



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

Marco Aurélio dos Santos Silva


**Influência do equilíbrio redox na resistência a fibrose pulmonar induzida
por bleomicina em camundongos**

Rio de Janeiro

2011

Marco Aurélio dos Santos Silva

**Influência do equilíbrio redox na resistência a fibrose pulmonar induzida por
bleomicina em camundongos**



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 Sobrino Porto

Coorientador: Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença

Rio de Janeiro

2011

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

S586 Silva, Marco Aurélio dos Santos.
Influência do equilíbrio redox sobre a resistência a fibrose pulmonar
induzida por bleomicina em camundongos / Marco Aurélio dos Santos
Silva - 2011.
69 f.

Orientador : Luís Cristóvão de Moraes Sobrino 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. Pulmões - Teses. 2. Fibrose pulmonar - Teses. 3. Bleomicina -
Teses. I. Porto, Luís Cristóvão de Moraes Sobrino. 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.

Assinatura

Data

Marco Aurélio dos Santos Silva

**Influência do equilíbrio redox na resistência a fibrose pulmonar induzida por
bleomicina em camundongos**

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 14 de julho de 2011.

Banca Examinadora

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

Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença (Coorientador)
Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

Prof^ª. Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Rodrigo Tinoco Figueiredo
Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais José Fidelis da Silva e Ana Lúcia dos Santos Silva e meu irmão Thiago dos Santos Silva que compreenderam que este é meu sonho e me incentivaram para chegar até aqui. Que acreditem em mim, em todos os momentos e me ajudaram a ultrapassar diversos obstáculos da dura caminhada da vida. À vocês que abdicaram de tudo para me possibilitar parar de sonhar e concretizar o sonho de “estudar”.

AGRADECIMENTOS

Acredito que uma dissertação, apesar do processo solitário a qual qualquer investigador está destinado, reúne contributos de várias pessoas. Reitero esta afirmativa, pois desde o início do mestrado, contei com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas. Sem via de dúvidas, sem àqueles contributos, esta investigação não teria sido possível. Nomear algumas, somente, parece injustiça. Entretanto, não simplesmente direi que agradeço a todos.

Agradeço a Deus, que de forma incondicional me proporcionou o direito de correr atrás de conhecimento, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades, pois sem Ele, nada seria possível e certamente não estaríamos aqui reunidos, desfrutando, juntos, deste momento único.

Aos meus grandes amigos Eduardo, Akinori, Jackson e Ana Carla “Naninha BB” por estar sempre ao meu lado apoiando-me em tudo como o “quarteto fantástico”. Agradeço muito “Ao Mestre” que me iniciou nesta longa caminhada, meu ex-professor e eterno amigo, Frank Silva Bezerra.

A mulher que teve a sensibilidade de proporcionar a, oportunidade ímpar de estudar, ao menino, filho dos caseiros de seu sítio, que apenas lavava seu carro nos fim de semana. Obrigado Profa. Dra. Nadja Lima Pinheiro (UFRRJ), “dona Nadja”, por ter me possibilitado o melhor presente da minha vida, o estudo. Obrigado por me permitir interpretar na prática a compreensão do sentido da palavra “perspectiva”, mesmo diante de baixa estima causado pelos obstáculos.

Aos meus professores orientadores, Luis Cristóvão Porto e Samuel Santos Valença que me possibilitaram estar realizando este sonho. Serei eternamente grato pelo aprendizado. Bem como a equipe do Laboratório de Reparo Tecidual (UERJ) e Laboratório Compartilhado (UFRJ), Karla Pereira Pires, Manuella Lanzetti, Renata Tiscoski, Janaína “Janinana”, Jayda Eiras “Jaydoca”, Alan Lopes, Thiago Ferreira, Douglas Fonseca, Marina Valente, Natália, Rômulo Fonseca e Michel. Sem vocês nada disso seria possível.

Obrigado a todos pelo estímulo intelectual para concretizar este sonho.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo”.

Martin Luther King

RESUMO

SILVA, Marco Aurélio dos Santos. *Influência do equilíbrio redox sobre a resistência a fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos*. 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O desenvolvimento de fibrose pulmonar (FP) induzida por bleomicina tem sido associado com as características genéticas e estresse oxidativo. Nosso objetivo foi investigar a influência do equilíbrio redox sobre a resistência a fibrose pulmonar induzida por bleomicina em diferentes linhagens de camundongos. Uma única dose de bleomicina (0,1 U/camundongo) ou salina (50 mL) foi administrada por via intratraqueal (i.t.) em camundongos C57BL/6, DBA/2 e camundongos BALB/c. Vinte e um dias após a administração de bleomicina, a taxa de mortalidade foi acima de 50% em camundongos C57BL/6 e 20% em DBA/2, enquanto não foi observada em BALB/c. Houve um aumento na elastância ($p < 0.001$), ΔP_2 ($p < 0.05$), ΔP_{tot} ($p < 0.01$) e DE₁ ($p < 0.05$) em camundongos C57BL/6. O volume dos septos aumentaram em camundongos C57BL/6 ($p < 0.05$) e DBA/2 ($p < 0.001$). Os níveis de INF- γ foram reduzidas em camundongos C57BL/6 ($p < 0.01$). Níveis OH-prolina foram aumentados em camundongos C57BL/6 e DBA/2 ($p < 0.05$). Atividade e expressão de SOD foram reduzidas em camundongos C57BL/6 e DBA/2 ($p < 0.001$ e $p < 0.001$, respectivamente), enquanto que a atividade de CAT reduziu em todas as linhagens (C57BL/6: $p < 0.05$; DBA/2: $p < 0.01$, BALB/c: $p < 0.01$). A atividade da GPx e expressão GPx 1/2 diminuíram em camundongos C57BL/6 ($p < 0.001$). Nós concluímos que a resistência da FP pode também estar relacionada com a atividade e expressão de SOD em camundongos BALB/c.

Palavras-chave: Fibrose pulmonar. Desequilíbrio redox. Resistência. Linhagens de camundongos.

ABSTRACT

The development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis (PF) has been associated with differences in genetic background and oxidative stress status. Our aim was to investigate the cross-talk between the redox profile, lung architecture and function in PF in different mouse strains. A single dose of either bleomycin (0.1 U/mouse) or saline (50 μ L) was by intratracheal (i.t.) administration in C57BL/6, DBA/2 and BALB/c mice. Twenty-one days after bleomycin, the mortality rate was over 50% in C57BL/6 and 20% in DBA/2 mice and PF was not observed in BALB/c. There was an increase in Est ($p<0.001$), ΔP_2 ($p<0.05$), ΔP_{tot} ($p<0.01$) and ΔE ($p<0.05$) in C57BL/6 mice. Septa volume increase in C57BL/6 ($p<0.05$) and DBA/2 ($p<0.001$). The levels of INF- γ were reduced by in C57BL/6 mice ($p<0.01$). OH-proline levels were increased in C57BL/6 and DBA/2 mice ($p<0.05$). SOD activity and expression was reduced in C57BL/6 and DBA/2 mice ($p<0.001$ and $p<0.001$ respectively), whereas CAT was reduced in all strains 21 days following bleomycin when compared to saline groups (C57BL/6: $p<0.05$; DBA/2: $p<0.01$, BALB/c: $p<0.01$). GPx activity and GPx1/2 expression decreased in C57BL/6 ($p<0.001$). We conclude that the PF resistance may also be related to the activity and expression of SOD in BALB/c.

Keywords: Pulmonary fibrosis. Redox imbalance. Resistance. Mouse strains.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Imagens do período da “Guerra Química”	14
Figura 2-	Ilustração da <i>Streptomyces Verticillus</i> e estrutura química da bleomicina.....	15
Figura 3-	Formação dos principais oxidantes e ação da primeira linha de defesa antioxidante.	18
Figura 4-	Ativação da bleomicina e dano oxidativo em biomoléculas.....	20
Figura 5-	Ilustração da possível participação do desequilíbrio redox na patogênese da fibrose pulmonar.....	21
Figura 6-	Esquema do desenho experimental do modelo de fibrose pulmonar induzida por BLM em diferentes linhagens de camundongos.....	25
Figura 7-	Taxa de sobrevivência de 21 dias após a administração intratraqueal de BLM.....	30
Figura 8-	Níveis de citocinas no LBA dos camundongos 21 dias após a administração de BLM.....	32
Figura 9-	Níveis de hidroxiprolina no LBA 21 dias após a administração de BLM.....	33
Figura 10-	Fotomicrografias de pulmão coradas com hematoxilina e eosina (H&E)	34
Figura 11-	Análise estereológica do parênquima pulmonar.....	35
Figura 12-	Análise bioquímica da atividade das enzimas antioxidantes no pulmão.....	36
Figura 13-	Expressão de enzimas antioxidantes em extratos protéicos de homogeneizados de pulmão.....	37
Figura 14-	Níveis de nitrito no LBA 21 dias após a administração de BLM.....	38
Figura 15-	Análise bioquímica da concentração de malondialdeído no pulmão.....	39
Figura 16-	Esquema do resumo dos principais achados no estudo.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLM	Bleomicina
CAT	Catalase
Cu	Cobre
CuZnSOD	Superóxido dismutase cobre/zinco
DNA	Acido desoxirribonucléico
LBA	Lavado broncoalveolar
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EcSOD	Superóxido dismutase extracelular (SOD-3)
FDA	Food and Drug Administration
Fe ²⁺	Ferro (II)
Fe ³⁺	Ferro (III)
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H ⁺	Hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO ₂	Hidroperoxila
IL-6	Interleucina-6
INF- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico induzida
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratraqueal
LBA	Lavado Bronco-Alveolar
MDA	Malondialdeído
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
$O_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido
$\cdot OH$	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
NFκB	Fator nuclear kappa B
SOD	Superóxido dismutase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteases
TNF-α	Fator de necrose tumoral –α
XO	Xantina oxidase
ΔP1	Resistência de via aérea central
ΔP1	Resistência de via aérea periférica
ΔPtot	Resistência de via aérea total

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	13
1	OBJETIVOS.....	23
1.1	Objetivos gerais.....	23
1.2	Objetivos específicos.....	23
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
2.1	Animais.....	24
2.2	Desenho experimental.....	24
2.3	Função pulmonar.....	26
2.4	Coleta do lavado broncoalveolar (LBA)	26
2.5	Ensaio de ELISA.....	26
2.5.1	Determinação dos níveis de IL-6 e INF-γ.....	25
2.6	Total de colágeno através do ensaio de hidroxiprolina no LBA.....	27
2.7	Coleta de tecido e análises histológicas e estereológicas pulmonares.....	27
2.8	Preparo do homogeneizado tecidual pulmonar.....	27
2.9	Marcadores de desequilíbrio redox.....	28
2.10	Marcador de dano oxidativo.....	28
2.11	Ensaio para quantificação de nitrito no LBA.....	29
2.12	Western Blotting (SOD3, CAT e GPx 1/2)	29
2.13	Análise estatística.....	29
3	RESULTADOS.....	30
3.1	Curva de sobrevivência.....	30
3.2	Mecânica pulmonar.....	31
3.3	Resposta inflamatória.....	32
3.4	Nívies de hidroxiprolina.....	33
3.5	Perfil histológico pulmonar.....	33
3.6	Marcadores de desequilíbrio redox.....	36
3.7	Western blotting.....	37
3.8	Níveis de nitrito.....	38
3.9	Marcador de dano oxidativo.....	39
4	DISCUSSÃO.....	40
5	CONCLUSÃO.....	45

REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE A - Resumo apresentado no Congresso Experimental Biology, 2011.....	54
APÊNDICE B – Resumo apresentado na XXV Reunião Anual da FeSBE, 2010.....	55
APÊNDICE C - Resumo apresentado no Congresso European Respiratory Society, 2010	56
APÊNDICE D - Resumo apresentado no Congresso European Respiratory Society, 2010.....	57
APÊNDICE E - Artigo científico aceito l-NAME and l-arginine differentially ameliorate cigarette smoke-induced emphysema in mice.....	58
APÊNDICE F - Carta de submissão do artigo científico Redox imbalance and pulmonary function in bleomycin-induced fibrosis in C57BL/6, DBA/2 and BALB/c mice.....	66
APÊNDICE G - Carta de submissão do artigo científico Endotoxin-induced acute lung injury is dependent upon oxidative response.....	67
APÊNDICE H - Carta de submissão do artigo científico Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lung.....	68
ANEXO – Aprovação no Comitê de Ética.....	69

INTRODUÇÃO

A fibrose pulmonar é uma doença intersticial grave, crônica e restritiva resultante da lesão do parênquima por inflamação seguida de excessiva deposição de matriz extracelular (Abid, Malhotra *et al.*, 2001) com significativa morbidade e mortalidade (Odajima, Betsuyaku *et al.*; Marshall, 1984). Sua patogênese é complexa e envolve uma série de etapas que resulta em um ambiente alveolar alterado e um processo de reparo tecidual anormal com fibrose. Vários fatores, incluindo idade, predisposição genética, exposição à agentes ambientais como poeira de carvão ou sílica e a administração de agentes quimioterápicos como a Bleomicina (BLM) (Martins, Valenca *et al.*, 2009) são conhecidos por contribuírem para o seu desenvolvimento (Garcia-Prieto, Gonzalez-Lopez *et al.*, 2010).

A fibrose pulmonar idiopática é a mais devastadora forma da fibrose pulmonar, sendo progressiva e fatal, a sobrevida média é de aproximadamente 5 anos em 60% dos casos e menos de 10% geralmente respondem ao tratamento com corticosteróides. Ocorre mais frequentemente em homens com idade superior a 50 anos. A incidência de fibrose pulmonar no mundo é de aproximadamente 10/100.000 homens e 4/100.000 mulheres (Raghu, Weycker *et al.*, 2006). Estima-se que em 45 anos (2050) o número de novos casos estará entre 12 e 21 mil/ano (Fernandez Perez, Daniels *et al.*, 2010).

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

História da BLM

A era da quimioterapia contra o câncer teve início em 1940 com a utilização da mostarda nitrogenada e drogas antagonistas do ácido fólico. A mostarda nitrogenada, “gás mostarda” como ficou conhecido, foi produzido em 1822 por Despretz na Inglaterra e utilizado como um arma no período da “Guerra Química” (Figura 1A e 1B) durante a Primeira Guerra Mundial (1914 – 1918) (Marshall, 1984). No período da Segunda Guerra Mundial, dois farmacêuticos, Louis S. Goodman e Alfred Gilman, foram recrutados pelo Departamento de Defesa dos EUA para investigar potenciais aplicações terapêuticas de agentes químicos como o gás mostarda na “Guerra Química”. Eles viram que o gás mostarda suprime diversos tipos celulares e pensaram que tal descoberta poderia ter um importante papel no combate a células cancerosas (Gilman, 1963).

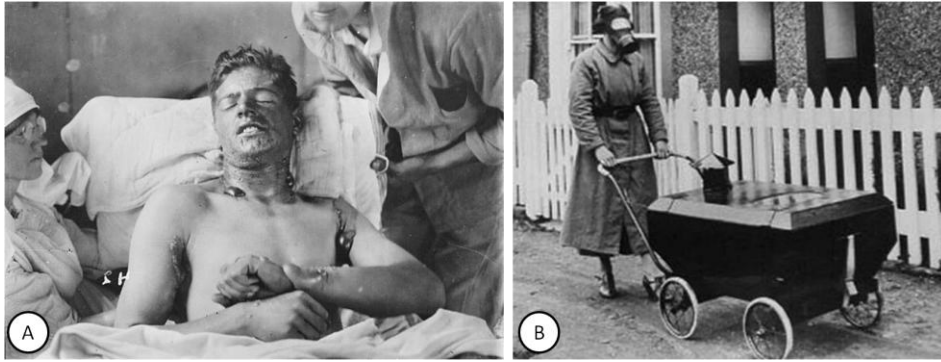


Figura 1 - Imagens do período da “Guerra Química”. Fotografia de soldado canadense ferido na pele e olhos após ataque com gás mostarda na Linha Hindenburg em 1918 - fim da Primeira Guerra Mundial (A). Fotografia de uma mãe que itens de segurança para transportar seu filho durante a “Guerra Química” (B). Adaptado de: Filosofía Jünger y Sloterdijk Guerra química por Adolfo Vásquez.

Goodman e Gilman foram os primeiros a criar um modelo animal, onde estabeleceram linfomas em ratos e demonstraram que poderiam tratá-los com os agentes de mostarda. Depois, em colaboração com Gustav Linskog, injetaram a *mustine* (substância a base de mostarda nitrogenada), em um paciente com linfoma Não-Hodgkin e observaram uma redução drástica nas massas do tumor do paciente, embora este efeito tenha durado apenas algumas semanas, e o paciente teve que voltar para um outro conjunto de tratamento, este foi o primeiro passo para a compreensão de que o câncer pode ser tratada com agentes farmacológicos (Goodman, Wintrobe *et al.*, 1984). A partir daí os agentes farmacológicos, os quimioterápicos, começaram a ser utilizados contra o câncer, dentre eles um antibiótico glicopeptídeo produzido pela bactéria *Streptomyces verticillus* (Figura 2A), a BLM (BLM).

A BLM (Figura 2B) foi descoberta em 1966 quando o cientista japonês Hamao Umezawa identificou sua atividade anticâncer, enquanto estudava os efeitos da *Streptomyces Verticillus* em filtrados de cultura (Umezawa, Maeda *et al.*, 1966). A droga foi lançada no Japão pela Nippon Kayaku em 1969 e nos EUA, a BLM ganhou a aprovação da Food and Drug Administration (FDA) em julho de 1973. A BLM foi inicialmente comercializada nos EUA pela Bristol-Myers Squibb sob a marca Blenoxane® (Li, Liu *et al.*, 2006).

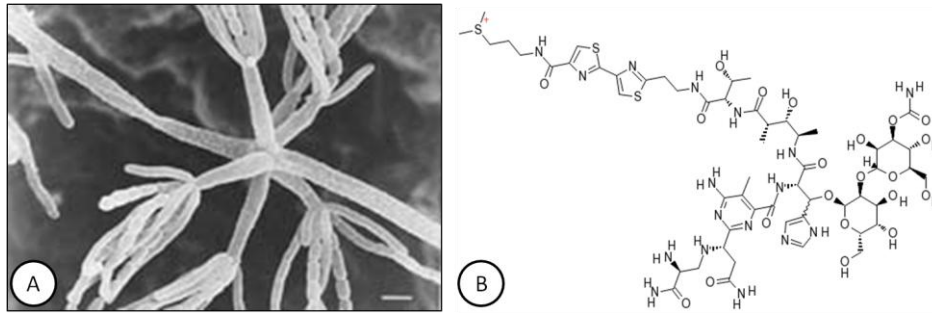


Figura 2 - Ilustração da *Streptomyces Verticillus* T. (Harada & M. Hamada) (A). Estrutura química da BLM (B).

A eficácia deste quimioterápico está relacionada com sua capacidade de causar quebras no DNA. A droga é utilizada até hoje no tratamento contra linfomas de Hodgkin e Não-Hodgkin e como um componente do conhecido esquema ABVD (Adriamicina, BLM, Vinblastina e Decarbazina) para carcinoma de células escamosas e câncer testicular (Muller, Niethammer *et al.*, 1998). Embora tenha um importante efeito sobre as células com câncer tem a sua eficácia terapêutica limitada pelo desenvolvimento de toxicidade pulmonar (Lewis e Nydorf, 2006).

Fibrose pulmonar

O entendimento da patogênese da fibrose pulmonar continua a evoluir desde a criação de seu modelo hipotético inicial, proposto há mais de 3 décadas atrás. A hipótese fisiopatológica da fibrose pulmonar sugeria que apenas a inflamação crônica era a causa da fibrose pulmonar (Crystal, Fulmer *et al.*, 1976; Keogh e Crystal, 1982; Martins, Valença *et al.*, 2009). Esta hipótese foi posteriormente posta em causa com base em duas observações clínicas: (a) a inflamação tecidual, independente de aguda ou crônica, tem relação com a gravidade da fibrose pulmonar, e (b) o uso de drogas imunossupressores não influencia no curso natural da doença (Selman, 2001; Selman e Pardo, 2002). Durante a última década, vários conceitos seguintes levaram ao refinamento destas hipóteses através de novas observações: (a) a perda da barreira da membrana alvéolo-capilar (BMAC) representa o "ponto de não retorno" da integridade que favorece o reparo tecidual com fibrose patológica ao invés do restabelecimento da arquitetura pulmonar normal (Wallace, Fitch *et al.*, 2007); (b) a falha de reepitelização e reendotelização durante a perda da integridade da BMAC na pneumonia intersticial (PI) associa-se a destruição da arquitetura de pulmão e fibrose patológica; (c) o fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) é necessário, mas não

inteiramente suficiente para promover fibrose permanente (Sime, Xing *et al.*, 1997); (d) uma lesão persistente com participação de antígeno e irritantes é necessária para a propagação da fibrose, e (e) os fibrócitos participam dos mecanismos da regulação da fibrose (Garcia-Prieto, Gonzalez-Lopez *et al.*, 2010) pulmonar associados aos fibroblastos (Gomperts e Strieter, 2007).

A fibrose pulmonar pode ser causada por diferentes tipos de estímulos como persistência de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), exposição à sílica (silicose) ou como resultado de citotoxicidade ao tratamento com BLM. Durante a quimioterapia com BLM, os fibrócitos originários da medula óssea são recrutados para o pulmão agindo como progenitores miofibroblásticos. A lesão pulmonar intersticial (epitelial e endotelial) estimula o influxo de células inflamatórias como macrófagos, neutrófilos, linfócitos e mastócitos através da ativação de fator de transcrição nuclear κ B (NF κ B). Os macrófagos alveolares e os fibroblastos liberam fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) para neutrófilos que secretam proteases, resultando na manutenção da alveolite e lesão dos pneumócitos tipo I, hiperplasia de pneumócito tipo II na tentativa de regenerar o revestimento epitelial alveolar liberando TGF- β 1 (Ulloa, Doody *et al.*, 1999).

Fibrose pulmonar e linhagens de camundongos

Nós demonstramos que os diferentes padrões de comprometimento fumaça de cigarro dependem da cepa do camundongo estudadas, sugerindo a influência da herança genética na susceptibilidade aos efeitos da fumaça de cigarro na cicatrização de feridas (Cardoso, Souza *et al.*, 2007; Cardoso, Mendes *et al.*, 2009). Órgão de diferentes linhagens de camundongos pode exibir uma série de suscetibilidades ao estresse oxidativo induzido por fumaça de cigarro. Camundongos BALB/c e C57BL/6 parecem ser as melhores escolhas como modelo experimental para estudar efeitos de fumaça de cigarro no fígado e pulmão, e as linhagens C3H e C57BL/6 para os efeitos fumaça de cigarro sobre o cérebro (Rueff-Barroso, Trajano *et al.*, 2010).

Em modelos experimentais utilizando BLM, a fibrose pulmonar é induzida através de uma única dose intratraqueal (Chung, Monick *et al.*, 2003) que causa uma lesão permanente associado à alteração da histoarquitetura e da função pulmonar semelhantes àquelas observadas em humanos (Liu, 2008). Foi demonstrado que as características genéticas desempenham um importante papel sobre a susceptibilidade individual do ser humano a desenvolver fibrose pulmonar (Schrier, Kunkel *et al.*, 1983; Du Bois, 2002). Em animais, a

gravidade da fibrose pulmonar induzida pela BLM varia entre as diferentes linhagens de camundongos (Harrison e Lazo, 1988; Lemay e Haston, 2005). Por exemplo, camundongos C57BL/6 são mais sensíveis, DBA/2 apresentam uma resposta intermediária, e camundongos BALB/c são resistentes ao desenvolvimento de fibrose pulmonar induzida pela BLM (Schrier, Kunkel *et al.*, 1983). Camundongos da linhagem C57BL/6 expressam Th1 (INF- γ e IL-12), enquanto camundongos DBA/2 e BALB/c expressam preferencialmente citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL13) (Chung, Monick *et al.*, 2003; Kikuchi, Ishii *et al.*, 2011). Citocinas Th1 estão relacionadas com o aumento de inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs), que diminuem a atividade das metaloproteinases (MMPs) e provocam a deposição excessiva de colágeno com aumento de hidroxiprolina (Martins, Valenca *et al.*, 2009) e consequente fibrose (Segel, Izbicki *et al.*, 2003; Manoury, Nenan *et al.*, 2006).

