

Fabíola Santos Zambon Robertoni

Estudo dos efeitos da instilação nasal de colágeno tipo V na inflamação e remodelamento pulmonar na DPOC experimental

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientadora: Dra. Walcy Paganelli Rosolia Teodoro

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes

(Versão corrigida. Resolução CoPGr n° 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2023

Fabíola Santos Zambon Robertoni

Estudo dos efeitos da instilação nasal de colágeno tipo V na inflamação e remodelamento pulmonar na DPOC experimental

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientadora: Dra. Walcy Paganelli Rosolia Teodoro

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Robertoni, Fabíola Santos Zambon
Estudo dos efeitos da instilação nasal de
colágeno tipo V na inflamação e remodelamento
pulmonar na DPOC experimental / Fabíola Santos
Zambon Robertoni. -- São Paulo, 2023.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.
Orientadora: Walcy Paganelli Rosolia Teodoro.
Coorientadora: Fernanda Degobbi Tenorio Quirino
dos Santos Lopes.

Descritores: 1.Doença pulmonar obstrutiva crônica
2.Tabagismo 3.Enfisema 4.Modelos animais
5.Autoimunidade 6.Colágeno tipo V 7.Tolerância
imunológica 8.Mediadores da inflamação

USP/FM/DBD-361/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, Daniel. O
melhor companheiro de vida
que eu poderia ter
encontrado. Como tenho
sorte! Que esse seja só mais
um dos inúmeros projetos que
ainda vamos concluir juntos.
Amo você.

AGRADECIMENTOS

“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com você.”

Carl Sagan

Foi uma jornada e tanto, meus amigos! Quase cinco anos incríveis e assustadores se passaram desde que começamos. Com a ajuda de vocês percorri um caminho de muitas incertezas, angústias, descobertas e alegrias. Juntos, passamos por uma pandemia arrasadora. Vivenciamos um período instável, com suspensão de projetos e sonhos, mas tivemos a sorte de sobreviver para continuar nossa trajetória nesse planeta.

Preciso começar meus agradecimentos por você, Dra. Clarice Olivo. Minha história aqui na FMUSP só existe porque você me apresentou a esse universo desafiador da pesquisa experimental. Mulher multitarefas e extremamente competente que tenho sorte de poder chamar de amiga. Obrigada por tantos anos de amizade!

Agradeço, carinhosamente, à Dra. Fernanda Lopes. Minha orientadora do mestrado, que me acolheu na pesquisa experimental quando eu não sabia nem o que era uma pipeta! Abriu as portas da faculdade para mim e, apesar de todas as minhas imperfeições, viu em mim potencial e aceitou fazer novamente uma parceria comigo. Minha coorientadora nesse doutorado, a quem serei grata, sempre.

Gratidão é o que eu sinto todos os dias pelo universo ter me presenteado com uma orientadora tão incrível quanto você, Dra. Walcy Teodoro. Um agradecimento mais que especial por ter confiado em mim para desenvolver esse projeto. Obrigada pelo suporte, pelo carinho e paciência infinita que teve comigo, assim como com todos os seus alunos e agregados. Ainda que o mundo esteja em ruínas, você encontra tempo e para nos ajudar nas aflições e sempre com um sorriso. Mulher polvo, que acolhe a todos e se dedica à ciência como poucos. É inspirador ver seu amor e zelo por esse ofício tão desafiador e incerto que é ser cientista nesse país. Espero ter correspondido às suas expectativas.

Agradeço também à Dra Ana Paula Velosa, melhor coorientadora extraoficial que eu poderia desejar ter. Obrigada pelo carinho, paciência e amizade. Exemplo de ética e profissionalismo que eu admiro demais! Seu apoio e dedicação foram fundamentais para que eu chegasse até o final dessa jornada. Será sempre lembrada por mim com muito carinho.

Obrigada Solange Carrasco pela amizade, pelas trocas e pela parceria nas dores de tentar padronizar minhas análises de citometria. Obrigada por estar sempre disposta a ensinar e ajudar. Foi muito bom poder contar com você nessa jornada!

Sou grata também à Dra. Maria Sato por ter nos recebido em seu laboratório e pela parceria nesse projeto. Obrigada pela paciência e por estar sempre disposta a nos ajudar e esclarecer nossas dúvidas. Sua ajuda foi fundamental para o enriquecimento desse projeto e serei para sempre grata por isso.

Agradeço à Dra. Luana Oliveira pela paciência e disponibilidade em nos ajudar no planejamento, execução e análises realizadas na citometria de fluxo. Sem a sua ajuda não teríamos conseguido incluir no projeto essa parte tão fundamental e interessante. Admiro seu profissionalismo e competência e agradeço todo o tempo que disponibilizou para tirar minhas dúvidas.

Um agradecimento mais que especial à minha amiga querida, Dra. Camila. Dividir minha jornada com você tornou esse caminho possível. Obrigada por ser ombro, ouvido e a melhor companhia que eu poderia ter nos momentos mais pesados. Espero que nossa jornada juntas, dentro e fora dessa faculdade, seja longa e próspera!

