



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

Larissa Alexsandra da Silva Neto Trajano

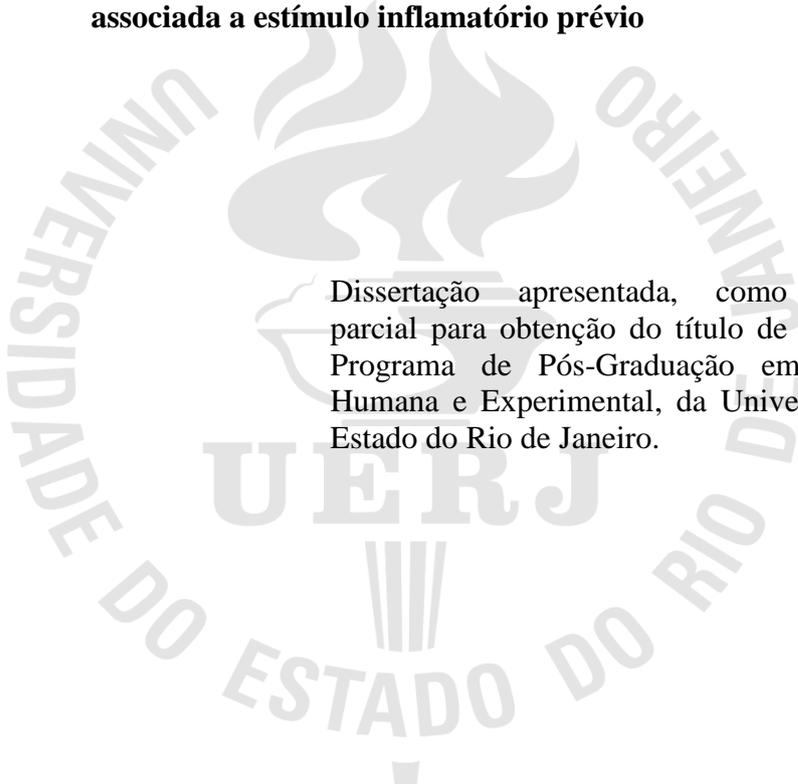
**Influência do desequilíbrio redox e resposta inflamatória na fibrose
pulmonar associada a estímulo inflamatório prévio**

Rio de Janeiro

2013

Larissa Alexsandra da Silva Neto Trajano

**Influência do desequilíbrio redox e resposta inflamatória na fibrose pulmonar
associada a estímulo inflamatório prévio**



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. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto

Coorientador: Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença

Rio de Janeiro

2013

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

T758 Trajano, Larissa Alexsandra da Silva Neto.
Influência do desequilíbrio redox e resposta inflamatória na fibrose pulmonar associada a estímulo inflamatório prévio/ Larissa Alexsandra da Silva Neto Trajano. – 2013.
68 f.

Orientador: Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto
Co-orientador: 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. Fibrose pulmonar – Teses. 2. Estresse oxidativo – Teses. 3. Enfisema pulmonar – Teses. 4. Bleomicina - Teses. 5. Oxirredução.. I. Pôrto, Luís Cristóvão de Moraes Sobrino. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.24

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

Assinatura

Data

Larissa Alexsandra da Silva Neto Trajano

Influência do desequilíbrio redox e resposta inflamatória na fibrose pulmonar associada a estímulo inflamatório prévio

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

Aprovada em 17 de Setembro de 2013.

Coorientador: Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

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

Prof. Dra. Taís Fontoura Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Vicent Lagente
Universidade Rennes

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, que nunca mediu esforços para que eu pudesse realizar os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me amparado nos momentos mais difíceis dessa jornada.

À minha mãe que sempre abdicou dos seus sonhos para que eu pudesse alcançar os meus, sei o quanto foi difícil para ela me ver sair de casa para morar tão longe, mas mesmo assim foi ela que me incentivou sempre a continuar e seguir até o fim. Mãe essa é mais uma conquista nossa. Te amo.

Ao meu marido por ter sido meu companheiro e meu alicerce. Obrigado por não ter me deixado desistir mesmo, por ter segurado minha mão, por ter me compreendido, por ter me ouvido, por ter me ajudado, você foi mais um presente de Deus na minha vida, porque ele sabia que sem você eu não estaria aqui hoje.

Aos meus irmãos Elton e Elvis e ao meu pai pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus amigos-irmãos Marco Aurélio e Jackson que me acolheram de braços abertos quando eu cheguei. Obrigado pela amizade sincera, pelos sorrisos, pelos desabafos, pelo apoio e principalmente pela amizade de vocês, sei que posso contar com vocês sempre.

A minha melhor amiga Bianca porque sei que estive ausente nesses anos, obrigado por me compreender, e por nunca deixar que a distância destruísse a nossa amizade que continua forte e sincera, já são 8 anos que tive o prazer de conhecer essa pessoa tão maravilhosa, ainda bem que você mudou de escola. Sinto muito sua falta.

A pessoa que iniciou tudo: Fabiano. Lembro-me de uma vez em que eu estava conversando com você e você me disse: “continua firme porque no final a sua vitória vai ser ainda maior”. Muito obrigado pela oportunidade, por ter visto em mim qualidades que nem eu podia ver. Você para mim é um grande exemplo de professor e líder.

Ao professor Cristóvão pela oportunidade, pela orientação, pela compreensão. Eu aprendi muito nesses dois anos e principalmente nesses últimos dias. Obrigado.

Ao professor Samuel pela oportunidade e a toda equipe do LABCOM.

As professoras Andréia e Bruna e à equipe do LRT que me acolheram nessa mudança de laboratório.

É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.

Theodore Roosevelt

RESUMO

TRAJANO, Larissa Alexsandra da Silva Neto. **Influência do desequilíbrio redox e resposta inflamatória na fibrose pulmonar associada a estímulo inflamatório prévio**. 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental)- Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A fibrose pulmonar é uma doença pulmonar crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de matriz extracelular (MEC) e um remodelamento na arquitetura pulmonar. Embora já se saiba da participação do estresse oxidativo e da inflamação na fibrose de forma isolada, é importante observar como se comporta o estresse oxidativo na fibrose quando esta ocorre associada a uma doença de base. O presente estudo teve como objetivo investigar o perfil inflamatório e oxidativo na fibrose pulmonar associado ao enfisema pulmonar prévio. Camundongos C57BL/6 foram divididos em três grupos: grupo controle (n=5) que receberam salina intranasal (50 µl) e foram sacrificados no 21º dia; grupo bleomicina (BLEO) (n=15) que receberam bleomicina intratraqueal (0.1 U/animal) no dia 0 e foram sacrificados nos 7º (n=5), 14º (n=5) e 21º (n=5) dias e grupo PPE (elastase) + BLEO (n=21) que receberam elastase (3U/animal) e após 14 dias receberam bleomicina e foram sacrificados nos 14º(n=7), 21º (n=7), 28º (n=7) e 35º (n=7) dias. Foram realizadas análises histológicas através de H&E e picro-sirius; análises bioquímicas para superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione-S-transferase (GST) e ELISA para Interleucina (IL)-1β e IL-6. A fibrose pulmonar ocorreu a partir do 14º dia (p<0.001) e o enfisema concomitante a fibrose pulmonar a partir do 28º dia (p<0.001) e um aumento de fibras colágenas no grupo BLEO 21(p<0.001) e PPE + BLEO 21(p<0.001). As enzimas antioxidantes CAT (p<0.01), SOD (p<0.01) e GPx (p<0.01) reduziram e a GST aumentou no grupo BLEO 21 dias (p<0.05). No grupo PPE + BLEO 21 dias houve redução das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx (p<0.05) e GST. Os níveis de óxido foram altos nos grupos BLEO 21 dias (p<0.01) e PPE + BLEO 21 dias (p<0.01). A IL-1β mostrou-se elevada no grupo BLEO 7 dias quando comparado ao controle (p<0.001) e ao grupo PPE + BLEO 7 dias (p<0.01). Concluímos que a resposta inflamatória inibiu a ação do sistema antioxidante contribuindo para o agravamento da lesão. Isso sugere que terapias anti-inflamatórias podem contribuir tanto para redução da resposta inflamatória quanto de forma indireta no sistema antioxidante.

Palavras-chave: Fibrose pulmonar. Enfisema pulmonar. Bleomicina. Elastase. Estresse oxidativo. Perfil inflamatório.

ABSTRACT

TRAJANO, Larissa Alexsandra da Silva Neto. **Influence of redox imbalance and inflammatory response in pulmonary fibrosis associated with inflammatory stimuli.** 2013. 68 p. Dissertation (Master in Human and Experimental Biology) - Institute of Biology Roberto Alcantara Gomes, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Pulmonary fibrosis (PF) is a chronic lung disease characterized by excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) and remodeling in the lung architecture. Although it is already known the role of oxidative stress and inflammation in the isolated pulmonary fibrosis, it is important to observe how it behaves oxidative stress in pulmonary fibrosis when it occurs associated with an underlying disease. The present study aimed to investigate the inflammatory status and oxidative pulmonary fibrosis associated with pulmonary emphysema prior. C57BL / 6 mice were divided into three groups: control group (n = 5) who received intranasal saline (50µl) and were sacrificed at 21 days, bleomycin (BLEO) group (n=15) who received intratracheal bleomycin (0.1U/animal) in the day 0 and were sacrificed at 7 (n=5), 14 (n=5) and 21 (n=5) days and the PPE + BLEO group (n=21) received elastase (PPE)(3U/animals) and 14 days after receiving bleomycin and were sacrificed at 14 (n = 7), 21 (n = 7) 28 ° (n = 7) and 35 (n = 7) days. Histological analysis was achieved using H&E and Sirius red staining; biochemical analysis for superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST) and ELISA for IL-1β and IL-6 were conducted. Pulmonary fibrosis occurred from day 14 (p<0.001) emphysema and pulmonary fibrosis from day 28 (p <0.001) and occurred an increase of collagen fibers in the BLEO group 21days (p<0.001) and PPE + BLEO 21days (p <0.001). Antioxidant enzymes CAT (p <0.01), SOD (p <0.01), and GPx (p <0.01) were reduced and GST increased in the BLEO group 21 days (p<0,05). In the PPE + BLEO group 21 days occurred an decreased antioxidant enzymes CAT, SOD, GPx (p <0.05), and GST. Oxide levels were higher in the BLEO groups 21 days (p <0.01), and PPE + BLEO group 21 days (p <0:01). IL-1β was elevated in the group BLEO 7 days when compared to control (p <0.001) and the PPE + BLEO group 7 days (p<0.01). The inflammatory response inhibited the action of the antioxidant system contributes to the aggravation of the injury. This suggests that anti-inflammatory therapies may contribute to reducing the inflammatory response as indirectly to the antioxidant system.

Keywords: Pulmonary fibrosis. Pulmonary emphysema. Bleomycin. Elastase. Oxidative Stress. Inflammatory profile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema mostrando como distúrbios na cicatrização normal de lesões contribuem para o desenvolvimento da fibrose pulmonar.....	15
Figura 2 -	Esquema dos eventos que desencadeiam a fibrose pulmonar.....	16
Figura 3 -	Esquema mostrando a formação da bleomicina ativada e a clivagem do DNA.....	18
Figura 4 -	Resumo dos eventos que ocorrem após a instilação de bleomicina.....	20
Figura 5 -	Esquema mostrando a maturação de IL-1 β e IL-1 α	22
Figura 6 -	Vias de formação de ROS.....	24
Figura 7 -	Esquema mostrando a ação das enzimas.....	26
Figura 8 -	Esquema ilustrativo do enfisema pulmonar.....	29
Figura 9 -	Descrição dos eventos experimentais por grupo.....	34
Figura10 -	Fotomicrografia de pulmão corado com Hematoxilina e Eosina.....	38
Figura11 -	Fotomicrografia de pulmão corado com Hematoxilina e Eosina.....	39
Figura12 -	Fotomicrografia das alterações dos septos alveolares em Hematoxilina e Eosina.....	40
Figura13 -	Fotomicrografia de pulmão corados com vermelho de Sírius ácido picrico.....	41
Figura14 -	Análise das fibras colágenas.....	42
Figura15 -	Esquema mostrando o que ocorre no pulmão nos grupos BLEO e PPE + BLEO.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela1 -	Análise estereológica do parênquima pulmonar do grupo bleomicina e do grupo PPE + BLEO.....	43
Tabela 2 -	Análise bioquímica da fibrose pulmonar.....	44
Tabela 3 -	Análise das interleucinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ARE	Elemento de resposta antioxidante
BLEO	Bleomicina
CAT	Catalase
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EC-SOD	Superóxido dismutase extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Especie reativas de Nitrogênio
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
GST	Glutationa-S-Transferase
H&E	Hematoxilina e eosina
IL-1	Interleucina-1
LBA	Lavado Broncoalveolar
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteases
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato
NFκB	Fator nuclear kappa B
Nrf2	Fator de transcrição nuclear relacionado à eritróide 2
ON	Óxido nítrico
PPE + BLEO	Elastase + bleomicina
SOD	Superóxido dismutase
TGF-β	Fator de crescimento tumoral-β

LISTA DE SÍMBOLOS

B	Beta
α	Alfa
%	Porcentagem
\pm	Mais ou menos
<	Menor
Fe^{2+}	Ferro
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
OH^-	Radical hidroxila
O_2^-	Ânion superóxido
ONOO_-	Peróxido de nitrito

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1	Fibrose pulmonar	15
1.2	Epidemiologia	17
1.3	Bleomicina	17
1.3.1	<u>Modelo animal de fibrose pulmonar</u>	18
1.3.2	<u>Bleomicina x inflamação</u>	19
1.3.3	<u>Bleomicina x estresse oxidativo</u>	20
1.4	Fibrose x inflamação	21
1.5	Estresse oxidativo	23
1.5.1	<u>Radicais livres</u>	23
1.5.2	<u>Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio</u>	23
1.5.3	<u>Antioxidantes</u>	25
1.6	Fibrose x estresse oxidativo	27
1.7	Enfisema pulmonar	28
1.7.1	<u>Modelos de enfisema pulmonar</u>	30
2	OBJETIVOS	32
2.2	Objetivo geral	32
2.3	Objetivos específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Animais	33
3.2	Modelo de fibrose com doença inflamatória prévia	33
3.3	Lavado Broncoalveolar	34
3.4	Histologia e análise estereológica	34
3.5	Homogeneizado tecidual	35
3.6	Ensaio bioquímico das enzimas antioxidantes	35
3.7	Ensaio para quantificação de nitrito no LBA	36
3.8	Dosagem de IL-1β e IL-6	36
3.9	Análise estatística	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Bleomicina induz fibrose em camundongos C57BL/6	38

4.2	Análises morfométricas.....	42
4.3	Marcadores de desequilíbrio redox e níveis de nitrito.....	43
4.4	Análise de IL-1β e IL-6.....	44
5	DISCUSSÃO.....	46
5.1	Desenvolvimento de fibrose no enfisema induzido por elastase.....	51
	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56
	ANEXO A - Comitê de ética em pesquisa.....	66
	ANEXO B - Apresentação em congresso.....	67
	ANEXO C - Submissão do artigo.....	68

INTRODUÇÃO

A fibrose pulmonar é uma doença pulmonar crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de matriz extracelular (MEC) e um remodelamento na arquitetura pulmonar. Isso ocorre devido a distúrbios no equilíbrio entre a proliferação e a apoptose de fibroblastos e o acúmulo e a degradação de MEC. Estima-se que ocorra de 6,8 a 16,3 casos de fibrose pulmonar para cada 100.000 pessoas. A fibrose pulmonar é mais prevalente entre homens mais velhos com mais de 60 anos. A taxa de mortalidade tem aumentado nos últimos anos, estima-se que ocorreram aproximadamente 50,8 mortes por milhão de pessoas entre os anos 1992 e 2003. Embora já se saiba da participação do estresse oxidativo e da inflamação na fibrose de forma isolada, é importante observar como se comporta o estresse oxidativo na fibrose quando esta ocorre associada a uma doença de base, justo que pacientes que irão desenvolver fibrose geralmente apresentam uma doença de base com características inflamatórias associadas (WHITE; MANTOVANI, 2013).

A bleomicina é uma droga que leva à fibrose pulmonar, sendo um dos modelos animais mais utilizados atualmente. A administração de bleomicina em animais causa alterações semelhantes às aquelas observadas em humanos com fibrose pulmonar, induzindo uma inflamação pulmonar seguida por aumento de MEC comprometendo a arquitetura pulmonar (POTTIER; et al, 2007).

A fibrose pulmonar geralmente ocorre associada a doenças inflamatórias prévias, como o enfisema pulmonar. O enfisema é caracterizado por uma destruição irreversível da arquitetura alveolar com alargamento dos espaços aéreos distais (MEINEL; et al, 2013). O uso da elastase para induzir enfisema tem sido amplamente utilizado devido ao seu baixo custo, uma vez que uma única dose pode resultar rapidamente em características morfológicas e histológicas compatíveis com o enfisema pulmonar (ANTUNES; ROCCO, 2011).

Desta forma, torna-se importante estudar a fibrose pulmonar associada a uma doença inflamatória prévia, neste caso o enfisema pulmonar, e observar as principais alterações histológicas, o perfil inflamatório e oxidativo.

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

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Fibrose pulmonar

A fibrose pulmonar é caracterizada por um dano epitelial persistente sem que haja reparo, pela proliferação e acúmulo de fibroblastos e miofibroblastos e aumento na deposição de colágeno (TANAKA; et al, 2013).

O reparo tecidual acontece em quatro fases distintas, incluindo a fase de coagulação, a fase inflamatória, a fase de proliferação/migração de miofibroblastos e uma fase final de remodelamento em que a arquitetura tecidual normal é restaurada, quando o organismo não consegue restaurar o tecido ocorre a fibrose pulmonar com excesso de MEC (WYNN, 2011) (Figura 1).