Radicais livres

O termo radical livre refere-se a átomos ou moléculas altamente reativos, que apresentem um número ímpar de elétrons em sua última camada orbital eletrônica. É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos e/ou moléculas. Os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução (Magder, 2006). As espécies reativas de oxigênio (ERO) são encontradas em todos os sistemas biológicos, em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O₂ (oxigênio) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H₂O (Aitken e Roman, 2008). Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), hidroperoxila (HO₂[·]) e o hidroxila ([·]OH) (Buffenstein, Edrey *et al.*, 2008). As espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o peróxinitrito (ONOO⁻), em sua maioria, são formadas a partir da junção do óxido nítrico (NO), produzido através da conversão da L-arginina em L-citrulina pela atividade das óxido nítrico sintases (NOS) (Brigham, 1986; Ryrfeldt, Bannenberg *et al.*, 1993; Heunks e Dekhuijzen, 2000). No trato respiratório, as principais fontes endógenas de oxidantes são macrófagos alveolares, células epiteliais, células endoteliais, neutrófilos, monócitos e linfócitos recrutados durante a inflamação (Rajendrasozhan, Yang *et al.*, 2008).

Enzimas antioxidantes

Para contrabalançar a produção de EROs/ERNs o organismo dispõe de um eficaz sistema antioxidante enzimático e não enzimático (Figura 3) (Espey, Miranda *et al.*, 2000; Burlacu, Jinga *et al.*, 2001; Mcfarland, Blokhin *et al.*, 2007; Ryter, Kim *et al.*, 2007). A ativação de células inflamatórias resulta na formação de $O_2^{\cdot-}$, que é rapidamente convertido a H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD). A enzima catalase (Russo, Garcia *et al.*, 2010) reage de forma muito eficiente com H_2O_2 produzido endogenamente pelas células para formar água e oxigênio molecular. A função bioquímica da glutaciona peroxidase (GPx) consiste em reduzir hidroperóxidos a álcoois e em reduzir o H_2O_2 em H_2O , utilizando a glutaciona reduzida (GSH) como agente redutor, transformando esta molécula em glutaciona oxidada (GSSG) (Mates, Perez-Gomez *et al.*, 1999). O desequilíbrio redox é resultado da alteração da atividade das enzimas antioxidantes frente a estímulos oxidantes, aumentando ou reduzindo a atividade das mesmas, seja por influência direta sobre os substratos, ou por prejuízo à síntese destas enzimas (Kinnula, 2005). Logo, quando há uma sobreposição dos níveis dos oxidantes sobre os antioxidantes, resultando em dano oxidativo a proteína, lipídios e/ou DNA caracteriza-se, o estresse oxidativo (Rahman, Biswas *et al.*, 2006).

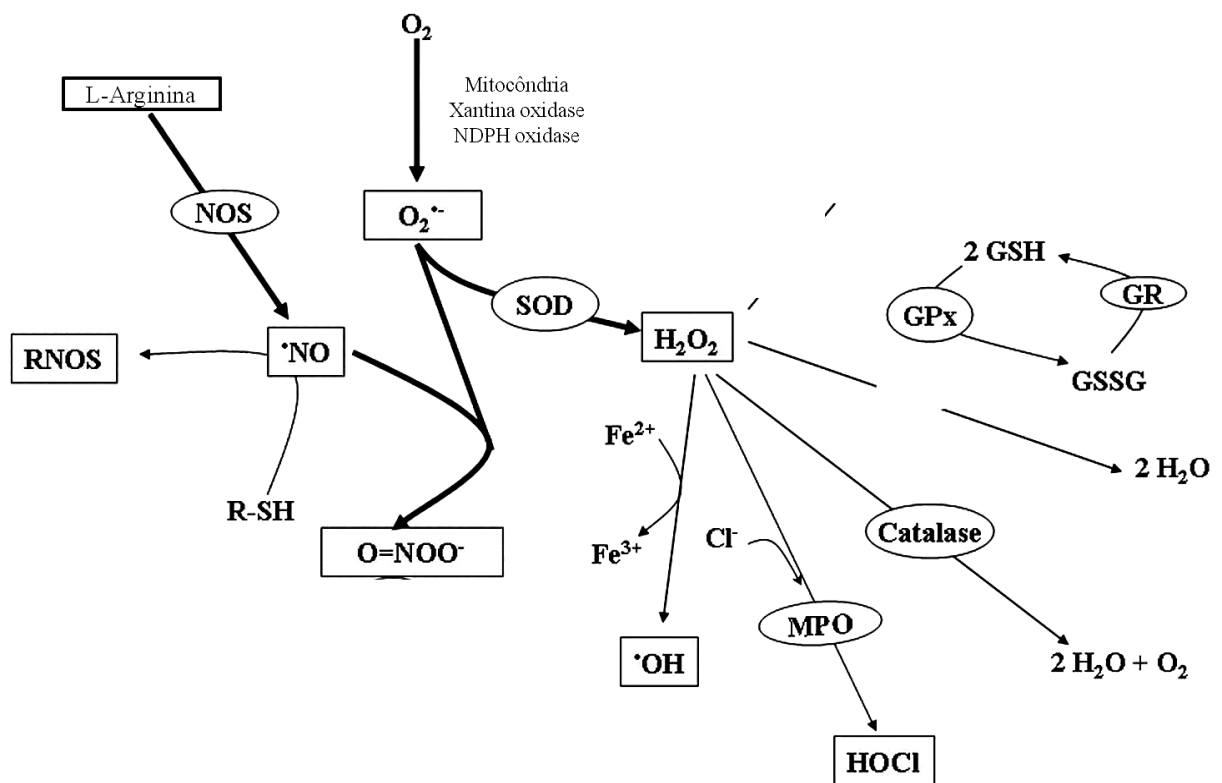


Figura 3 - Formação dos principais oxidantes e ação da primeira linha de defesa antioxidante. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutaciona peroxidase; GR: glutaciona

redutase; GSH: glutationa reduzida; GSSG: glutationa oxidada; MPO: mieloperoxidase; NADPH oxidase: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase; NOS: óxido nítrico sintase; ERNs: espécies reativas de nitrogênio; O=NOO⁻: peróxinitrito; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; OH: radical hidroxila; H₂O: água; HOCl: ácido hipocloroso. Adaptado de Mates e Sanchez (Mates, Perez-Gomez *et al.*, 1999)

BLM e estresse oxidativo

A BLM apresenta propriedade citotóxica anti-neoplásica (Ebihara, Venkatesan *et al.*, 2000) e é considerada como uma fonte exógena de ERO (Dolhnikoff, Mauad *et al.*, 1999), pois ela tem a capacidade de se ligar a metais de transição como o ferro Fe-(II) e, na presença de O₂ ou de H₂O₂, gera radical [•]OH (Lombard-Gillooly e Hubbard, 1993). A BLM aumenta a produção de ERO em macrófagos pulmonares e células epiteliais alveolares do tipo II in vivo (Inghilleri, Morbini *et al.*, 2006), aumenta a apoptose de células epiteliais do pulmão de maneira dose-dependente (Hoshino, Nakamura *et al.*, 2003; Wallach-Dayana, Izbicki *et al.*, 2006). Ao se ligar ao Cu (II) no plasma e no meio intracelular, o complexo BLM-Cu (II), pode ser reduzido a BLM-Cu (I) podendo reagir com O₂ para iniciar a ativação no núcleo ou perder esta forma de metal e se ligar ao Fe (II). Para evitar que a BLM seja ativada pela reação de Fenton formando outro complexo (BLM-Fe (III)-OOH), o complexo BLM-Cu (II), deve ser reduzido à BLM-Cu (I) no meio intracelular (Figura 4A). Uma vez ativada pode ocorrer dano oxidativo de proteínas, lipídios, DNA e RNA (Figura 4B) (Chen e Stubbe, 2005).

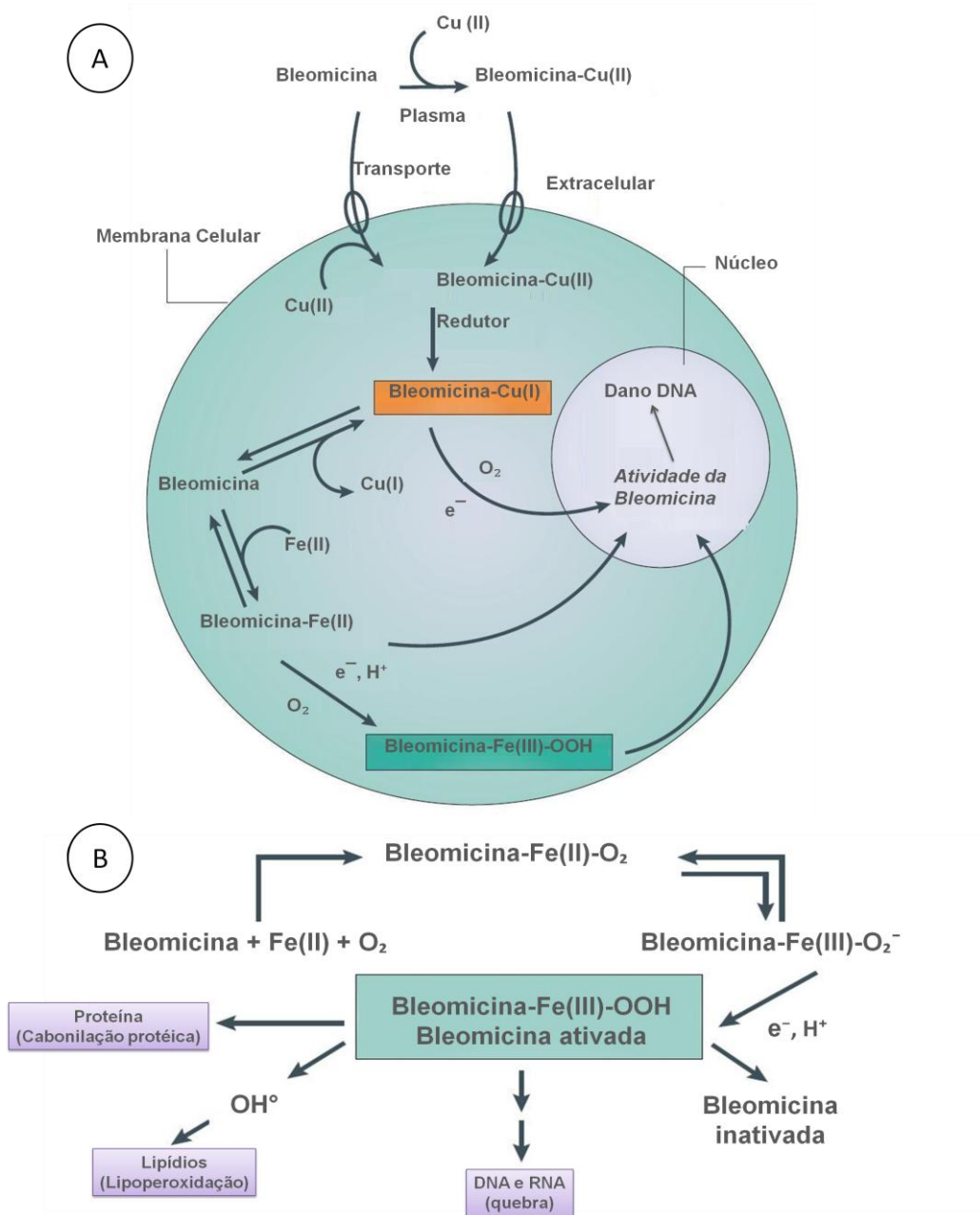


Figura 4 - Ativação da BLM e dano oxidativo em biomoléculas. Mecanismos propostos para a geração de ativação de BLM *in vivo* na presença de O_2 (A). Dano oxidativo em biomoléculas da célula causado pela ativação da BLM (B). Adptado de Chen (Chen e Stubbe, 2005).

Em detrimento a produção excessiva de ERO produzida via BLM (Mcanulty, Moores *et al.*, 1991; Ao, Lubman *et al.*, 2008), além da 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 (Tanaka, Ishihara *et al.*, 2010). Após um estímulo lesivo ocorre fragmentação de componentes da matriz extracelular (MEC) via estresse oxidativo (Figura 5A) (Gao, Kinnula *et al.*, 2008). No capilar pulmonar o O_2^- estimula a

agregação plaquetária e no espaço alveolar pode ocorrer a formação de ONOO^- e ativação de quimiocinas nos macrófagos que recrutam neutrófilos para o interstício pulmonar (Figura 5) que culmina em fibrose pulmonar (Fattman, Chang *et al.*, 2003).

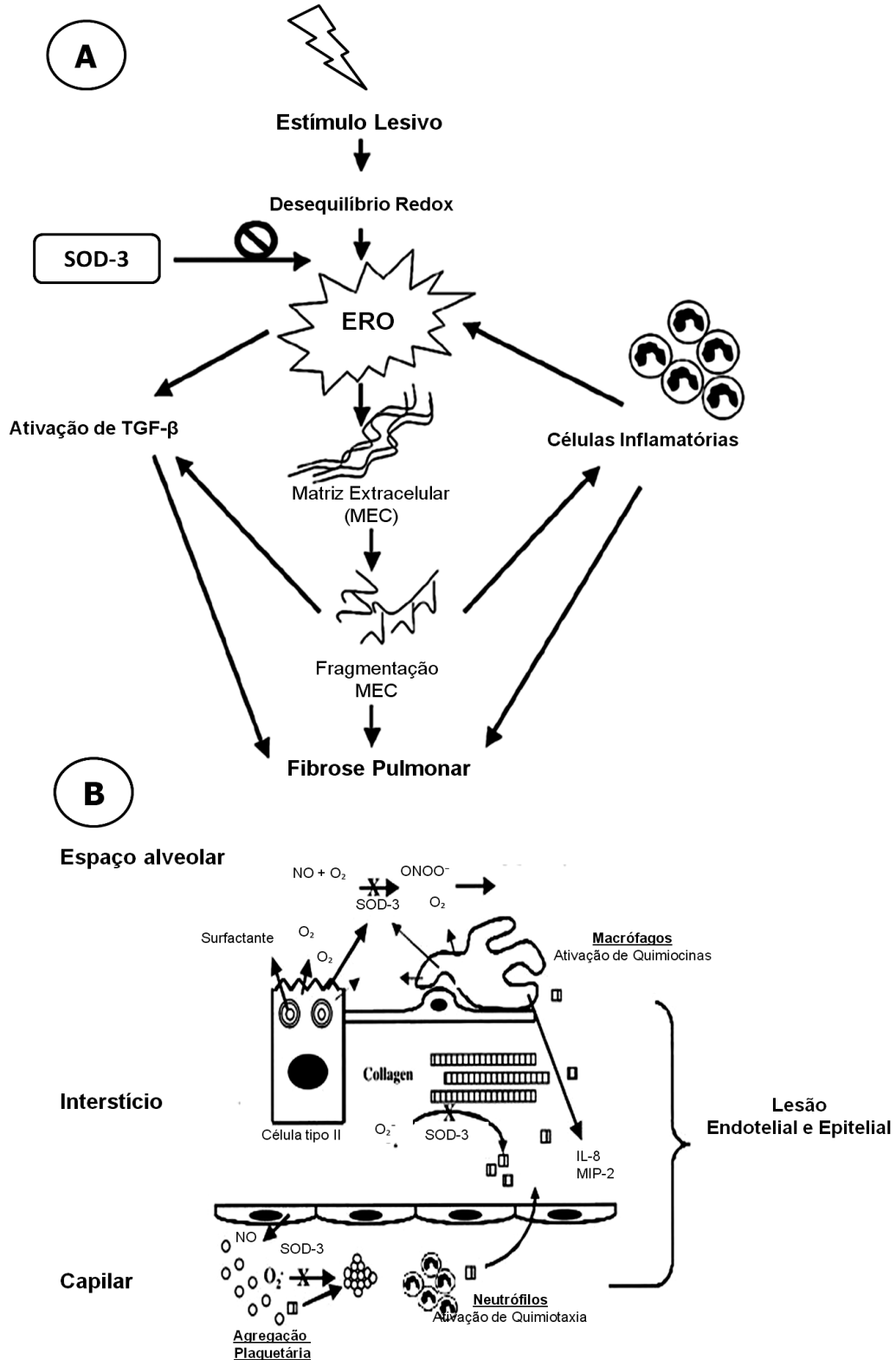


Figura 5 - Ilustração da possível participação do desequilíbrio redox na patogênese da fibrose pulmonar.

Estudos anteriores de nosso laboratório descrevem que a inalação aguda e crônica de fumaça de cigarro resulta no aumento do influxo de células inflamatórias para o pulmão de camundongos (Da Hora, Valenca *et al.*, 2005; Valenca, Castro *et al.*, 2006) e que este processo está ligado ao fenômeno de estresse oxidativo (Valenca, Bezerra *et al.*, 2008; Rueff-Barroso, Trajano *et al.*, 2010). Além disso, mostramos os efeitos de antioxidantes como o alfa-tocoferol e o ácido ascórbico (Silva Bezerra, Valenca *et al.*, 2006), N-acetil cisteína (NAC) e mercaptopropionil glicina (MPG) (Pires, Bezerra *et al.*, 2010), assim como o chá mate (Lanzetti, Bezerra *et al.*, 2008) sobre a lesão pulmonar induzida pela fumaça de cigarro.

Já foi demonstrado que EROs estão envolvidos com a lesão pulmonar induzida por BLM (Cortijo, Cerda-Nicolas *et al.*, 2001; Serrano-Mollar, Closa *et al.*, 2002; Iraz, Erdogan *et al.*, 2006). No pulmão, EROs podem inativar enzimas antioxidantes provocando morte de células alveolares (Ritter, Andrades *et al.*, 2004). Alguns estudos têm mostrado uma diminuição na atividade de enzimas antioxidantes após a administração BLM (Bowler, Nicks *et al.*, 2002; Erdogan, Fadillioglu *et al.*, 2006; Iraz, Erdogan *et al.*, 2006). O esgotamento tecidual pulmonar da atividade de SOD e CAT indica indiretamente a ação de oxidantes. SOD poderia diretamente atenuar a lesão pulmonar, reduzindo as concentrações de O_2^- no espaço extracelular e esta redução pode diminuir a estimulação de fibroblastos e diminuir recrutamento de células inflamatórias (Bowler, Nicks *et al.*, 2002).

Embora as mudanças nas propriedades da mecânica estática do pulmão têm sido relativamente bem definida, pouco se sabe sobre as mudanças no comportamento dinâmico mecânico (Ebihara, Venkatesan *et al.*, 2000), como a resistência do tecido durante a respiração (Ludwig, Dreshaj *et al.*, 1987) que aumentada em pacientes com fibrose pulmonar (Bachofen e Scherrer, 1967). Estudos têm demonstrado que mesmo uma única exposição à sílica pode levar a alterações pulmonares funcionais com aumento da resistência das vias aéreas e elastância estática (Rocco, Facchinetti *et al.*, 2004).

Estudo com modelos experimentais mostraram que alguns camundongos são resistentes e outros sensíveis a BLM (Kikuchi, Ishii *et al.*; Chung, Monick *et al.*, 2003), entretanto, ainda permanece pouco esclarecido o efeito do equilíbrio redox sobre a histioarquitetura e função pulmonar em diferentes linhagens de camundongos após a administração de BLM. Desse modo este conhecimento pode favorecer a compreensão dos motivos pelos quais alguns seres humanos são resistentes a fibrose pulmonar ao serem tratado com BLM durante a quimioterapia antineoplásica.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Investigar a influência do equilíbrio redox sobre a resistência a fibrose pulmonar induzida por BLM em diferentes linhagens de camundongos.

1.2 Objetivos específicos

- Analisar a taxa de sobrevivência das diferentes linhagens de camundongos após administração de BLM;
- Investigar as alterações funcionais do pulmão através da mecânica ventilatória 21 dias após administração de BLM;
- Analisar a expressão de citocinas IL-6 e INF- γ e o conteúdo de hidroxiprolina no lavado broncoalveolar (LBA);
- Investigar padrão das estruturais do parênquima pulmonar através da histologia (Hematoxilina e Eosina);
- Analisar os marcadores de desequilíbrio redox no homogeneizado de pulmão através da atividade enzimática da superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) e expressão de superóxido dismutase extracelular (SOD-3), catalase (CAT) e glutatona peroxidase 1/2 (GPx 1/2);
- Verificar os níveis de nitrito no LBA;
- Analisar o dano oxidativo através dos níveis de malondialdeído (MDA) no homogeneizado de pulmão.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6, DBA/2 e BALB/c machos, oito semanas, acondicionados, em grupos de 10 animais/caixa, 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, 19h00-07h00) e exaustão 15 min/h. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sob o número #IBCCF108 (Anexo A).

2.2 Desenho experimental

Os animais receberam uma única dose de 0.1 U/animal de BLM (Sigma-Adrich) via intratraqueal (i.t.) diluída em 50 mL de salina (Manoury, Nenan *et al.*, 2006) (Grupo BLM - 20 animais/linhagem) ou somente com 50 mL de salina (Grupo Salina - 10 animais/linhagem) sob anestesia quetamina por via intraperitoneal (i.p.). Foi avaliada a taxa de sobrevivência dos animais após a administração de BLM até completar o período de 21 dias. Os camundongos restantes passaram por protocolo de função pulmonar e foram eutanasiados por exsanguinação. Todos experimentos foram realizados três vezes.