Dra Denise Frediani, obrigada por toda a ajuda nas questões e aflições da minha biomol. Você sempre me acolheu com respeito e carinho, e sua paciência e delicadeza ficarão marcadas para mim como exemplo a seguir.

Dra Thais de Lima, te agradeço pelo apoio e por sempre estar disposta a tirar minhas dúvidas quando estávamos tentando solucionar os dramas da citometria de fluxo. Obrigada por disponibilizar seu tempo e seus recursos.

Agradeço a parceria e apoio de todos os amigos e colegas do Lim20. Dra. Beatriz, Francine, Juliana, Alyne, Suellen, Alex, Camila, Julia, Cristiane, Juliana Tiyaki, Thayse, Vitória, obrigada! E tantos outros com quem aprendi, que me ajudaram e com quem troquei experiências e compartilhei vivências nesses longos anos. O apoio, as conversas e risadas nunca serão esquecidos!

Minhas colegas que são como uma família, família científica de adotados da mãeorientadora Walcy. Obrigada! Zelita, Lizandre, Thays, Vitória, Laís, Amanda, Jaíne, Vítor, Valéria e Jurandir. Agradeço pela paciência em me ensinar, por toda a ajuda, pela parceria, pelas risadas, pelo ombro amigo e por terem me acompanhado nessa jornada. Vocês são incríveis!

Agradeço ao Antônio pela paciência e toda ajuda que tive para lidar com os animais na execução desse projeto. Foi fundamental para que tivéssemos sucesso.

Dr. Sérgio, agradeço o apoio, as ótimas conversas, e por toda a ajuda na coleta de sangue para as avaliações de gasometria dos animais. Obrigada pelo exemplo e por sempre me incentivar a continuar na pesquisa.

Obrigada Dr Ricardo Fuller pelo entusiasmo com que acompanhou essa jornada, pelo respeito e pelas sugestões importantes que nos deu para a conclusão desse projeto.

Mayra, obrigada pelo socorro nos momentos de crise e pela disposição para nos ajudar sempre com um grande sorriso e disposição.

Não posso deixar de incluir aqui minha banda, família do coração que a música me deu. Fernanda, Renata, Gisleine e Marcelo, sem vocês o mundo seria cinza, sem graça demais. Sou mais feliz por ter vocês na minha vida. Saber que sempre posso contar com vocês foi fundamental para sobreviver a essa pandemia e ao meu doutorado. Nossa música manteve minha saúde mental e o coração quentinho. Obrigada!

Obrigada minha querida cunhada e irmã, Alessandra. Seu carinho, a forma como sempre me acolheu, valorizou, e o incentivo constante que recebi de você são parte da estrutura que me dá forças para continuar minha jornada em ser uma pessoa melhor.

Lucas, obrigada! Meu irmão mais velho e a quem sempre recorro para me orientar nas decisões de vida. Obrigada pelo incentivo e por me ouvir quando tive dúvidas em iniciar essa jornada.

Fabrcio, obrigada por continuar a me apoiar e me amar mesmo quando não tive tempo ou disposição para te apoiar em suas questões. Saiba que tenho orgulho da pessoa incrível que você é e que ter você no meu mundo fez com que eu chegasse até aqui.

Meus pais, Fábio e Liz, saibam que não chegaria aqui sem vocês. Agradeço por terem se esforçado além das possibilidades para que eu tivesse uma boa educação e por me proporcionarem um lar para crescer com saúde. Obrigada por me ensinarem princípios de integridade e correção. Amo vocês.

Esses anos conturbados que passamos afastou muitas pessoas, mas me reaproximou de amigas muito queridas. Veronica e Marilia, obrigada por fazerem parte da minha vida e por torcerem por mim.

Obrigada, Daniel, meu amor! Pelo incentivo, por aceitar quem eu sou, por me apoiar mesmo quando eu tenho surtos de ansiedade, por ser minha estrutura. Obrigada por aguentar esses últimos meses, especialmente.

Pedrinho, incrível menino! Agradeço por me presentear a cada interação com sua sagacidade e criatividade, sua inteligência e bondade. Você me faz acreditar que o futuro desse mundo pode ser belo. Espero que seus sonhos se tornem realidade, mais que isso, espero que nunca pare de sonhar!

Agradeço a cada paciente que tive a oportunidade de atender na minha carreira de fisioterapeuta. Aprendi muito com todos e levo um pedacinho de cada um no meu coração! Espero ter feito diferença na vida de cada um e promovido não só saúde, mas acolhimento. Todos os percalços da vida de pesquisador valem a pena porque no final são as vidas dos nossos pacientes que impactamos positivamente!

Se esqueci de alguém aqui peço perdão. Podem não ter sido mencionados, mas serão lembrados.