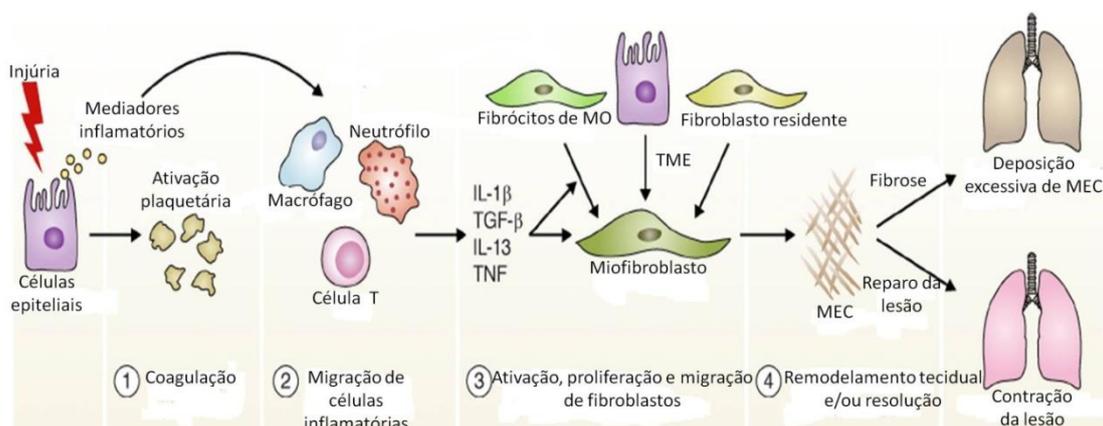


Figura 1- Esquema mostrando como distúrbios na cicatrização normal de lesões contribuem para o desenvolvimento da fibrose pulmonar. O reparo tecidual normal é dividido em fase de coagulação (1), fase de migração de células inflamatórias (2), fase de ativação, proliferação e migração de fibroblastos (3), e um remodelamento tecidual e fase de resolução. Após a lesão pulmonar, células epiteliais recrutam mediadores inflamatórios que iniciam uma cascata de coagulação antifibrinolítica, com ativação plaquetária seguido do recrutamento de leucócitos, neutrófilos, macrófagos e células T. O recrutamento de neutrófilos secreta citocinas pró-fibróticas tais como IL-1, TNF, IL-13 e TGF- β . A ativação de macrófagos e neutrófilos também remove células mortas e alguns organismos invasores. Em sequência, fibrócitos da medula óssea e fibroblastos residentes se diferenciam em miofibroblastos. Na fase final e na fase de resolução, miofibroblastos ativados podem promover reparo tecidual, levando a contração da lesão e a restauração de vasos sanguíneos. Entretanto, quando há fibrose pulmonar esses estágios de reparo tecidual normal estão desregulados há um aumento de MEC levando estímulos danosos persistentes no pulmão. Adaptado de Wynn 2011.

A fibrose ocorre quando há um dano nos tecidos e as respostas normais de cicatrização persistem ou tornam-se desreguladas, normalmente em resposta a algum tipo de lesão repetitiva ou muito extensa. Apesar de ter características etiológicas e clínicas distintas, as doenças fibróticas crônicas apresentam uma irritação persistente, que sustenta a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas fibrogênicas, que estimulam a deposição de componentes da MEC que modelam os tecidos progressivamente. Embora as lesões mecânicas e mudanças estruturais contribuam para a fibrose patológica grande parte das doenças fibróticas resultam de exposição crônica a toxinas, irritantes, complexos imunes ou infecções persistentes (DUFFIELD; et al, 2013).

Alterações no microambiente alveolar do pulmão levam a um reparo desregulado e a um remodelamento tecidual anormal característico da fibrose pulmonar. Essas alterações incluem um desequilíbrio de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento, e aumentam o estresse oxidativo contribuindo para uma desregulação na homeostase do tecido (Figura 2), tais alterações no microambiente alveolar favorecem a perda de células epiteliais e no acúmulo de fibroblastos e de miofibroblastos, levando à fibrose progressiva (THANNICKAL; et al, 2004).

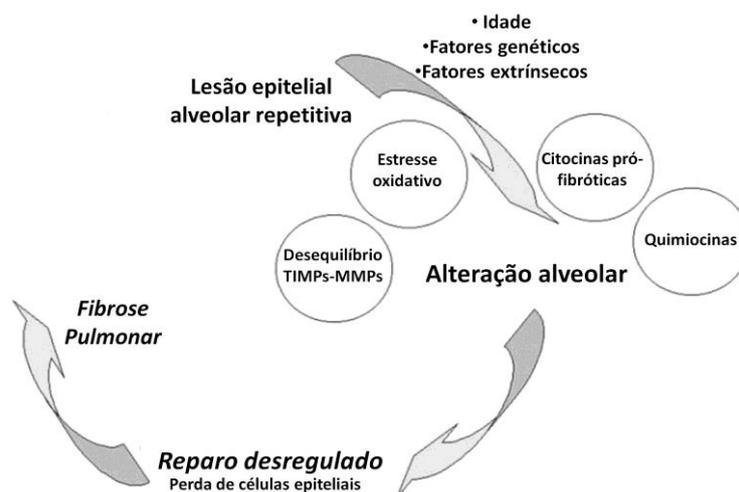


Figura 2 - Esquema dos eventos que desencadeiam a fibrose pulmonar. Lesões epiteliais repetitivas causadas pela idade, por fatores genéticos e fatores extrínsecos levam ao estresse oxidativo, ao desequilíbrio entre os inibidores teciduais de metaloproteases e as metaloproteases e a elevação dos níveis de quimiocinas e citocinas pró-fibróticas, levando a alterações alveolares. Essas alterações causam um reparo desregulado com perda de células epiteliais que levam à fibrose pulmonar. Adaptado de Thannickal et al. 2004.

1.2 Epidemiologia

Estima-se que ocorra de 6,8 a 16,3 casos de fibrose para cada 100.000 pessoas. A fibrose pulmonar é mais prevalente entre homens mais velhos com mais de 60 anos. A taxa de mortalidade associada à fibrose tem aumentado nos últimos anos, estima-se que ocorreram aproximadamente 50,8 mortes por milhão de pessoas entre os anos 1992 e 2003. Se esses números estiverem corretos, 40.000 pessoas morrem de fibrose pulmonar a cada ano apenas nos Estados Unidos, o que é compatível às taxas atribuídas ao câncer de mama (ZOLAK; DE ANDRADE, 2012). Estimativas recentes sugerem que doenças inflamatórias e fibróticas crônicas são responsáveis por um gasto anual de 142.000 milhões dólares anualmente nos Estados Unidos (WHITE; MANTOVANI, 2013).

Um estudo recente realizado em maio de 2012 estimou que a prevalência de fibrose na União Europeia é de 26 para cada 100 mil habitantes. Estudos retrospectivos mostram que após o diagnóstico a média de sobrevida é de 2 a 3 anos, entretanto o curso da fibrose pulmonar é variável, com alguns pacientes com longos períodos de estabilidade e outros com exarcebações e rápidos declínios (RAFII; et al, 2013).

1.3 Bleomicina

A bleomicina faz parte de uma família de glicopeptídeos isolado pela primeira vez a partir de *Streptomyces verticillus* em 1966. Desde a sua descoberta a bleomicina tem sido um componente importante no tratamento de câncer de testículo e de certos tipos de linfoma, seu efeito colateral é a fibrose pulmonar (POTTIER; et al, 2007). Para ser ativada a bleomicina necessita de um metal de transição reduzido (Fe (II) ou Cu (I)), de oxigênio e de um elétron reduzido, uma vez ativada a bleomicina causa oxidação de lipídeos, hidrólise da ligação amida de proteínas, bem como inicia eventos de clivagem específicas de sequências de RNA e DNA e se decompõe formando radical hidróxido que age rapidamente de forma inespecífica com qualquer molécula que encontra (CHEN; STUBBE, 2005) (Figura 3).

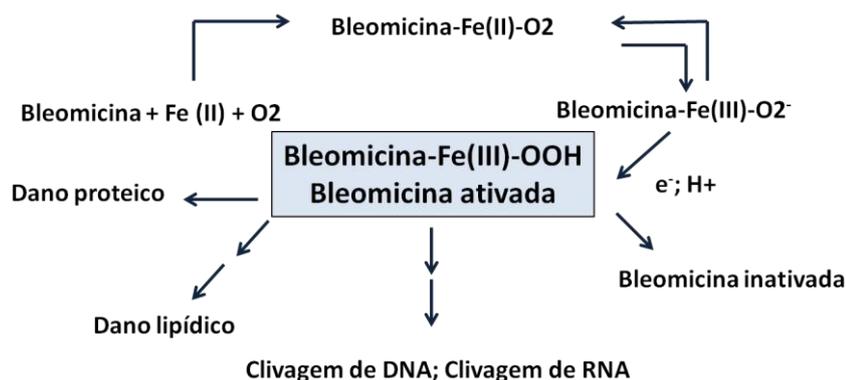


Figura 3 - Esquema mostrando a formação da bleomicina ativada. A bleomicina ativada é formada através da sua ligação com ferro, seguido da ligação com o oxigênio e uma redução por um agente redutor, formando um composto intermediário (caixa azul) que tem uma pequena vida útil de alguns minutos sendo responsável pelo dano proteico, lipídico e do dano ao DNA. Adaptado de Chen e Stubbe 2005.

A incidência da toxicidade da bleomicina levando a fibrose pulmonar é variável, mas acredita-se que acomete cerca de 10% dos pacientes, com ocorrência de morte em 1 a 2% de pacientes que desenvolvem a fibrose pulmonar. Essa incidência aumenta em crianças tratadas com bleomicina em que 70% demonstram restrição significativa da função pulmonar. A fibrose pulmonar induzida pelo uso da bleomicina ocorre geralmente meses após a conclusão da terapia. Não é possível estimar quais pacientes poderão desenvolver fibrose após o tratamento. A patogênese envolve a liberação de fatores quimiotáticos de macrófagos alveolares por linfócitos e leucócitos polimorfonucleares. Os fatores de risco incluem idade avançada, administração intravenosa, combinação da bleomicina com outros agentes e a dose, além disso, tratamentos com radiação anteriores, concomitantes ou subsequentes podem potencializar a lesão (ABID; MALHOTRA; PERRY, 2001).

1.3.1 Modelo animal de fibrose pulmonar

A bleomicina é uma droga que leva à fibrose pulmonar, sendo um dos modelos animais mais utilizados atualmente. A administração de bleomicina em animais causa alterações semelhantes àsquelas observadas em humanos com fibrose pulmonar,

induzindo uma inflamação pulmonar seguida por aumento de MEC comprometendo a arquitetura pulmonar (POTTIER; et al, 2007).

A dose de bleomicina utilizada nos modelos animais de fibrose pulmonar apresenta muitas variações que pode ser única ou repetida e de administração que pode ser intravenosa, intraperitoneal, intratraqueal ou subcutânea. A forma de administração mais comum é a intratraqueal que geralmente é utilizada quando se deseja obter uma resposta inflamatória e um aumento de apoptose epitelial que ocorrem nos primeiros sete dias, essas alterações são seguidas por um período de transição de três dias em que a inflamação é resolvida. A partir disso começam a ocorrer alterações fibróticas que persistem entre a terceira e quarta semana após a instilação de bleomicina e caracterizadas por uma excessiva deposição de matriz extracelular, em focos, o desenvolvimento de fibrose neste modelo pode ser visto a partir do 14º dia. Entretanto, após esse período há estudos que afirmam que há uma resolução espontânea da fibrose e um retorno do pulmão a um estado quase fisiológico com fibrose mínima após 28 dias, ao contrário do que ocorre em pacientes cuja lesão é irreversível (MOELLER; et al, 2008; MOURATIS; AIDINIS, 2011; MAHER, 2012).

As principais vantagens do uso da bleomicina em modelo animal é que é o mais bem caracterizado, apresenta aproximação da clínica, e o tempo de desenvolvimento da fibrose ocorre entre 14 e 28 dias. Entre as desvantagens está a regressão da fibrose após 28 dias, a estirpe *Mus musculus* (Balb/c) é resistente à ação da bleomicina e o seu preço (MOORE; HOGABOAM, 2008).

1.3.2 Bleomicina X inflamação

A bleomicina provoca reações inflamatórias e fibróticas dentro de um curto espaço de tempo principalmente após instilação intratraqueal. Ocorre um aumento inicial das citocinas pró-inflamatórias (Interleucina-1, fator de necrose tumoral- α , interleucina-6 e interferon- γ), esse aumento inicial é seguido por um aumento na expressão de marcadores pro-fibróticos (fator de crescimento transformante- β 1, fibronectina e pró-colágeno-1) com pico por volta do 14º dia (HIRATA; et al, 2008). Em modelos murinos de fibrose por bleomicina o animal C57BL/6 é o animal que tem

uma melhor resposta desenvolvendo fibrose pulmonar semelhante à fibrose pulmonar observada em humanos. O modelo animal de fibrose pulmonar induzido por bleomicina tem contribuído para elucidar o papel de citocinas, fatores de crescimento e vias de sinalização na fibrose pulmonar (MOELLER; et al, 2008).

1.3.3 Bleomicina x estresse oxidativo

Uma das características do modelo de fibrose induzido por bleomicina é a liberação de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxila ($\bullet OH$), óxido nítrico (ON) e H_2O_2 desempenhando um papel central na patogênese da lesão nesse modelo (MACNEE; RAHMAN, 1995).

A instilação de bleomicina gera um desequilíbrio redox aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio, as EROs degradam a MEC causando um remodelamento. Os fragmentos produzidos pela MEC conduzem ao recrutamento de células inflamatórias para o local aumentando ainda mais a produção de EROs. Enquanto isso a inflamação persistente desencadeia o processo fibrogênico (GAO; et al, 2008) (Figura 4).

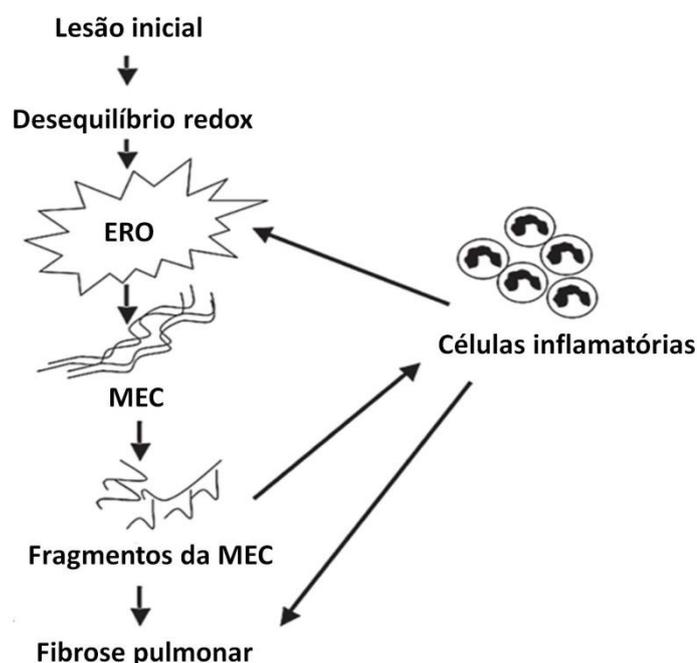


Figura 4 - Resumo dos eventos que ocorrem após a instilação de bleomicina. A administração de bleomicina leva a um desequilíbrio redox aumentando as espécies reativas de oxigênio (ERO), o aumento de ERO causa danos a matriz extracelular (MEC), causando um remodelamento da matriz. Os fragmentos da matriz recrutam células inflamatórias que leva ao aumento de ERO. Essa inflamação persistente e as ERO causam a fibrose pulmonar. Adaptado de Gao, Kinnula et al. 2008.

1.4 Fibrose x inflamação

Entre as décadas de 1970 e 1980 a fibrose pulmonar era descrita como uma doença inflamatória baseada na observação de que células inflamatórias (principalmente macrófagos e neutrófilos) tinham seus níveis elevados em lavado broncoalveolar de pacientes com fibrose pulmonar comparado a indivíduos saudáveis. Naquela época pensava-se que a fibrose pulmonar era consequência da inflamação causada por insultos exógenos (REYNOLDS, 2005).

Nos últimos anos essa versão da teoria inflamatória tem caído em desuso, isso porque se observou que a inflamação é relativamente leve em porções não fibróticas dos pulmões com fibrose pulmonar, mesmo na fase inicial, ou seja, histologicamente a inflamação observada inicialmente parece com aquela observada em uma fase mais tardia. Há também uma falta de correlação entre marcadores inflamatórios convencionais com a progressão da doença, falha de agentes imunossupressores convencionais que afetam o indivíduo doente e uma inconsistência entre a resposta imunossupressora em modelo animal. Com isso, muitos autores propuseram que a inflamação é uma característica secundária da doença, sendo causas principais a lesão epitelial recorrente e a cicatrização excessiva (HOMER; et al, 2011).

Entretanto outros autores defendem que embora a inflamação não tenha uma grande importância na progressão da doença, ela desempenha um papel mais importante em uma fase mais precoce da doença (GOGALI; WELLS, 2010).

Uma explicação para a ausência de inflamação no processo da fibrose pulmonar é que as respostas teciduais tem se “desligado” das respostas inflamatórias clássicas, mas persistem em um estado de reparo crônico. A natureza do agente etiológico e a lesão tecidual resultante podem ditar o grau de inflamação e de reparo. Além disso, a persistência ou reincidência da lesão podem alterar o microambiente tecidual, assim, lesões persistentes ou recorrentes em um processo de reparo crônico podem ser suficientes para atenuar a resposta inflamatória clássica (LAWRENCE; et al, 2001).

A interleucina-1 (IL-1) é uma das principais citocinas envolvidas na iniciação e na persistência da inflamação. A IL-1 se subdivide em dois polipeptídeos, IL-1 α e IL-1 β que são produtos de genes diferentes, são sintetizadas como proteínas de 31 kDa (pró- IL-1 α e pró-IL-1 β). A pró-IL-1 β é clivado pela enzima conversora de IL-1 β ou caspase-1 para gerar a IL-1 β de 17-kDa madura. Diversas vias de sinalização regulam um aumento na transcrição de pró-IL-1 β incluindo a própria IL-1 β , o fator de necrose tumoral- α e ligantes do receptor Toll-like tais como lipopolissacarídeo. Em contraste, a pró-IL-1 α é uma citocina ligada à célula e acredita-se que funciona como um mensageiro autócrino, pode ser clivada pela protease calpaína e é encontrada na circulação ou em fluidos biológicos corporais em casos de doenças graves e acredita-se que é gerada pelas células lisadas e clivadas por protease extracelular (BRADDOCK; QUINN, 2004) (Figura 5). Os monócitos-macrófagos são uma fonte primária de IL-1, mas também é produzida por outras células incluindo fibroblastos, células T, neutrófilos e células epiteliais alveolares (CHUNG, 2001). Mediadores pró-inflamatórios como a IL-1 β são conhecidos promotores de fibrose (BARLO; et al, 2011).