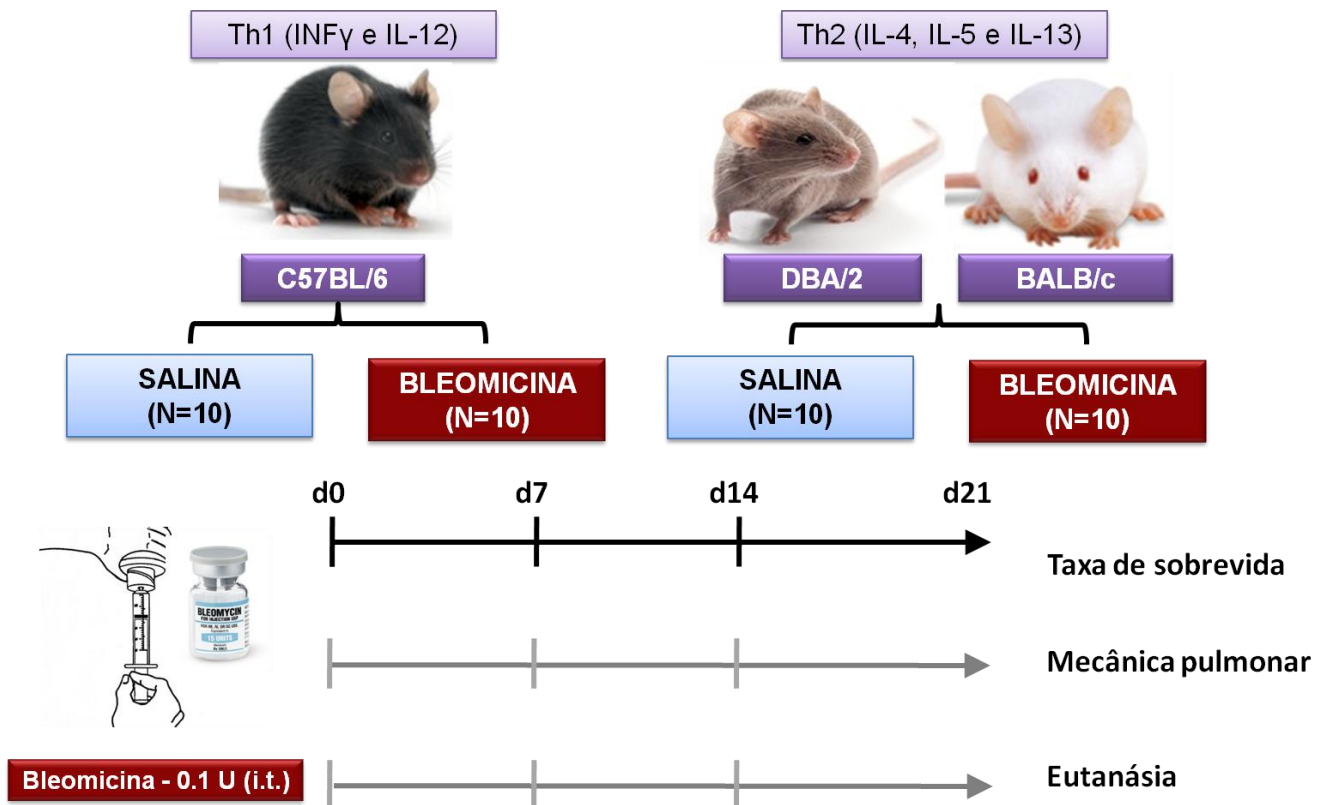


Figura 6 - Esquema do desenho experimental do modelo de fibrose pulmonar induzida por BLM em diferentes linhagens de camundongos. Imagem de própria autoria.

2.3 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 com brometo de pancurônio, (1.3 mg. kg⁻¹ i.p.) e ventilados com uma frequência de 100 ciclos por minuto (ciclos/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), o 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, Xisto, Ferreira *et al.*, 2007; Burburan, Xisto e Rocco, 2007). A resistência ($\Delta P1$), viscoelasticidade pulmonar ($\Delta P2$), pressão total após a interrupção do fluxo ($\Delta P_{tot} = \Delta P1 + \Delta P2$), elastância estática (Amara, Goven *et al.*, 2010) e dinâmica (Edyn) pulmonar foram calculadas 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, Seidl *et al.*, 2000).

2.4 Coleta do lavado broncoalveolar (LBA)

Imediatamente após a eutanásia, foi realizado o LBA. A traquéia dos animais foi canulada e os espaços aéreos pulmonares foram lavados com solução salina (500 μ L) três vezes (volume final de 1,2-1,5 mL). As amostras foram mantidas em gelo até o final do procedimento, a fim de evitar lise celular (Castro, Legora-Machado *et al.*, 2004).

2.5 Ensaio de ELISA

2.5.1 Determinação dos níveis de IL-6 e INF- γ

Os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IFN- γ no LBA foram analisadas pelo ensaio de ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (R&D Systems) seguindo as instruções do fabricante.

2.6 Total de colágeno através do ensaio de hidroxiprolina no LBA

O conteúdo de hidroxiprolina (ng/mg de proteína) no LBA foi determinado por um método colorimétrico previamente descrito (Woessner, 1961) com o objetivo indicar o índice quantitativo de fibrogênese e fibrose. Inicialmente, 8 μ L de cada amostra foi incubado com 40 μ L de cloramina-T 0.05 M por 20 min à temperatura ambiente. A mistura foi então incubada com 40 μ L de ácido perclórico 3 M por 5 min à temperatura ambiente. Finalmente, a mistura foi incubada com 40 μ L de 20% *p*-dimetilbenzaldeído por 20 min a 60°C. As amostras foram analisadas em leitor de ELISA a 550 nm.

2.7 Coleta de tecido e análises histológicas e estereológicas pulmonares

Os pulmões direitos de cinco animais de cada linhagem foram removidos e imersos em formalina tamponada (10%) e armazenados em temperatura ambiente por 48 horas, processados e incluído de modo a se obter fragmentos do ápice, terço médio e base. Foram realizados cortes de 5 μ m de espessura e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HeE) para análise histopatológica. Dez campos foram randomicamente analisados utilizando um microscópio (objetiva de 20 \times , Carl Zeiss modelo Axiolab, Oberkochen, Alemanha), ligado a uma câmera de vídeo colorida (JVC modelo TK-C380, Osaka, Japão) e a um monitor de vídeo (Sony Trinitron modelo PVM-14N2U, Londres, Reino Unido).

A estereologia foi realizada através de um sistema-teste composto por 42 pontos (M42). O sistema teste foi acoplado a um monitor (tela plana). A densidade de volume (V_v) de septo ($V_{v[\text{septo}]}$) e de alvéolo ($V_{v[\text{alvéolo}]}$) foram quantificados através do número de pontos (Kappus, Mahmutoglu *et al.*) que atingiram essas estruturas e dividido pelo número total de pontos do sistema teste (P_t). Temos então que $V_v = P_p/P_t$ (Weibel, Hsia *et al.*, 2007).

2.8 Preparo do homogeneizado tecidual pulmonar

Os pulmões esquerdos dos animais utilizados nos experimentos com BLM foram removidos, homogeneizados em gelo com 10% (w/v) PBS (pH 7,3) usando um homogeneizador (Nova Técnica, SP, Brasil) e em seguida, centrifugados a 3000g por 5 minutos (FANEM[®], SP, Brasil). O sobrenadante foi coletado e o volume final de todas as amostras foi ajustado para 1,5 mL com tampão fosfato de potássio. Essas amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

2.9 Análises bioquímicas para marcadores de desequilíbrio redox

Para investigar os efeitos sobre o desequilíbrio redox, as atividades das enzimas antioxidantes citadas abaixo foram realizadas para o homogeneizado de pulmão dos experimentos com BLM.

O ensaio para dosagem de proteínas foi realizado segundo o método de Bradford (Bradford, 1976). O reagente de Bradford contém como componente principal o azul de comassie que, em soluções ácidas se liga a proteínas presentes no lavado broncoalveolar (LBA) e homogeneizado pulmonar, alterando sua absorvância de 456 nm para 595 nm medidas em um leitor de microplacas (Bio-Rad mod 550, Hercules, CA, USA). Uma curva padrão, em triplicata, foi feita utilizando concentrações crescentes de 0,1% de albumina (0.5-10 μ L).

Alíquotas de homogeneizados pulmonares foram utilizadas nos ensaios bioquímicos para SOD, CAT e GPx por métodos espectrofotométricos. A atividade SOD (U/mg de proteína) foi estimada através da inibição da auto-oxidação da adrenalina e lida em um comprimento de onda de 480 nm (Mccord e Fridovich, 1969). A atividade da CAT (U/mg de proteína) foi mensurada em resposta a quantidade de H₂O₂ e lida em um comprimento de onda de 240 nm (Aebi, 1984). A atividade da GPx foi mensurada através do monitoramento da taxa de oxidação da NADPH em 340 nm na presença de peróxido de hidrogênio (Flohe e Gunzler, 1984).

2.10 Marcador de dano oxidativo

Como índice de peroxidação lipídica, foi utilizado o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para análise de malondialdeído (MDA) durante uma reacção ácido-aquecimento como descrito por Draper e cols (Draper, Squires *et al.*, 1993). Resumidamente, as amostras de homogeneizados de pulmão foram misturados com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e foram aquecidas em banho-maria por 1 hora. Níveis de TBARS foram determinados por absorvância a 532 nm e expressas como equivalentes de malondialdeído (MDA nM/mg de proteína).

2.11 Ensaio para quantificação de nitrito no LBA

Níveis de nitrito, um subproduto do metabolismo o óxido nítrico (NO), foi mensurado no LBA ($\mu\text{Mol/mg}$ de proteína) baseado na reação de Griess. Um total de 100 μL de amostra foi misturada com 100 μL do reagente de Griess (1% sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico e de 0,1% dicloridrato de diamina naftaleno em água) e incubadas em temperatura ambiente por 10 min seguido por leitura da absorbância 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 (Giovannoni, Land *et al.*, 1997).

2.12 Western Blotting (SOD3, CAT e GPx 1/2)

Vinte microgramas de proteínas do pulmão homogeneizado foram submetidos à eletroforese em gel de PAGE a 8% e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham, Arlington Heights, IL, EUA). A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com 5% de BSA e, posteriormente, incubadas em overnight com anticorpo policlonal goat anti-mouse SOD-3, CAT e GPx 1/2 (1:1000 diluição, SantaCruz Biotechnology, SantaCruz, CA, USA). Após três etapas de lavagem (10 minutos cada), os teores de proteína foram detectados com o anticorpo secundário (1:10000 diluição) ligada à peroxidase (Dako Cytomation, Santa Barbara, CA, EUA), e os complexos ligados foram detectados utilizando método de quimioluminescência (ECL, Amersham, CA, USA). Padrão de peso molecular foi usada para especificar a faixa-alvo (Precision Plus Protein All Blue Standards, Bio Rad).

2.13 Análise estatística

As taxas de sobrevivência foram expressas em porcentagem e o teste de Mantel-Cox foi utilizado para detectar diferenças na sobrevivência entre as linhagens de camundongos. Os dados mensurados foram expressos em média \pm erro padrão da média. O número de animais para cada experimento é descrito abaixo e são representativos de três experimentos separados. Após teste de normalidade, os dados paramétricos foram analisados pelo teste de variância one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. E os dados não-paramétricos através do teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

Resultados apresentados a seguir são representativos de três experimentos separados. O número de animais empregado é descrito a seguir para cada uma das análises realizadas.

3.1 Curva de sobrevivência

As curvas de sobrevivência dos grupos são mostrados na Figura 1. Não houve efeito da administração de BLM sobre a taxa de sobrevida de camundongos BALB/c. Em comparação com camundongos BALB/c, a mortalidade foi maior nos camundongos C57BL/6 e DBA/2 representado por um declínio gradual na taxa de sobrevida de camundongos a partir de 24 horas (C57BL/6) e 7 dias (DBA/2). A mortalidade foi superior a 50% em camundongos C57BL/6 e de aproximadamente 20% em camundongos DBA/2 ao final do experimento (n=20 por grupo).

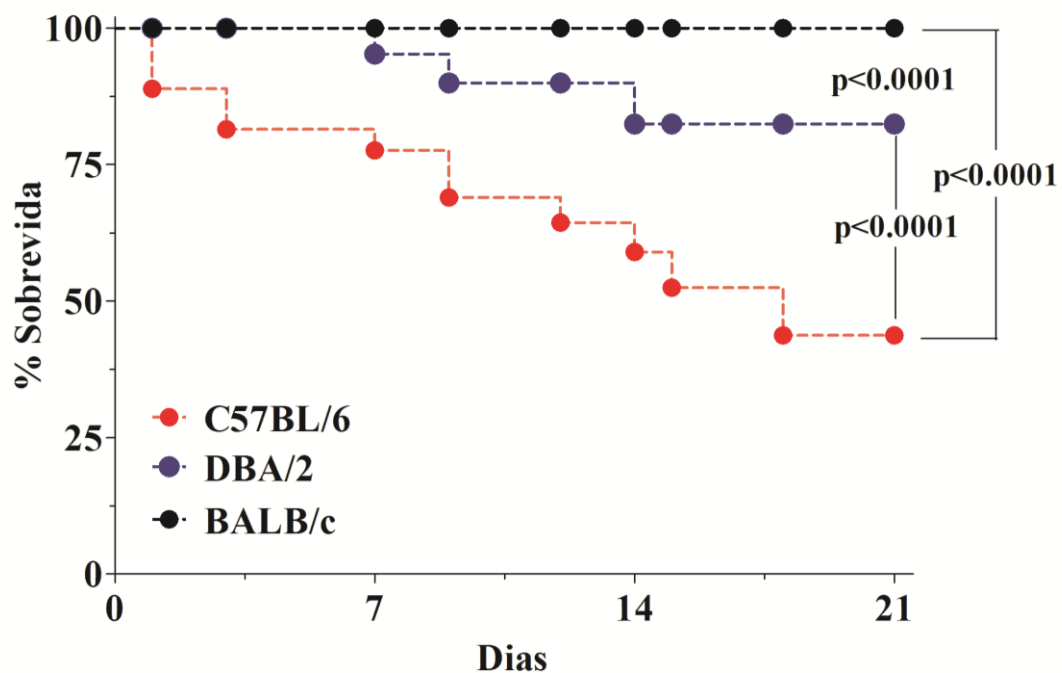


Figura 7 - Taxa de sobrevida de 21 dias após a administração intratraqueal de BLM. A administração de BLM aumenta a mortalidade em ambos os camundongos C57BL/6 e DBA/2. As taxas de sobrevivência foram expressos em porcentagem e o Mantel-Cox log-rank test (teste X^2) foi utilizado para detectar diferenças na taxa de sobrevivência entre as linhagens ($p < 0.05$ comparado ao BALB/c). em preto: BALB/c; em azul: DBA/2; em vermelho: BALB/c (n = 10/grupo).

3.2 Mecânica pulmonar

Os valores da mecânica pulmonar durante a respiração espontânea obtidos em cada grupo estão apresentados na Tabela 1. Foi observado um aumento de 53% na elastância pulmonar ($p<0.001$), na viscoelasticidade ($\Delta P2$), (35%, $p<0.05$), no componente viscoelástico da resistência (ΔP_{tot}) (26%, $p<0.01$) e de 35% do componente viscoelástico da resistência no pulmão ($p<0.05$) de camundongos C57BL/6 no 21º dia após a administração de BLM (n=10 por grupo).

Tabela 1: Mecânica ventilatória dos camundongos 21 dias após administração de BLM.

Grupos	Elastância	$\Delta P1$	$\Delta P2$	ΔP_{tot}	DE,l	
C57BL/6	Salina	33.8 ± 1.47	0.62 ± 0.03	0.95 ± 0.07	1.57 ± 0.06	4.55 ± 0.19
	BLM	51.8 ± 4.89***	0.69 ± 0.03	1.28 ± 0.09*	1.98 ± 0.11**	6.16 ± 0.45*
DBA/2	Salina	21.6 ± 0.79	0.48 ± 0.01	0.68 ± 0.02	1.16 ± 0.02	3.47 ± 0.15
	BLM	20.6 ± 1.09	0.48 ± 0.01	0.73 ± 0.04	1.21 ± 0.04	3.64 ± 0.20
BALB/c	Salina	44.3 ± 2.34	0.72 ± 0.04	1.25 ± 0.06	1.98 ± 0.07	6.50 ± 0.38
	BLM	43.6 ± 3.14	0.67 ± 0.05	1.30 ± 0.07	1.96 ± 0.11	6.40 ± 0.34

Elastância – Elastância pulmonar estática; $\Delta P1$ – resistência das vias aéreas; $\Delta P2$ – propriedade viscoelástica; ΔP_{tot} – $\Delta P1 + \Delta P2$; DE,l – componente viscoelástico da resistência; Dados expressos em média ± erro padrão e analisados pelo ANOVA com o pos-teste de Tukey considerando estatisticamente significativo níveis de * $p<0.05$, ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$; Todos os grupos BLM foram comparados com os respectivos grupos salina.

3.3 Resposta inflamatória

Os níveis de INF- γ , IL-6 são apresentados na Figura 8. Os níveis de INF- γ (Figura 8A) reduziram 43% nos camundongos C57BL/6 ($p<0.01$) quando comparado com o grupo salina. Houve um aumento de 76% nos níveis de IL-6 (Figura 8B) em camundongos C57BL/6 ($p<0.01$), enquanto diminuiu 40% nos camundongos DBA/2 ($p<0.05$) quando comparados com os respectivos grupos salina (n=10 por grupo).

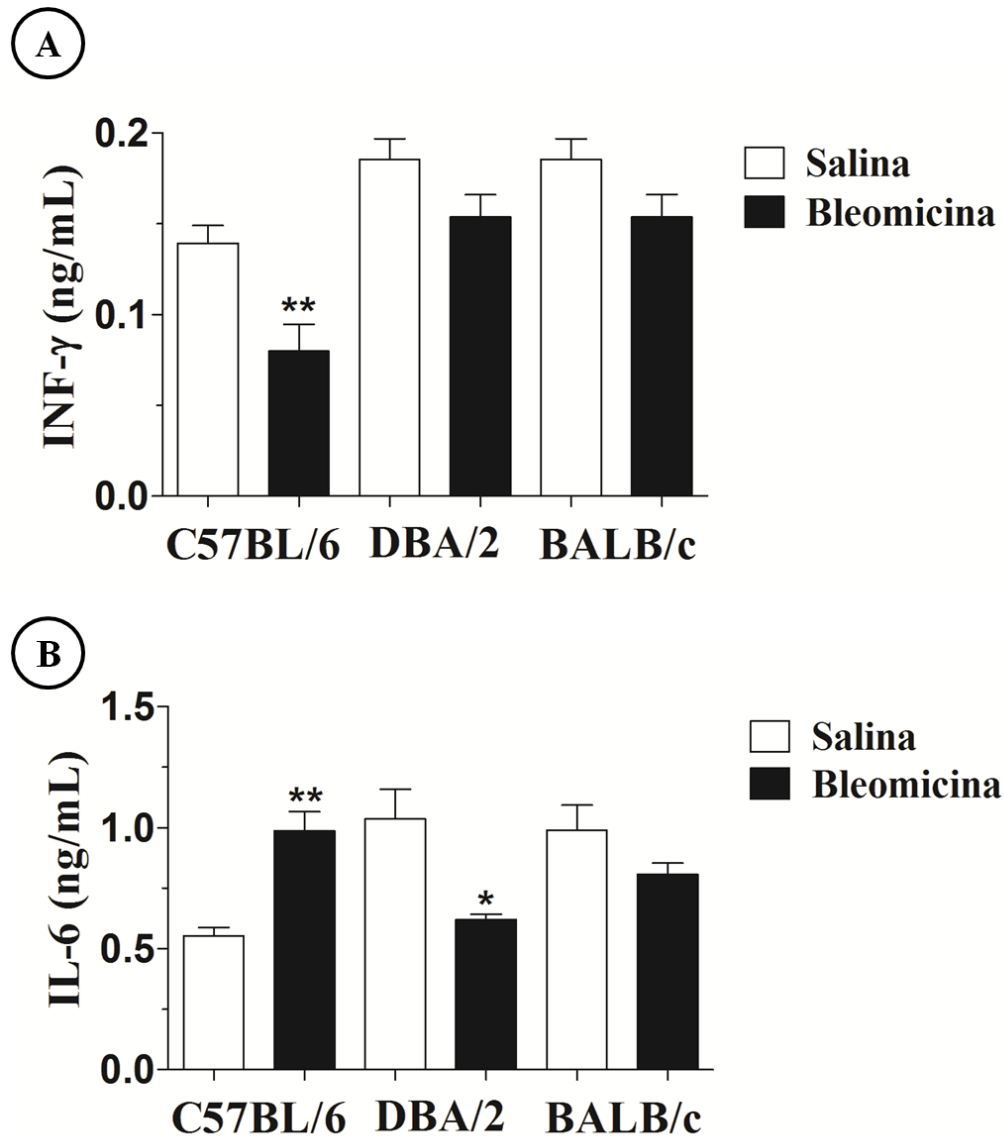


Figura 8 - Níveis de citocinas no LBA dos camundongos 21 dias após a administração de BLM. INF- γ - Interferon gama, (A); IL-6 – Interleucina 6 (B). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Os símbolos são representativos de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**) ($n = 10$ /grupo).

3.4 Níveis de OH-prolina

Níveis OH-prolina (Figura 9) foram aumentados em camundongos C57BL/6 e DBA/2, quando comparados aos respectivos grupos salina (112%, $p < 0.05$ e 104%, $p < 0.05$, respectivamente) ($n = 10$ por grupo).

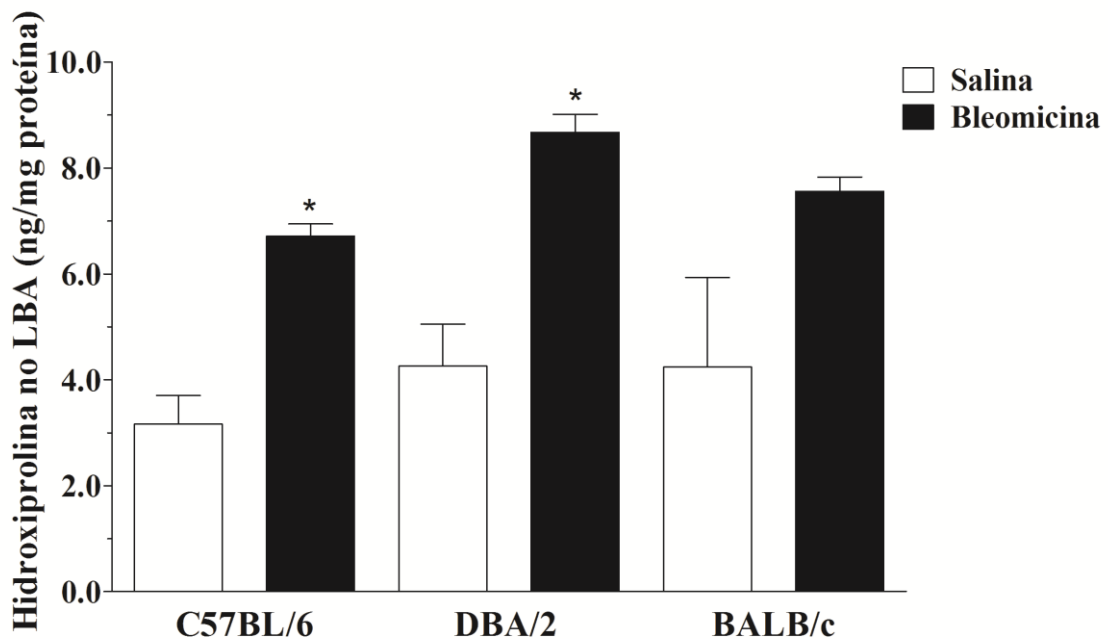


Figura 9 - Níveis de hidroxiprolina no LBA 21 dias após a administração de BLM. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Os símbolo é representativo de $p < 0.05$ (*) ($n = 10$ /grupo).

3.5 Perfil histológico pulmonar

Na histologia do pulmão dos grupos BLM da linhagem C57BL/6 e DBA/2 (Figuras 10B e D, respectivamente) 21 dias após a administração de BLM observou-se um padrão histológico característico de fibrose pulmonar difusa.

Nestas linhagens de camundongos, as fotomicrografias sugerem uma lesão do parênquima com excessiva deposição de matriz extracelular no interstício pulmonar principalmente nas regiões perialveolares e perivasculares. Tal alteração da histoarquitetura provoca uma redução das áreas alveolares acompanhada de aumento dos septos alveolares.