EPÍGRAFE

“Não devemos acreditar nos muitos que dizem que só as pessoas livres devem ser educadas, deveríamos antes acreditar nos filósofos que dizem que apenas as pessoas educadas são livres”

Epicteto - Discursos

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

- Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)
- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de símbolos

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Definição da DPOC.....	2
2.2. Fatores de risco para a DPOC	2
2.3. Manifestações pulmonares e fisiopatologia da DPOC	3
2.4. Desequilíbrio protease-antiprotease	3
2.5. Inflamação.....	4
2.6. Estresse oxidativo.....	7
2.7. Apoptose.....	7
2.8. Manifestações sistêmicas da DPOC	8
2.9. Modelos experimentais para estudo da DPOC	9
2.10. A matriz extracelular no pulmão	11
2.11. Os tipos de colágeno da matriz extracelular no pulmão.....	12
2.12. O colágeno tipo V no pulmão	13
2.13. Indução de tolerância periférica pela via das mucosas.....	14
2.14. Colágeno tipo V e autoimunidade em processos patológicos	16
2.15. Justificativa.....	17
3. OBJETIVOS	19

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Local do Estudo.....	20
4.2. Aspectos Éticos	20
4.3. Modelo Animal	20
4.4. Grupos Experimentais	21
4.5. Protocolo para indução de tolerância nasal ao colágeno tipo V	22
4.6. Modelo de exposição à fumaça de cigarro	22
4.7. Avaliação da mecânica do sistema respiratório.....	24
4.8. Coleta e processamento de amostras de sangue	25
4.9. Coleta e análise do fluido do lavado broncoalveolar (FLBA).....	26
4.10. Análises histológicas	26
4.10.1. Coleta e fixação dos pulmões para análise histológica	26
4.10.2. Avaliação Morfométrica - Intercepto linear médio	28
4.10.3. Análise Morfométrica do Edema Pulmonar	29
4.10.4. Imuno-histoquímica para Células e Citocinas	29
4.10.5. Imunofluorescência para o colágeno dos tipos I, III e V	31
4.10.6. Método de resorcina-fucsina de Weigert.....	32
4.10.7. Quantificação de células do sistema imune.....	32
4.10.8. Quantificação do colágeno dos tipos I, III e V	33
4.10.9. Quantificação das fibras elásticas.....	34
4.11. Avaliação da expressão gênica.....	34
4.11.1. Criopreservação dos tecidos e extração de RNA	34
4.11.2. Avaliação da integridade do RNA.....	35
4.11.3. Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras	36
4.11.4. Transcrição Reversa	36
4.11.5. Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR	37

4.12.	Imunofenotipagem de células T por citometria de fluxo.....	39
4.13.	Preparo das amostras biológicas e dosagem de citocinas.....	40
4.13.1.	Preparo dos homogenatos e Dosagem de proteínas totais.....	40
4.13.2.	Quantificação de citocinas por citometria de fluxo.....	41
4.13.3.	Quantificação de citocinas por ELISA.....	41
4.14.	Quantificação de colágeno total pela dosagem de 4-hidroxiprolina.....	42
4.15.	Análise Estatística.....	43
5.	RESULTADOS.....	44
5.1.	Mecânica do sistema respiratório.....	44
5.2.	Análise das células inflamatórias no lavado broncoalveolar.....	44
5.3.	Avaliação da estrutura do parênquima pulmonar.....	46
5.4.	Avaliação do edema no eixo peribroncovascular.....	47
5.5.	Proteínas fibrilares da matriz extracelular do pulmão.....	49
5.6.	Resposta imunológica.....	55
5.7.	Análise de Expressão Gênica no Tecido Pulmonar.....	61
5.8.	Imunofenotipagem de células T no baço e linfonodos mediastinais.....	65
5.9.	Análise da dosagem de citocinas por CBA.....	73
5.10.	Análise da dosagem de citocinas por ELISA.....	77
5.11.	Resumo dos achados.....	78
6.	DISCUSSÃO.....	80
7.	CONCLUSÕES.....	102
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
	ANEXO 1.....	122

Lista de Figuras

Figura 1. Linha do tempo do protocolo experimental.	23
Figura 2. Esquema ilustrativo da caixa de exposição à fumaça de cigarro.....	24
Figura 3. Esquema ilustrativo da avaliação da mecânica do sistema respiratório.	25
Figura 4. Esquema ilustrativo da caixa utilizada para fixação dos pulmões.....	27
Figura 5. Modelo do retículo de Weibel utilizado nas análises morfométricas e exemplo de sua aplicação na avaliação do enfisema.....	28
Figura 6. Representação da delimitação do espaço peribroncovascular e células CD3 positivas (setas). .	33
Figura 7. Mecânica do sistema respiratório nos grupos experimentais.....	44
Figura 8. Contagem de células totais e macrófagos no BALF e fotomicrografias representativas de células totais no BALF..	45
Figura 9. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar distal dos animais do estudo.....	46
Figura 10. Representação gráfica dos valores do Intercepto Linear Médio.	47
Figura 11. Fotomicrografias representativas da região broncovascular dos animais.....	48
Figura 12. Quantificação do edema peribroncovascular e fotomicrografias representativas da região broncovascular dos pulmões.....	49
Figura 13. Imunofluorescência dos colágenos I, III e V no parênquima pulmonar.	50
Figura 14. Quantificação da proporção de colágeno tipo I no pulmão.	51
Figura 15. Quantificação da proporção de colágeno tipo III no pulmão.	52
Figura 16. Quantificação da proporção de colágeno tipo V no pulmão.	53
Figura 17. Fotomicrografias representativas das fibras elásticas no parênquima pulmonar.....	54
Figura 18. Representação gráfica da concentração de 4-hidroxiprolina no tecido pulmonar.	55
Figura 19. Imunomarcção para células Galectina-3 ⁺ no parênquima pulmonar.	56
Figura 20. Imunomarcção para células TGF- β ⁺ no parênquima pulmonar.....	57
Figura 21. Imunomarcção para células IL-17 ⁺ no parênquima pulmonar.....	58
Figura 22. Imunomarcção para células IL-10 ⁺ no parênquima pulmonar.....	59
Figura 23. Imunomarcção para células FOXP3 ⁺ no parênquima pulmonar.	60