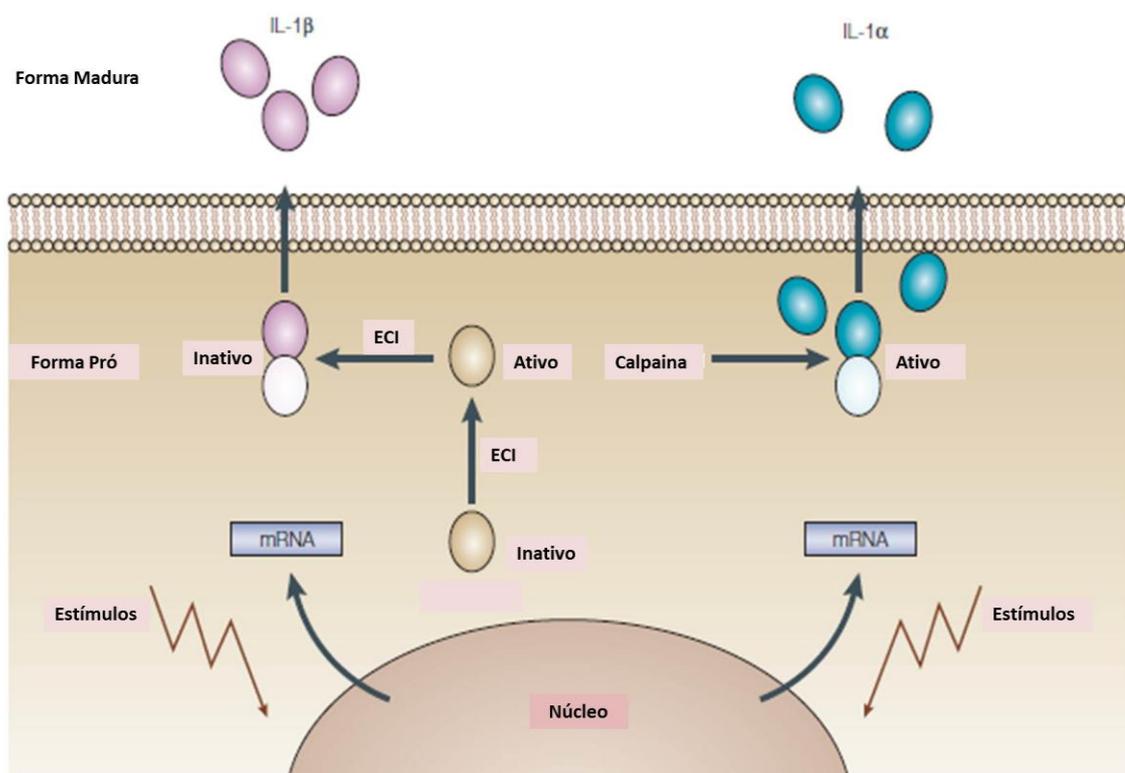


Figura 5 - Esquema mostrando a maturação de IL-1 β e IL-1 α . O estímulo nas células produz a enzima conversora de IL-1 β inativa (ECI) que, quando ativada cliva a pró-IL-1 β que é liberada através da membrana celular de forma madura ativada. A protease Calpaína cliva a da pró- IL-1 α estimulando a liberação de IL-1 α maduro através da membrana celular. Adaptado de Braddock e Quinn 2004.

A IL-6 é conhecida como mediadora de muitos processos inflamatórios no pulmão e o recrutamento desregulado de mediadores inflamatórios tem contribuído para a patogênese de vários distúrbios respiratórios (RINCON; IRVIN, 2012). Um estudo que avaliou os efeitos de camundongos deficientes para IL-6 na fase aguda após a administração intratraqueal de bleomicina observou que a deficiência de IL-6 atenua o acúmulo de células inflamatórias e alterações fibróticas subsequentes, além disso, reduz a expressão de TGF- β que é um importante marcador de fibrose pulmonar (SAITO; et al, 2008).

1.5 Estresse oxidativo

1.5.1 Radicais livres

A importância dos radicais livres em sistemas biológicos começou a ser explorado em 1957 por Denham Harman, que propôs que os radicais livres tem um importante papel no processo de envelhecimento. Esse trabalho desencadeou uma intensa investigação dos radicais livres em sistemas biológicos. Posteriormente, foi descoberta a superóxido dismutase (SOD) e o $\bullet\text{OH}$ fornecendo evidências da importância dos radicais livres em seres vivos (VALKO; et al, 2007). Os radicais livres derivados do oxigênio são denominados espécies reativas de oxigênio e representam a classe mais importante de espécies de radicais gerados em sistemas vivos (VALKO; et al, 2007).

1.5.2 Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio

As EROs bem como as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são produtos do metabolismo celular normal. As EROs e ERNs são conhecidos por desempenhar um

papel duplo podendo ter ações tanto benéficas quanto deletérias para os sistemas vivos. Os efeitos benéficos das EROs ocorrem em concentrações de baixas a moderadas e envolvem funções fisiológicas como, por exemplo, na defesa contra agentes infecciosos e na indução de uma resposta miogênica (DOMEJ; et al, 2006).

As EROs podem ser produzidas de forma endógena por reações metabólicas ou ter origem exógena, tais como poluentes do ar ou por fumaça de cigarro. Transportados pelo ar esses poluentes podem resultar em dano direto bem como na ativação de resposta inflamatória nos pulmões. A ativação de células inflamatórias gera O_2^- que pode reagir com o ON para formar a molécula reativa de H_2O_2 ou ser convertido em H_2O_2 sob ação da enzima SOD. O H_2O_2 resulta na produção não enzimática do radical mais prejudicial, o radical $\bullet OH$ na presença de ferro (Fe^{2+}), através da reação de Fenton (Figura 6). As EROs podem ser geradas de maneira intracelular através de diversos mecanismos envolvendo respiração mitocondrial, bem como a xantina/xantina oxidase e pelo sistema nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH). Este último representa a geração primária de EROs, localizado principalmente em fagócitos e células epiteliais (KIRKHAM; RAHMAN, 2006).

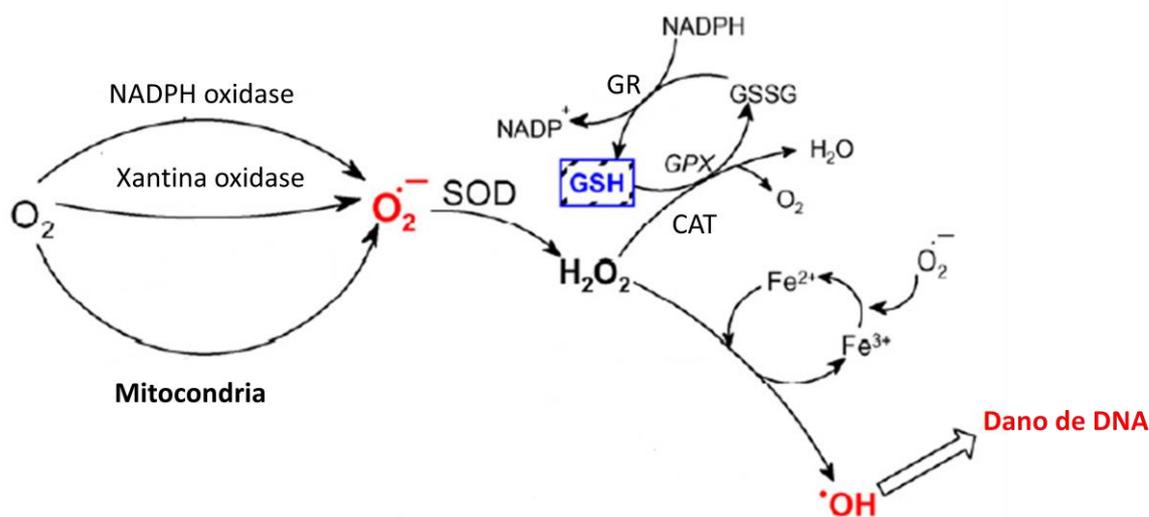


Figura 6 - Vias de formação de ROS. O ânion superóxido (O_2^-) é um radical formado pelo processo de redução do oxigênio mediada pela enzima NADPH oxidase e xantina oxidase. O radical superóxido é dismutado pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 pode ser eliminado pela glutatona peroxidase (GPx) e pela catalase (CAT) que requer a glutatona reduzida (GSH) como doadora de elétrons. A glutatona oxidada (GSSG) é reduzida novamente a GSH pela enzima glutatona redutase (GR) que usa a NADPH como doadora de elétrons. Alguns metais de transição (por exemplo, Fe^{2+} , Cu^{+} e outros) podem quebrar o peróxido de hidrogênio através da reação de Fenton e formar o radical hidroxila ($\bullet OH$) que causa dano no DNA. Adaptado de Valko et al 2007.

Algumas das EROs são altamente reativas, e quando geradas perto de membranas celulares, oxidam os fosfolipídios dessas membranas levando ao processo de peroxidação lipídica. Produtos da peroxidação lipídica, que geralmente são considerados instáveis, prejudicam a função da membrana, inativam receptores ligados à membrana e aumentam a permeabilidade do tecido. Essas ações levam a diferentes lesões pulmonares, tais como danos nos tecidos, além de ativação e proliferação celular (JANSSEN; CATALI; HELLI, 2005).

As EROs inativam proteases e antiproteases induzindo a apoptose, regulam a proliferação celular e modulam o sistema imune no pulmão. No nível molecular, o aumento de EROs implica em respostas inflamatórias através da ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NFκB) e ativador de proteína-1, transdução de sinais, remodelação de cromatina e expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios. A produção intracelular de EROs e as respectivas mudanças no estado redox intracelular são cruciais uma vez que este procedimento controla a expressão de vários genes para diferentes mediadores pró-inflamatórios (RAHMAN; MACNEE, 1998).

As ERNs são moléculas oxidantes que podem regular a sobrevivência das células. O ON é um vasodilatador com muitos efeitos bioquímicos produzidos através da ativação da ON sintase. ERN, além de nitrito, nitrato e peroxinitrito são gerados como produto do metabolismo do ON (BARGAGLI; et al, 2009).

1.5.3 Antioxidantes

Para proporcionar uma defesa contra a constante carga oxidativa, os pulmões produzem vários agentes endógenos denominados de antioxidantes. As espécies antioxidantes ajudam os pulmões a afastar as consequências deletérias de uma grande variedade de oxidantes/EROs e ERNs, seja de origem endógena ou ambiental. Os principais antioxidantes não enzimáticos dos pulmões são a glutatona, vitaminas C e E, ácido úrico, betacaroteno, enquanto que os mais importantes antioxidantes enzimáticos são a SOD, CAT e as peroxidases (LOUKIDES; BAKAKOS; KOSTIKAS, 2011).

Os antioxidantes se dividem em antioxidantes de fase I e de fase II. Os antioxidantes de fase I (SOD, CAT e GPx) são as primeiras linhas de defesa antioxidante. Conhecimentos mais recentes sobre a química redox celular revelaram a presença de certas proteínas especializadas, tais como, peroxiredoxinas, tireoredoxinas, glutaredoxinas, heme-oxigenase e redutases que estão envolvidas na adaptação celular contra a agressão oxidativa. Essas moléculas exercem sua ação em um nível mais sutil no processo de sinalização celular. Como o estresse oxidativo provoca um aumento da expressão de vários genes inflamatórios através da ativação de fatores de transcrição, o sistema antioxidante responde com a ativação de genes antioxidantes (REDDY, 2008).

A SOD catalisa a conversão de $O_2^{\cdot-}$ em oxigênio e H_2O_2 . O H_2O_2 é reduzido pela CAT ou pela GPx. A CAT foi a primeira enzima antioxidante conhecida que tem a função de converter H_2O_2 para água e oxigênio no interior da membrana da célula. A GPx é uma enzima antioxidante que contém selênio e glutathione. É encontrada no citoplasma e nas mitocôndrias. A GPx retira o oxigênio do H_2O_2 e produz glutathione oxidada e água. Numa outra reação a glutathione oxidada é reduzida de volta para glutathione. Todo esse sistema regenera a glutathione que pode ser utilizada repetidas vezes (Figura 7) (REPINE; BAST; LANKHORST, 1997; GOODYEAR-BRUCH; PIERCE, 2002).

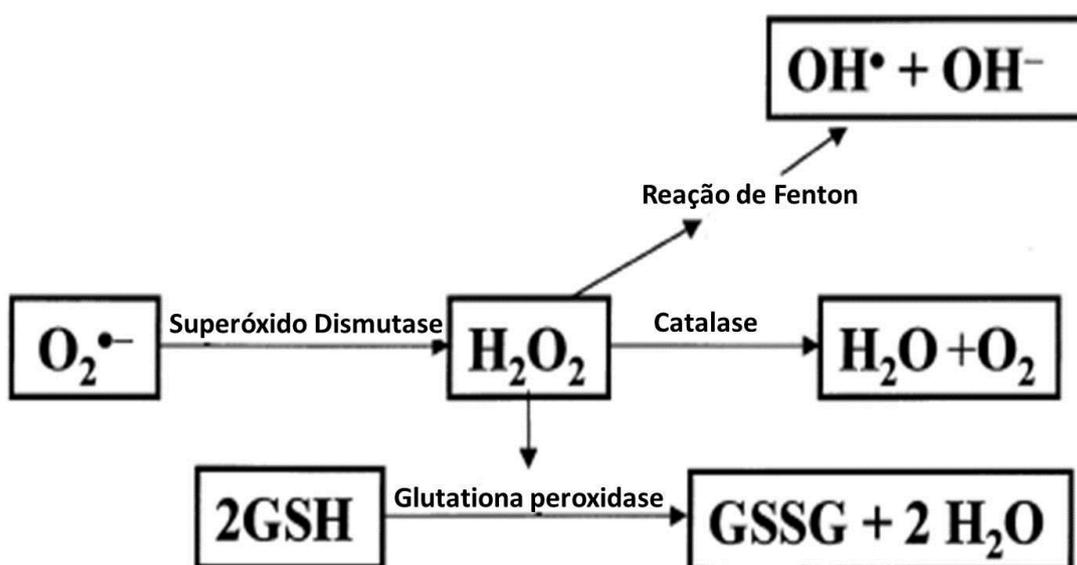


Figura 7 - Esquema mostrando a ação das enzimas antioxidantes. As enzimas antioxidantes irão agir quando espécies reativas de oxigênio forem formadas, a SOD irá reduzir o $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 , que sofrerá a ação da CAT e da GPx formando água evitando que na presença de ferro ocorra a formação de $\cdot OH$ que é o radical que causa mais danos ao tecido. Desta forma as enzimas antioxidantes protegem o tecido contra peroxidação lipídica, danos às proteínas e ao DNA, adaptado de Goodyear-Bruch and Pierce 2002

Além dos antioxidantes de fase I existem os antioxidantes de fase II que tem atuação em um nível mais tardio no processo de proteção. O fator de transcrição nuclear relacionado à eritróide 2 (Nrf2) em presença de estresse oxidativo migra para o núcleo ligando-se ao elemento de resposta antioxidante (ARE) localizado na região promotora de genes que codificam enzimas antioxidantes de fase II e proteínas que respondem ao estresse (ARTAUD-MACARI; et al, 2013). Dentre essas enzimas pode-se citar: quinona oxidoreductase, GST, heme oxigenase-1, glutamato cistina ligase, e peroxiredoxina I que desempenham um papel-chave na defesa celular pela remoção de EROs (CHO; et al, 2006; TSAI; et al, 2013).

1.6 Fibrose x Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes que levam a uma disfunção celular e danos ao tecido (KLIMENT; OURY, 2010). A fibrose pulmonar surge através de uma inflamação iniciada por lesão celular e tecidual que vão sendo substituídos por fibras de colágenos produzidas através da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. O processo fibrótico tem sido objeto de vários estudos. Atualmente, há uma forte evidência da participação do estado redox e do equilíbrio oxidante/antioxidante desempenhando um importante papel na patogênese da fibrose pulmonar. Na fibrose o estresse oxidativo induz apoptose de células estruturais e aumentam a síntese de citocinas pró-inflamatórias (GAO; et al, 2013).

As enzimas antioxidantes também se mostram alteradas em pacientes com fibrose pulmonar. Estudos mostraram que há uma redução nos níveis de glutathiona e de SOD, sugerindo um aumento de estresse oxidativo. Além disso, há uma elevação nos níveis de Nrf2 na tentativa de compensar o estresse oxidativo. A perda de antioxidantes

no pulmão e a sinalização celular anormal para a expressão antioxidante tem um importante papel na patogênese da fibrose pulmonar (KLIMENT; OURY, 2010). A glutathiona também tem um importante papel protetor inibindo fibroblastos e a proliferação e diferenciação de linfócitos, tanto em fluidos epiteliais quanto em células do lavado broncoalveolar (GOGALI; WELLS, 2010). Estudos realizados no lavado broncoalveolar em pacientes com fibrose mostraram que há uma elevação nos níveis de marcadores de estresse oxidativo como mieloperoxidase, 8-isoprostano, nitrito e nitrato e ON (MONTALDO; et al, 2002).

Reações de radicais livres tem um importante papel no desenvolvimento da fibrose pulmonar diretamente ou através de estímulos inflamatórios. Células inflamatórias do pulmão são ativadas e produzem EROs e ON (KINNULA; MYLLARNIEMI, 2008).

1.7 **Enfisema pulmonar**

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é caracterizada pela limitação progressiva do fluxo aéreo devido a uma combinação de inflamação crônica e remodelamento das pequenas vias aéreas (bronquiolite) e perda de recolhimento elástico causado pela destruição das paredes alveolares (enfisema). (DE-TORRES; et al, 2013). O enfisema é caracterizado por uma destruição irreversível da arquitetura alveolar com alargamento dos espaços aéreos distais (MEINEL; et al, 2013) (Figura 8A).

Fisiologicamente, o enfisema é caracterizado por uma grave limitação do fluxo aéreo resultando em hiperinsuflação. Histologicamente o enfisema é caracterizado pela dilatação permanente dos sacos aéreos distais aos bronquíolos terminais secundários à destruição da parede alveolar, com presença de fibrose em um estágio mais avançado. O pulmão enfisematoso requer uma menor pressão para inflar, mas uma vez inflados exercem uma menor pressão de esvaziamento comparado a um pulmão normal (SACHITHANANDAN; BADMANABAN, 2012). Com o passar dos anos exposto a agentes causadores de DPOC ou decorrentes de alterações genéticas, o pulmão apresenta inicialmente alterações bioquímicas e eventos celulares como aumento de células inflamatórias, aumento de agentes oxidantes e aumento de proteases. Com o

tempo é possível ver as alterações fisiológicas que culminarão com sinais clínicos e radiológicos e no fim da vida evidências patológicas em biópsias cirúrgicas ou autópsia (PETTY, 2006) (Figura 8B).