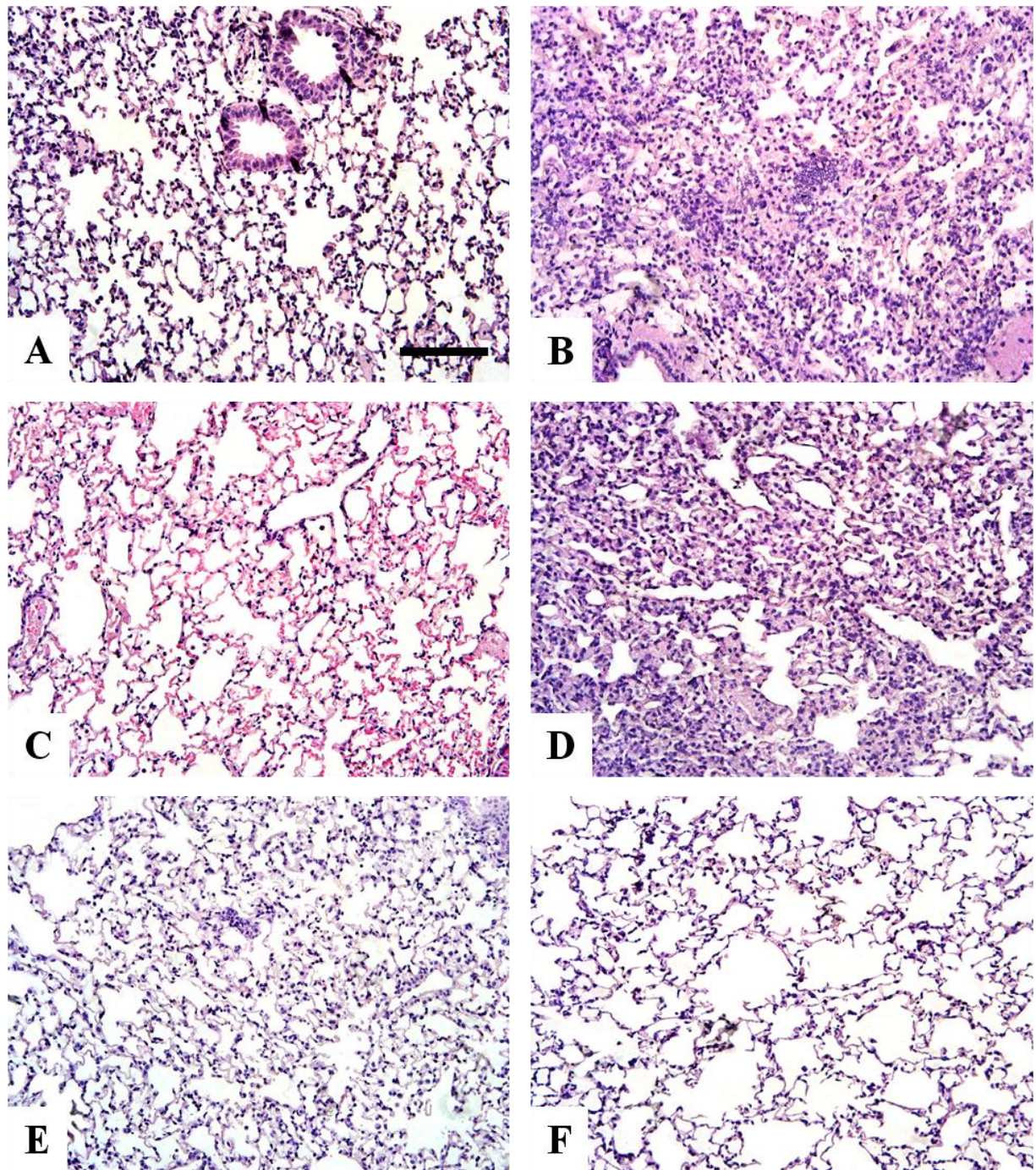


Figura 10 - Fotomicrografias de pulmão coradas com hematoxilina e eosina (H&E) 21 dias após a administração i.t. de solução salina (coluna esquerda) e de 0.1U de BLM (coluna direita). A e B: linhagem C57BL/6, C e D: DBA/2, E e F: BALB/c. Extensas áreas de fibrose dos septos alveolares, pois foi observado diminuição dos espaços aéreos em ambos os camundongos C57BL/6 e DBA/2 (B e D). Não houve alterações histológicas em camundongos BALB/c após administração de BLM (n = 5/grupo).

Densidade de volume dos septos aumentou 79% ($p<0.05$) e 126% ($p<0.001$) (Figura 11A) e a densidade de volume dos alvéolos diminuiu 59% ($p<0.05$) e 58% ($p<0.001$) (Figura 11B) em camundongos C57BL/6 e DBA/2, respectivamente, quando comparados aos grupos salina.

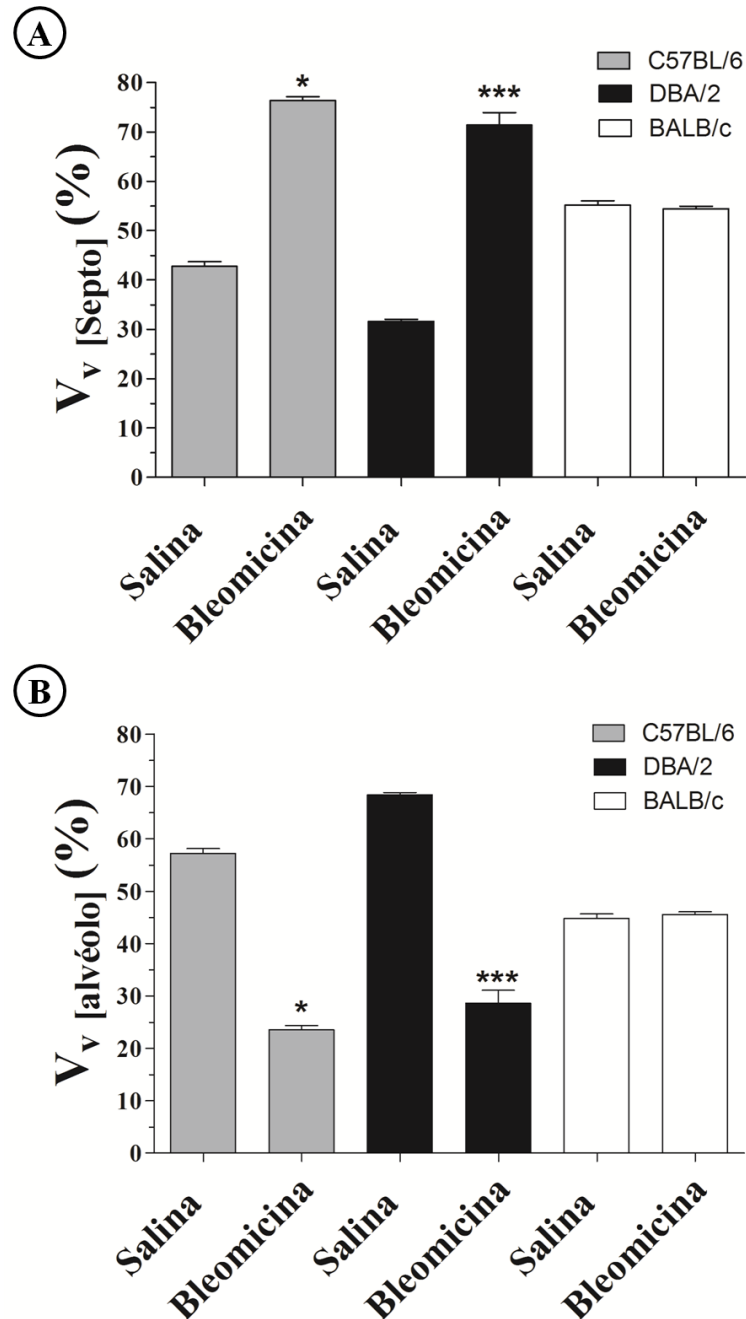


Figura 11 - Análise estereológica do parênquima pulmonar. (A) V_v [septos] - densidade de volume dos septos; (B) V_v [alvéolos] - densidade de volume dos alvéolos, sacos alveolares e ductos. (Os dados são apresentados como média \pm erro padrão e foram analisados por Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn ($p<0.05$). Os símbolos são representativos de $p<0.05$ (*) e $p<0.001$ (***) ($n = 10$ /grupo).

3.6 Marcadores de desequilíbrio redox

Marcadores de desequilíbrio redox são mostrados na Figura 12 (n=10 por grupo). Um desequilíbrio redox foi observado em todas as linhagens. A atividade da SOD (Figura 12A) foi reduzida em camundongos C57BL/6 e DBA/2 (76%, $p<0.001$ e 24%, $p<0.001$, respectivamente), enquanto que a atividade da CAT (Figura 12B) foi reduzida em todas as linhagens 21 dias após a administração de BLM, quando comparada aos grupos salina (C57BL/6: 53%, $p<0.05$; DBA/2: 33%, $p<0.01$; BALB/c: 45%, $p<0.01$). Embora tenha havido uma redução na atividade da GPx (Figura 12C) em camundongos C57BL/6 (31%, $p<0.05$) e BALB/c (26%, $p<0.01$), houve um aumento de 56% na atividade desta enzima em DBA/2 ratos ($p<0.01$) quando comparado aos respectivos grupos salina.

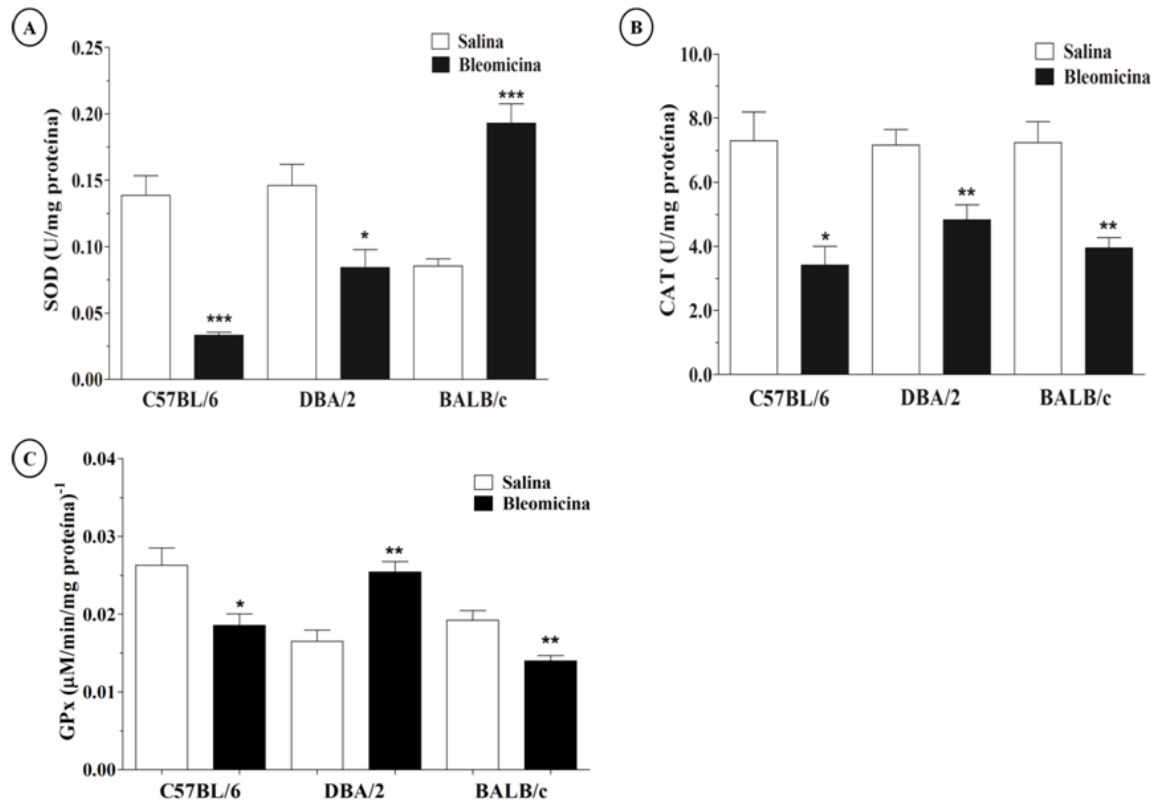


Figura 12 - Análise bioquímica da atividade das enzimas antioxidantes no pulmão. Superóxido dismutase – SOD (A); Catalase – CAT (B) e Glutathione peroxidase – GPx (C). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p<0,05$). Os símbolos são representativos de $p<0.05$ (*), $p<0.01$ (**) e $p<0.001$ (***) (n = 10/grupo).

3.7 Western blotting

A expressão da SOD-3 foi reduzida nos camundongos C57BL/6 e DBA/2, mas a expressão dessa proteína foi aumentada nos BALB/c (Figura 13A). A expressão da CAT aumentou em camundongos C57BL/6, mas reduziu em DBA/2 e BALB/c (Figura 13B). Expressão da GPx diminuiu nos camundongos C57BL/6 e BALB/c 21 dias após a administração de BLM (Figura 13C).

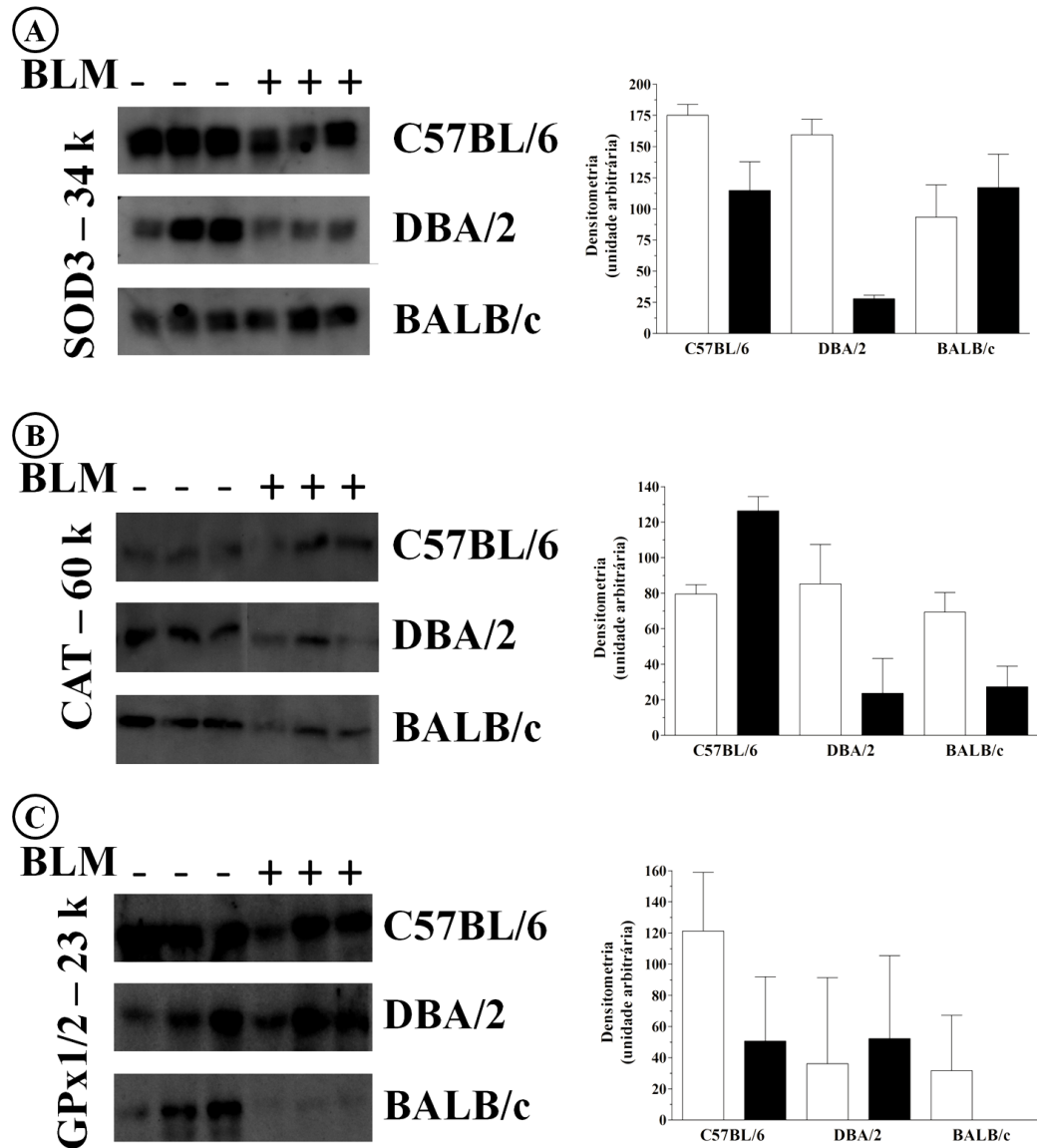


Figura 13 - Expressão de enzimas antioxidantes em extratos protéicos de homogeneizados de pulmão analisada através de western blotting. SOD-3 superóxido dismutase-3 (A), CAT - Catalase (B); GPx 1/2 - glutathiona peroxidase 1/2 (C). A administração de BLM não altera a expressão de SOD-3 em homogeneizado de pulmão de camundongos BALB/c. Os blots (borrões) foram analisados por densitometria óptica (unidades arbitrárias - UA) (n = 3/group).

3.8 Níveis de nitrito

Níveis de nitrito foram aumentadas em camundongos C57BL/6 e BALB/c (129%, respectivamente, $p < 0.001$ e 150%, $p < 0.001$, respectivamente).

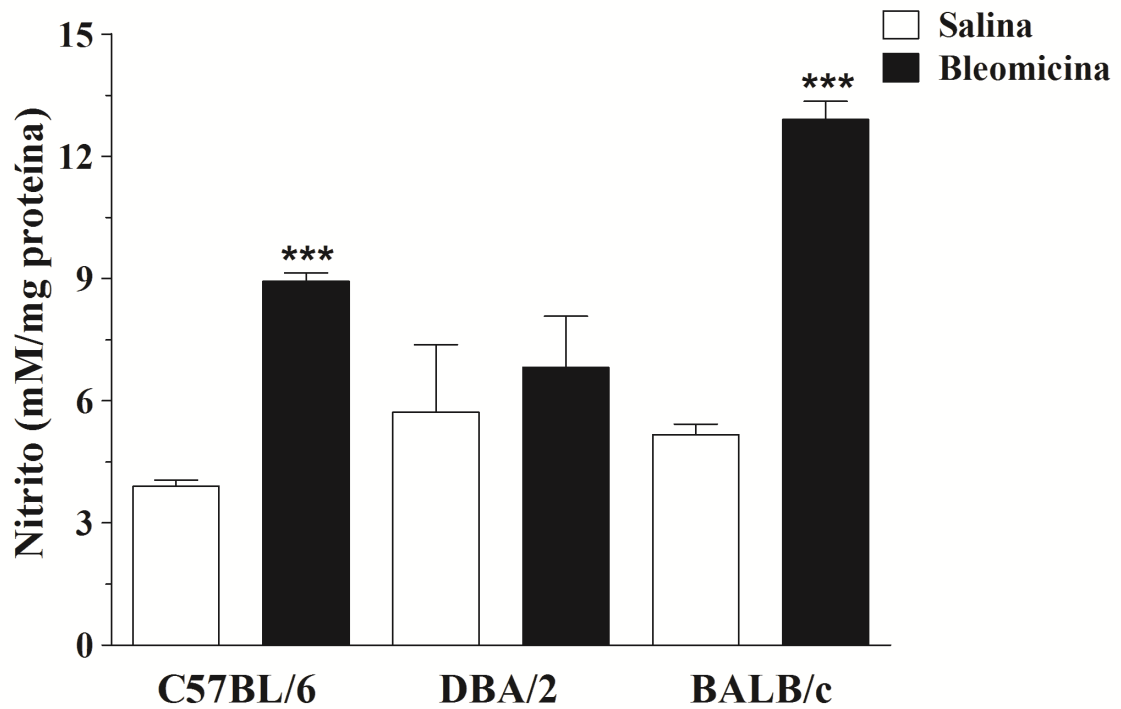


Figura 14 - Níveis de nitrito no LBA 21 dias após a administração de BLM. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). O símbolo é representativo de $p < 0.001$ (***) ($n = 10$ /grupo).

3.9 Marcador de dano oxidativo

Os níveis de MDA aumentaram nos camundongos C57BL/6 (163% $p<0.001$) e foram reduzidos em camundongos BALB/c (44%, $p<0.001$) 21 dias após a administração de BLM, quando comparado aos respectivos grupos salina.

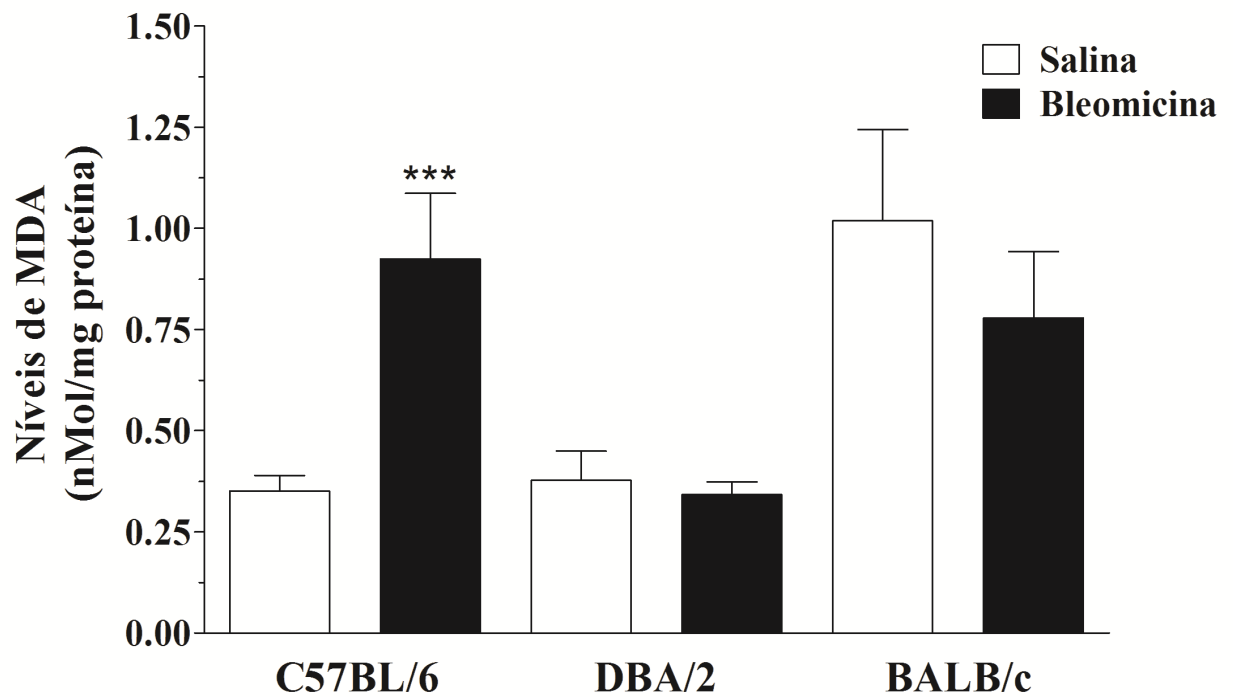


Figura 15 - Análise bioquímica da concentração de malondialdeído (MDA) no pulmão. Níveis de MDA dias após a administração de BLM. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p<0,05$). O símbolo é representativo de $p<0.001$ (***) ($n = 10$ /grupo).

4 DISCUSSÃO

A fibrose pulmonar ocorre em consequência do processo anormal de reparo tecidual pulmonar frente a um estímulo danoso, como a BLM, podendo resultar em disfunção pulmonar (Sansores, Ramirez-Venegas *et al.*, 1996; Pardo e Selman, 2002). Entre os mecanismos envolvidos na progressão da fibrose pulmonar, a ativação de fibroblastos e inflamação crônica se destacam (Meneghin e Hogaboam, 2007; Martins, Valenca *et al.*, 2009). O estresse oxidativo tem sido associado a uma série de doenças, incluindo a fibrose pulmonar induzida por BLM (Day, 2008). Ao se associar a metais pesados de transição como Fe^{2+} , a BLM funciona como uma fonte exógena de EROs, via reação de Fenton (Chen e Stubbe, 2005). Estudos têm sugerido que a característica genética pode desempenhar um papel importante na susceptibilidade fibrose pulmonar humana uma vez que apenas 10% dos pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico com BLM a desenvolvem a doença (Abid, Malhotra *et al.*, 2001; Du Bois, 2002).