Figura 24. Imunomarcção para células CD3 ⁺ na região peribroncovascular.	61
Figura 25. Ilustração gráfica da expressão gênica das cadeias de colágeno.	62
Figura 26. Ilustração gráfica da expressão gênica para a fibrilina 1.....	63
Figura 27. Ilustração gráfica da expressão gênica para as metaloproteinases de matriz.	64
Figura 28. Ilustração gráfica da expressão gênica para Foxp3 e Ror γ t.	65
Figura 29. Estratégia de análise para avaliação de linfócitos T no baço e nos linfonodos mediastinais. ..	66
Figura 30. Subpopulações de linfócitos TCD4 nos linfonodos mediastinais.	67
Figura 31. Subpopulações de linfócitos TCD8 nos linfonodos mediastinais.	68
Figura 32. Subpopulações de linfócitos TCD4 nos baços.	69
Figura 33. Subpopulações de linfócitos TCD8 nos baços.	70
Figura 34. Caracterização de subpopulações de células Treg FoxP3 ⁺ (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺) nos linfonodos mediastinais dos animais.	71
Figura 35. Caracterização de subpopulações de células Treg FoxP3 ⁺ (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺) no baço dos animais.	72
Figura 36. Caracterização de células Treg LAP ⁺ nos linfonodos mediastinais e no baço dos animais....	73
Figura 37. Citocinas inflamatórias dosadas por CBA em homogenatos de pulmão.....	74
Figura 38. IL-10 e IL-17A dosadas por CBA em homogenatos de pulmão.	75
Figura 39. Citocinas inflamatórias dosadas por CBA em homogenatos de baço.	75
Figura 40. IL-10 e IL-17A dosadas por CBA em homogenatos de baço.....	76
Figura 41. Citocinas inflamatórias dosadas por CBA no FLBA..	76
Figura 42. Citocinas inflamatórias dosadas por ELISA nos homogenatos de pulmão.....	77
Figura 43. Citocinas inflamatórias dosadas por ELISA nos homogenatos de baço.	77
Figura 44. Esquema representativo dos mecanismos avaliados.	79

Lista de Tabelas

Tabela 1. Relação dos grupos experimentais.....	21
Tabela 2. Anticorpos primários utilizados nos estudos de imuno-histoquímica.....	30
Tabela 3. Anticorpos primários utilizados nos estudos de imunofluorescência.	31
Tabela 4. Relação das sequências de oligonucleotídeos estudados.	38
Tabela 5. Painel para marcação de Linfócitos T e Treg.	40
Tabela 6. Resumo dos resultados relevantes.	78

Lista de Abreviaturas e Siglas

α 1-AT	Alfa-1 Antitripsina
BALF	<i>Bronchoalveolar Lavage Fluid</i>
C57BL/6	Camundongo de linhagem isogênica
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD3 ⁺	Linfócito T CD3 ⁺
CD4 ⁺	Linfócito T CD4 ⁺
CD8 ⁺	Linfócito T CD8 ⁺
CD20 ⁺	Linfócito B CD20 ⁺
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO	Monóxido de Carbono
Col I	Colágeno do Tipo I
Col III	Colágeno do Tipo III
Col V	Colágeno do Tipo V
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
CXCL 10	Ligante 10 da Quimiocina da família CXC
DAB	Diaminobenzidina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DC	Células Dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FLBA	Fluido do Lavado Broncoalveolar
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FOXP3	<i>Forkhead Box P3</i> (Fator de Transcrição para Célula T Regulatória)
GAGs	Glicosaminoglicanos
GOLD	<i>The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
Gtis	Resistência Tecidual do Pulmão

H&E	Coloração Hematoxilina-eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
Htis	Elastância Tecidual do Pulmão
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
IgG	Imunoglobulina G
LIM	Laboratório de Investigação Médica da FMUSP
Lm	Intercepto Linear Médio
LTB ₄	leucotrieno B ₄
MEC	Matriz Extracelular
mEPHX1	Epóxido Hidrolase Microsomal
MMP	Metaloproteinase de Matriz
NE	Elastase Neutrofílica
PBS	Tampão Fosfato-salino
PCR	Proteína C Reativa
PPE	Elastase Pancreática de Porco
Raw	Resistência das vias aéreas
RFO	Resorcina-Fucsina oxidada pela Oxona
RNA	Ácido Ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RT-qPCR	Reação de Transcrição Reversa seguida da Reação de Polimerização em Cadeia, em Tempo Real, do inglês “ <i>Real Time Reverse-Transcription</i> ”
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TGF- β	Fator de Crescimento Tumoral Beta
Th1	Células T Auxiliares Tipo 1
Th17	Células T Auxiliares Tipo 17
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Treg	Células T Regulatórias
VEF1	Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Lista de símbolos

cmH ₂ O	centímetro de água
g	grama
kg	quilograma
M _e	média
M _d	mediana
mg	miligrama
ml	mililitro
min	minuto
v/v	volume a volume
ppm	partes por milhão
°C	graus Celsius
µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrômetro