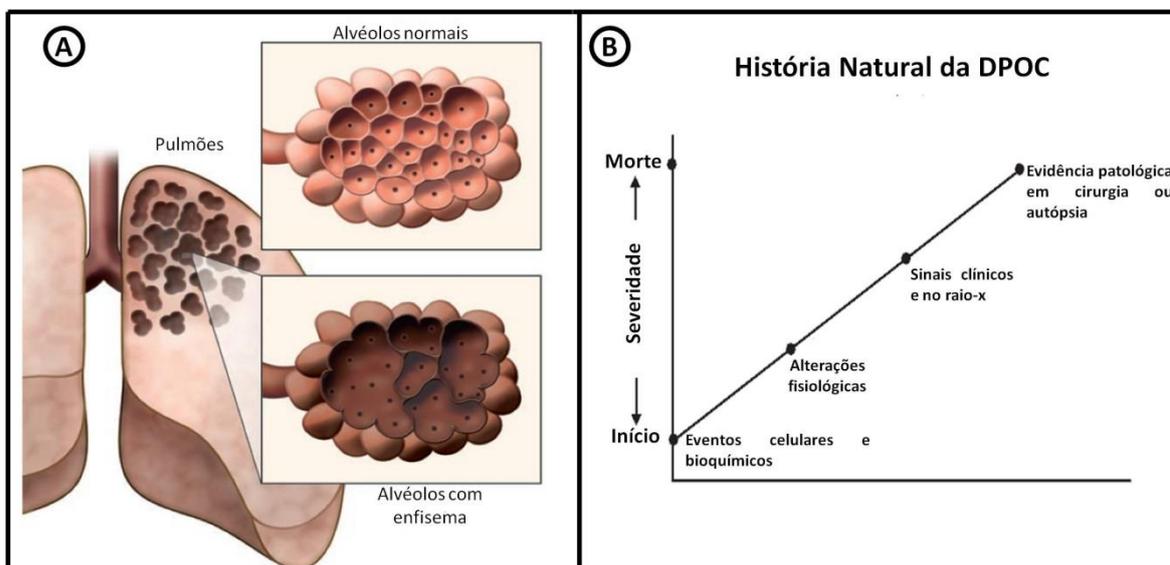


Figura 8 - Esquemas ilustrativos do enfisema pulmonar. Em (A) observa-se a diferença entre o pulmão com septos preservados comparados ao pulmão com enfisema pulmonar que apresenta destruição de septos alveolares com conseqüente aumento do espaço alveolar. Em (B) observa-se a história natural da DPOC desde o início da doença até o óbito, caracterizando-se inicialmente por eventos celulares e bioquímicos que incluem aumento de células inflamatórias, aumento de agentes oxidantes e aumento de proteases. O eixo X representa a passagem dos anos. À medida que há um avanço do tempo com o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, proteases e antiproteases e um aumento persistente da inflamação em que o organismo não consegue se defender dessas lesões permanentes começam a aparecer alterações fisiológicas e sinais clínicos podendo ser observado em raios-x e por fim na evidência patológica vista em cirurgias ou biópsias. Adaptado de Petty 2006.

Embora o tabagismo seja o principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento de enfisema pulmonar, apenas cerca de 15% dos fumantes desenvolvem a doença, sugerindo que existem outros fatores que influenciam na expressão da doença. Estudos anteriores estimam que o fumo contribua em 15% para a variabilidade da função pulmonar (WOOD; STOCKLEY, 2006).

Uma das causas do enfisema pulmonar é o estresse oxidativo que potencializa danos proteolíticos, induzem morte celular e inibem mecanismos de reparo do pulmão em pacientes com enfisema pulmonar (FISCHER; PAVLISKO; VOYNOW, 2011). Proteases produzidas por infiltração de leucócitos e de células residentes podem decompor a matriz, especificamente as fibras elásticas que são vitais para a mecânica pulmonar. Essas enzimas tornam-se tóxicas quando seus inibidores endógenos são inativados por oxidantes, permitindo que as proteases alterem a estrutura do pulmão,

sugerindo que o desequilíbrio redox desencadeia o desequilíbrio protease/antiprotease (STEVENSON; KOCH; BRITTON, 2006).

1.7.1 Modelos de enfisema pulmonar

Os modelos experimentais mais utilizados para induzir enfisema pulmonar são por inalação de fumaça de cigarro e por aplicação de doses de elastase. Em várias linhagens de camundongos, a fumaça de cigarro causa em longo prazo inflamação e alargamento do espaço aéreo semelhante ao que ocorre em seres humanos. Apesar de haver um consenso de que o tabagismo que causa o enfisema, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda é desconhecido. A fumaça de cigarro contém altas concentrações de EROs, esse excesso causa um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes resultando em estresse oxidativo (KASAHARA; et al, 2000).

O uso da elastase para induzir enfisema tem sido amplamente utilizado devido ao seu baixo custo, uma vez que uma única dose pode resultar rapidamente em características morfológicas e histológicas compatíveis com o enfisema pulmonar. Por outro lado, a exposição prolongada à fumaça de cigarro é cara e mais lenta, levando ao enfisema pulmonar em 60 dias. Enquanto que o dano resultante do enfisema pulmonar causado por elastase é homoganeamente distribuído, as partículas provenientes do cigarro permanecem na árvore brônquica até que se expandem lentamente aos alvéolos (ANTUNES; ROCCO, 2011; VALENÇA; et al, 2011).

Protocolos de enfisema induzido por elastase são rápidos e baratos. A gravidade da lesão é modulada por dose da enzima induzindo alterações morfológicas e funcionais que são irreversíveis, ao contrário da lesão causada pela fumaça de cigarro que se apresenta de forma leve e reverte com o tempo. Considerando que o enfisema apresenta uma destruição alveolar irreversível que pode progredir mesmo quando o indivíduo para de fumar, o uso da elastase tem se tornado mais apropriado para o estudo das mudanças fisiológicas causadas pelo enfisema (ELLISEN, 2010).

Desta forma a elastase tem se tornado uma ferramenta útil para validar novas drogas ou para estudar o desenvolvimento de anomalias graves no tecido pulmonar. Além disso, várias características do enfisema humano foram reproduzidas com o uso

da elastase como inflamação sistêmica e adaptações crônicas. A instilação de elastase induz um desequilíbrio entre proteases e antiproteases. As enzimas elastolíticas aumentam o influxo de células inflamatórias nos espaços aéreos que favorecem o aumento de metaloproteases (MMPs) e de EROs. A capacidade de degradação de matriz por MMPs causa a destruição dos septos alveolares, aumentando o espaço aéreo. (ANTUNES; ROCCO, 2011).

Embora elastase cause a maioria das alterações observada na inalação por fumaça de cigarro, as diferenças que ocorrem durante a evolução da lesão devem ser esclarecidas, e o início e duração de lesões diferem em ambos os modelos. A principal desvantagem deste modelo é que o tipo de lesão causada difere daquela causada por fumaça de cigarro, enquanto, o modelo de enfisema por fumaça de cigarro causa um enfisema centrilobular característico de fumantes, o enfisema causado por elastase causa um enfisema panacinar que ocorre em pessoas com deficiência de α 1- antitripsina, sendo esse modelo mais utilizado quando se objetiva estudar os efeitos de algum medicamento (ANTUNES; ROCCO, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o perfil inflamatório e oxidativo na fibrose pulmonar associado ao enfisema pulmonar prévio.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil das estruturas do parênquima pulmonar através da histologia (H&E e Vermelho de Sirius) e da estereologia;
- Analisar o perfil oxidativo do pulmão através de ensaios para estresse oxidativo (CAT, SOD, GPx, GST e nitrito);
- Analisar o perfil inflamatório através das citocinas envolvidas na inflamação como IL-1 β e IL-6.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, (n= 51) de seis semanas, acondicionados, em grupos de 5 ou 7 animais/caixa, no microisolador do LABCOM/ICB/UFRJ com temperatura e umidade controladas ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$, $50\pm 10\%$, respectivamente), submetidos aos ciclos invertidos claro/escuro de 12h (luzes artificiais, 07:00h-19:00h) e exaustão contínua. Esse trabalho foi realizado em parceria com a Universidade Federal do Rio de Janeiro. O protocolo experimental foi aceito pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (DFBCICB063) conforme anexo 1.

3.2 Modelo de fibrose com inflamação prévia

Foi administrado bleomicina intratraqueal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em camundongos C57BL/6 após anestesia com ketamina. Após a traqueostomia foi instilado uma dose 0.1U de bleomicina com volume final de 50 μl . Os controles receberam salina por administração intratraqueal. Os animais foram analisados 21 dias após a instilação. O grupo de enfisema associado à bleomicina recebeu elastase intranasal 14 dias após a instilação de bleomicina. Os animais foram separados nos seguintes grupos experimentais (Figura 9):

- Grupo controle (CTR) (n=5): Animais que receberam salina intranasal (50 μl), sacrificados no 35 $^{\circ}$ dia;
- Grupo bleomicina (BLEO) (n=15): Animais que receberam bleomicina intratraqueal (0.1 U/animal) no dia 0 e foram sacrificados nos 7 $^{\circ}$ (n=5), 14 $^{\circ}$ (n=5) e 21 $^{\circ}$ (n=5) dias;
- Grupo elastase e bleomicina (PPE + BLEO) (n=21): Animais que receberam elastase (3U/animal) e após 14 dias receberam bleomicina e foram sacrificados no dia 0 (n=7), 7 (n=7), 14 (n=7) e 21(n=7).

Para confirmar que os animais desenvolveram enfisema até o 35º, foi administrada elastase e os animais foram sacrificados nos dias 21, 28, 35 e 42 e observamos que há o desenvolvimento de fibrose progressiva até o 42º dia (dados não apresentados).

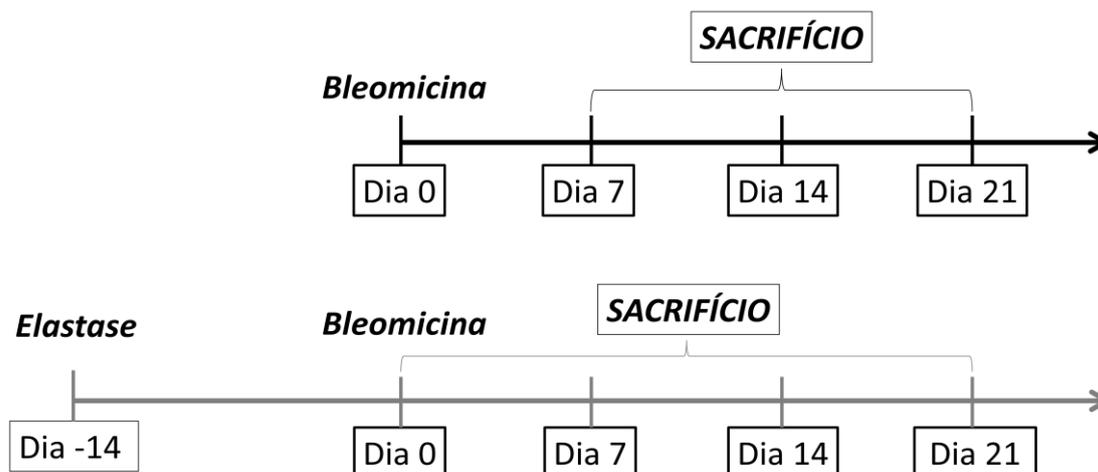


Figura 9 - Descrição dos eventos experimentais por grupos. A figura representa a divisão dos grupos e os dias em que os animais foram sacrificados.

3.3 Lavado broncoalveolar (LBA)

Imediatamente após o sacrifício, foi realizado o LBA. Para tanto a traquéia foi canulada e o pulmão foi lavado com 1,5ml de solução salina (3 x 500µl). As amostras foram mantidas em gelo até o final do procedimento, a fim de evitar lise celular. Após o término de todos os grupos, as amostras foram centrifugadas (Centrifuga Micro FANEM mod. 243M, São Paulo, Brasil) a 2000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante coletado e estocado em freezer.

3.4 Histologia e Análise Estereológica

Os pulmões esquerdos de cinco animais foram removidos e imersos em formalina tamponada (4%) processados e incluído de modo a se obter fragmentos do

ápice, terço médio e base. Cortes de 5 μm foram corados em hematoxilina e eosina (H&E) e picro-sirius para a análise histopatológica. Dez campos foram randomicamente analisados utilizando um microscópio de vídeo (Leica DML30, Bannockburn, IL, USA). A estereologia foi realizada através de um sistema-teste composto por 42 pontos (M42). O sistema teste foi acoplado a um monitor (tela plana) ligado a um microscópio. A densidade de volume (V_V) de septo ($V_{V_{\text{sep}}}$) e de alvéolo ($V_{V_{\text{ar}}}$) foram analisadas através do número de pontos (P_P) que atingiram os septos alveolares e os espaços alveolares pelo o número total de pontos de um sistema teste (P_t) segundo a fórmula $V_V = P_P/P_t$ (WEIBEL; HSIA; OCHS, 2007).

3.5 Homogeneizado tecidual

Os pulmões direitos foram removidos e armazenados em gelo picado em tubos devidamente etiquetados, em seguida foram homogeneizados (Homogeneizador Novatécnica mod. NT136, Piracicaba, Brasil) em 1ml de tampão fosfato de potássio pH 7,5 e centrifugado a 7.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o volume final de todas as amostras ajustado para 1,5ml com tampão fosfato. Essas amostras foram armazenadas em freezer (70°C) para posterior análise bioquímica. A dosagem de proteínas foi realizada nas amostras de tecido e homogeneizado tecidual pelo Método de Bradford usando albumina sérica bovina como padrão.

3.6 Ensaio bioquímico das enzimas antioxidantes

Alíquotas de homogeneizados pulmonares foram utilizadas nos ensaios bioquímicos para parâmetros de estresse oxidativo por métodos de espectrofotometria. SOD: foi estimada através da inibição da auto-oxidação da adrenalina e lida em um comprimento de onda de 480 nm (BANNISTER; BANNISTER; ROTILIO, 1987). A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. CAT: produzida pelas células foi mensurada em resposta a quantidade de H_2O_2 administrado durante a análise e foi

lida em um comprimento de onda de 240 nm (AEBI, 1984). A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. GPx: foi mensurada monitorando a oxidação da NADPH em 340 nm na presença de H₂O₂. A atividade enzimática foi expressa em umol/min/mg de proteína⁻¹. (FLOHE; GUNZLER, 1984). Glutathione-S-transferase: foi mensurada observando a reação do CNDB com a glutathione reduzida adicionada (GSH) por ação da GST (presente na amostra) em um comprimento de onda de 340nm e com aumento de sua concentração pode inferir sobre a atividade de GST no tecido (PABST; HABIG; JAKOBY, 1974).

3.7 Ensaio para quantificação de nitrito no LBA

Níveis de nitrito, um subproduto do metabolismo do ON, foi mensurado no LBA (μMol/mg de proteína) baseado na reação de Griess. Um total de 100 μL de amostra foi misturado 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 incubado 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 com diferentes concentrações de nitrito de sódio (GREEN; et al, 1982).

3.8 Dosagem de IL-1β e IL-6

As citocinas pró-inflamatória IL-6 e IL-1β foram dosadas pelo ensaio de ELISA padronizado (R & D Systems) seguindo as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Estas amostras foram preparadas a partir de todo o pulmão homogeneizado em 2 ml de PBS contendo uma mistura de inibidores de protease.

3.9 Análise estatística

Os dados mensurados foram expressos em média \pm erro padrão da média. As análises dos dados paramétricos foram realizadas pelo teste de variância one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises dos dados não paramétricos (estereologia) foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). O software *Graphpad Prism* foi utilizado para realizar as análises estatísticas (*GraphPad Prism* versão 5.0, São Diego, CA, EUA). A correlação de Person foi realizada com o uso do excel para os dados de morfologia, enzimas antioxidantes e perfil inflamatório para determinar a força e a direção das relações entre duas variáveis

4 RESULTADOS

4.1 Bleomicina induz fibrose em camundongos C57BL/6

Para avaliar a histoarquitetura pulmonar durante o desenvolvimento da fibrose pulmonar, os animais foram expostos a bleomicina e a histologia pulmonar foi observada 7, 14 e 21 dias após a instilação. A coloração de H&E mostrou aumento progressivo da fibrose (Figura 10). Após 7 dias da instilação de bleomicina os septos alveolares estavam mais alargados e pequenos depósitos de matriz foram observados (Figura 10B). Em 14 dias, o alargamento dos septos foram ainda maiores e em 21 dias após a instilação de bleomicina as áreas fibróticas foram mais confluentes e as superfícies respiratórias estavam reduzidas (Figura 10 C e D). A deposição excessiva de colágeno induzida por bleomicina foi observada pela coloração de picro-sirius.

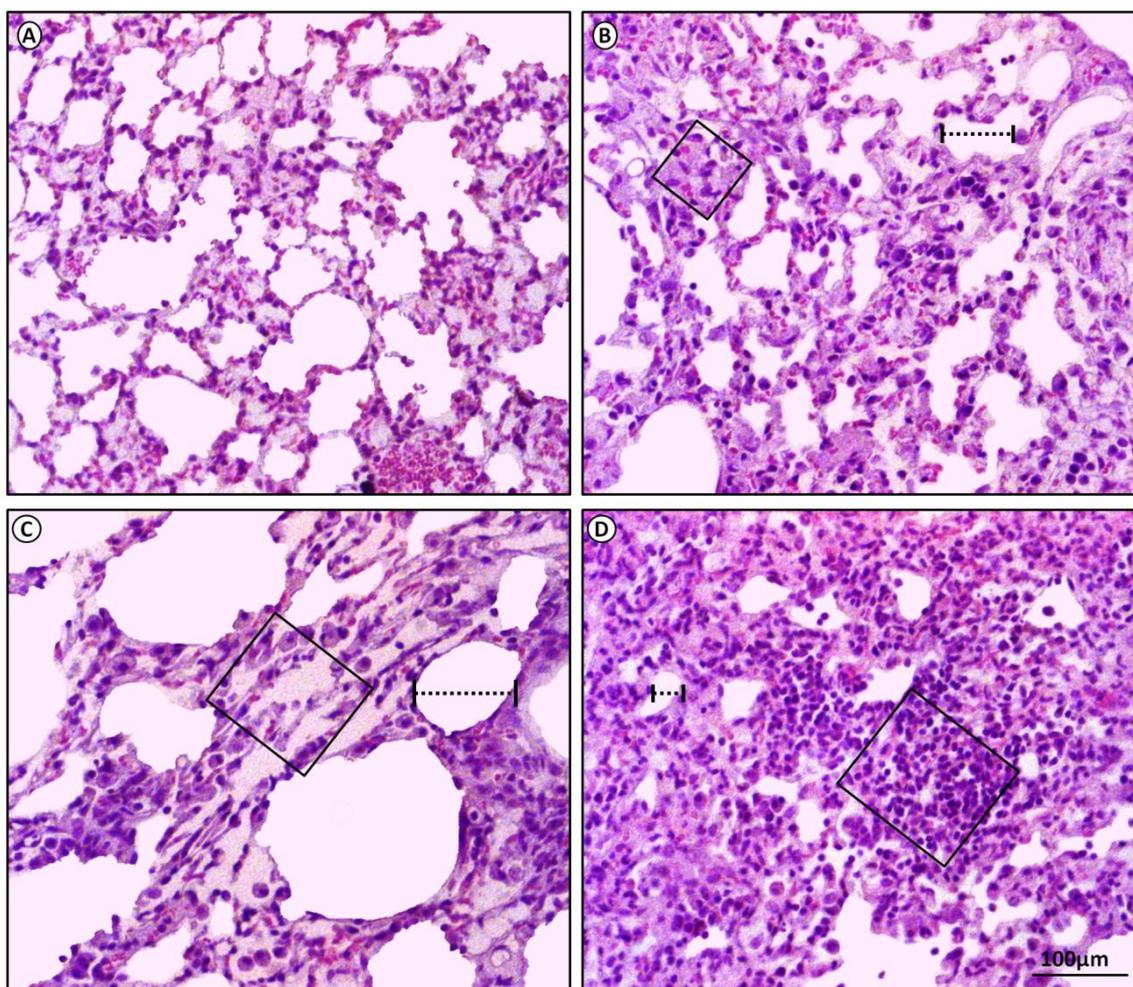


Figura 10 - Fotomicrografia do parênquima pulmonar em coloração de H&E. Os tecidos apresentados são de (A) camundongos do grupo controle que receberam solução salina, (B-D) camundongos tratados com 0.1U de bleomicina 7, 14, e 21 dias após a instilação, respectivamente. As Os quadrados indicam áreas com aumento de deposição de matriz extracelular e linhas pontilhadas representam alterações nas superfícies respiratórias.