Apesar de camundongos C57BL/6 e BALB/c terem sido descritos como animais propensos a dano oxidativo nos pulmões, após um longo prazo da exposição à fumaça de cigarro (Rueff-Barroso, Trajano *et al.*, 2010), os parâmetros oxidativos seguintes a administração de BLM observados no presente estudo mostraram uma tendência de resistência ao dano oxidativo em camundongos BALB/c, em contraste com as linhagens C57BL/6 e DBA/2.

No presente estudos, ao compararmos, em três diferentes linhagens de camundongos, através de um modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por BLM, observando a relação entre o perfil redox, histoarquitetura pulmonar e função pulmonar destes animais, mostramos que a atividade da SOD e expressão são associados com a presença de fibrose.

No sistema de enzimas antioxidantes, a SOD converte O_2 em H_2O_2 , enquanto a CAT, GPx converte H_2O_2 em H_2O . Junto com este sistema, a relação GSH/GSSG é sugerida com a principal ação redox na célula que controla não só o conteúdo celular de H_2O_2 , mas também outros hidroperóxidos orgânicos (Meister e Anderson, 1983; Keller e Menzel, 1989). Devido a uma deficiência na ação de enzimas antioxidantes, o aumento da produção de oxidantes conduz à peroxidação lipídica, carbonilação protéica e danos ao DNA (Rahman e Macnee, 1996). Como os produtos de peroxidação lipídica podem resultar em desidratação e morte celular, que são considerados como fatores importantes para o desenvolvimento da PF (Sato, Tashiro *et al.*, 2008). Nossos resultados mostraram que os níveis de MDA, um dos produtos da peroxidação lipídica, estavam aumentados apenas em camundongos C57BL/6. O aumento

de peroxidação lipídica tem sido descrito como um produto direto da ação oxidativa radicais hidroxila na fibrose pulmonar induzida por BLM (Sato, Tashiro *et al.*, 2008; Iraz, Erdogan *et al.*, 2006; Kalayarasan, Sriram *et al.*, 2008). Nossos resultados mostraram que o aumento da peroxidação lipídica em camundongos C57BL/6 está associado com a redução da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx no pulmão.

Três codificações da SOD foram descritas em mamíferos: a SOD citosólica (SOD-1), SOD mitocondrial (SOD-2) e a SOD extracelular (SOD-3) (Zelko, Mariani *et al.*, 2002). Camundongos deficientes para SOD-3 apresentaram aumento da resposta inflamatória induzida pela BLM nos pulmões, SOD-3 está localizada na matriz extracelular e parece desempenhar um papel importante na proteção contra a fibrose pulmonar (Fattman, Chang *et al.*, 2003; Petersen, Oury *et al.*, 2004). No presente estudo, camundongos C57BL/6 não mostraram apenas a diminuição da atividade da SOD, mas também apresentaram diminuição na expressão da SOD-3 no pulmão. A diminuição da atividade da SOD observada em camundongos C57BL/6 21 dias após a administração de BLM, poderia ser resultado da sua inativação por oxidantes. Como os níveis de nitrito foram mostrados aumentados em camundongos C57BL/6, o anion superóxido O_2^- , pode ter sido convertido em peroxonitrito ($ONOO^-$), visto que esta reação é feita em uma constante de velocidade 3,5 vezes mais rápida que a dismutação do O_2^- pela SOD (Sandstrom, Carlsson *et al.*, 1992; Dweik, 2005). Além disso, nossos dados sugerem que o aumento tanto da expressão quanto da atividade de SOD podem estar associados à resistência BALB/c a fibrose pulmonar.

Ao contrário da SOD, a atividade da CAT diminuiu no pulmão de todos os grupos após a administração de BLM, enquanto a expressão aumentou apenas em camundongos C57BL/6. Os dados atuais sugerem que, devido à atividade reduzida da SOD, níveis menores de H_2O_2 são produzidos, portanto, afetando diretamente a atividade da CAT, embora a expressão desta enzima tenha sido maior em camundongos C57BL/6. Além disso, com a redução a atividade de GPx prejudica a proteção dos fosfolipídios da membrana, também resultando em peroxidação lipídica, como observado nos camundongos C57BL/6.

Estudos têm mostrado que a diminuição do $INF-\gamma$ está envolvida com a ativação de fibroblastos, conseqüentemente, aumentando da deposição de matriz extracelular, que leva ao aumento da resistência das vias aéreas em pacientes com fibrose pulmonar idiopática (Ziesche, Hofbauer *et al.*, 1999; Segel, Izbicki *et al.*, 2003). No presente estudo, a fibrose pulmonar em camundongos C57BL/6 foi associada com redução dos níveis de $INF-\gamma$ e aumento dos níveis de OH-prolina. Além disso, camundongos C57BL/6 apresentaram comprometimento da função pulmonar, com aumento da elastância e resistência pulmonares,

provavelmente devido ao aumento da deposição de matriz extracelular em pulmões (Faffe e Zin, 2009).

No presente estudo, a administração de BLM também foi capaz de induzir a fibrose pulmonar com aumento de hidroxiprolina em camundongos DBA/2. Embora as atividades de SOD e CAT apresentaram-se reduzidas, a ausência de peroxidação lipídica foi observado provavelmente devido à elevação da atividade da GPx nesses camundongos. Além disso, camundongos DBA/2 não apresentaram alteração nos parâmetros de mecânica ventilatória, embora a quantificação histológica mostrou claros indícios da fibrose pulmonar. Estudos anteriores demonstraram que uma única dose de BLM é capaz de induzir fibrose reversível em camundongos DBA/2, enquanto doses múltiplas, fibrose persistente e prolongada (Chung, Monick *et al.*, 2003). Os resultados sugerem que os camundongos DBA/2 podem estar num estágio inicial de resolução da FP onde os componentes elásticos do parênquima pulmonar foram preservados, como descrito por Monoury *et al.*, onde a mecânica pulmonar não é alterada 21 dias após administração de BLM (Manoury, Nenan *et al.*, 2006).

Os resultados mostram também que em camundongos BALB/c, a FP não se desenvolveu, nem apresentou peroxidação lipídica, nem alterou os níveis de IL-6, IFN- γ e parâmetros de mecânica pulmonar. Embora os níveis de fator de crescimento transformado beta (TGF- β) não foram mensurados nesse estudo, a falta de qualquer sinal de fibrose em camundongos BALB/c pode estar relacionada com a manutenção dos níveis de IFN- γ nesses camundongos. As células T Natural Killer (NKT) liberam IFN- γ . O IFN- γ é capaz de diminuir a produção de TGF- β , sendo este processo importante para a prevalência de FP em camundongos (Kim, Kim *et al.*, 2005).

Como a SOD atua como a primeira linha de defesa antioxidante em sistemas orgânicos (Kaartenaho-Wiik e Kinnula, 2004), as atividades de CAT e de GPx provavelmente foram reduzidas em camundongos BALB/c devido à ausência de substratos (principalmente H₂O₂). As EROs bem como o TGF- β estão relacionados com a diferenciação irreversível de miofibroblastos a partir de fibroblastos via NADPH oxidase (Hecker, Vittal *et al.*, 2009; Amara, Goven *et al.*, 2010).

Camundongos BALB/c apresentam um número significativamente reduzido de miofibroblastos, resultando em uma produção ineficiente de colágeno após processo de reparo de feridas (Cardoso, Mendes *et al.*, 2009). Isto pode, em parte, explicar, o fato de que, mesmo após administração da BLM, os camundongos BALB/c não desenvolveram FP.

Além disso, a SOD tem sido descrito como uma enzima chave no processo de fibrose pulmonar induzida por BLM, como já foi demonstrado pela administração intratraqueal ou

inalada de um conjugado de fosfatidilcolina SOD (SOD-PC: superóxido dismutase lecitinizada) que reduziu a deposição de colágeno nos pulmões camundongos após a administração de BLM (Tanaka, Ishihara *et al.*, 2010). Portanto, nossos resultados indicam que tanto a expressão quanto a atividade de SOD parecem desempenhar um papel central na prevalência de fibrose pulmonar induzida por BLM como indicado pela manutenção de ambas atividade da SOD e expressão em camundongos BALB/c.

Os presentes resultados mostraram que os níveis de MDA foram reduzidos em camundongos BALB/c após administração de BLM. Como as EROs, principalmente H₂O₂, têm sido implicadas no aumento da morte celular nos pulmões de ratos submetidos fibrose pulmonar induzida por BLM (Kasper e Barth, 2009; Tanaka, Ishihara *et al.*, 2010), os resultados apresentados parecem indicar uma baixa susceptibilidade dos camundongos BALB/c para o dano oxidativo as células pulmonares.

A BLM induziu fibrose pulmonar nos camundongos C57BL/6 e DBA2, mas não nos camundongos BALB/c. Apesar do padrão histológico entre o C57BL/6 e o DBA/2 estarem semelhantes, a mecânica pulmonar foi particularmente afetada nos camundongos C57BL/6. Mesmo que os camundongos DBA/2 e BALB/c tenham resposta Th2, o equilíbrio redox, principalmente com o aumento da SOD, parecem favorecer a resistência a fibrose pulmonar em camundongos BALB/c.

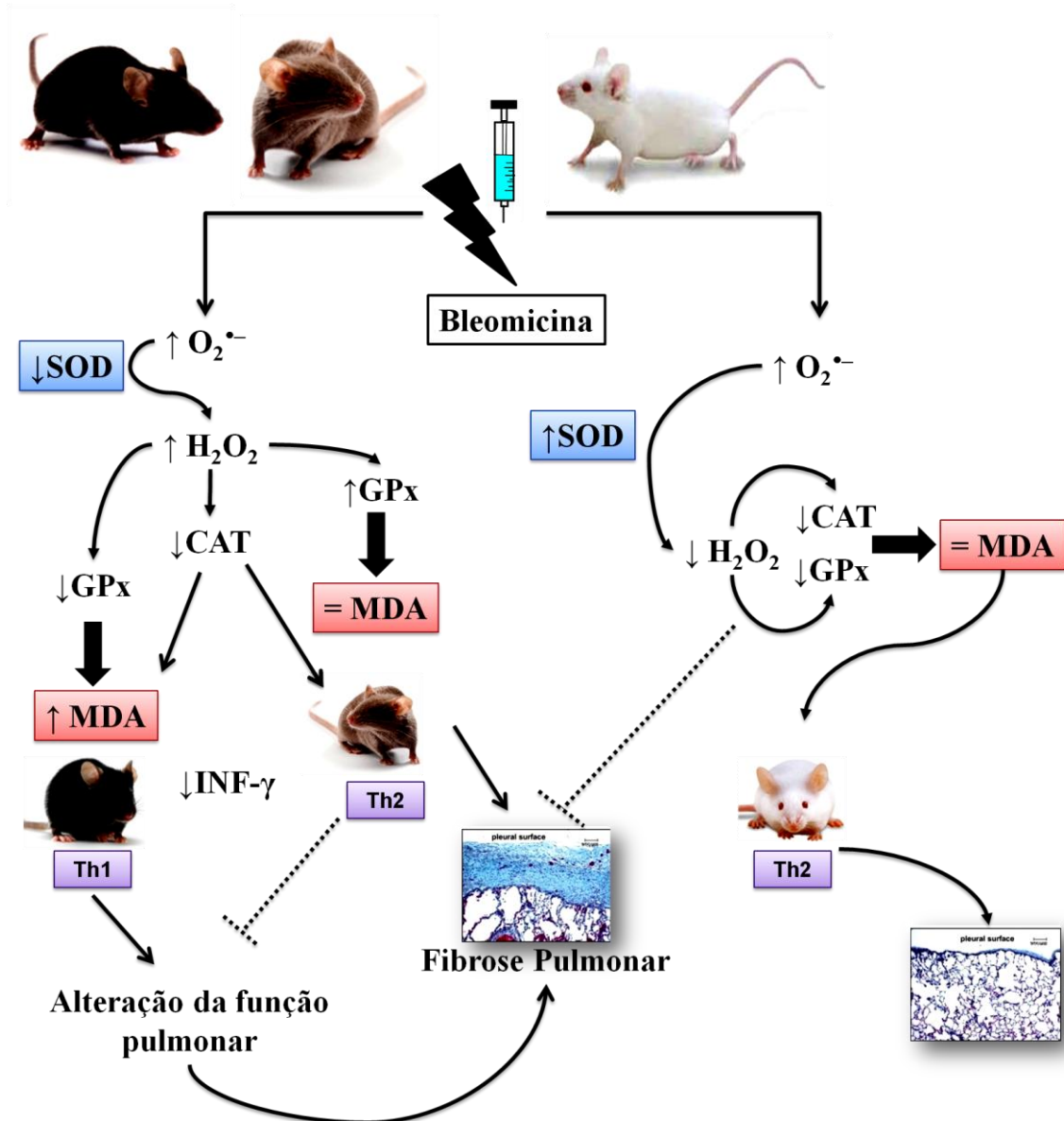


Figura 16 - Esquema do resumo dos principais achados no estudo. Possível papel da SOD sobre resistência a fibrose pulmonar induzida por BLM em camundongos BALB/c (Imagem de própria autoria).

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados colocam o equilíbrio redox como um importante ponto a ser considerado nas diferentes populações que apresentam fibrose pulmonar e abre uma nova discussão sobre a relação entre a inflamação, o perfil genético e o equilíbrio redox. Assim, nossos resultados sugerem que a determinação fibrose pulmonar está associado não apenas a resposta Th1, mas também com a atividade da SOD e a expressão da SOD-3 em camundongos C57BL/6 e DBA/2.

REFERÊNCIAS

Abid, S. H., V. Malhotra, *et al.* Radiation-induced and chemotherapy-induced pulmonary injury. Curr Opin Oncol, v.13, n.4, Jul, p.242-8. 2001.

Aebi, H. Catalase in vitro. Methods Enzymol, v.105, p.121-6. 1984.

Aitken, R. J. e S. D. Roman. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. Oxid Med Cell Longev, v.1, n.1, Oct-Dec, p.15-24. 2008.

Amara, N., D. Goven, *et al.* NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates TGFbeta1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts. Thorax, v.65, n.8, Aug, p.733-8. 2010.

Ao, X., D. M. Lubman, *et al.* Comparative proteomic analysis of radiation-induced changes in mouse lung: fibrosis-sensitive and -resistant strains. Radiat Res, v.169, n.4, Apr, p.417-25. 2008.

Bachofen, H. e M. Scherrer. Lung tissue resistance in diffuse interstitial pulmonary fibrosis. J Clin Invest, v.46, n.1, Jan, p.133-40. 1967.

Bowler, R. P., M. Nicks, *et al.* Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.282, n.4, Apr, p.L719-26. 2002.

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, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Brigham, K. L. Role of free radicals in lung injury. Chest, v.89, n.6, Jun, p.859-63. 1986.

Buffenstein, R., Y. H. Edrey, *et al.* The oxidative stress theory of aging: embattled or invincible? Insights from non-traditional model organisms. Age (Dordr), v.30, n.2-3, Sep, p.99-109. 2008.

Burburan, S. M., D. G. Xisto, *et al.* Lung mechanics and histology during sevoflurane anesthesia in a model of chronic allergic asthma. Anesth Analg, v.104, n.3, Mar, p.631-7. 2007.

_____. Anaesthetic management in asthma. Minerva Anesthesiol, v.73, n.6, Jun, p.357-65. 2007.

Burlacu, A., V. Jinga, *et al.* Severity of oxidative stress generates different mechanisms of endothelial cell death. Cell Tissue Res, v.306, n.3, Dec, p.409-16. 2001.

Cardoso, J. F., F. A. Mendes, *et al.* Ccn2/Ctgf overexpression induced by cigarette smoke during cutaneous wound healing is strain dependent. Toxicol Pathol, v.37, n.2, p.175-82. 2009.

- Cardoso, J. F., B. R. Souza, *et al.* Effects of cigarette smoke in mice wound healing is strain dependent. Toxicol Pathol, v.35, n.7, p.890-6. 2007.
- Castro, P., A. Legora-Machado, *et al.* Inhibition of interleukin-1beta reduces mouse lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke. Eur J Pharmacol, v.498, n.1-3, Sep 13, p.279-86. 2004.
- Chen, J. e J. Stubbe. Bleomycins: towards better therapeutics. Nat Rev Cancer, v.5, n.2, Feb, p.102-12. 2005.
- Chung, M. P., M. M. Monick, *et al.* Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol, v.29, n.3 Pt 1, Sep, p.375-80. 2003.
- Cortijo, J., M. Cerda-Nicolas, *et al.* Attenuation by oral N-acetylcysteine of bleomycin-induced lung injury in rats. Eur Respir J, v.17, n.6, Jun, p.1228-35. 2001.
- Crystal, R. G., J. D. Fulmer, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical, histologic, radiographic, physiologic, scintigraphic, cytologic, and biochemical aspects. Ann Intern Med, v.85, n.6, Dec, p.769-88. 1976.
- Da Hora, K., S. S. Valenca, *et al.* Immunohistochemical study of tumor necrosis factor-alpha, matrix metalloproteinase-12, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 on alveolar macrophages of BALB/c mice exposed to short-term cigarette smoke. Exp Lung Res, v.31, n.8, Oct, p.759-70. 2005.
- Day, B. J. Antioxidants as potential therapeutics for lung fibrosis. Antioxid Redox Signal, v.10, n.2, Feb, p.355-70. 2008.
- Dolhnikoff, M., T. Mauad, *et al.* Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. Am J Respir Crit Care Med, v.160, n.5 Pt 1, Nov, p.1750-7. 1999.
- Draper, H. H., E. J. Squires, *et al.* A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. Free Radic Biol Med, v.15, n.4, Oct, p.353-63. 1993.
- Du Bois, R. M. The genetic predisposition to interstitial lung disease: functional relevance. Chest, v.121, n.3 Suppl, Mar, p.14S-20S. 2002.
- Dweik, R. A. Nitric oxide, hypoxia, and superoxide: the good, the bad, and the ugly! Thorax, v.60, n.4, Apr, p.265-7. 2005.
- Ebihara, T., N. Venkatesan, *et al.* Changes in extracellular matrix and tissue viscoelasticity in bleomycin-induced lung fibrosis. Temporal aspects. Am J Respir Crit Care Med, v.162, n.4 Pt 1, Oct, p.1569-76. 2000.
- Erdogan, H., E. Fadillioglu, *et al.* Effects of Ginkgo biloba on plasma oxidant injury induced by bleomycin in rats. Toxicol Ind Health, v.22, n.1, Feb, p.47-52. 2006.

Espey, M. G., K. M. Miranda, *et al.* Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. Ann N Y Acad Sci, v.899, p.209-21. 2000.

Faffe, D. S., V. R. Seidl, *et al.* Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. Eur Respir J, v.15, n.1, Jan, p.85-91. 2000.

Faffe, D. S. e W. A. Zin. Lung parenchymal mechanics in health and disease. Physiol Rev, v.89, n.3, Jul, p.759-75. 2009.

Fattman, C. L., L. Y. Chang, *et al.* Enhanced bleomycin-induced pulmonary damage in mice lacking extracellular superoxide dismutase. Free Radic Biol Med, v.35, n.7, Oct 1, p.763-71. 2003.

Fernandez Perez, E. R., C. E. Daniels, *et al.* Incidence, prevalence, and clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis: a population-based study. Chest, v.137, n.1, Jan, p.129-37. 2010.

Flohe, L. e W. A. Gunzler. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol, v.105, p.114-21. 1984.

Gao, F., V. L. Kinnula, *et al.* Extracellular superoxide dismutase in pulmonary fibrosis. Antioxid Redox Signal, v.10, n.2, Feb, p.343-54. 2008.

Garcia-Prieto, E., A. Gonzalez-Lopez, *et al.* Resistance to bleomycin-induced lung fibrosis in MMP-8 deficient mice is mediated by interleukin-10. PLoS One, v.5, n.10, p.e13242. 2010.

Gilman, A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. Am J Surg, v.105, May, p.574-8. 1963.

Giovannoni, G., J. M. Land, *et al.* Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. Ann Clin Biochem, v.34 (Pt 2), Mar, p.193-8. 1997.

Gomperts, B. N. e R. M. Strieter. Fibrocytes in lung disease. J Leukoc Biol, v.82, n.3, Sep, p.449-56. 2007.

Goodman, L. S., M. M. Wintrobe, *et al.* Landmark article Sept. 21, 1946: Nitrogen mustard therapy. Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. By Louis S. Goodman, Maxwell M. Wintrobe, William

Dameshek, Morton J. Goodman, Alfred Gilman and Margaret T. McLennan. JAMA, v.251, n.17, May 4, p.2255-61. 1984.

Harrison, J. H., Jr. e J. S. Lazo. Plasma and pulmonary pharmacokinetics of bleomycin in murine strains that are sensitive and resistant to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. J Pharmacol Exp Ther, v.247, n.3, Dec, p.1052-8. 1988.

Hecker, L., R. Vittal, *et al.* NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. Nat Med, v.15, n.9, Sep, p.1077-81. 2009.

Heunks, L. M. e P. N. Dekhuijzen. Respiratory muscle function and free radicals: from cell to COPD. Thorax, v.55, n.8, Aug, p.704-16. 2000.

Hoshino, T., H. Nakamura, *et al.* Redox-active protein thioredoxin prevents proinflammatory cytokine- or bleomycin-induced lung injury. Am J Respir Crit Care Med, v.168, n.9, Nov 1, p.1075-83. 2003.

Inghilleri, S., P. Morbini, *et al.* In situ assessment of oxidant and nitrogenic stress in bleomycin pulmonary fibrosis. Histochem Cell Biol, v.125, n.6, Jun, p.661-9. 2006.

Iraz, M., H. Erdogan, *et al.* Ginkgo biloba inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in rats. Pharmacol Res, v.53, n.3, Mar, p.310-6. 2006.

Kaarteenaho-Wiik, R. e V. L. Kinnula. Distribution of antioxidant enzymes in developing human lung, respiratory distress syndrome, and bronchopulmonary dysplasia. J Histochem Cytochem, v.52, n.9, Sep, p.1231-40. 2004.

Kalayarasan, S., N. Sriram, *et al.* Diallyl sulfide attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis: critical role of iNOS, NF-kappaB, TNF-alpha and IL-1beta. Life Sci, v.82, n.23-24, Jun 6, p.1142-53. 2008.

Kappus, H., I. Mahmutoglu, *et al.* Liver nuclear NADPH-cytochrome P-450 reductase may be involved in redox cycling of bleomycin-Fe(III), oxy radical formation and DNA damage. Free Radic Res Commun, v.2, n.4-6, p.271-7. 1987.

Kasper, M. e K. Barth. Bleomycin and its role in inducing apoptosis and senescence in lung cells - modulating effects of caveolin-1. Curr Cancer Drug Targets, v.9, n.3, May, p.341-53. 2009.

Keller, D. A. e D. B. Menzel. Effects of sulfite on glutathione S-sulfonate and the glutathione status of lung cells. Chem Biol Interact, v.70, n.1-2, p.145-56. 1989.

Keogh, B. A. e R. G. Crystal. Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders. Thorax, v.37, n.1, Jan, p.1-10. 1982.

Kikuchi, N., Y. Ishii, *et al.* Nrf2 protects against pulmonary fibrosis by regulating the lung oxidant level and Th1/Th2 balance. Respir Res, v.11, p.31.