RESUMO

Robertoni FSZ. Estudo dos efeitos da instilação nasal de colágeno tipo V na inflamação e remodelamento pulmonar na DPOC experimental [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O tabagismo, principal causa da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), induz uma inflamação pulmonar persistente, que resulta na degradação da matriz extracelular (MEC) pulmonar. Este dano leva à exposição do colágeno tipo V (Col V), um antígeno normalmente escondido do sistema imunológico, desencadeando uma resposta autoimune, previamente verificada na patogênese de algumas doenças pulmonares. Caso a resposta anti-Col V tenha um papel também na DPOC, a indução de tolerância imune a esse colágeno pode ser promissora no tratamento dessa doença. Nesse sentido, nossa proposta foi de verificar os efeitos da indução de tolerância nasal ao Col V na modulação do processo inflamatório e do remodelamento pulmonar em um modelo murino subagudo de DPOC. Para isso, camundongos machos C57BL/6 (6–8 semanas) foram divididos em 3 grupos: um exposto à fumaça de cigarro por 4 semanas (F), um tolerado para Col V e exposto à fumaça de cigarro por 4 semanas (FT), e um mantido em ar ambiente pelo mesmo período (C). Foram avaliados: mecânica respiratória; alargamento dos espaços aéreos (Lm); edema peribroncovascular; células no fluido do lavado broncoalveolar (FLBA); proporções de colágeno dos tipos I, III e V, de fibras elásticas e dosagem de 4-hidroxiprolina no pulmão; células Galectina-3⁺, CD3⁺, IL-17⁺, IL-10⁺, TGF-β⁺ e FOXP3⁺ no tecido pulmonar; expressão gênica de colágeno dos tipos I, III e V, fibrilina, metaloproteinasas de matriz (MMPs 8, 12 e 13) e de fatores de transcrição Foxp3 e Rorγt no pulmão; imunofenotipagem de células T em baço e linfonodos mediastinais; citocinas inflamatórias (IFN, IL-6, IL-10, IL-17A e TNF) em homogenatos de pulmão e baço. A indução de tolerância nasal ao Col V preservou os pulmões dos animais das alterações estruturais causadas pela fumaça de cigarro. Em contraposição ao aumento significativo do Lm nos animais do grupo F em relação ao C, os animais tolerados (FT) apresentaram valores significativamente menores de Lm do que o grupo F (p=0,0032), mesmo padrão do edema peribroncovascular (p=0,043). Houve também uma tendência de aumento na proporção do Col I (p=0,0513) e do Col V (p=0,07) nos animais do grupo FT em relação ao F, fibras que reduziram

significativamente no grupo F. A proteção do parênquima pulmonar pela tolerância parece ter relação com a promoção de um microambiente imunossupressor nesse tecido. Isso se evidencia pela tendência de redução da ativação de macrófagos (MAC2) no grupo FT com relação ao grupo F ($p=0,0721$), pelo aumento significativo de células FOXP3⁺ no grupo FT em relação ao grupo F ($p=0,034$) e de células IL-10⁺ no grupo FT com relação ao grupo C ($p=0,0034$), e também pela inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias no grupo FT em relação ao F (INF γ , $p=0,0073$; IL-6, $p=0,0009$; TNF α , $p=0,0845$; IL-17, $p=0,002$). A tolerância promoveu, ainda, aumento significativo de linfócitos Treg sistêmicos no grupo FT ($p=0,0465$) com relação ao grupo C. A indução da tolerância nasal ao Col V inibiu a resposta inflamatória, prevenindo o remodelamento pulmonar na DPOC experimental, sugerindo que a autoimunidade ao Col V tem de fato um papel na patogênese da DPOC.

Palavras-chave: Doença pulmonar obstrutiva crônica. Tabagismo. Enfisema. Modelos animais. Autoimunidade. Colágeno tipo V. Tolerância imunológica. Mediadores da inflamação.