Nos grupos PPE + BLEO, observou-se uma destruição progressiva, alargamento dos septos alveolares e alargamento significativo dos espaços alveolares distribuídos por todo o parênquima 7, 14 e 21 dias após a instilação de bleomicina (Figura 11). O enfisema e a fibrose ocorreram associados a partir de 14 dias, no grupo PPE + BLEO 21 dias observou-se distribuição de matriz de forma focal e extensas áreas de fibrose. Os grupos BLEO e PPE + BLEO apresentaram mortalidade entre 14 e 21 dias.

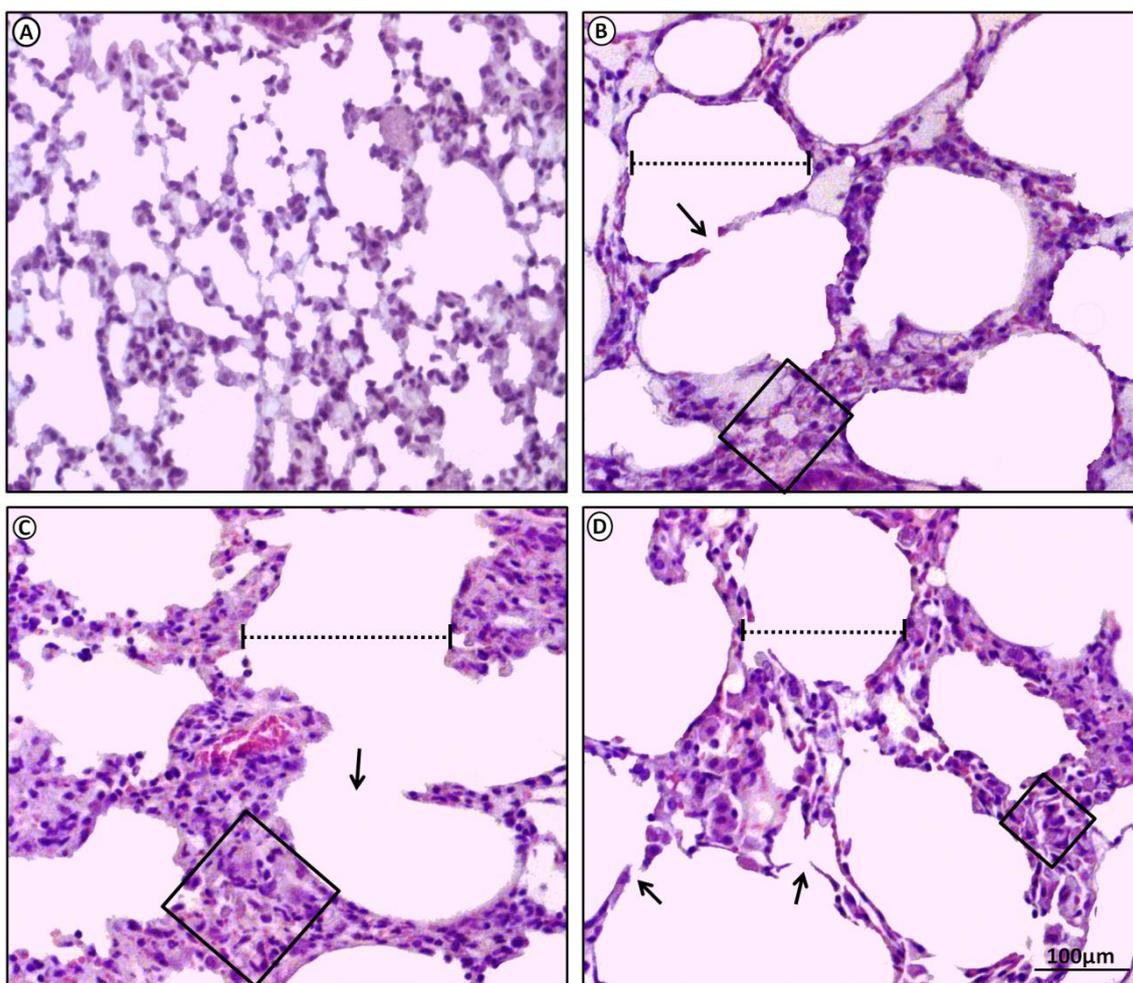


Figura 11 - Fotomicrografia do parênquima pulmonar em coloração de H&E. Os tecidos apresentados são de (A) camundongos tratados com 0.1U de bleomicina no dia 0, (B-D) camundongos tratados com 3U de PPE no dia -14 e 0.1U de bleomicina 7, 14 e 21 dias, respectivamente. Setas pretas indicam a destruição dos septos alveolares, as linhas pontilhadas indicam alargamento alveolar e os quadrados representam o aumento de deposição de matriz extracelular.

As alterações que ocorreram nos septos alveolares são mostrados na figura 12. Observou-se que o aumento da espessura alveolar ocorreu a partir de 7 dias no grupo BLEO. O alargamento dos septos alveolares foi progressivo a partir de 14 dias e em 21 dias o alargamento dos septos foi maior do que em 14 dias. Nos grupos PPE + BLEO foram observados dois tipos de alterações. Em sete dias houve destruição de septos alveolares e um leve aumento da espessura septal. Em 14 dias, houve destruição dos septos alveolares característico de enfisema pulmonar grave e ocorreu um aumento da espessura do septo semelhante ao grupo BLEO 14 dias. Em 21 dias o enfisema pulmonar foi mais severo e, em consequência, houve uma degradação da matriz extracelular e a fibrose foi distribuída de uma forma mais focal.

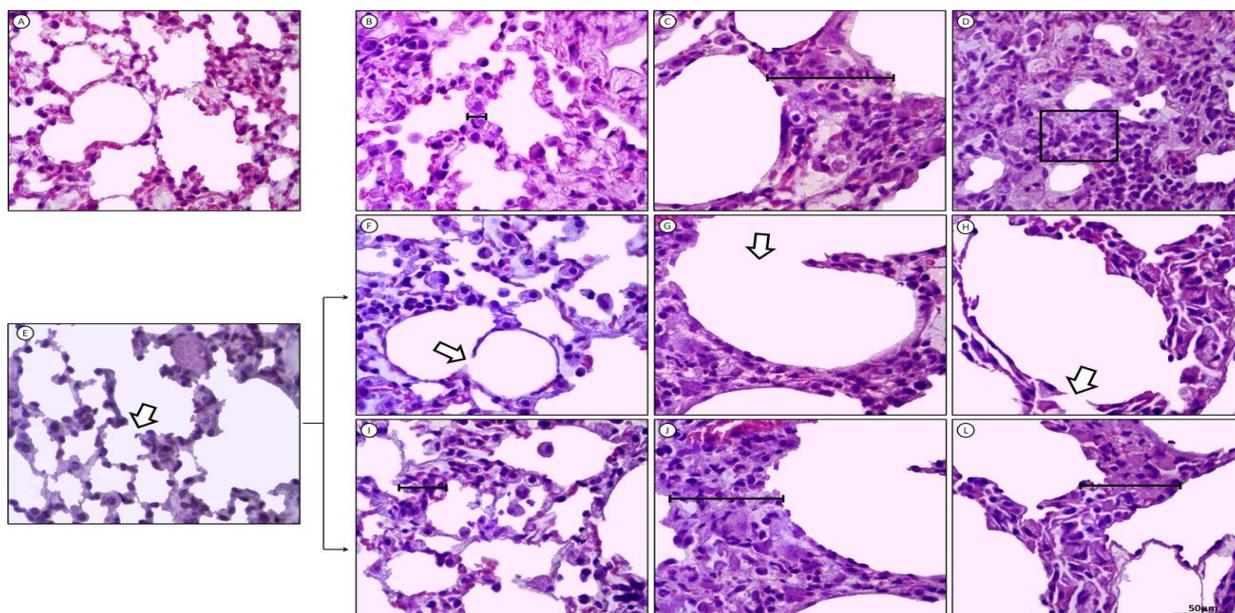


Figura 12 - Fotomicrografias das alterações dos septos alveolares em H&E. Em (A) observa-se septos preservados no grupo controle após 21 dias; (B-D) grupo BLEO tratado com 0.1U de bleomicina 7, 14 e 21 dias, respectivamente. O aumento da espessura dos septos começou a ocorrer em 7 dias. Em 14 dias observou-se o alargamento de septos característicos de fibrose pulmonar e em 21 dias a fibrose pulmonar foi mais grave e a com poucos espaços aéreos presentes. Em (E) é observada destruição de septos alveolares, mas com presença de septos alveolares normais no grupo de PPE + BLEO 0 dias. Em (F-L), camundongos tratados com 3U de elastase no dia -14 e 0.1U de bleomicina após 7, 14 e 21 dias, respectivamente, observa-se a destruição dos septos alveolares que ocorreram 7, 14 e 21 dias, respectivamente, e houve um aumento na espessura dos septos alveolares a partir de 7 dias (I) e a fibrose pulmonar ocorreu a partir de 14 dias e se manteve em 21 dias (J e L, respectivamente). O quadrado indica aumento da matriz extracelular, as setas brancas com contorno preto indicam as áreas de destruição dos septos alveolares e as linhas indicam as alterações na espessura do septo.

Houve um aumento das fibras de colágeno nos grupos BLEO 14 e 21 dias. As fibras de colágeno estavam mais densas, compactadas e em maior quantidade em torno da árvore

respiratória no grupo PPE + BLEO 21 dias e eram mais difusas no grupo BLEO 21 dias (Figura 13).

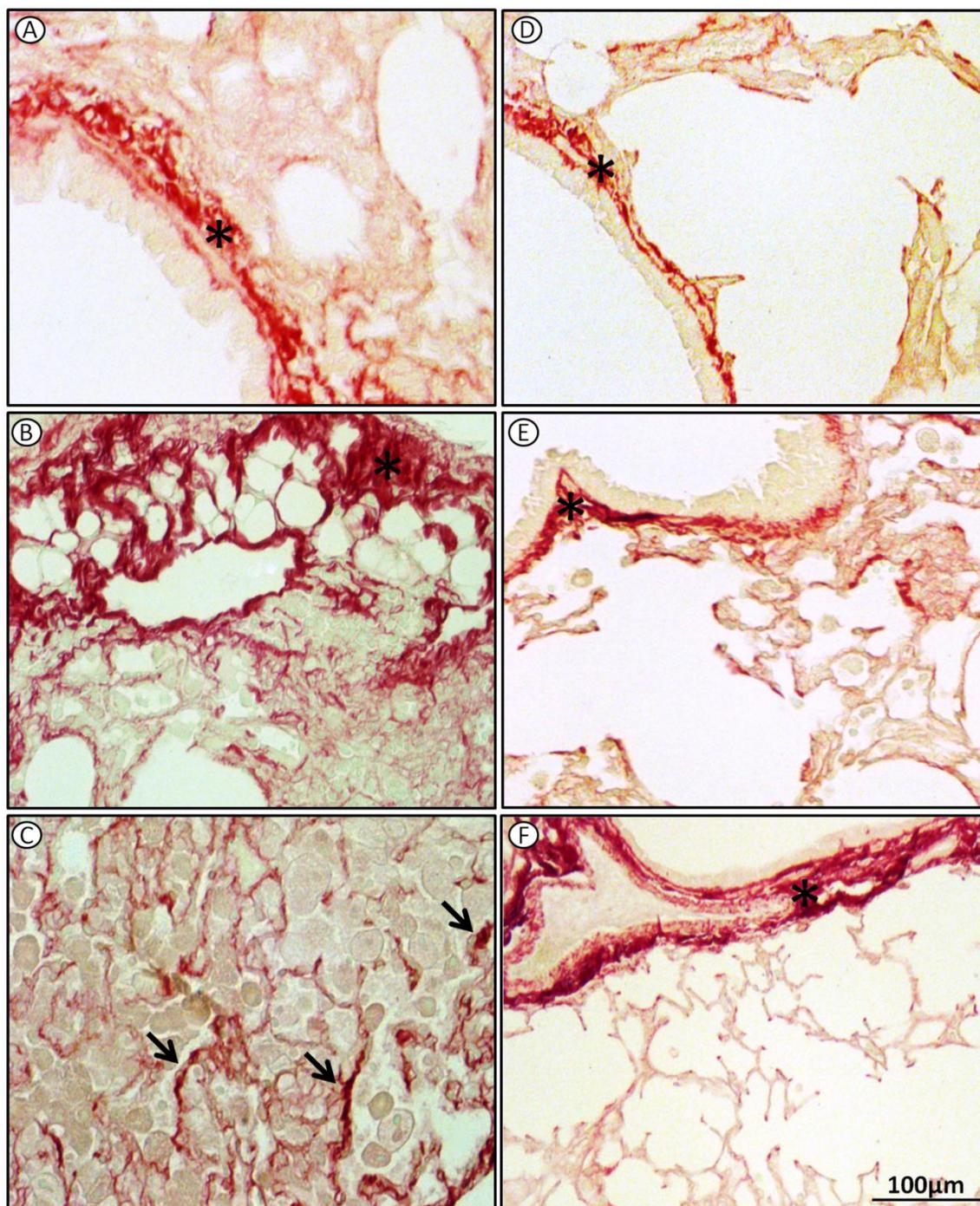


Figura 13 - Fotomicrografia do parênquima pulmonar corado com picro-sirius. Em (A-C) camundongos tratados com 0.1U de bleomicina após 7, 14 e 21 dias após a instilação, respectivamente; (D-F) camundongos tratados com 3U de PPE e 0.1U de bleomicina após 7, 14 e 21 dias após a instilação respectivamente. Setas pretas e asteriscos indicam presença de fibras colágenas.

BLEO 21 dias (Figura 14).

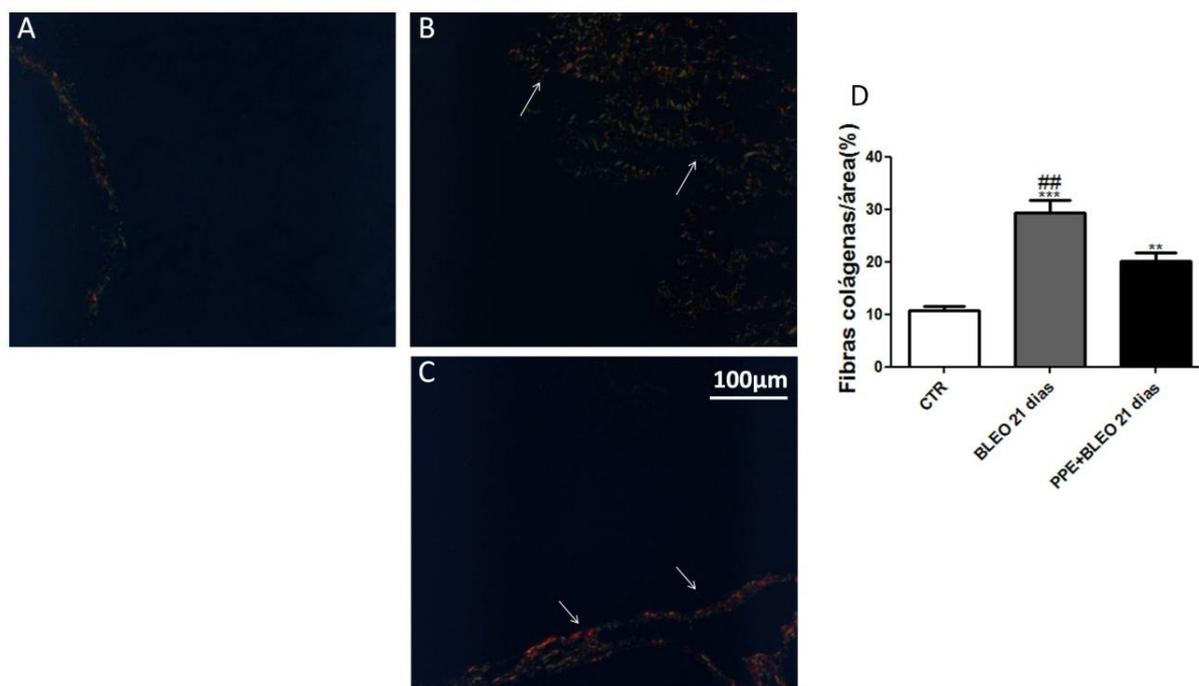


Figura 14 - Análise das fibras colágenas. Os tecidos mostraram a presença de fibras de colágeno em luz polarizada, (A) camundongos do grupo controle que receberam solução salina, (B) camundongos tratados com 0.1U de bleomicina após 21 dias e (C) camundongos tratados com 3U de elastase no dia -14 e 0.1U de bleomicina após a 14 dias. As setas brancas indicam a presença de fibras de colágeno (%). *** P <0,001; ** p <0,01 grupos foram comparados com o controle de solução salina; # # p <0,01 grupos BLEO 21 dias comparado com o grupo de PPE + BLEO 21 dias. Os dados foram expressos como média + SEM e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunn, considerando o nível de significância de 5%.

4.2 Análise morfométrica

As alterações morfológicas no tecido pulmonar estão representadas na tabela 1. A densidade de volume dos septos alveolares em grupo BLEO reduziu 33% em 7 dias (p <0,001), e aumentou 37% no dia 21 (p <0,001), quando comparado com o grupo controle. De forma inversa, a densidade de volume dos septos alveolares no grupo PPE + BLEO reduziu 26% apenas no dia 7 (p <0,01) quando comparado com o grupo controle. O grupo PPE + BLEO apresentou no dia 21 uma redução de 36% (p <0,001) em densidade de volume dos septos alveolares quando comparados ao mesmo ao grupo BLEO 21 dias. A densidade de volume dos alvéolos no grupo BLEO aumentou 33% no dia 7 (p <0,001) e reduziu 37% no dia 21 (p <0,001), quando comparado com o grupo controle. De forma contrária, a densidade de volume dos alvéolos no grupo PPE + BLEO aumentou 26% apenas no dia 7 (p <0,01) quando comparado com o grupo

controle. O grupo PPE + BLEO no dia 21, apresentou um aumento de 36% ($p < 0,001$) em densidade de volume dos alvéolos quando comparados ao mesmo tempo com um recebeu instilação de BLEO.