_____. Nrf2 protects against pulmonary fibrosis by regulating the lung oxidant level and Th1/Th2 balance. Respir Res, v.11, p.31. 2011.

Kim, J. H., H. Y. Kim, *et al.* Natural killer T (NKT) cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by producing interferon-gamma. Am J Pathol, v.167, n.5, Nov, p.1231-41. 2005.

Kinnula, V. L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. Thorax, v.60, n.8, Aug, p.693-700. 2005.

- Lanzetti, M., F. S. Bezerra, *et al.* Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. Nutrition, v.24, n.4, Apr, p.375-81. 2008.
- Lemay, A. M. e C. K. Haston. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis susceptibility genes in AcB/BcA recombinant congenic mice. Physiol Genomics, v.23, n.1, Sep 21, p.54-61. 2005.
- Lewis, T. G. e E. D. Nydorf. Intralesional bleomycin for warts: a review. J Drugs Dermatol, v.5, n.6, Jun, p.499-504. 2006.
- Li, H., X. M. Liu, *et al.* [Effect of hydrogen sulfide on Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats]. Beijing Da Xue Xue Bao, v.38, n.2, Apr 18, p.140-5. 2006.
- Liu, R. M. Oxidative stress, plasminogen activator inhibitor 1, and lung fibrosis. Antioxid Redox Signal, v.10, n.2, Feb, p.303-19. 2008.
- Lombard-Gillooly, K. e A. K. Hubbard. Modulation of silica-induced lung injury by reducing lung non-protein sulfhydryls with buthionine sulfoximine. Toxicol Lett, v.66, n.3, Mar, p.305-15. 1993.
- Ludwig, M. S., I. Dreshaj, *et al.* Partitioning of pulmonary resistance during constriction in the dog: effects of volume history. J Appl Physiol, v.62, n.2, Feb, p.807-15. 1987.
- Magder, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? Crit Care, v.10, n.1, Feb, p.208. 2006.
- Manoury, B., S. Nenan, *et al.* Macrophage metalloelastase (MMP-12) deficiency does not alter bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. J Inflamm (Lond), v.3, p.2. 2006.
- Marshall, E. Iraq's Chemical Warfare: Case Proved: A U.N. team found mustard and nerve gas bombs on the battlefield; now the challenge is to prevent the war from spreading. Science, v.224, n.4645, Apr 13, p.130-2. 1984.
- Martins, V., S. S. Valenca, *et al.* ATLa, an aspirin-triggered lipoxin A4 synthetic analog, prevents the inflammatory and fibrotic effects of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. J Immunol, v.182, n.9, May 1, p.5374-81. 2009.
- Mates, J. M., C. Perez-Gomez, *et al.* Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Biochem, v.32, n.8, Nov, p.595-603. 1999.
- Mcanulty, R. J., S. R. Moores, *et al.* Long-term changes in mouse lung following inhalation of a fibrosis-inducing dose of ²³⁹PuO₂: changes in collagen synthesis and degradation rates. Int J Radiat Biol, v.59, n.1, Jan, p.229-38. 1991.
- Mccord, J. M. e I. Fridovich. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. J Biol Chem, v.244, n.22, Nov 25, p.6056-63. 1969.
- Mcfarland, R., A. Blokhin, *et al.* Oxidative stress, nitric oxide, and the mechanisms of cell death in Lurcher Purkinje cells. Dev Neurobiol, v.67, n.8, Jul, p.1032-46. 2007.

- Meister, A. e M. E. Anderson. Glutathione. Annu Rev Biochem, v.52, p.711-60. 1983.
- Meneghin, A. e C. M. Hogaboam. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. J Clin Invest, v.117, n.3, Mar, p.530-8. 2007.
- Muller, I., D. Niethammer, *et al.* Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review). Int J Mol Med, v.1, n.2, Feb, p.491-4. 1998.
- Odajima, N., T. Betsuyaku, *et al.* The role of catalase in pulmonary fibrosis. Respir Res, v.11, p.183.
- Pardo, A. e M. Selman. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. Front Biosci, v.7, Aug 1, p.d1743-61. 2002.
- Petersen, S. V., T. D. Oury, *et al.* Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation. J Biol Chem, v.279, n.14, Apr 2, p.13705-10. 2004.
- Pires, K. M., F. S. Bezerra, *et al.* N-(2-mercaptopropionyl)-glycine but not allopurinol prevented cigarette smoke-induced alveolar enlargement in mouse. Respir Physiol Neurobiol, v.175, n.3, Mar 15, p.322-30. 2010.
- Raghu, G., D. Weycker, *et al.* Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med, v.174, n.7, Oct 1, p.810-6. 2006.
- Rahman, I., S. K. Biswas, *et al.* Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. Eur J Pharmacol, v.533, n.1-3, Mar 8, p.222-39. 2006.
- Rahman, I. e W. Macnee. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. Free Radic Biol Med, v.21, n.5, p.669-81. 1996.
- Rajendrasozhan, S., S. R. Yang, *et al.* Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. Antioxid Redox Signal, v.10, n.4, Apr, p.799-811. 2008.
- Ritter, C., M. E. Andrades, *et al.* Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. Crit Care Med, v.32, n.2, Feb, p.342-9. 2004.
- Rocco, P. R., L. D. Facchinetti, *et al.* Time course of respiratory mechanics and pulmonary structural remodelling in acute lung injury. Respir Physiol Neurobiol, v.143, n.1, Oct 12, p.49-61. 2004.
- Rueff-Barroso, C. R., E. T. Trajano, *et al.* Organ-related cigarette smoke-induced oxidative stress is strain-dependent. Med Sci Monit, v.16, n.7, Jul, p.BR218-26. 2010.
- Russo, R. C., C. C. Garcia, *et al.* Phosphoinositide 3-kinase gamma plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. J Leukoc Biol, v.89, n.2, Feb, p.269-82.

- _____. Phosphoinositide 3-kinase gamma plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. J Leukoc Biol, v.89, n.2, Feb, p.269-82. 2010.
- Ryrfeldt, A., G. Bannenberg, *et al.* Free radicals and lung disease. Br Med Bull, v.49, n.3, Jul, p.588-603. 1993.
- Ryter, S. W., H. P. Kim, *et al.* Mechanisms of cell death in oxidative stress. Antioxid Redox Signal, v.9, n.1, Jan, p.49-89. 2007.
- Sandstrom, J., L. Carlsson, *et al.* The heparin-binding domain of extracellular superoxide dismutase C and formation of variants with reduced heparin affinity. J Biol Chem, v.267, n.25, Sep 5, p.18205-9. 1992.
- Sansores, R. H., A. Ramirez-Venegas, *et al.* Correlation between pulmonary fibrosis and the lung pressure-volume curve. Lung, v.174, n.5, p.315-23. 1996.
- Sato, K., Y. Tashiro, *et al.* Role of lipid-derived free radical in bleomycin-induced lung injury in mice: availability for ESR spin trap method with organic phase extraction. Biol Pharm Bull, v.31, n.10, Oct, p.1855-9. 2008.
- Schrier, D. J., R. G. Kunkel, *et al.* The role of strain variation in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Am Rev Respir Dis, v.127, n.1, Jan, p.63-6. 1983.
- Segel, M. J., G. Izbicki, *et al.* Role of interferon-gamma in the evolution of murine bleomycin lung fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.285, n.6, Dec, p.L1255-62. 2003.
- Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis challenges for the future. Chest, v.120, n.1, Jul, p.8-10. 2001.
- Selman, M. e A. Pardo. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. Respir Res, v.3, p.3. 2002.
- Serrano-Mollar, A., D. Closa, *et al.* P-selectin upregulation in bleomycin induced lung injury in rats: effect of N-acetyl-L-cysteine. Thorax, v.57, n.7, Jul, p.629-34. 2002.
- Silva Bezerra, F., S. S. Valenca, *et al.* Alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. Nutrition, v.22, n.11-12, Nov-Dec, p.1192-201. 2006.
- Sime, P. J., Z. Xing, *et al.* Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. J Clin Invest, v.100, n.4, Aug 15, p.768-76. 1997.
- Tanaka, K., T. Ishihara, *et al.* Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.298, n.3, Mar, p.L348-60. 2010.
- Ulloa, L., J. Doody, *et al.* Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. Nature, v.397, n.6721, Feb 25, p.710-3. 1999.

- Umezawa, H., K. Maeda, *et al.* New antibiotics, bleomycin A and B. J Antibiot (Tokyo), v.19, n.5, Sep, p.200-9. 1966.
- Valenca, S. S., F. S. Bezerra, *et al.* Supplementation with vitamins C and E improves mouse lung repair. J Nutr Biochem, v.19, n.9, Sep, p.604-11. 2008.
- Valenca, S. S., P. Castro, *et al.* Light cigarette smoke-induced emphysema and NFkappaB activation in mouse lung. Int J Exp Pathol, v.87, n.5, Oct, p.373-81. 2006.
- Wallace, W. A., P. M. Fitch, *et al.* Inflammation-associated remodelling and fibrosis in the lung - a process and an end point. Int J Exp Pathol, v.88, n.2, Apr, p.103-10. 2007.
- Wallach-Dayana, S. B., G. Izbicki, *et al.* Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.290, n.4, Apr, p.L790-L796. 2006.
- Weibel, E. R., C. C. Hsia, *et al.* How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry. J Appl Physiol, v.102, n.1, Jan, p.459-67. 2007.
- Woessner, J. F., Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. Arch Biochem Biophys, v.93, May, p.440-7. 1961.
- Zelko, I. N., T. J. Mariani, *et al.* Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic Biol Med, v.33, n.3, Aug 1, p.337-49. 2002.
- Ziesche, R., E. Hofbauer, *et al.* A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med, v.341, n.17, Oct 21, p.1264-9. 1999.

APÊNDICE A – Resumo apresentado no Congresso Experimental Biology, 2011



The FASEB Journal

The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology

HOME | CURRENT ISSUE | ARCHIVE | ALERTS | HELP

Institution: UFRJ

(*The FASEB Journal*. 2011;25:114.8)

© 2011 FASEB

114.8

Oxidative Stress is Strain Dependent in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis

Luis Cristovao Porto¹, Marco Aurelio S Silva¹, Eduardo Trajano¹, Karla Maria P Pires¹, Manuella Lanzetti¹, Vanessa Martins², Maurício Caetano⁴, Mariana Nascimento Machado³, Cinthya Sternberg⁴, Claudia Benjamim², Walter A Zin³ and Samuel S Valenca²

¹ Histology and Embryology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

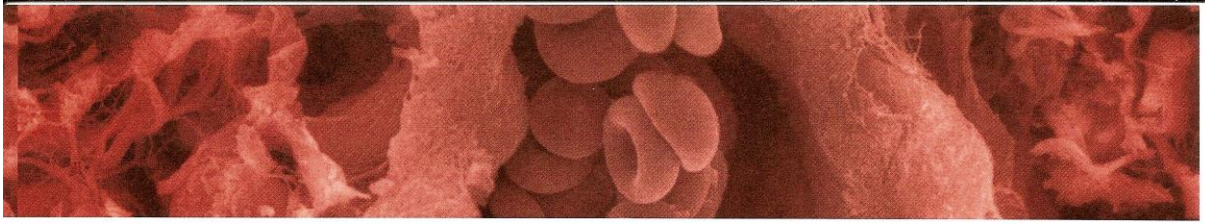
² Laboratory of Inflammation, Oxidative Stress and Cancer

³ Laboratory of Respiration Physiology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ National Institute of Cancer, Rio de Janeiro, Brazil

Oxidants play an important role in pulmonary fibrosis. We investigated the oxidative stress (OS) markers in the lungs of different mouse strains. Male C57BL/6, DBA/2 and BALB/c mice were divided in Control group (50µl saline; i.t., N = 10 each strain) and Bleomycin group [B] (0.1 U/kg i.t., N = 10 each strain). After 21 days, lung mechanics was assessed and then mice were killed; lungs were homogenized for OS markers measurement. Statistical analysis compared B groups with their respective controls. Elastance, and both peripheral and central lung resistance were only increased in C57BL/6 group (p<0.05). MDA levels were increased in the C57BL/6-B group (p<0.01), but were decreased in DBA/2 and BALB/c-B groups (p<0.0001). Both activity and expression of catalase were increased in C57BL/6-B groups (p<0.01), but were decreased in BALB/c-B groups (p<0.01). SOD activity increased in C57BL/6 and BALB/c-B groups (p<0.01). Nitrite increased in C57BL/6 and BALB/c (p<0.01) groups. Our results show C57BL/6 mice are more susceptible to redox imbalance and oxidative damage. Also, BALB/c strain show some degree of redox imbalance; however DBA and BALB/c strains seem to be resistant to oxidative damage. Financial Support: CAPES, UERJ, CNPq

APÊNDICE B – Resumo apresentado na XXV Reunião Anual da FeSBE, 2010



25 a 28 de agosto de 2010
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 08.062 intitulado ANÁLISE DO PERFIL REDOX NA FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR BLEOMICINA EM DIFERENTES ESTIRPES DE CAMUNDONGOS de autoria Silva, M. A. S., Trajano, E. T. L., Martins, V., Caetano, M., Sternberg, C., Benjamim, C. F., Valença, S. S., Porto, L. C. - Laboratório de Reparo Tecidual, UERJ Serviço de Pesquisa Clínica, INCA3 Laboratório de Inflamação, Estresse Oxidativo e Câncer, UFRJ, foi apresentado sob a forma de painel na

XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 25 a 28 de agosto de 2010.

Comissão Organizadora



APÊNDICE C - Resumo apresentado no Congresso European Respiratory Society, 2010

Apresentação Oral



E-Communication Session

Budapest (Hall 3) - 08:30-10:30

TUESDAY, SEPTEMBER 21ST 2010

E3729

Bleomycin-induced pulmonary fibrosis results in strain dependent oxidative stress

Karla Maria Pires¹, Marco Aurelio Silva¹, Eduardo Trajano¹, Renata Nesi¹, Luis Cristovao Porto¹, Samuel Valenca². ¹*Department of Histology and Embryology, Rio de Janeiro State University, Brazil;* ²*Pharmacology Department/Biomedical Science Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil*

Oxidants play an important role in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Understanding the effects of oxidative stress in pulmonary fibrosis in different mouse model may help finding key antioxidant therapies this disease. We aimed investigating and comparing oxidative stress markers in the lungs of different strains known by their singular response to pulmonary fibrosis induced by bleomycin. Male mice C57BL/6, DBA/2 and BALB/c (8 weeks-old) were divided into 2 main groups: Control group (intratracheal administration of 50µl saline; N = 10 each strain) and Bleomycin (0.1 U/kg of bleomycin diluted in 50µl of saline; N = 10 each strain). After 21 days, mice were sacrificed; lungs were removed and homogenized for the further biochemical analysis: Catalase expression was analyzed by Western Blotting assay. Malondyaldehyde levels were increased in the C57BL/6-bleomycin group ($p < 0.0001$), but these levels were decreased in DBA/2 and BALB/c-bleomycin groups ($p < 0.0001$) when compared to controls. Both activity and expression of catalase were increased in C57BL/6-bleomycin groups ($p < 0.01$), but were decreased in BALB/c-bleomycin groups ($p < 0.0001$) when compared with its respective controls. Superoxide dismutase activity increased in C57BL/6 and BALB/c-bleomycin groups ($p < 0.01$), when compared with its respective controls. Nitrite increased in C57BL/6 and BALB/c ($p < 0.0001$) compared with its respective controls. Our results show C57BL/6 mice are more susceptible to redox imbalance and oxidative damage; Also, BALB/c strain show some degree of redox imbalance; however DBA and BALB/c strains seem to be resistant to oxidative damage.

APÊNDICE D - Resumo apresentado no Congresso European Respiratory Society, 2010
Apresentação de Pôster



Thematic Poster Session

Hall 3-21 - 12:50-14:40

TUESDAY, SEPTEMBER 21ST 2010

P4373

Lung remodeling in cigarette smoke-induced emphysema is independent of nitric oxide participation

Samuel Valença¹, Carlos Rueff-Barroso², Wagner Pimenta², Renata Nesi², Eduardo Trajano², Marco Silva², Adriana Mello², Luís Cristóvão Porto².

¹*Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil;* ²*Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil*

Nitric oxide (NO) is present in the cigarette smoke (CS) and inflammatory response, but its role in the effects of CS exposure is unclear. Groups of C57BL/6 male mice were exposed to CS for 60 days and treated with vehicle (CS), G-nitro-L-Arginine-Methyl Ester (60 mg/kg/day; CS+L-NAME group), L-arginine (120 mg/kg/day; CS+LA group), or N-acetylcysteine (230 mg/kg/day; CS+NAC). After the sacrifice, lungs were removed for histological and biochemical analysis. The balance among

oxidants/antioxidants and protease/antiprotease were analyzed. Emphysema was observed in CS group. Lung remodeling was observed in CS+L-NAME, CS+LA and CS+NAC groups. Superoxide dismutase activity was decreased in all groups exposed to CS ($p < 0.001$). Catalase activity was increased in CS+LN compared with the CS group ($p < 0.01$). Reduced glutathione/oxidized glutathione ratio was decreased in CS group ($p < 0.05$). Myeloperoxidase was increased in all CS groups ($p < 0.01$). Nitrite levels were increased in all CS groups ($p < 0.001$), out CS+LN ($p < 0.001$) compared with the control group. Lipid peroxidation (4-HNE) and elastases (MMP-12 and NE) expressions were increased in CS group. However, CS groups treated with L-NAME, LA and NAC presented reduction of 4-HNE expression. Antiproteases were reduced in CS group and increased only in the CS+L-NAME group. We suggest that L-NAME protection is via antiprotease mechanisms. The oxidative burden caused by L-arginine accelerated oxidative stress with major lung remodeling. The lung protection found in mouse treated with NAC is via glutathione without interference of protease/antiprotease pathway. NO could be a future way in the target drugs to COPD in humans.

APÊNDICE E - Artigo científico aceito L-NAME and L-arginine differentially ameliorate cigarette smoke-induced emphysema in mice

ARTICLE IN PRESS

YPUPT1110_proof ■ 27 May 2011 ■ 1/8

Pulmonary Pharmacology & Therapeutics xxx (2011) 1–8



Contents lists available at ScienceDirect

Pulmonary Pharmacology & Therapeutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ypupt

L-NAME and L-arginine differentially ameliorate cigarette smoke-induced emphysema in mice

Samuel Santos Valença^{a,*}, Carlos Romualdo Rueff-Barroso^{b,1,2}, Wagner Alves Pimenta^b,
 Q1 Adriana Correa Melo^{a,b}, Renata Tiscoski Nesi^{a,b}, Marco Aurélio Santos Silva^b, Luís Cristóvão Porto^b

^a Institute of Biomedical Science, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

^b Laboratory of Tissue Repair, Department of Histology and Embryology, Rio de Janeiro State University, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2010

Received in revised form

25 April 2011

Accepted 14 May 2011

Keywords:

Nitric oxide
 Cigarette smoke
 Inflammation
 Oxidative stress
 Mouse

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) represents one of the most important intra- and extracellular mediators and takes part in both biologic and pathologic processes. This study aimed to verify the treatment with an NO inhibitor and an NO substrate in pulmonary emphysema induced by cigarette smoke (CS) in a murine model. We compared N-acetylcysteine (NAC), a precursor of glutathione, to G-nitro-L-Arginine-Methyl Ester or L-NAME (LN), which is an NO inhibitor, and to L-arginine (LA), which is a substrate for NO formation. Mice were divided into several groups: control, CS, CS + LN, CS + LA, and CS + NAC. Control and CS groups were treated daily with a vehicle, while CS + LN, CS + LA, and CS + NAC groups were treated daily with LN (60 mg/kg), LA (120 mg/kg) and NAC (200 mg/kg), respectively. The bronchoalveolar lavage was analyzed and the lungs were removed for histological and biochemical analysis. CS increases neutrophil number. Neutrophil number was lowest in CS + LN, followed by CS + LA. The lungs of CS + LN, CS + LA and CS + NAC mice were protected compared to the lungs of CS mice, but not equal to the quality of lungs in control mice. The CS group also exhibited increased oxidative stress, which was also present in the CS + LN group and to a lesser extent in the CS + LA group. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and 2 increased in the CS + LN group and to a lesser extent in the CS + LA group relative to the control group. These results suggest that LN and LA treatment protected the mouse lung from CS. However, NAC treatment was more than LN and LA. We suggest that the protection conferred by LN treatment requires a balance between proteases and antiproteases, and that protection conferred by LA treatment involves the balance between oxidants and antioxidants.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tobacco is thought to have been cultivated since 5000–3000 BC, and its use originated from the American continents involving ancient people who lived mainly in the Andes around Peru and Ecuador [1]. In the beginning, tobacco was consumed in many forms: it was sniffed, smoked, chewed, eaten and drunk. It was

blown into warriors' faces before battle and over women before sex. It was used medicinally and in religious ceremonies as an offering to the gods [2]. When Christopher Columbus arrived in Spain, prior to his first journey in North America in 1492, he brought tobacco to the Old World. However, the Europeans gained more experience with tobacco in 1500 when Pedro Alvarez Cabral, a Portuguese explorer, reached what is Brazil today. In Brazil, the native inhabitants believed that tobacco was a holy herb [3]. Smoking tobacco spread quickly into Europe. Afterwards, tobacco became popular as a cigarette during the First World War. Later, it developed into a sign of social status. Nowadays, cigarette smoke represents the most important risk factor for respiratory diseases, and it is the first risk factor to contribute to chronic obstructive pulmonary diseases (COPD), specifically emphysema and asthma [4].

The COPD is characterized by the deterioration of small airways and obstruction associated with cellular inflammation and structural remodeling [5]. The prediction of the World Health Organization [6] is that COPD will become the third leading cause of

* Corresponding author. Laboratório Compartilhado, ICB/CCS/UFRJ, Av. Prof. Carlos Chagas Filho 373, Bloco F/sala 14, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21.941-902, Brazil. Tel./fax: +55 21 25 62 64 60.

E-mail addresses: samuelf@ufrj.br (S.S. Valença), carlosrueff@yahoo.com.br (C.R. Rueff-Barroso), wagpimenta@yahoo.com.br (W.A. Pimenta), adriana@fisickfisioterapia.com.br (A.C. Melo), retiscoski@hotmail.com (R.T. Nesi), marcoarelioanato@hotmail.com (M.A.S. Silva), lcporto@uerj.br (L.C. Porto).

¹ Present address: Laboratory of Experimental Morphology, Department of Morphology, Fluminense Federal University, Brazil.

² Contributed equally to this study.

2

S.S. Valença et al. / Pulmonary Pharmacology & Therapeutics xxx (2011) 1–8

111 mortality and the fifth cause of disability in 2020 worldwide [7].
112 The impact of this respiratory disease worldwide is expected to
113 increase with heavy economic burden on individuals and society.

114 Two theories are directly associated to the pathogenesis of
115 emphysema: the imbalance of oxidants and antioxidants and the
116 imbalance of proteases and antiproteases [8,9]. Nitric oxide (NO) is
117 one of many molecules implicated in oxidative stress. Although NO
118 is known to have antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant
119 properties, there is evidence that supports the correlation of
120 inflammatory diseases of the respiratory tract and elevated
121 production of NO [10,11].

122 Previous work of acute lung inflammation caused by short-term
123 CS exposure presents encouraging results with NO treatment [12].
124 The aim of the present study was to verify the role of NO in mouse
125 emphysema induced by long-term CS. We compared the effects of
126 N-acetylcysteine (NAC), a precursor of glutathione, to those of
127 G-nitro-L-Arginine-Methyl Ester (L-NAME), an NO inhibitor, and
128 L-arginine (LA), a substrate for NO formation, on CS-induced lung
129 pathology.