ABSTRACT

Robertoni FSZ. Study of type V collagen nasal instillation effects on inflammation and lung remodeling in experimental COPD [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Cigarette smoking, the main cause of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), induces persistent lung inflammation, which results in the degradation of the lung extracellular matrix (ECM). This damage leads to exposure of type V collagen (Col V), an antigen normally hidden from the immune system, triggering an autoimmune response, previously verified in the pathogenesis of some lung diseases. If the anti-Col V response also plays a role in COPD, the induction of immune tolerance to this collagen may be promising in the treatment of this disease. In this sense, our proposal was to verify the effects of Col V-induced nasal tolerance in modulating the inflammatory process and lung remodeling in a subacute murine model of COPD. For this, male C57BL/6 mice (6–8 weeks) were divided into 3 groups: one exposed to cigarette smoke for 4 weeks (F), one tolerated for Col V and exposed to cigarette smoke for 4 weeks (FT), and one kept in room air for the same period (C). The following were evaluated: respiratory mechanics; enlargement of air spaces (Lm); peribronchovascular edema; cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF); proportions of types I, III and V collagen, elastic fibers and 4-hydroxyproline dosage in the lung; Galectin-3⁺, CD3⁺, IL-17⁺, IL-10⁺, TGF-β⁺ and FOXP3⁺ cells in lung tissue; gene expression of collagen types I, III and V, fibrillin, matrix metalloproteinases (MMPs 8, 12 and 13) and transcription factors Foxp3 and Rorγt in the lung; immunophenotyping of T cells in spleen and mediastinal lymph nodes; inflammatory cytokines (IFN, IL-6, IL-10, IL-17A and TNF) in lung and spleen homogenates. The induction of nasal tolerance to Col V preserved the animals' lungs from structural changes caused by cigarette smoke. In contrast to the significant increase in Lm in animals in group F in relation to C, tolerated animals (FT) presented significantly lower Lm values than group F (p=0.0032), the same pattern as peribronchovascular edema (p= 0.043). There was also a tendency for an increase in the proportion of Col I (p=0.0513) and Col V (p=0.07) in the animals in the FT group in relation to the F, fibers that were significantly reduced in the F group. tolerance appears to be related to the promotion of an immunosuppressive microenvironment in this

tissue. This is evidenced by the tendency towards reduced macrophage activation (MAC2) in the FT group in relation to the F group ($p=0.0721$), the significant increase in FOXP3⁺ cells in the FT group in relation to the F group ($p=0.034$) and of IL-10⁺ cells in the FT group compared to group C ($p=0.0034$), and also by the inhibition of the secretion of pro-inflammatory cytokines in the FT group compared to F (INF γ , $p=0.0073$; IL-6, $p=0.0009$; TNF α , $p=0.0845$; IL-17, $p=0.002$). Tolerance also promoted a significant increase in systemic Treg lymphocytes in the FT group ($p=0.0465$) in relation to group C. The induction of nasal tolerance to Col V inhibited the inflammatory response, preventing lung remodeling in experimental COPD, suggesting that autoimmunity to Col V plays a role in the pathogenesis of COPD.

Keywords: Chronic obstructive pulmonary disease. Cigarette smoke. Emphysema. Animal models. Autoimmunity. Type V collagen. Immune tolerance. Inflammation mediators.

1. INTRODUÇÃO

Por que investir no estudo de novas terapias para tratamento da DPOC?

As doenças respiratórias crônicas estão entre as principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo, atrás apenas de doenças cardiovasculares e neoplasias, entretanto, recebem relativamente pouca atenção e financiamento. A maioria das mortes por doenças respiratórias crônicas são decorrentes da DPOC (*Global Burden of Disease Study*, GBD 2017)¹. Os dados mais atuais disponíveis colocam a DPOC como terceira principal causa de mortalidade mundialmente, tendo sido responsável por 3,23 milhões de mortes em 2019, 6% do total das mortes no mundo². A DPOC é a doença respiratória crônica mais prevalente no mundo¹, prevalência que vem aumentando globalmente em termos absolutos³. Devido ao envelhecimento da população mundial e à exposição continuada aos fatores de risco para DPOC, são projetados aumentos na prevalência e no impacto dessa doença para as próximas décadas⁴.

Uma revisão sistemática e metanálise de estudos epidemiológicos observacionais, publicados até maio de 2018, mostrou uma prevalência de DPOC no Brasil de 17% entre adultos maiores de 40 anos⁵. De acordo com o painel de monitoramento das principais causas de morte, segundo método *Global Burden Disease/Brasil*, disponibilizado pelo Departamento de Análise em Saúde e Vigilância das Doenças Não Transmissíveis (DASNT/SVS/MS), a DPOC era em 2016 a quinta principal causa de morte no Brasil, entre todas as idades⁶. Centenas de milhares de pacientes com DPOC são internados anualmente, gerando tanto altos custos diretos ao Sistema de Saúde do país, tanto custos indiretos, como dias perdidos de trabalho, aposentadorias precoces, morte prematura e sofrimento familiar e social⁷.

Embora as terapias farmacológicas possam reduzir os sintomas, a frequência e severidade da DPOC, com possíveis efeitos benéficos nas taxas de declínio da função pulmonar e da mortalidade⁸, o tratamento para essa doença ainda é bastante insuficiente⁹. As terapias atuais visam melhorar a tolerância ao exercício e o estado geral de saúde, mas ainda não há cura nem terapias que impeçam a progressão da DPOC, tornando fundamentais as investigações em busca de tratamentos mais eficazes, a fim de aliviar o impacto clínico e econômico dessa doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Definição da DPOC

De acordo com o *The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD 2024), a DPOC é uma doença pulmonar heterogênea caracterizada por sintomas (dispneia, tosse, produção de expectoração e/ou exacerbações) devido a anomalias das vias respiratórias (bronquite, bronquiolite) e/ou alvéolos (enfisema) que causam obstrução persistente e muitas vezes progressiva do fluxo aéreo. Pacientes com DPOC apresentam diversos sintomas, como dispneia, fadiga, limitação de atividades, tosse, podendo sofrer exacerbações que influenciam seu estado de saúde e prognóstico. A DPOC frequentemente está associada a comorbidades, que influenciam o quadro clínico e prognóstico dos pacientes⁸.

