria induced by antibiotics (Part two).** *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 2002, **18**:92-4
- Redl, H. Bahrami, S. Schlag, G. Traber, D. L. **Clinical detection of LPS and animal models of endotoxemia.** *Immunobiology*, 1993, **187**:330-45
- Piazza, M. Colombo, M. Zanoni, I. Granucci, F. Tortora, P. Weiss, J. Gioannini, T. Prosperi, D. Peri, F. **Uniform Lipopolysaccharide (LPS)-Loaded Magnetic Nanoparticles for the Investigation of LPS-TLR4 Signaling.** *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, **50**: 622-6
- Canadas, O. Keough, K. M. Casals, C. **Bacterial lipopolysaccharide promotes destabilization of lung surfactant-like films.** *Biophys J*, 2010, **100**:108-16
- Soda, K. Kawakami, M. **Endotoxin (lipopolysaccharide: LPS).** *Nippon Rinsho*, 2010, **68**: 211-4
- Nalbantsoy, A. Karaboz, I. Gurhan, I. D. **Production of monoclonal antibodies in a mouse model via lipopolysaccharide conjugates with synthetic polymers specific to Salmonella Enteritidis O antigen.** *Foodborne Pathog Dis*, 2010, **7**:1521-9
- Weissmann, G. **Free radicals can kill you: Lavoisier's oxygen revolution.** *FASEB J*, 2010, **24**:649-52
- Magder, S. **Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?** *Crit Care*, 2006, **10**:208

- Rahman, I. Adcock, I. M. **Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD.** *Eur Respir J*, 2006, **28**:219-42
- Loukides, S. Bakakos, P. Kostikas, K. **Oxidative Stress in Patients with COPD.** *Curr Drug Targets*, 2011, **12**:123-126
- Aitken, R. J. Roman, S. D. **Antioxidant systems and oxidative stress in the testes.** *Oxid Med Cell Longev*, 2008, **1**:15-24
- Buffenstein, R. Edrey, Y. H. Yang, T. Mele, J. **The oxidative stress theory of aging: embattled or invincible? Insights from non-traditional model organisms.** *Age (Dordr)*, 2008, **30**: 99-109
- Tsang, A. H. Chung, K. K. **Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease.** *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1792**:643-50
- Bhardwaj, P. **Oxidative stress and antioxidants in gastrointestinal diseases.** *Trop Gastroenterol*, 2008, **29**: 129-35
- Mendes, J. F. Arruda, S. F. Siqueira, E. M. Ito, M. K. Silva, E. F. **Iron status and oxidative stress biomarkers in adults: a preliminary study.** *Nutrition*, 2009, **25**:379-84
- Singh, A. Ling, G. Suhasini, A. N. Zhang, P. Yamamoto, M. Navas-Acien, A. Cosgrove, G. Tuder, R. M. Kensler, T. W. Watson, W. H. Biswal, S. **Nrf2-dependent sulfiredoxin-1 expression protects against cigarette smoke-induced oxidative stress in lungs.** *Free Radic Biol Med*, 2009, **46**: 376-86
- Ward, P. A. **Oxidative stress: acute and progressive lung injury.** *Ann N Y Acad Sci*, 2011, **1203**:53-9
- Cross, C. E. Eiserich, J. P. **Oxidative stress in acute lung injury: Deja vu or something new?** *Crit Care Med*, 2004, **32**:892-3
- Roberts, E. S. Richards, J. H. Jaskot, R. Dreher, K. L. **Oxidative stress mediates air pollution particle-induced acute lung injury and molecular pathology.** *Inhal Toxicol*, 2003, **13**: 1327-46
- Chow, C. W. Herrera Abreu, M. T. Suzuki, T. Downey, G. P. **Oxidative stress and acute lung injury.** *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, **29**: 427-31
- Yang, C. Moriuchi, H. Takase, J. Ishitsuka, Y. Irikura, M. Irie, T. **Oxidative stress in early stage of acute lung injury induced with oleic acid in guinea pigs.** *Biol Pharm Bull*, 2003, **26**: 424-8
- Bernard, G. R. **N-acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury.** *Am J Med*, 1993, **91**: 54S-59S
- Zhu, Y. **Experimental study of the protective effects of N-acetylcysteine on endotoxin-induced acute lung injury.** *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 1991, **7**: 373-7, 26