131 2. Material and methods

132 2.1. Reagents

133 Adrenaline, bovine serum albumin, bromophenol blue, 5,5'-
134 dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), glycerol, G-nitro-L-arginine
135 methyl ester (L-NAME), hexadecyltrimethylammonium bromide
136 (HTAB), L-arginine, 2-mercaptoethanol, naphthylethylenediamide
137 dihydrochloride, oxidized glutathione (GSSG), phosphoric acid,
138 reduced glutathione (GSH), sodium acetate, sodium chloride
139 (NaCl), sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium nitrite, sulfanil-
140 amide, Tween-20, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), trietha-
141 nolamine, Tris-HCl and 2-vinylpyridine were purchased from
142 Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Pallflex filters were
143 purchased from Imprint (São Paulo, Brazil). Panótico was
144 purchased from LaborClin (Curitiba, Brazil) Bradford reagent was
145 purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Hydrogen peroxide
146 was purchased from Vetec (Duque de Caxias, Brazil).

147 2.2. Animals

148 C57BL/6 male mice (8 weeks old weighing 20–24 g) were
149 purchased from the Veterinary Institute at the Fluminense Federal
150 University (Niterói, Brazil). Mice were housed (5 per cage) in a
151 controlled environment room with a 12-h light/12-h dark cycle
152 (lights on at 6 pm) and ambient temperature of 25 ± 2 °C, with
153 approximately 80% humidity. The animals had free access to water
154 and food. Acclimatization was performed during the two weeks
155 before the experimental procedures.

156 2.3. CS protocol

157 C57BL/6 male mice ($n = 40$) were exposed to six commercial
158 full-flavor, filtered Virginia cigarettes, containing 10 mg of tar,
159 0.9 mg of nicotine and 10 mg of carbon monoxide, per day for 60
160 days by using a smoking chamber as previously described [12].
161 Briefly, each group of mice was placed in the inhalation chamber
162 (40 cm long, 30 cm wide and 25 cm high), inside an exhaustion
163 chapel. A cigarette was coupled to a plastic 60 mL syringe so that
164 puffs could be drawn in and subsequently expelled into the expo-
165 sure chamber. We aspirated 1 L of smoke from one cigarette with
166 this syringe (20 puffs of 50 mL) and immediately injected the puffs
167 into the chamber. Ten animals of each group were maintained in
168 this smoke-air condition for 6 min, then the inhalation chamber
169 was opened, and the smoke evacuated for 1 min by exhaustion of

170 the chapel. This cigarette exposure was repeated four times
171 (4×6 min) with intervals of 1 min (exhaustion). We repeated this
172 procedure three times per day (morning, noon and afternoon)
173 resulting in 72 min of CS exposure to twelve cigarettes. Each ciga-
174 rette smoked produced 300 mg/m^3 of total particulate matter in the
175 chamber, which was measured by weighing material collected on
176 Pallflex filters. Carboxyhemoglobin (COHb) concentration was
177 previously monitored in mice using the experimental protocol
178 described above, and COHb levels were not toxic. Groups ($n = 10$
179 each) were defined as mice exposed to CS and treated with saline as
180 a vehicle (CS), mice exposed to CS and treated with 60 mg/kg/day of
181 L-NAME (CS + LN), mice exposed to CS and treated with 120 mg/kg/
182 day of L-arginine (CS + LA), and mice exposed to CS and treated
183 with 200 mg/kg/day of N-acetylcysteine (CS + NAC). Drugs were
184 diluted in saline and all treatments were performed by oral gavages
185 once per day during CS exposure. Mice exposed to ambient air were
186 used as the control group ($n = 10$) and were subjected to oral
187 gavages with vehicle alone. The doses of L-NAME, LA and NAC were
188 based on previous studies [12,13]. The mouse body weights were
189 analyzed during experimental design and are shown in the Table 1.
190 We did not observe statistical differences among the mouse groups
191 in this analysis. Separate groups of C57BL/6 male mice ($n = 5$ for
192 each group) were exposed to ambient air during 60 days by using
193 the same protocol described above and simultaneously treated
194 with vehicle (control group), 60 mg/kg/day of L-NAME (L-NAME),
195 120 mg/kg/day of L-arginine (LA) and 200 mg/kg/day of N-ace-
196 tylcysteine (NAC). All procedures were carried out in accordance
197 with conventional guidelines for experimentation with animals,
198 and the Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes Ethic
199 Committee approved the experimental protocol.

200 2.4. Tissue processing and morphometry

201 Twenty-four hours after the last experimental day, mice were
202 sacrificed and the right ventricle was perfused with saline to
203 remove blood. The left lungs in all mice were inflated by instilling
204 4% formalin buffer at 25 cm H₂O pressure for 2 min, then ligated,
205 removed and weighed. Inflated lungs were fixed for 48 h before
206 embedding in paraffin. Serial sagittal sections were obtained for
207 histological and morphometrical analyses.

208 The alveolar airspace enlargement was determined by mean
209 linear intercept (Lm) as described previously [14], using a video
210 microscope (20 \times objective lens, Zeiss-Axioplan, Carl Zeiss, Ober-
211 kochen, Germany), and a test-system superimposed on the monitor
212 screen. The Lm was measured by placing a $100 \times 100 \mu\text{m}$ grid over
213 each field. The total length of each line of the grid divided by the
214 number of alveolar intercepts provides the average distance
215 between alveolated surfaces, or the Lm. Two independent

216 **Table 1**
217 Weight of mice treated with vehicle or LN, LA and NAC.

218 Groups	219 Mean of weight – day 30 (g)	220 Mean of weight – day 60 (g)
221 Control	25.4 \pm 1.2	28.2 \pm 0.8
222 CS	23.9 \pm 0.9	24.9 \pm 1.3
223 CS + LN	26.2 \pm 0.9	27.8 \pm 0.9
224 CS + LA	24.8 \pm 0.7	27.2 \pm 1.3
225 CS + NAC	28.9 \pm 0.6	30.3 \pm 0.8
226 LN	24.3 \pm 0.8	25.1 \pm 0.9
227 LA	26.8 \pm 0.7	29.7 \pm 1.5
228 NAC	25.7 \pm 1.5	29.1 \pm 1.8

229 Data are shown as mean \pm SEM of ten mice for each group exposed to cigarette
230 smoke (CS) or control. The others groups (LN, LA and NAC) had a sample of 5 mice.
231 The initial weight of all mice was 20–24 g. CS + LN, cigarette smoke group treated
232 with L-NAME; CS + LA, cigarette smoke group treated with L-arginine; CS + NAC,
233 cigarette smoke group treated with N-acetylcysteine; LN, control group treated with
234 L-NAME; LA, control group treated with L-arginine; NAC, control group treated with
235 N-acetylcysteine.

Please cite this article in press as: Valença SS, et al., L-NAME and L-arginine differentially ameliorate cigarette smoke-induced emphysema in mice, Pulmonary Pharmacology & Therapeutics (2011), doi:10.1016/j.pupt.2011.05.006

241 observers measured the Lm, which exhibited a positive correlation
242 ($p < 0.01$).

243 The alveolar surface density Sv[as] was stereologically assessed
244 using a cycloid test-system superimposed on the monitor screen,
245 adapted from Barth et al. [15]. The number of intersections (k)
246 between test grid lines and alveolar septa was counted at a micro-
247 scopic magnification of 200 \times . With known test line length (L) the
248 alveolar surface density can be computed according to: Sv
249 [as] = $\frac{2}{L} \times \sum k/L$. The dimension of Sv[as] is μm^{-1} and is, therefore,
250 equivalent to the alveolar surface per unit lung volume ($\mu\text{m}^{-1} = \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$).
251 A reduction in Sv[as] correlates to an increasing severity of
252 emphysema. In each animal, at least 40 measuring fields were evalu-
253 ated. The standard error of measurements was less than 10%.

254 2.5. Bronchoalveolar lavage (BAL)

255 Before lung fixation BAL was performed in all mice by injecting
256 saline three consecutive times to a final volume of 1.5 mL. The
257 withdrawn fluid was stored at 4 °C until total cell number was
258 determined in a Neubauer counting chamber. Differential cell
259 counts were performed on cytospin preparations (Shandon, Wal-
260 tham, MA, USA) stained with Panótico. At least 200 cells per BAL
261 fluid sample were counted using standard morphological criteria.
262 After BAL, lungs were immediately removed and homogenized on
263 ice with 10% (w/v) PBS (pH 7.3) using an Ultra-Turrax T8 homoge-
264 nizer (Toronto, Canada) and then centrifuged at 600 \times g for 5 min.
265 Supernatants were kept at -20 °C for biochemical analysis.

266 2.6. Biochemical assays

267 Biochemical assays were performed in lung homogenates.
268 Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed by measuring
269 inhibition of adrenaline auto-oxidation at an absorbance of 480 nm
270 [16]. Catalase (CAT) activity was measured by the rate of decrease in
271 hydrogen peroxide concentration at 240 nm [17]. Myeloperoxidase
272 (MPO) activity was measured by using hydrogen peroxide, HTAB and
273 TMB. Initially, 100 μL of BAL samples were centrifuged with 900 μL
274 of HTAB at 14,000 \times g for 15 min. Then 75 μL of supernatant was incu-
275 bated with 5 μL of TMB for 5 min at 37 °C. This mixture was incubated
276 with 50 μL of hydrogen peroxide for 10 min at 37 °C, followed by the
277 addition of 125 μL of sodium acetate buffer. The reaction was read in
278 a microplate reader (Bio-Rad mod 550, Hercules, CA, USA) at 630 nm
279 [18]. GSH/GSSG ratio was based on the reaction with DTNB that
280 produces the 2-nitro-5-thiobenzoate (TNB) chromophore [19]. To
281 determine GSSG, lung homogenates were treated with 2-vinylpyridine,
282 which covalently reacts with GSH, but not GSSG. The excess 2-vinylpyridine
283 is neutralized with triethanolamine. The rate of formation of TNB, measured
284 at 412 nm, is proportional to the concentration of GSH or GSSG in the
285 sample. GSH or GSSG concentrations in the samples were determined from
286 a standard curve generated by different concentrations of GSH or GSSG [19].
287 Nitrite levels were determined by a method based on the Griess reaction.
288 A total of 100 μL of sample was mixed with 100 μL of Griess reagent (1%
289 sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% naphthylethylenediamide
290 dihydrochloride in water) and incubated at room temperature for
291 10 min followed by measuring the absorbance in a plate reader at
292 550 nm. Nitrite concentrations in the samples were determined from
293 a standard curve generated by different concentrations of sodium nitrite
294 [20]. The total protein content in the samples from lung homogenates
295 was determined by the Bradford method [21].

296 2.7. Western blot

297 Lung homogenates from two animals per group were denatured
298 in the sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-

299 mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) and
300 heated in boiling water for 3 min. Samples (50 μg of total protein)
301 were resolved by 15% SDS polyacrylamide gel electrophoresis and
302 proteins transferred to nitrocellulose membranes (Invitrogen, CA,
303 USA). Rainbow markers (Amersham Pharmacia Biotech, PA, USA)
304 were run in parallel to estimate molecular weights. Membranes
305 were blocked with Tween-TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM
306 NaCl, 0.5% Tween-20) containing 2% bovine serum albumin and
307 probed with the following primary antibodies (SantaCruz
308 Biotechnology, CA, USA): goat anti-mouse 4-hydroxynonenal
309 (1:2000), goat anti-mouse metalloelastase-12 (1:2000), goat anti-
310 mouse neutrophil elastase (1:3000), tissue inhibitor of metallo-
311 proteinase 1 (1:5000) and tissue inhibitor of metalloproteinase 2
312 (1:5000). After extensive washing in Tween-TBS, the membranes
313 were incubated with biotin-conjugated donkey anti-goat immu-
314 noglobulin G (1:10000; SantaCruz Biotechnology, CA, USA) for 1 h
315 and then the blots were developed with the ECL Western Detection
316 Reagent (Amersham Pharmacia Biotech, PA, USA) according to the
317 instructions of the manufacturer. Densitometry was performed on
318 all bands and Ponceau S staining was used to verify protein weight.

319 2.8. Statistical analysis

320 Data are expressed as means \pm SEM. For comparison among
321 groups one-way ANOVA was performed followed by the Tukey
322 post-hoc test ($p < 0.05$), except for GSH/GSSG and stereology that
323 were tested with Kruskal-Wallis followed by the Dunns post-hoc
324 test ($p < 0.05$). InStat Graphpad software was used to perform
325 the statistical analyses (GraphPad InStat version 3.00 for Windows
326 95, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

327 3. Results

328 3.1. Histology

329 The control group exhibits normal pulmonary tissue with
330 preservation of the alveolar septa and space (Fig. 1a). The CS group
331 is characterized by septal condensation and confluence, enlarge-
332 ment of alveolar spaces, and the presence of inflammatory cells
333 (Fig. 1b). In the CS + LN and CS + LA groups, we observed protected
334 areas and few inflammatory cells (Fig. 1c and d) compared to the
335 tissue structural damage caused by cigarette smoke evident in the
336 CS group. The CS + NAC group presented the best histological
337 results among the treated groups (Fig. 1e), showing better preser-
338 vation of pulmonary structure, few enlarged alveolar spaces and
339 many inflammatory cells.

340 3.2. Morphometry

341 Measurements of mean linear intercept (Lm) and alveolar septa
342 surface density (Sv[as]) were shown in Figs. 2 and 3, respectively.
343 The Lm of CS and CS + LN were increased in relation to the control
344 group ($p < 0.001$ and $p < 0.05$), whereas the CS + NAC showed
345 a decrease in comparison to the CS group ($p < 0.05$). The data
346 indicate that the Sv[as] decreased in the CS group compared to the
347 Sv[as] in the control group. On the other hand, the CS + LN, CS + LA
348 and CS + NAC exhibited an increase in Sv[as] when compared to the
349 CS group ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively).

350 3.3. Bronchoalveolar lavage (BAL)

351 The profile of inflammatory cells found in the bronchoalveolar
352 lavage is shown in Table 2. BAL cell counts revealed a high number of
353 leukocytes in CS, CS + LN, CS + LA and CS + NAC ($p < 0.001$) in
354 comparison to that in the control. However, the total number of

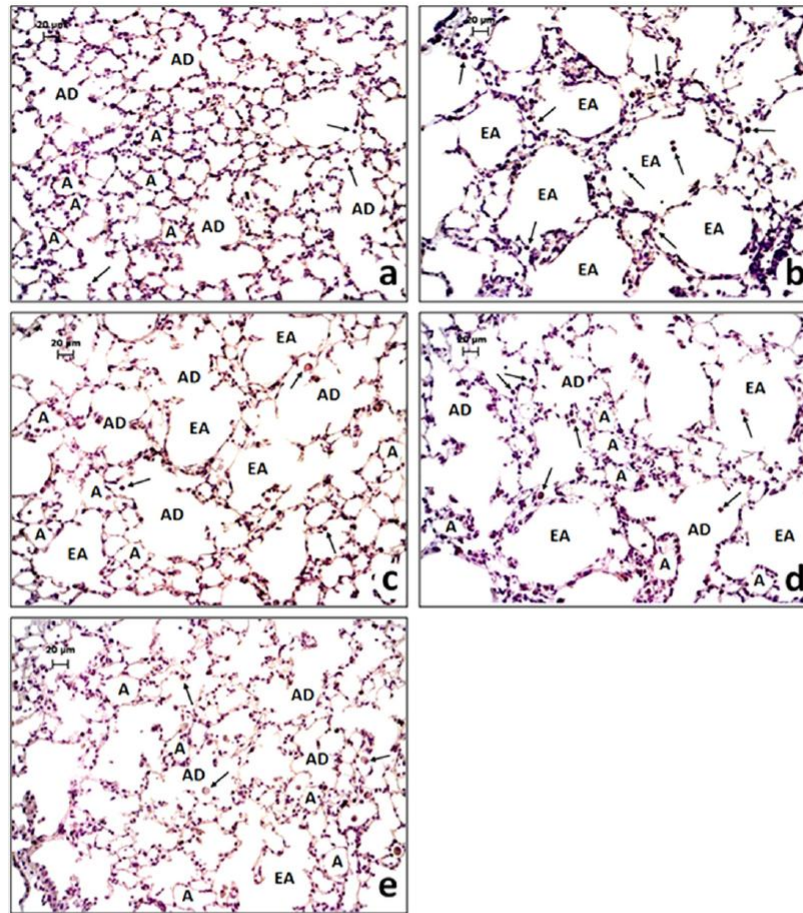


Fig. 1. Photomicrographs of lungs from control and from mice exposed to chronic cigarette smoke (CS). (a) Control air-exposed group exhibits a normal parenchymal structure; (b) CS group displays emphysema; (c) CS group treated with L-NAME (CS + LN) and (d) CS group treated with LA (CS + LA) show areas with emphysema; (e) CS group treated with N-acetylcysteine (CS + NAC) display areas with normal and emphysematous appearance. Hematoxylin-eosin stain was performed.

leukocytes in CS + LN, CS + LA and CS + NAC was significantly lower than that in the CS group ($p < 0.05$, $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). The number of alveolar macrophages was increased in CS and CS + LN compared to that in the control group ($p < 0.001$). Compared to the number of alveolar macrophages in the CS group, CS + LN, CS + LA and CS + NAC exhibited a decrease ($p < 0.001$). As expected, neutrophils in CS, CS + LN, CS + LA and CS + NAC ($p < 0.001$) were more numerous compared to the control group. Nevertheless, neutrophils were significantly less numerous in CS + LN and CS + LA ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively) in relation to the CS group. In contrast, the CS + NAC group demonstrated an increase in neutrophils when compared to the CS group ($p < 0.001$).

3.4. Biochemistry

Biochemical parameters of oxidative stress in mouse lungs are shown in Table 3. The activity of SOD was diminished in all groups exposed to cigarette smoke in comparison to the control group

($p < 0.001$). We observed that the CAT activity was reduced in the CS, CS + LA and CS + NAC groups compared to the CAT activity in the control group ($p < 0.001$, $p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively). However, the CS + LN group demonstrated elevated CAT activity compared to that in the CS group ($p < 0.05$). We observed an increase of MPO activity in CS, CS + LN, CS + LA and CS + NAC in relation to MPO activity in the control ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively). Also, the CS + LA and CS + NAC groups showed an increase of MPO activity when compared to the CS group ($p < 0.01$ and $p < 0.001$). We found that the CS group exhibited a lower GSH/GSSG ratio than that in the control group ($p < 0.01$) and a higher ratio in the CS + NAC group than that in the CS group ($p < 0.01$). The nitrite content in the CS, CS + LA and CS + NAC groups was higher than the nitrite content in the control group ($p < 0.001$). The CS + LN group showed the lowest level of nitrite formation compared to that in the CS group ($p < 0.001$). In contrast, the CS + LA group showed a higher level of nitrite content than the nitrite content in the CS group ($p < 0.001$).

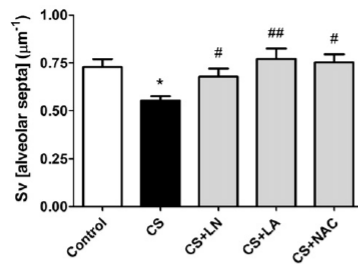


Fig. 2. Stereological analysis of median alveolar diameter (Lm) of alveolar septa in lungs of control and cigarette smoke exposed groups. Data are shown as mean \pm SEM of ten mice for each group. *Compared to Control group. #Compared to CS group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. CS, cigarette smoke group; CS + LN, cigarette smoke group treated with ι -NAME; CS + LA, cigarette smoke group treated with LA; CS + NAC, cigarette smoke group treated with N-acetylcysteine.

Table 4 shows the MPO activity and GSH/GSSG ratio of animals that received the vehicles and drugs without cigarette smoke exposure. We observed an increase of MPO activity only in the LA group when compared to the MPO activity in the control ($p < 0.001$). The NAC group exhibited an elevated GSH/GSSG ratio compared to the control group ($p < 0.001$).

3.5. Western blot

Bands from western blot (WB) are shown in Fig. 4 and densitometry corresponding bands in Fig. 5. Two lungs from each group were used for WB. We observed a marked increase in the expression of 4-hydroxynonenal (4-HNE) in the CS group compared to the expression levels in the other groups exposed to cigarette smoke. The expression of metalloelastase12 (MMP-12) was confirmed in the CS group but was increased in the CS + NAC group. The expression of NE was also greatly increased in CS and CS + NAC groups. Finally, we noted high expressions of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in CS + LN and CS + LA groups and TIMP-2 in the CS + LN group.

4. Discussion

Several experimental studies and clinical trials have been conducted to create new therapeutic strategies for the treatment of

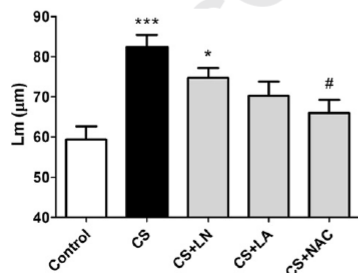


Fig. 3. Stereological analysis of total alveolar septal volume (Sv) in lungs of control and cigarette smoke exposed groups. Data are shown as mean \pm SEM of ten mice for each group. *Compared to Control group. #Compared to CS group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. CS, cigarette smoke group; CS + LN, cigarette smoke group treated with ι -NAME; CS + LA, cigarette smoke group treated with LA; CS + NAC, cigarette smoke group treated with N-acetylcysteine.

Table 2
Inflammatory cells in bronchoalveolar lavage (BAL).

Groups	Leukocytes of BAL $\times 10^3$ /mL	Macrophages of BAL $\times 10^3$ /mL	Neutrophils of BAL $\times 10^3$ /mL
Control	48.3 \pm 3.9	47.1 \pm 3.9	1.2 \pm 0.3
CS	209.1 \pm 15.3***	113.4 \pm 7.4***	102.8 \pm 6.8***
CS + LN	128.3 \pm 8.0***#	78.0 \pm 5.2***###	55.5 \pm 8.6***###
CS + LA	123.8 \pm 4.4***###	44.5 \pm 4.1###	79.3 \pm 5.5***##
CS + NAC	164.8 \pm 12.8***#	41.7 \pm 4.0###	139.0 \pm 8.9***###

Data are shown as mean \pm SEM of ten mice for each group. *Compared to Control group. #Compared to CS group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. CS, cigarette smoke group; CS + LN, cigarette smoke group treated with ι -NAME; CS + LA, cigarette smoke group treated with ι -arginine; CS + NAC, cigarette smoke group treated with N-acetylcysteine.

CPD [22–26]. The present study is not the first to investigate the inhibition of iNOS or NO as a therapeutic strategy for emphysema [27–30]. But it is the first study to investigate the effects of inhibition of iNOS or treating with ι -arginine for the formation of NO in a model of cigarette smoke-induced emphysema after 60 days. NO is known to participate in various biological processes involved in the inflammatory cascade [31]. We previously reported that the administration of donor NO (nitroglycerin) or NO precursor (ι -arginine) caused a reduction of CS-induced acute lung inflammation [12]. We suggested that NO may also be implicated in oxidative stress formation related to CS-induced chronic pulmonary inflammation.

NAC is an important drug in the treatment of COPD [32–35]. The CS + NAC group showed an increase in the number of neutrophils in BAL compared to both control and CS groups. This increase was concomitant with MMP-12 and NE expression, but without an increase in 4-HNE, an important marker of oxidative damage [36]. NAC administration has been shown to increase glutathione levels resulting in a reduction in tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) expression [37,38]. Therefore, the reduction of both TIMP-1 and TIMP-2 observed in the CS + NAC group was expected. The increase of neutrophils in the CS + NAC group was confirmed with the increase of MPO activity, which also contributed to tissue remodeling as previously described [39]. According to the present results, NAC interfered in the balance between proteases and antiproteases, which can contribute to lung inflammation. ι -NAME was also able to interfere in the protease-antiprotease balance by causing a decrease in MMP-12 and NE expression and an increase in TIMP-1 and TIMP-2 expression.