2.2. Fatores de risco para a DPOC

De acordo com o GBD 2017¹, os principais fatores de risco para DPOC são tabagismo, incluindo o passivo, poluição do ar doméstico, material particulado ambiental, ozônio e partículas ocupacionais, que incluem pó de carvão, sendo a exposição à fumaça de cigarro o mais importante deles⁸. Estudos sugerem que, além dos fatores de risco ambientais, há fatores intrínsecos ao indivíduo envolvidos na patogênese da DPOC, como fatores genéticos, que podem aumentar a suscetibilidade individual para os efeitos adversos da fumaça do cigarro, ou alterar os processos normais de reparação pulmonar¹⁰.

Foi observado um risco aumentado para obstrução do fluxo aéreo em irmãos fumantes de pacientes com DPOC grave, o que sugere uma interação entre genética e fatores ambientais no desenvolvimento da DPOC¹¹. O fator de risco genético mais bem documentado é a deficiência hereditária de alfa-1 antitripsina (α 1-AT), um inibidor de serino-proteases¹². Além disso, diversas regiões genômicas que influenciam a suscetibilidade à DPOC já foram identificadas em estudos de associação genômica, como a região CHRNA3/CHRNA5/IREB2 no cromossomo 15q25, a região *HHIP*, o locus *FAM13A*, a região próxima a *RIN3*, além de regiões perto de *MMP12* e *TGFB2*¹³.

2.3. Manifestações pulmonares e fisiopatologia da DPOC

A fumaça de cigarro e outras partículas nocivas induzem estresse oxidativo, causando desequilíbrio homeostático, o que leva a inflamação no tecido pulmonar. A resposta inflamatória pulmonar parece estar alterada em pacientes que desenvolvem DPOC, tornando-se crônica e podendo induzir a destruição do parênquima pulmonar e a interrupção dos mecanismos normais de reparação e defesa, resultando em enfisema e fibrose das vias aéreas.⁸ A perda das ligações entre os alvéolos e pequenas vias aéreas e a destruição das paredes alveolares, leva ao alargamento dos espaços aéreos e estreitamento das pequenas vias aéreas, reduzindo assim o recolhimento elástico pulmonar e levando ao aprisionamento de gás e obstrução progressiva e irreversível ao fluxo aéreo¹⁰.

As alterações patológicas características da DPOC são encontradas nas vias aéreas, parênquima pulmonar e vasculatura pulmonar¹⁴, e incluem inflamação crônica, com aumento do número de tipos específicos de células inflamatórias em diferentes partes do pulmão, e alterações estruturais resultantes do processo de lesão e reparo repetidos. Em geral, as alterações inflamatórias e estruturais das vias aéreas aumentam com a gravidade da doença e persistem na cessação do tabagismo. A inflamação sistêmica pode estar presente e pode ter um papel nas múltiplas comorbidades encontradas em pacientes com DPOC¹⁵.

A DPOC é uma doença complexa que tem múltiplos mecanismos envolvidos no seu desenvolvimento e progressão, entre os quais estão incluídos o desequilíbrio entre proteases e antiproteases, a inflamação crônica, o estresse oxidativo e a apoptose de células estruturais¹⁶. Cada um desses mecanismos contribui de forma variável para o desenvolvimento da DPOC, o que pode explicar as diferentes formas de apresentação e gravidade da doença¹⁷.

2.4. Desequilíbrio protease-antiprotease

Um dos mecanismos que explica a destruição tecidual no enfisema é o desequilíbrio entre a atividade de proteases e antiproteases¹⁸, causado pela liberação aumentada de proteases por células inflamatórias recrutadas em decorrência da inalação da fumaça de cigarro.¹⁰ As proteases destroem as fibras constituintes do parênquima

pulmonar, acarretando perda das paredes alveolares e alargamento dos espaços aéreos, com conseqüente redução de elasticidade tecidual^{16;19}. Normalmente, essas enzimas proteolíticas são neutralizadas por antiproteases. Porém, já foi demonstrado que, em fumantes que desenvolvem DPOC, a produção de antiproteases pode ser insuficiente para neutralizar as proteases e evitar a lesão pulmonar²⁰.

Diversas proteases estão aumentadas na DPOC, incluindo serino-proteases (elastase neutrofílica²¹, catepsina G e proteinase 3²²), cisteíno proteinases (catepsinas B, K, L e S²²) e metaloproteinases de matriz - MMPs (MMP-1²³, MMP-8²⁴, MMP-9²³, MMP-12⁸, MMP-13²⁵). Macrófagos e neutrófilos de enfisematosos produzem MMPs, com atividades tanto colagenolítica quanto elastolítica, gerando peptídeos quimiotáticos que promovem recrutamento de mais macrófagos para o tecido. Em pacientes enfisematosos a MMP-1 (colagenase) e a MMP-9 (gelatinase B) estão aumentadas no FLBA. A MMP-9 também apresenta atividade aumentada no parênquima pulmonar desses pacientes, levando a maior atividade elastolítica no tecido²⁰.