A correlação entre a densidade de volume de alvéolos e de septo nos grupos PPE + BLEO e BLEO foi forte e negativa (-0,94).

Tabela 1 - Análise estereológica do parênquima pulmonar em camundongos C57BL/6 nos grupos BLEO e PPE + BLEO.

Groups	CTR	BLEO 7 days	BLEO 14 days	BLEO 21 days	PPE + BLEO 7 days	PPE + BLEO 14 days	PPE + BLEO 21 days
Vv[Septum]	59.0±1.68	40.2±3.03***	69.7±0.85	81.0±1.22***	44.5±2.36 **	62.2±3.79	52.2±3.32###
Vv[Alveoli]	41.0±1.68	59.7±3.03***	30.2±0.85	19.0±1.22***	55.5±2.36 **	37.7±3.79	47.7±3.32###

CRT- grupo controle; BLEO 7 dias- grupo bleomicina 7 dias; BLEO 14 dias- grupo bleomicina 14 dias; BLEO 21 dias- grupo bleomicina 21 dias; PPE + BLEO 7 dias- grupo elastase + bleomicina 7 dias; PPE + BLEO 14 dias- grupo elastase + bleomicina 14 dias; PPE + BLEO 21 dias- grupo elastase + bleomicina 21 dias; Vv [septum] densidade de volume de septos alveolares (%); Vv[alvéolo] - densidade de volume dos espaços aéreos(%). Os dados foram expressos como média ± erro padrão e analisados estatisticamente por ANOVA com pós-teste de Dunn, considerando o nível de significância de 5%. *** $P < 0,001$, ** $p < 0,01$, todos os grupos comparados com o grupo controle, ### $p < 0,01$ grupo PPE + BLEO 21 dias comparado com grupo BLEO 21 dias.

4.3 Marcadores de desequilíbrio redox e níveis de nitrito

A atividade dos marcadores de estresse oxidativo são apresentados na Tabela 2. A atividade da SOD foi reduzida 69% no grupo BLEO 7 dias ($p < 0,05$), 75% no grupo BLEO 21 dias ($p < 0,01$) e 62% no grupo PPE + BLEO 14 dias ($p < 0,05$). A atividade da CAT reduziu 53% no grupo BLEO 21 dias ($p < 0,01$) e 75% no grupo PPE + BLEO 7 dias ($p < 0,001$) comparados com o grupo controle e 70% no grupo PPE + BLEO 7 dias comparado com o grupo BLEO 7 dias ($p < 0,001$). A atividade da GPx foi reduzida 21% no grupo BLEO 21 dias ($p < 0,01$) e 19% PPE + BLEO 21 dias ($p < 0,05$) comparados com o grupo controle. A GST aumentou 45% no grupo BLEO 21 dias comparado com o grupo controle ($p < 0,05$), e 75% no grupo PPE + BLEO 7 dias comparado com o grupo BLEO 7 dias ($p < 0,05$) e 36% no grupo PPE + BLEO 14 dias comparado com o grupo BLEO 14 dias ($p < 0,05$) e reduziu 50% no grupo PPE + BLEO 21 dias em comparação com o grupo BLEO 21 dias ($p < 0,05$). Os níveis de aumentaram 20% e 74% no grupo BLEO 14 ($p < 0,01$). e 21 ($p < 0,01$). dias respectivamente e 75% no grupo PPE + BLEO 21 dias ($p < 0,01$). Os níveis de nitrito e de GPx apresentaram uma

correlação forte e negativa (-0,84) indicando que a redução nos níveis de GPx estão diretamente relacionados com o aumento dos níveis de nitrito.

Tabela 2 - Análise bioquímica da fibrose no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6.

Grupos	CTR	BLEO 7 dias	BLEO 14 dias	BLEO 21 dias	PPE + BLEO 7 dias	PPE + BLEO 14 dias	PPE + BLEO 21 dias
SOD	1,70±0,40	0,53±0,12 *	0,98±0,22	0,43±0,05 **	0,96±0,04	0,66±0,08 *	0,91±0,04
CAT	11,53±1,01	10,45±1,02	10,06±0,70	5,48±0,95 **	2,91±0,56 ***	9,65±0,34	7,75±1,29
GPx	18,7±0,40	17,3±0,60	16,8±0,60	14,9±0,40 **	19,5±0,80	15,5±0,40 &	15,2±1,10 *
GST	0,11±0,08	0,08±0,04 <i>a</i>	0,11±0,09 \$	0,16±0,01 †	0,14±0,01	0,15±0,02	0,08±0,02
NO ₂ ⁻	50,34±3,98	50,89±3,06	60,76±7,78	87,73±2,61 **	35,35±2,74	75,78±4,61	88,52±13,9 **

CRT- grupo controle; BLEO 7 dias- grupo bleomicina 7 dias; BLEO 14 dias- grupo bleomicina 14 dias; BLEO 21 dias- grupo bleomicina 21 dias; PPE + BLEO 7 dias- grupo elastase + bleomicina 7 dias; PPE + BLEO 14 dias- grupo elastase + bleomicina 14 dias; PPE + BLEO 21 dias- grupo elastase + bleomicina 21 dias; SOD- atividade da superóxido dismutase (U/mg de proteína), CAT- atividade da catalase (U/mg de proteína), GPx- atividade da glutathione peroxidase (umol/min/mg de proteína⁻¹); Nitrito (mM/mg de proteína); GST- atividade da glutathione-S-transferase (μ Moles min⁻¹ ml⁻¹). Os dados são expressos como média \pm erro padrão e analisados por ANOVA com pós teste de Tukey considerando um nível de significância de 5%. * P <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 todos os grupos comparados com o grupo controle salina; ### p <0,001 grupo BLEO 7 dias comparado com o grupo de PPE + BLEO 7 dias; & p <0,05 grupo BLEO 14 dias comparado com o grupo PPE + BLEO 14 dias; *a* p <0,05 grupo BLEO 7 dias comparado com o grupo PPE + BLEO 7 dias; \$ p <0,05 grupo BLEO 14 dias comparado com o grupo PPE + BLEO 14 dias; † p <0,001 grupo BLEO 21 dias comparado com o grupo PPE + BLEO 21 dias.

4.4 Análise de IL-1 β e IL-6

Os níveis de IL-1 β e IL-6 são apresentados na Tabela 3. Nós observamos no grupo BLEO um aumento de 4x na IL-1 β no dia 7 (p<0.001), e um aumento de 134% no dia 14 (p<0.05) quando comparado com o grupo controle. O grupo PPE + BLEO apresentou um aumento de IL-1 β de 135% no dia 7 (p<0.01) e 147% no dia 14 (p<0.01) quando comparado ao grupo controle. No entanto, o aumento de IL-1 β no grupo PPE + BLEO no dia 7 foi inferior ao aumento de IL-1 β no grupo da BLEO no mesmo tempo, com redução de 44% (p<0,01). Em relação a IL-6, observou-se no grupo PPE + BLEO uma redução de 75% (p <0,01) no dia 7, quando comparado com o grupo controle e uma redução de 78% (p <0,001), quando comparado com o grupo BLEO 7 dias. No dia 21, observou-se redução de 61% (p <0,05) em relação a IL-6 no grupo PPE + BLEO, quando comparado com o grupo controle.

Tabela 3 - Citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6.

Grupos	CTR	BLEO 7 dias	BLEO 14 dias	BLEO 21 dias	PPE +BLEO 7 dias	PPE + BLEO 14 dias	PPE + BLEO 21 dias
IL-1 β	0,82 \pm 0,04	3,39 \pm 0,36 ***	1,92 \pm 0,16 *	1,31 \pm 0,04	1,93 \pm 0,19 **###	2,03 \pm 0,34 **	1,01 \pm 0,22
IL-6	1,19 \pm 0,09	1,35 \pm 0,18	1,06 \pm 0,19	0,88 \pm 0,12	0,30 \pm 0,09 #####	1,23 \pm 0,17	0,47 \pm 0,10

CRT- grupo controle; BLEO 7 dias- grupo bleomicina 7 dias; BLEO 14 dias- grupo bleomicina 14 dias; BLEO 21 dias- grupo bleomicina 21 dias; PPE + BLEO 7 dias- grupo elastase + bleomicina 7 dias; PPE + BLEO 14 dias- grupo elastase + bleomicina 14 dias; PPE + BLEO 21 dias- grupo elastase + bleomicina 21 dias; IL-6, interleucina-6 (pg/mL), IL-1 β interleucina-1 β (pg/mL). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados estatisticamente por ANOVA com pós-teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5%. * p<0.05 comparado com o grupo controle, ** p<0.01 comparado com o grupo controle, *** P <0,001 comparado com o grupo controle, ## p <0,01 comparado com o grupo o grupo BLEO 7 dias, ### p <0,01 comparado com o grupo BLEO 7 dias.

5 DISCUSSÃO

Uma das principais limitações de comparar estudos experimentais com condições clínicas é a complexidade do paciente que apresenta além da sua queixa principal outras doenças de base. Investigar a fisiopatologia da fibrose pulmonar associado à inflamação pode aproximar estudos experimentais da realidade clínica. O presente estudo buscou avaliar como se comportam as enzimas antioxidantes na fibrose quando há uma condição inflamatória associada.

Em nosso protocolo com uma dose de 0.1U de bleomicina intratraqueal induzimos fibrose pulmonar resultando em dados semelhantes obtidos anteriormente pelo nosso grupo (SANTOS-SILVA; et al, 2012) e por outros grupos (MOELLER; et al, 2008; MOURATIS; AIDINIS, 2011). O desenvolvimento de fibrose após a instilação de bleomicina ocorreu progressivamente a partir de 7 dias até 21 dias (172%), quando medida por densidade de volume de septo e do volume de colágeno em picro-sirius. A mortalidade entre camundongos C57BL/6 em 14 e 21 dias corrobora com dados anteriores por Santos-silva et al. (2012).

Estudos sobre a progressão da fibrose pulmonar induzida por bleomicina tem sido realizados há várias décadas em diversos modelos experimentais. Em ratos, observou-se que 1-2 semanas após a instilação de bleomicina houve um aumento de células mononucleares. Após 3 semanas aumentou a quantidade de colágeno intersticial, houve um aumento de macrófagos alveolares e as áreas de espessamento estavam mais evidentes nas regiões hílares devido a distorção do tamanho e da forma alveolar (HESTERBERG, 1981). Após 23 dias da instilação de bleomicina observam-se regiões focais de hiper celularidade presentes no parênquima pulmonar, além de células mononucleares e fusiforme, estas regiões foram estendidas à superfície pleural e os espaços aéreos estavam dilatados, com presença de fibras de colágeno (ZUCKERMAN; et al, 1980; SIKIC; et al, 1978).

Em hamsters houve um aumento na densidade das células intersticiais em 21 dias. O número de células diminuiu a partir de 21 e 28 dias. A composição celular da lesão foi dominada por monócitos, neutrófilos e macrófagos, na fase inicial da fibrose. Os monócitos reduziram em 21 em comparação com o valor de 7 dias, assim como os neutrófilos. Em contraste, os macrófagos foram reduzidas na fase inicial (7 dias) do infiltrado celular e na fase posterior em 35 e 42 dias, em comparação com o valor de 4 dias após o tratamento. Na fase mais tardia da lesão houve aumento de fibroblastos e

eosinófilos, acompanhado por um aumento geral dos linfócitos (CHANDLER; HYDE; GIRI, 1983). Esses estudos corroboram com nossos resultados onde observamos aumento de células mononucleares a partir de sete dias e um aumento de colágeno e áreas mais espessas presentes nas regiões hílares a partir de 14 dias. Nós sugerimos que o modelo de bleomicina em camundongos causa fibrose pulmonar com progressão semelhante a observada em outros modelos animais.

Nossos resultados corroboram com estudos anteriores que demonstraram a participação de citocinas pró-inflamatórias. IL-1 β aumentou 313% aos 7 dias após o tratamento com bleomicina e diminuiu os níveis de 134% e 59%, respectivamente, em 14 e 21 dias, comparado ao controle. Anteriormente, Kalayarasan, Sriram e Sudhandiran, (2008) e Hoshino et al. (2009) demonstraram que os níveis de IL-1 β e IL-6 foram aumentados desde o 3º dia, com pico em 7 dias (GASSE; et al, 2011; HOSHINO; et al, 2009) e, em seguida, diminuiu progressivamente aos 14 e 21 dias (RHEE; et al, 2011). Os resultados mostram a participação da IL-1 β e IL-6 na primeira semana que altera a histoarquitetura pulmonar, mas esse aumento pode ser visto também como um equilíbrio entre a inflamação e a deposição de colágeno que pode ser resultado do equilíbrio entre outros fatores de crescimento e citocinas durante esta fase inicial e as próximas fases fibroblásticas (KALAYARASAN; SRIRAM; SUDHANDIRAN, 2008; KAMINSKI; et al, 2000; ZHAO; et al, 2010).

Sugerimos que os mediadores inflamatórios podem estar retidos pela MEC, resultando em reparo prolongado com um depósito em excesso ou redução de matriz remodelando o colágeno. Os fatores de crescimento, tais como IL-1 β ficaram retidos pela MEC perpetuando a proliferação e a diferenciação celular que podem favorecer a fibrose pulmonar atuando com outras citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, que leva ao reparo tecidual progressivo e desorganizado do tecido pulmonar. (KOLB; et al, 2001; BRINGARDNER; et al, 2008; WYNN, 2011). A administração de bleomicina resulta em maior expressão de IL-1 β em camundongos associada à inflamação e a fibrose (MOELLER; et al, 2006). Recentemente, Bardo et al. (2011) demonstrou que o estado pró-inflamatório e pro-fibrótico nos pacientes com fibrose pulmonar idiopática pode estar relacionado com uma diminuição da proporção de IL-1Ra/IL-1, observou tanto a nível genético e por medições séricos e LBA.

Durante a inflamação a IL-6 participa da fisiopatologia da fibrose pela via de sinalização Erk 1/2 induzindo a proliferação de fibroblastos (MOODLEY; et al, 2003). O aumento de IL-6 já foi observado tanto em LBA de pacientes (MOZAFFARIAN; et

al, 2008) quanto em modelo animal ambas atuando em uma fase mais aguda tendo um papel importante no remodelamento da histoarquitetura pulmonar principalmente nas primeiras 24 horas (MANOURY; et al, 2005), mantendo-se elevada até o 3° dia após a instilação de bleomicina (O'DONOGHUE; et al, 2012). Nossos resultados mostram um pico nos níveis de IL-6 no dia 7 e diminuição progressiva até 21 dias. Sugerimos que a IL-6 atua em uma fase mais aguda induzindo a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e dessa forma participando no remodelamento tecidual anormal.

Um dos principais fatores implicados na etiologia da fibrose pulmonar é a inflamação (REYNOLDS, 2005). Por outro lado, grande parte dos tratamentos com drogas anti-inflamatórias não se mostraram eficazes contra a progressão da fibrose (ADAMALI; MAHER, 2012; MAHENDRAN; SETHI, 2012), assim, para Noble e Homer (2004), revisto por Homer et al. (2011) a inflamação é um fator secundário. Além disso, outras teorias foram desenvolvidas para explicar a progressão da fibrose baseado em achados clínicos e histopatológicos em doença humana, revisado por Gogali e Wells (2010). Encontrar correlações entre marcadores bioquímicos e de biologia molecular com achados histopatológicos podem contribuir para elucidar os mecanismos fisiopatológicos da doença e contribuir para terapêuticas futuras.

Por outro lado, também investigamos o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes para fundamentar um possível papel em associação com a progressão da fibrose. Nossos resultados confirmam uma deficiência das enzimas antioxidantes. Além disso, para as atividades de SOD no homogeneizado de tecido pulmonar, observamos uma queda significativa sete dias após a instilação de bleomicina.

Silva-santos et al. (2012), mostrou que não apenas a atividade da SOD está reduzida como também há diminuição da expressão da SOD-3 no pulmão. Esta diminuição da atividade da SOD foi observada em camundongos C57BL/6, 21 dias após administração de bleomicina podendo ser resultado da inativação das enzimas por oxidantes (DE RAEVE; et al, 1997) e o uso de lecitinizada suprime a fibrose pulmonar induzida por bleomicina num perfil de dose resposta (TANAKA; et al, 2010). Alguns antioxidantes, incluindo a N-acetilcisteína e a SOD podem diminuir a deposição de colágeno e proteger os pulmões numa variedade de modelos animais ou mesmo em ensaios clínicos (SALVEMINI; RILEY; CUZZOCREA, 2002). Além disso, Ren et al. (2007) sugeriram que (5R)-5-hidroxitriptólido reduziu os radicais livres, aumentou a atividade da SOD, e inibiu a peroxidação lipídica, o que contribuiu para melhorar

reação inflamatória, por sua vez, possivelmente contribuindo para a redução da produção de TGF- β e atenuando as alterações fibróticas.

As lesões causadas por bleomicina em camundongos de tipo selvagem resultam numa perda significativa de EC-SOD intersticial e um acúmulo de EC-SOD no fluido de revestimento alveolar (FATTMAN; et al, 2001). A constatação de que camundongos nocautes reduziu EC-SOD e aumentou a fibrose em resposta à bleomicina sugerem que a redução de EC-SOD intersticial após a lesão induzida por bleomicina pode contribuir com o estresse oxidativo na matriz extracelular, promovendo ainda mais a resposta fibrótica. Bleomicina após a lesão poderá ainda contribuir para o stress oxidativo na matriz extracelular, que promove ainda mais a resposta fibrótica (GAO; et al, 2008). Qi, Den hartog e Bast (2009), demonstraram que o $O_2^{\cdot-}$ gerado a partir de xantina e de xantina oxidase ativa fibroblastos pulmonares aumentando a liberação de TGF- β 1 e colágeno foi evitado pela eliminação SOD extracelular e intracelular, respectivamente. A detecção *in situ* das enzimas antioxidantes e produção de ROS levou Inghilleri et al. (2006) sugerir que a ativação concomitante de enzimas antioxidantes não é suficiente para eliminar a carga oxidante induzida pelos danos pulmonares causados pela bleomicina.

A SOD age como a primeira linha de defesa antioxidante nas células e na matriz extracelular o que sugere que a sua redução contribuiu para uma maior deposição de colágeno e pela perda de EC-SOD (FATTMAN; et al, 2001; PETERSEN; et al, 2004) e pelo acúmulo de radicais superóxido (INGHILLERI; et al, 2006).

Apesar dos níveis de GST reduzirem em 7 dias após a instilação de bleomicina, aos 21 dias observou-se um aumento de 45%. Já foi descrito que enzimas antioxidantes de fase II estão reduzidas em ratos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina (SABA; et al, 2013; SRIRAM; KALAYARASAN; SUDHANDIRAN, 2009).