All groups exposed to CS exhibited high leukocyte levels in BAL when compared to the leukocyte level in the control group. Leukocytes in BAL from CS animals treated with ι -NAME or LA were reduced when compared to leukocyte number in the CS group. Treatment with ι -NAME concomitant with CS induced a greater reduction in neutrophils when compared to the neutrophil number in the CS group. However, treatment with LA concomitant with CS resulted in a greater reduction in macrophages when compared to macrophage number in the CS group. These data suggest that NO blockade or providing an NO substrate may contribute to control inflammatory cell influxes into the BAL. The links between LA and macrophages and between ι -NAME and neutrophils were not studied here, but we suggest that the association between the drug and cell type contributed to the protective effects against CS damage in the lung.

The 4-HNE is a product of lipid peroxidation and an important marker of oxidative damage [26]. The increased expression of 4-HNE found only in the CS group support our theory that all treated groups showed a reduction in oxidative damage. CS exposure induced alveolar thickening and expanded air spaces. Because CS + LN and CS + LA groups displayed normal areas of alveoli and

6

S.S. Valença et al. / Pulmonary Pharmacology & Therapeutics xxx (2011) 1–8

631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695**Table 3**
Biochemical parameters of oxidative stress.

Groups	SOD (U/mg ptn)	CAT (U/mg ptn)	MPO (mU/mg ptn)	GSH/GSSG	NO ₂ ⁻ (μM/mg ptn)
Control	18.4 ± 2.1	3.85 ± 0.06	0.248 ± 0.008	1.10 ± 0.03	0.70 ± 0.06
CS	12.1 ± 0.4***	3.25 ± 0.10***	0.555 ± 0.079*	0.72 ± 0.08**	3.77 ± 0.23***
CS + LN	10.3 ± 0.8***	3.75 ± 0.06*	0.577 ± 0.079*	1.03 ± 0.07	0.62 ± 0.06***
CS + LA	10.3 ± 0.8***	3.37 ± 0.09**	1.368 ± 0.120***,##	0.89 ± 0.10	7.46 ± 0.58***,###
CS + NAC	9.6 ± 0.5***	3.46 ± 0.08**	2.336 ± 0.201***,###	1.11 ± 0.09**	4.68 ± 0.27***

Data are shown as mean ± SEM of ten mice for each group. *Compared to Control group. #Compared to CS group. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001; #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001. CS, cigarette smoke group; CS + LN, cigarette smoke group treated with L-NAME; CS + LA, cigarette smoke group treated with L-arginine; CS + NAC, cigarette smoke group treated with N-acetylcysteine.

alveolar septa, which indicates protection of the lung parenchyma, we suggest that lung epithelium and extracellular matrix turnover contribute to the maintenance and protection of tissue organization against the effects of CS. L-NAME and NAC were associated with the protease–antiprotease balance, which is very important for lung tissue integrity.

SOD is the first line of antioxidant defense and catalyzes the dismutation of O₂⁻ in O₂ and H₂O₂ [40]. Our results indicated that CS reduced SOD activity. None of the drugs used here were able to restore SOD activity. However, all drugs conferred some protection to the lung to some extent. Therefore, we suggest that these drugs may have some involvement with the O₂⁻-SOD pathway. We observed a restoration of CAT activity only in the CS + LN group. In this sense, LA and NAC may be involved in the H₂O₂-CAT pathway. Conversely, lung protection observed in the CS + LN group is concomitant with an increase in CAT activity when compared to the CS group. Because H₂O₂ is more reactive with MPO than with CAT [17], the reduced CAT activity in CS + LA and in CS + NAC concomitant with increased MPO activity in these groups could explain the conflicting results of the CS + LN group. Furthermore, increased MPO activity in these groups also correlates to the increased number of neutrophils in BAL.

The GSH/GSSG ratio is an important indicator of oxidative stress [41]. The GSH/GSSG ratio in the CS group was reduced when compared to the ratio in the control group. All treated groups were similar to the control group and did not exhibit any oxidative stress. The GSH/GSSG ratio was highest in the CS + NAC group, because NAC is a precursor of glutathione synthesis. Also, 4-HNE, an oxidative damage marker, was reduced in treated groups compared to that in the CS group. The GSH/GSSG ratio and 4-HNE levels confirmed that there was less oxidative stress and damage in all treated groups, although the lung histology did not resemble the control group. These results indicate that L-NAME, LA and NAC were associated with the oxidant–antioxidant balance, which is also very important for lung tissue integrity.

Nitrite amounts were reduced in CS + LN and increased in CS + LA as expected. However, the CS + NAC group showed nitrite values similar to the CS group. We suggest that NAC increases NO production because control mice treated chronically with NAC exhibited increased nitrite levels (data not shown). NO increases endothelial and capillary functions and the excess of NO may react

Table 4
Biochemical parameters of oxidative stress in groups treated with drugs without cigarette smoke exposure.

Groups	MPO (mU/mg ptn)	GSH/GSSG
Control	0.248 ± 0.008	1.10 ± 0.03
LN	0.363 ± 0.029	0.96 ± 0.07
LA	2.725 ± 0.275***	1.19 ± 0.08
NAC	0.472 ± 0.059	4.63 ± 0.48***

Data are shown as mean ± SEM of ten mice in the control group and five mice for every other group. *Compared to Control group. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. LN, group treated with L-NAME; LA, group treated with L-arginine; NAC, group treated with N-acetylcysteine.

with O₂⁻ to form peroxynitrite, a potent pro-oxidant [42–44]. However, oxidative burden over a shorter time period seems to have no influence in tissue MMP–TIMP balance. Conversely, oxidative burden over a long time period could affect tissue remodeling by disequilibrium in the MMP–TIMP balance. We suggest that short-term exposure to LA in the CS + LA group promotes the pro-oxidant effects of LA to facilitate lung remodeling and consequently lung protection. This condition is inversely proportional to a situation where an insult, such as CS, maintains a constant amount of oxidants in the system over a longer period of time [42–44]. NAC also increases nitrite levels, acting as another great antioxidant in lung tissue.

Our study has some limitations. Emphysema in our experimental design was set at 60 days, while in humans it emerges after 20, 30 or 40 years. Mouse is not people, but it is the best way to study the pathophysiological mechanism and to test therapeutic strategies for emphysema. The doses of the drugs used are huge, and we may not discard gastrointestinal and cardiovascular side effects associated with these drugs. However, body weights were archived and no statistical differences among the mouse groups were observed. Moreover, none of the mice died during treatment with the drugs and/or during exposure to CS. The nonselective inhibition of NO, such as the one studied here through the use of L-NAME, can bring undesirable effects to other organs. These might include a worsening of airways obstruction due to a loss of NANC inhibitory responses [45,46], a worsening of the comorbid condition of pulmonary hypertension [47,48] and increased risk of infection, a major cause of exacerbation in COPD [49–51]. Another limitation in our study was the number of animals used for western blot. The ideal number would have used at least three animals per group; however, by technical limitations it was not possible. With two animals per group is not possible to make statistical analysis, and therefore, the results are limited to a tendency of increase/decrease. However, we cannot rule out that these data suggest an interesting response from

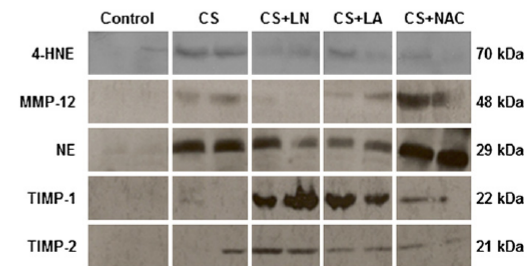


Fig. 4. Western blot showing the expression levels of 4-hydroxynonenal (4-HNE), metalloproteinase 12 (MMP-12), neutrophil elastase (NE), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) in cigarette smoke group (CS), cigarette smoke group treated with L-NAME (CS + LN), cigarette smoke group treated with L-arginine (CS + LA) and cigarette smoke group treated with N-acetylcysteine (CS + NAC). The two bands in each group are different animals.

Please cite this article in press as: Valença SS, et al., L-NAME and L-arginine differentially ameliorate cigarette smoke-induced emphysema in mice, Pulmonary Pharmacology & Therapeutics (2011), doi:10.1016/j.pupt.2011.05.006

696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760

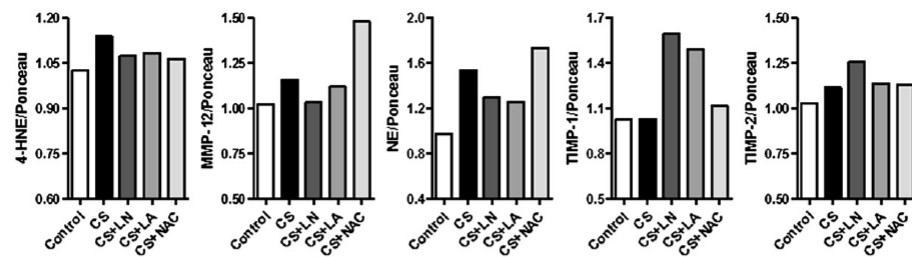


Fig. 5. Densitometric analyses of bands in Fig. 4. The values are represented as mean and were equalized through membranes stained with Ponceau.

treatment with LN, LA or NAC. Finally, cigarette smoke contains massive amounts of nitric oxide [52,53] and the suggestive good effects observed here would not be modulated by either L-NAME or L-arginine directly, but due its action on the alveolar septa by distinct pathways reducing the imbalance between proteases/antiproteases and oxidants/antioxidants.

5. Conclusions

In conclusion, both LN and LA were found to be somewhat protective against CS-induced markers of lung emphysema, and both caused a marked induction of TIMP-1. This suggests that these effects must be unrelated to NO production or NOS activity, and potential role of other arginine-dependent processes could be considered. We suggest that L-NAME and NAC is associated with protease-antiprotease and oxidant-antioxidant balance, while LA is only associated with oxidant-antioxidant balance. In addition, NAC naturally acts to increase levels of glutathione, which directly interferes with the oxidant-antioxidant balance, while LN and LA probably act on inflammatory cells and induce other secondary interactions with lung tissue. These results suggest that NO management is of great interest regarding the development of therapeutic treatments for COPD.

Acknowledgments

This work was supported by FAPERJ, CNPq and CEPUERJ. We are grateful to Karla Pires, Eduardo Trajano, Jackson Alves and Frank Bezerra for their technical support of the biochemistry.

References

- Gately I, La Dava Nicotina. The history of how tobacco seduced the world. London: Simon and Schuster; 2001.
- Musk AW, de Klerk NH. History of tobacco and health. *Respirology* 2003;8: 286–90.
- Heiman RK. Tobacco and Americans. New York: McGraw-Hill; 1960.
- Viegi G, Scognamiglio A, Baldacci S, Pistelli F, Carrozzi L. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respiration* 2001;68:4–19.
- Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J* 2008;31:1334–56.
- WHO. World Health Organization – world health report; 2008.
- Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: global burden of disease study. *Lancet* 1997;349: 1498–504.
- Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol*. 2006;533:222–39.
- Rahman I, Skwarska E, Henry M, Davis M, O'Connor CM, FitzGerald MX, et al. Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radical Biol Med* 1999;27:60–8.
- van der Vliet A, Eisenich JP, Cross CE. Nitric oxide: a pro-inflammatory mediator in lung disease? *Respir Res* 2000;1:67–72.
- Tinker AC, Wallace AV. Selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase: potential agents for the treatment of inflammatory diseases? *Curr Top Med Chem* 2006;6:77–92.

- Valença SS, Pimenta WA, Rueff-Barroso CR, Ferreira TS, Resende AC, Moura RS, et al. Involvement of nitric oxide in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Nitric Oxide* 2009;20:175–81.
- Rubio ML, Martín-Mosquera MC, Ortega M, Peces-Barba G, Gonzalez-Mangado N. Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Chest* 2004;125:1500–6.
- Valença SS, Porto LC. Immunohistochemical study of lung remodeling in mice exposed to cigarette smoke*. *J Bras Pneumol* 2008;34:787–95.
- Barth PJ, Muller B, Wagner U, Bittinger A. Quantitative analysis of parenchymal and vascular alterations in NO₂-induced lung injury in rats. *Eur Respir J* 1995;8:1115–21.
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 1987;22:111–80.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6.
- Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 1983; 132:345–52.
- Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* 2006;1:3159–65.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131–8.
- Bradford MM. 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.
- Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 2006;111:476–94.
- Rahman I, Kilty I. Antioxidant therapeutic targets in COPD. *Curr Drug Targets* 2006;7:707–20.
- Barnes PJ. Future treatments for chronic obstructive pulmonary disease and its comorbidities. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:857–64.
- de Boer WI, Yao H, Rahman I. Future therapeutic treatment of COPD: struggle between oxidants and cytokines. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007;2: 205–28.
- Owen CA. Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2:373–85. discussion 94–5.
- Boyer L, Plantier L, Dagouassat M, Lanone S, Goven D, Caramelle P, et al. Role of nitric oxide synthases in elastase-induced emphysema. *Lab Invest* 2011;91: 353–62.
- Roh GS, Yi CO, Cho YJ, Jeon BT, NizamudtinoVA IT, Kim HJ, et al. Anti-inflammatory effects of celecoxib in rat lungs with smoke-induced emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;299:L184–91.
- Atochina-Vaserman EN, Beers MF, Kadire H, Tomer Y, Inch A, Scott P, et al. Selective inhibition of inducible NO synthase activity in vivo reverses inflammatory abnormalities in surfactant protein D-deficient mice. *J Immunol* 2007;179:8090–7.
- Atochina EN, Beers MF, Hawgood S, Poulain F, Davis C, Fusaro T, et al. Surfactant protein-D, a mediator of innate lung immunity, alters the products of nitric oxide metabolism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:271–9.
- Adams HR. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *J Am Vet Med Assoc* 1996;209:1297–302.
- Cai S, Chen P, Zhang C, Chen JB, Wu J. Oral N-acetylcysteine attenuates pulmonary emphysema and alveolar septal cell apoptosis in smoking-induced COPD in rats. *Respirology* 2009;14:354–9.
- Dekhuijzen PN, van Beurden WJ. The role for N-acetylcysteine in the management of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2006;1:99–106.
- Sadowska AM, Verbracke J, Darquennes K, De Backer WA. Role of N-acetylcysteine in the management of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2006;1:425–34.
- Stav D, Raz M. Effect of N-acetylcysteine on air trapping in COPD: a randomized placebo-controlled study. *Chest* 2009;136:381–6.
- Yoshino K, Sano M, Hagiwara M, Fujita M, Tomita I. Accumulation of (E)-4-hydroxy-2-nonenal and n-hexanal, degradation products of lipid peroxides, in mouse lung and liver. *Biol Pharm Bull* 1993;16:84–6.

Please cite this article in press as: Valença SS, et al., L-NAME and L-arginine differentially ameliorate cigarette smoke-induced emphysema in mice, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* (2011), doi:10.1016/j.pupt.2011.05.006

- 891 [37] Vanderbist F, Maes P, Neve J. In vitro comparative assessment of the antiox-
892 idant activity of n-acetylcysteine against three reactive oxygen species. *Arznei-*
893 *mittelforschung* 1996;46:783–8.
- 894 [38] De Backer WA, Amsel B, Jorens PG, Bossaert L, Hiemstra PS, van Noort P, et al.
895 N-acetylcysteine pretreatment of cardiac surgery patients influences plasma
896 neutrophil elastase and neutrophil influx in bronchoalveolar lavage fluid.
897 *Intensive Care Med* 1996;22:900–8.
- 898 [39] Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D,
899 Belaouaj A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced
900 emphysema in mice. *Am J Pathol* 2003;163:2329–35.
- 901 [40] Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1975;44:147–59.
- 902 [41] Ghezzi P, Bonetto V, Fratelli M. Thiol-disulfide balance: from the concept of
903 oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:
904 964–72.
- 905 [42] Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl
906 radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from
907 nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1620–4.
- 908 [43] O'Donnel VB, Freeman BA. Interactions between nitric oxide and lipid
909 oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circulation* 2001;88:
910 12–21.
- 911 [44] Oeckler RA, Wolin MS. New concepts in vascular nitric oxide signaling. *Curr*
912 *Atheroscler Rep* 2000;2:437–44.
- 913 [45] Belvisi MG, Stretton CD, Yacoub M, Barnes PJ. Nitric oxide is the endogenous
914 neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur J Pharmacol* 1992;
915 210:221–2.
- 916 [46] Ward JK, Belvisi MG, Fox AJ, Miura M, Tadjkarimi S, Yacoub MH, et al.
917 Modulation of cholinergic neural bronchoconstriction by endogenous nitric
918 oxide and vasoactive intestinal peptide in human airways in vitro. *J Clin Invest*
919 1993;92:736–42.
- 920 [47] Shujaat A, Minkin R, Eden E. Pulmonary hypertension and chronic cor-
921 pulmonale in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007;2:273–82.
- 922 [48] McGhan R, Radcliff T, Fish R, Sutherland ER, Welsh C, Make B. Predictors of
923 rehospitalization and death after a severe exacerbation of COPD. *Chest* 2007;
924 132:1748–55.
- 925 [49] MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identi-
926 fication of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis.
927 *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5243–8.
- 928 [50] Noda S, Tanaka K, Sawamura S, Sasaki M, Matsumoto T, Mikami K, et al. Role
929 of nitric oxide synthase type 2 in acute infection with murine cytomegalo-
930 virus. *J Immunol* 2001;166:3533–41.
- 931 [51] De Serres G, Lampron N, La Forge J, Rouleau I, Bourbeau J, Weiss K, et al.
932 Importance of viral and bacterial infections in chronic obstructive pulmonary
933 disease exacerbations. *J Clin Virol* 2009;46:129–33.
- 934 [52] Pryor WA, Prier DG, Church DF. Electron-spin resonance study of mainstream
935 and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase
936 smoke and in cigarette tar. *Environ Health Perspect* 1983;47:345–55.
- 937 [53] Hatzinikolaou DG, Lagesson V, Stavridou AJ, Pouli AE, Lagesson-Andrasko L,
938 Stavrides JC. Analysis of the gas phase of cigarette smoke by gas chroma-
939 tography coupled with UV-diode array detection. *Anal Chem* 2006;78:
940 4509–16.

APÊNDICE F – Carta de submissão do artigo científico Redox imbalance and pulmonary function in bleomycin-induced fibrosis in C57BL/6, DBA/2 and BALB/c mice

----- Forwarded message -----

From: <toxpathjournal@verizon.net>
Date: 2011/7/8
Subject: Toxicologic Pathology - Manuscript ID ToxPath-11-2199-ORGMAN
To: lcporto@uerj.br
Cc: toxpathjournal@verizon.net

08-Jul-2011

Dear Dr. Porto:

Your manuscript entitled "Redox imbalance and pulmonary function in bleomycin-induced fibrosis in C57BL/6, DBA/2 and BALB/c mice" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Toxicologic Pathology. The review process will take up to 6 weeks at which time we will communicate the results to you.

If this is a revision, a decision should be made within 4 weeks.

Your manuscript ID is ToxPath-11-2199-ORGMAN.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/toxpath> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/toxpath> .

Thank you for submitting your manuscript to Toxicologic Pathology.

Sincerely,
Toxicologic Pathology Editorial Office
John Foster, Editor-in-Chief
Stephanie Dickinson, Managing Editor

--

Luís Cristóvão Pôrto

Para Comprovação junto ao BHEX

APÊNDICE G - Carta de submissão do artigo científico Endotoxin-induced acute lung injury is dependent upon oxidative response

> Date: Sun, 15 May 2011 17:46:00 -0400
 > From: gardnerde@aol.com
 > To: samuelv@ufrj.br
 > Subject: Inhalation Toxicology - Manuscript ID UIHT-2011-0069
 >
 > 15-May-2011
 >
 > Dear Prof. Valenca:
 >
 > Your manuscript entitled "Endotoxin-induced acute lung injury is dependent upon oxidative response" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Inhalation Toxicology.
 >
 > Your manuscript ID is UIHT-2011-0069.
 >
 > Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/uiht> and edit your user information as appropriate.
 >
 > You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/uiht> .
 >
 > Thank you for submitting your manuscript to Inhalation Toxicology.
 >
 > Sincerely,
 > Inhalation Toxicology Editorial Office

Inhalation Toxicology

Page 2 of 3:

Eduardo Tavares Lima Trajano¹, Cinthya Sternberg², Maurício Caetano², Marco Aurélio Santos Silva¹, Luís Cristóvão Porto¹, Juliana Carvalho Santos³, Marcelo Lima Ribeiro³, Clarissa Bichara Magalhães⁴, Walter Araújo Zin⁴, Cláudia Farias Benjamim⁵, Samuel Santos Valença⁵

¹ Laboratório de Reparo Tecidual – DHE/IBRAG/UERJ, Rio de Janeiro, Brazil.

² Setor de Pesquisa Clínica – INCA, Rio de Janeiro, Brazil.

³ Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia – USF, Bragança Paulista, Brazil.

⁴ Laboratório de Fisiologia da Respiração – IBCCF/CCS/UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil.

⁵ Laboratório de Inflamação, Estresse Oxidativo e Câncer – ICB/CCS/UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding author:

Prof. Dr. Samuel Santos Valença - Laboratório Compartilhado – ICB/CCS/UFRJ. Av. Carlos Chagas Filho nº 373, Bloco F1/sala 14, Ilha do Fundão. CEP: 21941-902, Rio de Janeiro – RJ, Brasil. Tel: 55 21 25 62 64 60 / Fax: 55 21 25 62 66 74. E-mail: samuelv@ufrj.br

APÊNDICE H - Carta de submissão do artigo científico Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lung

> Date: Sun, 22 May 2011 16:58:00 -0400
 > From: gardnerde@aol.com
 > To: samuelv@ufrj.br
 > Subject: Inhalation Toxicology - Manuscript ID UIHT-2011-0073
 >
 > 22-May-2011
 >
 > Dear Prof. Valença:
 >
 > Your manuscript entitled "Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lung" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Inhalation Toxicology.
 >
 > Your manuscript ID is UIHT-2011-0073.
 >
 > Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/uiht> and edit your user information as appropriate.
 >
 > You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/uiht>.
 >
 > Thank you for submitting your manuscript to Inhalation Toxicology.
 >
 > Sincerely,
 > Inhalation Toxicology Editorial Office

Inhalation Toxicology

Page 2 of 35

Hyperoxia-induced lung oxidative response

Nagato et al.

Title Page

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

Akinori Cardozo Nagato^a, Frank Silva Bezerra^b, Manuella Lanzetti^a, Alan Aguiar Lopes^a, Marco Aurélio Santos Silva^a, Luís Cristóvão Porto^a, Samuel Santos Valença^c

a) Laboratório de Reparo Tecidual, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil.

b) Laboratório de Imunopatologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Brazil.

c) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding author:

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

Running Title Page: **Hyperoxia-induced lung oxidative response**

ANEXO – Aprovação no Comitê de Ética

Instituto de Ciências Biomédicas – ICB
Universidade Federal do Rio de Janeiro -UFRJ
CCS – Bloco F – sala 14 - Ilha do Fundão – 21941-902 - Rio de Janeiro, RJ
- Tel.: (55 21) 2562-6460

O comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde - CCS possui o parecer favorável para o seguinte projeto:

Projeto: Papel do estresse oxidativo no remodelamento da matriz extracelular em camundongo com fibrose pulmonar.

NUMERO DE APROVAÇÃO: IBCCF 108