- Suter, P. M. Domenighetti, G. Schaller, M. D. Laverriere, M. C. Ritz, R. Perret, C. **N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study.** *Chest*, 1995, **104**: 190-4
- Kao, S. J. Wang, D. Lin, H. I. Chen, H. I. **N-acetylcysteine abrogates acute lung injury induced by endotoxin.** *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, **33**: 33-40
- Alkan, A. Eroglu, F. Eroglu, E. Ergin, C. Cerci, C. Alsancak, G. **Protective effects of N-acetylcysteine and erdosteine on hemorrhagic shock-induced acute lung injury.** *Eur J Emerg Med*, 2006,**13**: 281-5
- Bannister, J. V. Calabrese, L. **Assays for superoxide dismutase.** *Methods Biochem Anal* 1987, **32**: 279-312
- Aebi, H. **Catalase in vitro.** *Methods Enzymol* 1984, **105**: 121-6
- 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* 1976, **72**: 248-54
- Livak, K. J. Flood, S. J. Marmaro, J. Giusti, W. Deetz, K. **Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.** *PCR Methods Appl*, 1995, **4**:357-62
- van der Vaart, H. Postma, D. S. Timens, W. ten Hacken, N. H. **Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review.** *Thorax*, 2004, **59**: 713-21
- Matthay, M. A. **Function of the alveolar epithelial barrier under pathologic conditions.** *Chest*,1994, **105**: 67S-74S
- Gole, A. Dash, C. Mandale, A. B. Rao, M. Sastry, M. **Fabrication, characterization, and enzymatic activity of encapsulated fungal protease--fatty lipid biocomposite films.** *Anal Chem*, 2000, **72**: 4301-9
- Pasparakis, M. **Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases.** *Nat Rev Immunol*, 2009, **9**: 778-88
- Haddad, J. J. **Science review: redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for hypoxia-inducible factor-1alpha.** *Crit Care*, 2003, **7**:47-54
- Mohamed, M. R. McFadden, G. **NFkB inhibitors: strategies from poxviruses.** *Cell Cycle*, 2009, **8**: 3125-32
- Sow, F. B. Gallup, J. M. Olivier, A. Krishnan, S. Patera, A. C. Suzich, J. Ackermann, M. R. **Respiratory syncytial virus is associated with an inflammatory response in lungs and architectural remodeling of lung-draining lymph nodes of newborn lambs.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, **300**: L12-24

Magalhaes, C. B. Riva, D. R. DePaula, L. J. Brando-Lima, A. Koatz, V. L. Leal-Cardoso, J. H. Zin, W. A. Faffe, D. S. **In vivo anti-inflammatory action of eugenol on lipopolysaccharide-induced lung injury.** *J Appl Physiol*, 2010, **108**: 845-51

Passaro, C. P. Silva, P. L. Rzezinski, A. F. Abrantes, S. Santiago, V. R. Nardelli, L. Santos, R. S. Barbosa, C. M. Morales, M. M. Zin, W. A. Amato, M. B. Capelozzi, V. L. Pelosi, P. Rocco, P. R. **Pulmonary lesion induced by low and high positive end-expiratory pressure levels during protective ventilation in experimental acute lung injury.** *Crit Care Med*, 2009, **37**: 1011-7

Burchardi, H. **New strategies in mechanical ventilation for acute lung injury.** *Eur Respir J*, 1996, **9**: 1063-72

ANEXO A – Comitê de Ética

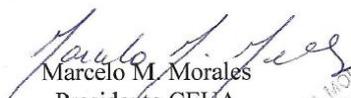


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Prezado Professor Samuel dos Santos Valença

A Comissão de Ética com uso de animais (CEUA) em Experimentação Científica do centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro certifica que os projetos sob sua coordenação e intitulados: **“Participação do fator relacionado à eritroide nuclear 2 (NRF2) no equilíbrio redox em um modelo de sepse murina induzida por lipopolissacarídeo.”**, onde é previsto protocolo com utilização de animais, foi aprovado por esta comissão, sob o número de referência **DFBCICB 035**.

Atenciosamente;


Marcelo M. Morales
Presidente CEUA

*MARCELO M. MORALES
Presidente da Comissão
de Ética em Animais - CCS*

Decania do CCS: Av. Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, 2º andar -
Cidade Universitária - CEP 21941-590 – Rio de Janeiro – Brasil
Fone (21) 2562.6705 - FAX (21) 2270.1749 - www.ccsdecania.ufrj.br