A GST integra um grupo de enzimas antioxidantes de fase II transcritas pelo fator nuclear de eritróide 2 (Nrf2) que atuam como enzimas antioxidantes indiretas que dentre outras funções tem um importante papel de proteção contra o desequilíbrio redox (WALTERS; CHO; KLEEBERGER, 2008; HYBERTSON; et al, 2011) em doenças inflamatórias (KIM; et al, 2010), desta forma o Nrf2 é um antioxidante essencial para a limitação da fibrose pulmonar induzida por bleomicina (CHO; REDDY; KLEEBERGER, 2006; KIKUCHI; et al, 2010). Nós sugerimos que na fibrose pulmonar a GST mantém a sua função protetora agindo em um tempo mais tardio na tentativa de

proteger o pulmão quando as enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx tiveram sua ação inibida.

A bleomicina causa fibrose pulmonar em camundongos em 21 dias, entretanto, uma das desvantagens desse modelo é que há uma resolução espontânea da fibrose e um retorno do pulmão a um estado quase fisiológico com fibrose mínima após 28 dias, ao contrário do que ocorre em pacientes cuja lesão é irreversível (MOELLER; et al, 2008; MOURATIS; AIDINIS, 2011; MAHER, 2012), desta forma sugerimos que essa ação tardia da GST pode ser caracterizada como um início de recuperação desses animais, entretanto mais estudos devem ser realizados com o objetivo de fundamentar a participação da GST como um importante fator de recuperação da fibrose em camundongos C57BL/6, uma vez que a fibrose pulmonar em humanos é irreversível. Os níveis de nitrito estavam aumentados em 14 (20%) e 21 dias (60%), este aumento progressivo pode estar relacionado negativamente a atividade SOD como proposto por Dweik (2005), em que o O_2^- poderia ter sido previamente convertida em peróxido de nitrito ($ONOO^-$), com uma razão constante 3.5 vezes mais rápido do que a dismutação de O_2^- pela SOD. Embora não seja um radical livre, o $ONOO^-$ é uma espécie de vida curta muito mais reativa do que o O_2^- que em concentrações elevadas resulta em dano oxidativo destruindo constituintes celulares, oxidando lipídios da membrana, tióis, proteínas e DNA (GIRI; et al, 2002) sendo um dos fatores causadores fibrose pulmonar (ROMANSKA; et al, 2000). Na fibrose são observados altos níveis de ON exalado e no BALF (CHEN; et al, 2003; GURUJEYALAKSHMI; WANG; GIRI, 2000), desta forma torna-se importante investigar a via de dano nitrosativo.

Nossos resultados corroboram com os de Santos-Silva et al. (2012) que apresentou redução nos níveis de SOD, CAT e GPx após 21 dias. Isso ocorreu provavelmente devido a inativação das enzimas antioxidantes por oxidantes (RAHMAN; BISWAS; KODE, 2006). Sugerimos que na fibrose pulmonar essas enzimas estão desreguladas a partir do 7º dia devido a presença da inflamação que age causando um aumento de oxidantes que levará a uma redução das enzimas com o passar dos dias levando à fibrose pulmonar (ODAJIMA; et al, 2010; REN; et al, 2007).

5.1 Desenvolvimento de fibrose no enfisema induzido por elastase

No enfisema pulmonar acredita-se que o reparo tecidual pode estar alterado induzindo aumento da expressão gênica de elastase levando a degradação dos septos alveolares (RENNARD, 1999). Essas alterações podem ser observadas a partir de 14 dias após a instilação de elastase em que há uma destruição de septos alveolares e um aumento do espaço alveolar e do diâmetro alveolar médio característico de enfisema pulmonar leve (KINOSHITA; et al, 2007; PARAMESWARAN; et al, 2009). Nesta fase, ainda há ação das enzimas antioxidantes SOD e GPx, entretanto os níveis de nitrito e de peroxidação lipídica estão elevados caracterizando que nesta fase começa a ocorrer dano oxidativo com presença de inflamação (LANZETTI; et al, 2012), que embora apresente um papel mais importante na fase aguda da doença ainda encontra-se agindo com presença de IL-1 β e IL-6 em 14 dias (RHEE; et al, 2011). Em 14 dias há uma alteração na histoarquitetura pulmonar sem a presença de um componente inflamatório significativo, uma vez que essa fase é intermediária entre a inflamação (7 dias) e o pico de enfisema (21 dias). Com base nestas evidências, para avaliar os efeitos da fibrose pulmonar na presença de uma doença inflamatória de base a bleomicina foi administrada 14 dias após a instilação intranasal de elastase.

As alterações histológicas desse modelo podem ser observadas na figura 15. Nesse modelo foi observada uma redução na densidade de volume de septo, e um aumento na densidade de volume de alvéolos e no diâmetro alveolar médio característico de enfisema pulmonar a partir de 7 dias após instilação de bleomicina. Na análise do micro-sirius observou-se que no grupo bleomicina e no grupo PPE + BLEO após 21 dias há presença significativa de fibras de colágeno característico de fibrose pulmonar. Quando a bleomicina está associada à elastase nós observamos que a deposição de colágeno aumenta gradualmente até 14 dias, momento em que a fibrose passa a coexistir com o enfisema, com aumento de células mononucleadas e de colágeno semelhante à fibrose isolada. Entretanto após 21 dias há uma degradação da matriz extracelular fazendo com que a fibrose se apresente de maneira focal. Nós sugerimos que isso ocorre provavelmente devido a ação de MMPs no enfisema pulmonar que culminará com a atenuação da fibrose nesses grupos. Nossos resultados mostram que quando a bleomicina é administrada após a elastase a fibrose passa a

coexistir com o enfisema, e ambas as doenças apresentam-se distribuídas de maneira difusa no pulmão.

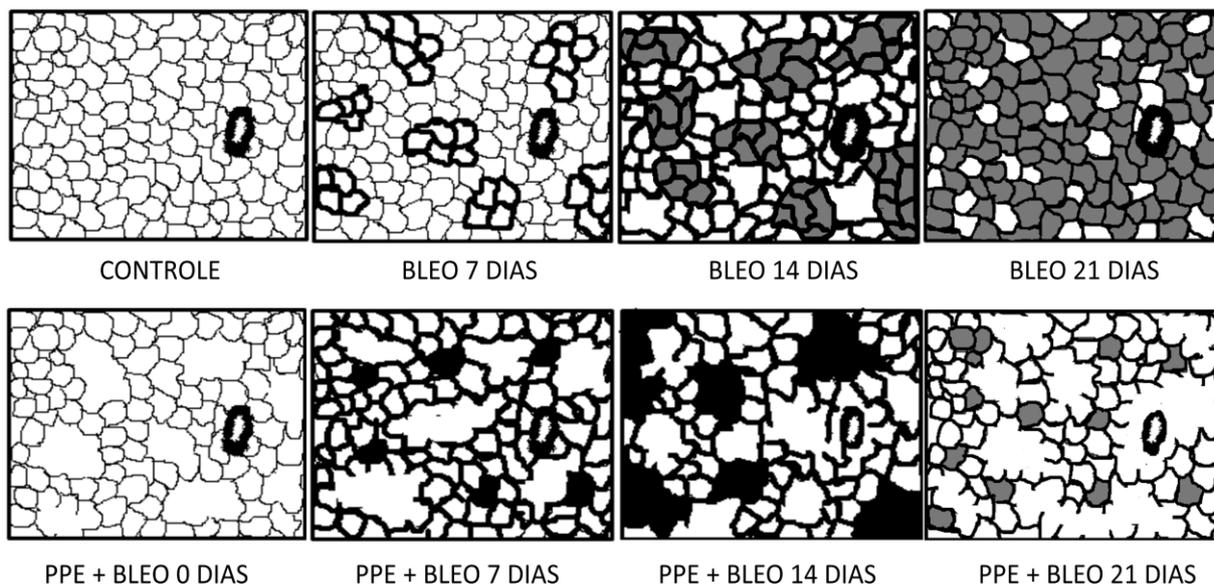


Figura 15.-. Esquema mostrando o que ocorre no pulmão nos grupos BLEO e PPE + BLEO. Nos grupos BLEO é possível observar um aumento inicial na matriz extracelular (linhas escuras) a partir de 7 dias. A fibrose pulmonar ocorreu a partir de 14 dias. Nos grupos PPE + BLEO é possível observar enfisema pulmonar, um aumento da matriz extracelular e presença de algumas áreas normais em 7 dias. Em 14 dias observa-se uma evolução do enfisema e da fibrose pulmonar, com o aumento da matriz extracelular sem áreas normais e em 21 dias, o enfisema pulmonar foi mais grave, com a presença de fibrose pulmonar distribuída em focos.

Estudo animal utilizando ratos observou que a presença de colágeno tipo I é maior que o colágeno tipo III 21 dias após a instilação de bleomicina (REISE; LAST, 1983). Nós observamos através do picro-sirius em luz polarizada que no grupo BLEO após 21 dias o colágeno encontra-se mais difuso e menos compactado, já no grupo PPE + BLEO 21 dias, percebemos uma presença mais abundante de colágeno mais compactado ao redor da árvore respiratória. O modelo animal de bleomicina mostra uma regressão da fibrose pulmonar a partir de 28 dias. Nós sugerimos que isso começa a acontecer a partir de 21 dias com presença de colágeno mais difuso no grupo BLEO 21 dias, entretanto, na fibrose associada à inflamação após 21 dias a presença de fibras colágenas mais compactadas mostra que a fibrose pulmonar possivelmente não irá regredir nesse grupo, sendo um bom modelo para mimetizar a fibrose pulmonar que ocorre em seres humanos.

Seguindo o padrão observado em grupos com fibrose pulmonar, nos grupos PPE + BLEO a IL-1 β apresentou-se elevada após 7 dias, tendo seus níveis reduzidos com o passar dos dias. A elastase promove inflamação aguda aumentando a expressão e

atividade da IL-1 β que se mantém do primeiro ao sétimo dia em animais C57BL/6 (INOUE; KOIKE; TAKANO, 2010; KATSHA; et al, 2011). Outro estudo utilizando a mesma linhagem, via de administração e dosagem de elastase que o nosso observou uma inflamação aguda com aumento dos níveis de IL-6 e IL-1 β a partir de 24h (COUILLIN; et al, 2009) e os níveis de IL-6 se mantém elevados após 14 e 21 dias (LAGENTE; et al, 2008). Sugerimos que na fibrose associada a uma doença inflamatória a inflamação atua também inicialmente não sendo responsável pela progressão da fibrose pulmonar.

A IL-6 é conhecida como mediadora de muitos processos inflamatórios no pulmão e o recrutamento desregulado tem contribuído para a patogênese de vários distúrbios respiratórios (RINCON; IRVIN, 2012). Mantendo o padrão observado na fibrose pulmonar os níveis de IL-6 estavam elevados aos 7 dias reduzindo após 14 e 21 dias. Entretanto, no grupo PPE + BLEO a IL-6 apresentou-se elevada apenas após 14 dias. Nosso resultado mostrou-se diferente do que já foi descrito, em que após 7 dias da instilação intratraqueal de bleomicina em camundongos fêmeas C57BL/6 houve um aumento de IL-6, reduzindo após 14 dias (BRAUN; et al, 2010). Esses resultados mostram que no grupo PPE + BLEO a resposta inflamatória da IL-6 encontra-se mantida até um tempo mais tardio.

Nos grupos PPE + BLEO os níveis de CAT apresentaram-se reduzidos no 7° dia e os de SOD no 14° dia. Esses resultados mostram que esse grupo segue o padrão observado nos grupos que receberam apenas bleomicina em que se percebeu uma redução nos níveis de CAT a partir do 7° dia (ODAJIMA; et al, 2010) e uma redução de SOD que ocorre no 7° dia e se mantém no 14° dia (YILDIRIM; et al, 2006; REN; et al, 2007). Após 21 dias as enzimas antioxidantes apresentaram-se reduzidas, inclusive a GST. Sugerimos que tanto na fibrose isolada quanto associada a uma doença inflamatória de base a ação das enzimas antioxidantes se mantém inibida pelo provável aumento de agentes oxidantes, entretanto a fibrose associada a uma doença inflamatória mostra-se mais grave uma vez que a proteção antioxidante de fase II mostra-se comprometida neste grupo.

A GST atua de forma diferente na presença de uma doença inflamatória de base, isso porque ela já se encontrava aumentada nos grupos PPE + BLEO 7 e 14 dias, reduzindo seus níveis após 21 dias. A atuação da GST nos dias 7 e 14 ocorreu porque além da fibrose pulmonar já existia o enfisema que nessa fase já está instalado, sugerimos que a ação da GST nesses dias deve-se a presença do enfisema e não da

fibrose uma vez que ela é consumida nesse grupo após 21 dias possivelmente devido a uma redução na transcrição de Nrf2.

O óxido nítrico é a principal ERN encontrada *in vivo*, em altas concentrações exerce toxicidade quando se combina com o O^{2-} formando ONOO₂. O nitrito é um marcador indireto de ON e se apresenta aumentado em pacientes com fibrose pulmonar (RIHAK; et al, 2010; BOYER; et al, 2011). Nossos resultados corroboram com esses estudos uma vez que tanto no grupo bleomicina quanto no grupo PPE + BLEO houve um aumento progressivo dos níveis de nitrito. Isso sugere que o ON em altos níveis contribui para a progressão da fibrose pulmonar quando ela apresenta-se isolada ou associada a uma doença inflamatória de base.

CONCLUSÃO

A administração de bleomicina associada a uma doença inflamatória prévia causa fibrose pulmonar com características histológicas que diferem da fibrose pulmonar causada apenas com o uso da bleomicina, uma vez que as fibras de colágeno se apresentam de maneira mais compacta podendo indicar que nesse modelo ao contrário do que ocorre na administração isolada de bleomicina a fibrose pulmonar não regride. Embora sejam necessários mais estudos esse modelo pode ser utilizado como um modelo de fibrose pulmonar que mimetiza o que ocorre em seres humanos em que a fibrose é irreversível. Além disso, concluímos que a resposta inflamatória inicial inibiu a ação do sistema antioxidante e elevou os níveis de óxido nítrico contribuindo para o agravamento da lesão.

REFERÊNCIAS

ABID, S.H.; MALHOTRA, V.; PERRY, M.C. Radiation-induced and chemotherapy-induced pulmonary injury. *Curr Opin Oncol*, v.13, n.4, p.242-8, 2001.

ADAMALI, H.I.; MAHER, T.H. Current and novel drug therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Drug Des Devel Ther*, v.6, p.261-72, 2012.

ARTAUD-MACARI, E. et al. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Nuclear Translocation Induces Myofibroblastic Dedifferentiation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Antioxidants & redox signaling*, v.18, n.1, p.66-79, 2013.

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

BANNISTER, J.V.; BANNISTER, W.H.; ROTILIO, G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem*, v.22, n.2, p.111-80, 1987.

BARGAGLI, E. et al. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: a review. *Respir Med*, v.103, n.9, p.1245-56, 2009.

BARLO, N.P. et al. Genetic variability in the IL1RN gene and the balance between interleukin (IL)-1 receptor agonist and IL-1beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol*, v.166, n.3, p.346-51, 2011.

BOYER, L. et al. Role of nitric oxide synthases in elastase-induced emphysema. *Lab Invest*, v.91, n.3, p.353-62, 2011.

BRAUN, R.K. et al. Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis through pre-treatment with collagen type V. *J Heart Lung Transplant*, v.29, n.8, p.873-80, 2010.

BRADDOCK, M.; QUINN, A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov*, v.3, n.4, p.330-9, 2004.

BRINGARDNER, B.D. et al. The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*, v.10, n.2, p.287-301, 2008.

CASTRO, P. et al. Inhibition of interleukin-1beta reduces mouse lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke. *Eur J Pharmacol*, v.498, n.1-3, p.279-86, 2004.

CHANDLER, D.B.; HYDE, D.M.; GIRI, S.N. Morphometric estimates of infiltrative cellular changes during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Am J Pathol*, v.112, p.170-7, 1983.

CHEN, X.L. et al. Role of endogenous peroxynitrite in pulmonary injury and fibrosis induced by bleomycin A5 in rats. *Acta Pharmacol Sin*, v.24, n.7, p.697-702, 2003.

CHEN, J.; STUBBE, J. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer*, v.5, n.2, p. 102-12, 2005.

CHO, H.Y.; REDDY, S.P.; KLEEBERGER, S. R. Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, v.8, n.(1-2), p.76-87, 2006.

CHUNG, K.F. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl*, v.34, p.50s-54s, 2001.

COUILLIN, I. et al. IL-1R1/MyD88 signaling is critical for elastase-induced lung inflammation and emphysema. *J Immunol*, v.183, n.12, p.8195-202, 2009.

DE-TORRES, J.P. et al. Smokers with CT Detected Emphysema and No Airway Obstruction Have Decreased Plasma Levels of EGF, IL-15, IL-8 and IL-1ra. *PLoS One*, v.8, n.4, p.e60260, 2013.

DE MOURA, R.S. et al. Addition of acai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. *Food Chem Toxicol*, v.49, n.4, p.855-63, 2011.

DE RAEVE, H.R. et al. Decreased Cu,Zn-SOD activity in asthmatic airway epithelium: correction by inhaled corticosteroid in vivo. *Am J Physiol*, v.272, n.(1 Pt 1), p. L148-54, 1997.

DOMAJ, W. et al. Chronic obstructive pulmonary disease and oxidative stress. *Curr Pharm Biotechnol*, v.7, n.2, p.117-23, 2006.

DUFFIELD, J.S. et al. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu Rev Pathol*, v.8, p.241-76, 2013.

DUNNILL, M.S. Evaluation of a Simple Method of Sampling the Lung for Quantitative Histological Analysis. *Thorax*, v.19, p.443-8, 1964.

DWEIK, R.A. Nitric oxide, hypoxia, and superoxide: the good, the bad, and the ugly!. *Thorax*, v.60, n.4, p.265-7, 2005.

ELLISEN, L.W. Smoking and emphysema: the stress connection. *Nat Med*, v.16, n.7, p.754-5, 2010.

FATTMAN, C.L. et al. Altered expression of extracellular superoxide dismutase in mouse lung after bleomycin treatment. *Free Radic Biol Med*, v.31, p.1198-1207, 2001.

FISCHER, B.M.; PAVLISKO, E.; VOYNOW, J.A. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. *International Journal of COPD*, v.6, p.413-21, 2011.

FLOHE, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, v.105, p.114-21, 1984.

FORONJY, R.F. et al. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, v.173, n.6, p.623-31, 2006.

- GAO, F. et al. Extracellular superoxide dismutase in pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*, v.10, n.2, p.343-54, 2008.
- GAO, Y. et al. Baicalein attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats through inhibition of miR-21. *Pulm Pharmacol Ther*, v.30, p.1-6, 2013.
- GASSE, P. et al. IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production in pulmonary inflammation leading to late fibrosis. *PLoS One*, v.6, n.8, p.e23185, 2011.
- GIOVANNONI, G. 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, n.(Pt 2), p.193-8, 1997.
- GIRI, S.N. et al. Abrogation of bleomycin-induced lung fibrosis by nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine in mice. *Nitric Oxide*, v.7, n.2, p.109-18, 2002.
- GOGALI, A.; WELLS, A.U. New pharmacological strategies for the treatment of pulmonary fibrosis. *Ther Adv Respir Dis*, v.4, n.6, p.353-66, 2010.
- GOLDKLANG, M.P.; MARKS, S.M.; GIRI, S.N. Second hand smoke and COPD: lessons from animal studies. *Front Physiol*, v.4, p.30, 2013.
- GOODYEAR-BRUCH, C.; PIERCE, J.D. Oxidative stress in critically ill patients. *Am J Crit Care*, v.11, n.6, p.543-51, 2002.
- GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, v.126, n.1, p.131-8, 1982.
- GURUJEYALAKSHMI, G.; WANG, Y.; GIRI, S.N. Suppression of bleomycin-induced nitric oxide production in mice by taurine and niacin. *Nitric Oxide*, v.4, n.4, p.399-411, 2000.
- HESTERBERG, T.W. et al. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis: correlation of biochemical, physiological, and histological changes. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.60, p.360-7, 1981.
- HIRATA, H. et al. Effects of Th2 pulmonary inflammation in mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Respirology*, v.13, n.6, p.788-98, 2008.
- HOMER, R.J. et al. Modern concepts on the role of inflammation in pulmonary fibrosis. *Arch Pathol Lab Med*, v.135, n.6, p.780-8, 2011.
- HOSHINO, T.M. et al. Role of proinflammatory cytokines IL-18 and IL-1beta in bleomycin-induced lung injury in humans and mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.41, n.6, p.661-70, 2009.
- HYBERTSON, B.M. et al. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med*, v.32, n.(4-6), p.234-46, 2011.

INGHILLERI, S. et al. In situ assessment of oxidant and nitrogenic stress in bleomycin pulmonary fibrosis. *Histochem Cell Biol*, v.125, p.661-69, 2006.

INOUE, K.; KOIKE, E.; TAKANO, H. Comprehensive analysis of elastase-induced pulmonary emphysema in mice: effects of ambient existing particulate matters. *Int Immunopharmacol*, v.10, n.11, p.1380-9, 2010.

JANSSEN, L.J.; CATALI, A.; HELLI, P. The pulmonary biology of isoprostanes. *Antioxid Redox Signal*, v.7, n. (1-2), p.244-55, 2005.

KALAYARASAN, S.; SRIRAM, N.; SUDHANDIRAN, G. 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), p.1142-53, 2008.

KAMINSKI, N. et al. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.97, n.4, p.1778-83, 2000.

KASAHARA, Y. et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest*, v.106, n.11, p.1311-9, 2000.

KATSHA, A.M. et al. Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model. *Mol Ther*, v.19, n.1, p.196-203, 2011.

KHOR, T.O. et al. Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Cancer Res*, v.66, n.24, p.11580-4, 2006.

KIKUCHI, N. et al. Nrf2 protects against pulmonary fibrosis by regulating the lung oxidant level and Th1/Th2 balance. *Respir Res*, v.11, p.31, 2010.

KIM, J.; CHA, Y.N.; SURH, Y.J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res*, v.690, n. (1-2), p.12-23, 2010.

KINOSHITA, T. et al. Thioredoxin prevents the development and progression of elastase-induced emphysema. *Biochem Biophys Res Commun*, v.354, n.3, p.712-9, 2007.

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

KINNULA, V.L.; MYLLARNIEMI, M. Oxidant-antioxidant imbalance as a potential contributor to the progression of human pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*, v.10, n.4, p.727-38, 2008.

KIRKHAM, P.; RAHMAN, I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther*, v.111, n.2, p.476-94, 2006.

KLIMENT, C.R.; OURY, T.D. Oxidative stress, extracellular matrix targets, and idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med*, v.49, n.5, p.707-17, 2010.

KOLB, M. et al. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*, v.107, n.12, p.1529-36, 2001.

LAGENTE, V. et al. Oxidative stress is an important component of airway inflammation in mice exposed to cigarette smoke or lipopolysaccharide. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v.35, n.(5-6), p.601-5, 2008.

LAI, C.C. et al. Idiopathic pulmonary fibrosis in Taiwan - a population-based study. *Respir Med*, v.106, n.11, p.1566-74, 2012.

LANZETTI, M. et al. Oxidative stress and nitrosative stress are involved in different stages of proteolytic pulmonary emphysema. *Free Radic Biol Med*, v.53, n.11, p.1993-2001, 2012.

LAPPALAINEN, U. et al. Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.32, n.4, p.311-8, 2005.

LAWRENCE, T. et al. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med*, v.7, n.12, p.1291-7, 2001.

LOUKIDES, S.; BAKAKOS, P.; KOSTIKAS, K. Oxidative stress in patients with COPD. *Curr Drug Targets*, v.12, n.4, p.469-77, 2011.

MACNEE, W. Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest*, v.117, 5 Suppl 1, p. 303S-17S, 2000.

MACNEE, W.; RAHMAN, I. Oxidants/antioxidants in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, v.50, Suppl 1, p. S53-8, 1995.

MAHENDRAN, S.; SETHI, T. Treatments in idiopathic pulmonary fibrosis: time for a more targeted approach?. *QJM*, v.105, n.10, p.929-34, 2012.

MAHER, T.M. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathobiology of novel approaches to treatment. *Clin Chest Med*, v.33, n.1, p.69-83, 2012.

MANOURY, B. et al. The absence of reactive oxygen species production protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Respir Res*, v.6, p.11, 2005.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH I. 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, p.6056-63, 1969.

MEINEL, F.G. et al. Diagnosing and mapping pulmonary emphysema on x-ray projection images: incremental value of grating-based x-ray dark-field imaging. *PLoS One*, v.8, n.3, p.e59526, 2013.

MOELLER, A. et al. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol*, v.40, n.3, p.362-82, 2008.

- MONTALDO, C. et al. Bronchoalveolar glutathione and nitrite/nitrate in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, v.19, n.1, p.54-8, 2002.
- MOODLEY, Y.P. et al. Fibroblasts isolated from normal lungs and those with idiopathic pulmonary fibrosis differ in interleukin-6/gp130-mediated cell signaling and proliferation. *Am J Pathol*, v.163, n.1, p.345-54, 2003.
- MOORE, B.B.; HOGABOAM, C.M. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v.294, n.2, p. L152-60, 2008.
- MOURATIS, M.A.; AIDINIS, V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Curr Opin Pulm Med*, v.17, n.5, p.355-61, 2011.
- MOZAFFARIAN, A. et al. Mechanisms of oncostatin M-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *J Immunol*, v.181, n.10, p.7243-53, 2008.
- NOBLE, P.W.; HOMER, J.R. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights into pathogenesis. *Clin Chest Med*, v.25, n.4, p.749-58, 2004.
- ODAJIMA, N. et al. The role of catalase in pulmonary fibrosis. *Respir Res*, v.11, p.183, 2010.
- O'DONNELL, R. et al. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax*, v.61, n.5, p.448-54, 2006.
- O'DONOGHUE, R.J. et al. Genetic partitioning of interleukin-6 signalling in mice dissociates Stat3 from Smad3-mediated lung fibrosis. *EMBO Mol Med*, v.4, n.9, p.939-51, 2012.
- OSBURN, W.O.; KENSLER, T.W. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res*, v.659, n.(1-2), p.31-9, 2008.
- PABST, M.J.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferase A. A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration. *J Biol Chem*, v.249, n.22, p.7140-7, 1974.
- PARAMESWARAN, H. et al. Three-dimensional measurement of alveolar airspace volumes in normal and emphysematous lungs using micro-CT. *J Appl Physiol*, v.107, n.2, p.583-92, 2009.
- PETERSEN, S.V. et al. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation. *J Biol Chem*, v.279, p.13705-10, 2004.
- PETTY, T.L. The history of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, v.1, n.1, p.3-14, 2006.

- POTTIER, N. et al. Relationships between early inflammatory response to bleomycin and sensitivity to lung fibrosis: a role for dipeptidyl-peptidase I and tissue inhibitor of metalloproteinase-3? *Am J Respir Crit Care*, v.176, n.11, p.1098-107, 2007.
- PUGLIESE, P.T. The skin, free radicals, and oxidative stress. *Dermatol Nurs*, v.7, n.6, p.361-9, 1995.
- QAMAR, W.; SULTANA, S. Farnesol ameliorates massive inflammation, oxidative stress and lung injury induced by intratracheal instillation of cigarette smoke extract in rats: an initial step in lung chemoprevention. *Chem Biol Interact*, v.176, n.(2-3), p.79-87, 2008.
- QI ,S.; DEN HARTOG, G.J.; BAST, A. Superoxide radicals increase transforming growth factor-beta1 and collagen release from human lung fibroblasts via cellular influx through chloride channels. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.237, p.111-8, 2009.
- RAFII, R. et al. A review of current and novel therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *J Thorac Dis*, v.5, n.1, p.48-73, 2013.
- RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol*, v.533, n. (1-3), p.222-39, 2006.
- RAHMAN, I.; MACNEE, W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax*, v.53, n.7, p.601-12, 1998.
- RAISFELD, I.H. Role of terminal substituents in the pulmonary toxicity of bleomycins. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.57, n.3, p.355-66, 1981.
- RAJASEKARAN, S. et al. Expression profiling of genes regulated by Fra-1/AP-1 transcription factor during bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *BMC Genomics*, v.14, p.381, 2013.
- REDDY, S.P. The antioxidant response element and oxidative stress modifiers in airway diseases. *Curr Mol Med*, v.8, n.5, p.376-83, 2008.
- REISER, K.M.; LAST, J.A. Type V collagen. Quantitation in normal lungs and in lungs of rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Biol Chem*, v.258, p.269-75, 1983.
- REN, Y.X. et al. (5R)-5-hydroxytryptolide (LLDT-8) protects against bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Acta Pharmacol Sin*, v.28, n.4, p.518-25, 2007.
- RENNARD, S.I. Inflammation and repair processes in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, v.160, n.(5 Pt 2), p.S12-6, 1999.
- REPINE, J.E.; BAST, A.; LANKHORST, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*, v.157, n.(2 pt 1), p.341-57, 1997.
- REYNOLDS, H.Y. Lung inflammation and fibrosis: an alveolar macrophage-centered perspective from the 1970s to 1980s. *Am J Respir Crit Care Med*, v.171, n.2, p.98-102, 2005.

- RHEE, C.K. et al. Effect of nilotinib on bleomycin-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis in mice. *Respiration*, v.82, n.3, p.273-87, 2011.
- RIHAK, V. et al. Nitrite in exhaled breath condensate as a marker of nitrosative stress in the airways of patients with asthma, COPD, and idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Lab Anal*, v.24, n.5, p.317-22, 2010.
- RINCON, M.; IRVIN, C.G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int J Biol Sci*, v.8, p.1281-90, 2012.
- ROMANSKA, H.M. et al. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in fibroblasts parallels the onset and progression of fibrosis in an experimental model of post-transplant obliterative airway disease. *J Pathol*, v.191, n.1, p.71-7, 2000.
- RUEFF-BARROSO, C.R. et al. Organ-related cigarette smoke-induced oxidative stress is strain-dependent. *Med Sci Monit*, v.16, n.7, p.218-26, 2010.
- SABA, et al. Ellagic acid attenuates bleomycin and cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in Wistar rats. *Food Chem Toxicol*, v.58, p.210-19, 2013.
- SACHITHANANDAN, A.; BADMANABAN, B. Contemporary surgical management of advanced end stage emphysema: an evidence based review. *Med J Malaysia*, v.67, n.3, p.253-8, 2012.
- SAITO, F. et al. Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.38, n.5, p.566-71, 2008.
- SALVEMINI, D.; RILEY, D.P.; CUZZOCREA, S. SOD mimetics are coming of age. *Nat Rev Drug Discov*, v.1, p.367-74, 2002.
- SANTOS-SILVA, M.A. Redox imbalance and pulmonary function in bleomycin-induced fibrosis in C57BL/6, DBA/2, and BALB/c mice. *Toxicol Pathol*, v.40, n.5, p.731-41, 2012.
- SHARAFKHANEH, A.; HANANIA, N.A.; KIM, V. Pathogenesis of emphysema: from the bench to the bedside. *Proc Am Thorac Soc*, v.5, n.4, p.475-7, 2008.
- SIKIC, B.I. et al. Quantification of bleomycin pulmonary toxicity in mice by changes in lung hydroxyproline content and morphometric histopathology. *Cancer Res*, v.38, p.787-92, 1978.
- SRIRAM, N.; KALAYARASAN, S.; SUDHANDIRAN, G. Epigallocatechin-3-gallate augments antioxidant activities and inhibits inflammation during bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis through Nrf2-Keap1 signaling. *Pulm Pharmacol Ther*, v.22, p.221-26, 2009.
- STEVENSON, C.S.; KOCH, L.G.; BRITTON, S. L. Aerobic capacity, oxidant stress, and chronic obstructive pulmonary disease-a new take on an old hypothesis. *Pharmacol Ther*, v.110, n.1, p.71-81, 2006.

- STRAMER, B.M.; MORI, R.; MARTIN, P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol*, v.127, n.5, p.1009-17, 2007. 127(5):
- TANAKA, K. et al. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v.298, p. L348-L360, 2010.
- TANAKA, J. et al. Preventive effect of irbesartan on bleomycin-induced lung injury in mice. *Respir Investig*, v.51, n.2, p.76-83, 2013.
- THANNICKAL, V.J. et al. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med*, v.55, p.395-417, 2004.
- TSAI, J.J. et al. Nrf2 regulates haematopoietic stem cell function. *Nat Cell Biol*, v.15, n.3, p.309-16, 2013.
- TUDER, R.M.; PETRACHE, I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*, v.122, n.8, p.2749-55, 2012.
- VALENCA, S.S. et al. L-NAME and L-arginine differentially ameliorate cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Pulm Pharmacol Ther*, v.24, n.5, p.587-94, 2011.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, v.39, n.1, p.44-84, 2007.
- WALTERS, D.M.; CHO, H.Y.; KLEEBERGER, S.R. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2. *Antioxid Redox Signal*, v.10, n.2, p.321-32, 2008.
- WEIBEL, E.R.; HSIA, C.C.; OCHS, M. How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry. *J Appl Physiol*, v.102, n.1, p.459-67, 2007.
- WHITE, E.S.; MANTOVANI, A.R. Inflammation, wound repair, and fibrosis: reassessing the spectrum of tissue injury and resolution. *J Pathol*, v.229, n.2, p.141-4, 2013.
- WOOD, A.M.; STOCKLEY, R.A. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, v.7, p.130, 2006.
- WYNN, T.A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med*, v.208, n.7, p.1339-50, 2011.
- YAREN, H. et al. Lung toxicity of nitrogen mustard may be mediated by nitric oxide and peroxynitrite in rats. *Res Vet Sci*, v.83, n.1, p.116-22, 2007.
- YILDIRIM, Z. et al. Preventive effect of melatonin on bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *J Pineal Res*, v.40, n.1, p.27-33, 2006.

ZHAO, L. et al. Neferine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol*, v.627, n.(1-3), p.304-12, 2010.

ZOLAK, J.S.; DE ANDRADE, J.A. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Immunol Allergy Clin North Am*, v.32, n.4, p.473-85, 2012.

ZUCKERMAN, J.E.; HOLLINGER, M.A.; GIRI, S.N. Evaluation of antifibrotic drugs in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *J Pharmacol Exp Ther*, v.213, p.425-31, 1980.

ANEXO 1 - Comitê de ética em pesquisa



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

Rio de Janeiro, 26 de Julho de 2012

Prezado Professor Samuel dos Santos Valença

A Comissão de Ética com Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado: **"O Estresse Oxidativo como Regulador de Alterações Morfológicas no Enfisema Combinado com a Fibrose: Qual a Participação do Fator Nuclear Relacionado à Eritróide 2 (NRF2)"**, onde é previsto protocolo com utilização de animais, foi aprovado por esta comissão no dia **26/07/2012**, sob o número de referência **DFBCICB063**, este protocolo tem validade de 3 anos.

Atenciosamente;

Prof. Paulo de Assis Melo
Presidente da Comissão de Ética com Animais - CCS

Prof. Paulo de Assis Melo
Presidente da CEUA - CCS
Comitê de Ética com Uso
de Animais em Pesquisa de CCS

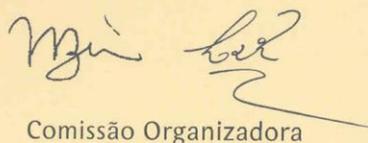
ANEXO 2- Apresentação em congresso



Certificamos que

o resumo 08.034 - ENFISEMA COM FOCOS DE FIBROSE CAUSA DESEQUILÍBRIO REDOX E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS: UM MODELO DE ELASTASE ASSOCIADO À BLEOMICINA. Trajano LADSN, Trajano ETL, Pires KMP, Mendonça MSDA, Lanzetti M, Guilherme RDF, Benjamim CF, Figueiredo RT, Valença SDS, Porto LC. Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ., foi apresentado sob a forma de painel na

XXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada no Centro de Convenções do Hotel Gloria em Caxambu - MG, de 21 a 24 de agosto de 2013.



Comissão Organizadora



Ministério da
Saúde



ANEXO 3- Submissão do artigo

PLOS ONE: Notification of co-authorship on manuscript [Elastase modifies bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice] [↑](#) [↓](#) [×](#)

Para ver mensagens relacionadas a esta, [agrupar mensagens por conversa](#).



PLOS ONE (plosone@plos.org) [Adicionar aos contatos](#) 21/10/2013 ▶

Para: Larissa Alexandra Silva Neto Trajano ✕

Dear MSc Larissa Alexandra Trajano,

You are receiving this email because you have been listed as an author on a manuscript recently submitted to PLOS ONE and entitled "Elastase modifies bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice".

The corresponding author for the submission process is: Prof Samuel Santos Valenca

The full author list for the submission is: Larissa Alexandra Silva Neto Trajano; Eduardo Tavares Lima Trajano; Karla Maria Pereira Pires; Manuella Lanzetti; Morena Scopel Amorim Mendonça; Rodrigo Tinoco Figueiredo; Rafael Freitas Guilherme; Cláudia Farias Benjamim; Samuel Santos Valenca, PhD; Luis Cristóvão Porto

If you are not aware of this submission, or if you should not be listed as a co-author, then please contact the journal office at plosone@plos.org.

Kind regards,
PLOS ONE
<http://pone.edmgr.com/>