As MMPs têm função de regulação da homeostase e da imunidade, e de remodelamento dos tecidos, sendo capazes de degradar todos os componentes da matriz extracelular (MEC) e da membrana basal. Elas regulam a liberação e ativação de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, peptídeos antibióticos e outras moléculas bioativas, participando, assim, em processos como imunidade inata e adaptativa, inflamação, angiogênese, remodelamento ósseo, e crescimento de neurites²⁶. Diversos estudos de enfisema, em animais e humanos, têm mostrado várias MMPs desempenhando papel importante no ataque a componentes proteicos da MEC no parênquima pulmonar^{27;28}. Estudos realizados por Janoff *et al.* (1982)²⁹ sugerem que até 50% da atividade elastolítica no FLBA de fumantes pode ser atribuída às MMPs.

2.5. Inflamação

A inflamação pulmonar do enfisema é caracterizada pelo aumento alveolar do número de macrófagos, neutrófilos, linfócitos T (predominantemente Tc1, Células Th1 e Th17) e células linfoides inatas recrutadas a partir da circulação¹⁵. Essas células e as células estruturais, incluindo células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, são estimuladas pela fumaça do cigarro. Uma vez ativadas, secretam uma variedade de

mediadores pró-inflamatórios, que interagem com as células das vias aéreas e parênquima pulmonar^{8;15}.

O número de células T na DPOC se correlaciona com a quantidade de destruição alveolar e a gravidade da obstrução ao fluxo aéreo. Há um aumento no número total de linfócitos T no parênquima pulmonar e nas vias aéreas centrais e periféricas, principalmente CD8⁺ (citotóxico) em pacientes enfisematosos. Células T CD8⁺ podem causar citólise e apoptose de células epiteliais alveolares, através da liberação de mediadores pró-inflamatórios como perforinas, granzima-B e fator de necrose tumoral- α (TNF- α)²⁰. Em fumantes, o número de linfócitos T CD8⁺ nas vias aéreas periféricas está significativamente correlacionado com o grau de limitação do fluxo aéreo, sugerindo um papel importante dessas células na fisiopatologia da DPOC³⁰.

Lee *et al.* (2007)³¹ mostraram que o enfisema é uma doença autoimune caracterizada pela presença de respostas de anticorpos antielastina e células T-auxiliares tipo 1 (Th1), que se correlacionam com a gravidade do enfisema. Estes achados ligam o enfisema à imunidade adaptativa contra um antígeno pulmonar específico e sugerem o potencial de patologia autoimune de outros tecidos ricos em elastina, como as artérias e a pele dos fumantes. Células T ativadas em pulmões enfisematosos exibem um fenótipo efetor predominantemente Th1 e expressam o receptor de quimiocinas CXCR3, que induz a liberação da quimiocina CXCL10 e, conseqüentemente, a liberação de MMPs^{32;33}.

Em estudos feitos por Lacoste *et al.* (1993)³⁴ e Keatings *et al.* (1996)³⁵, foi observado aumento de neutrófilos ativados no FLBA e em amostras de escarro, além de aumento nas concentrações do TNF- α e interleucina 8 (IL-8) no escarro de pacientes com DPOC. Estas células inflamatórias são responsáveis pela secreção de proteases, incluindo elastase neutrofílica (NE), envolvidas no aumento da produção de muco pelo epitélio das vias aéreas e na destruição das paredes alveolares. Fatores quimiotáticos incluindo IL-8 e leucotrieno B4 (LTB4) promovem a migração neutrofílica da circulação sistêmica para o trato respiratório. Em fumantes, a gravidade da limitação do fluxo aéreo está correlacionada com o aumento do número de neutrófilos e à gravidade da inflamação das vias aéreas^{20 36}.

Em enfisemas, há um aumento acentuado no número de macrófagos nas vias aéreas, nas regiões de lesão do parênquima pulmonar, no FLBA e no escarro^{20,37;38}, havendo também uma correlação entre o número destas células e a extensão do enfisema³⁸. Quando ativados pela fumaça de cigarro, os macrófagos liberam espécies reativas de oxigênio (EROs)²⁰, leucotrienos (LTB₄), prostaglandinas, citocinas (TNF- α , INF- γ), quimiocinas (IL-8), e MMPs^{20;39}. Os macrófagos alveolares de pacientes com DPOC secretam mais proteínas inflamatórias e têm maior atividade elastolítica quando expostos a fumaça do cigarro do que em fumantes normais⁴⁰.

O papel dos eosinófilos na DPOC ainda não está muito bem esclarecido²⁰, mas evidências crescentes apoiam o papel da inflamação eosinofílica em alguns pacientes, apontando os eosinófilos como um potencial biomarcador⁴¹. Em exacerbações agudas, há aumento na concentração de eosinófilos nas vias aéreas em comparação com a DPOC estável. Tratar a inflamação eosinofílica tem se mostrado uma estratégia promissora em certos fenótipos de DPOC, sendo os agentes que bloqueiam a IL-5 ou seu receptor, os tratamentos biológicos em estágio mais avançado de desenvolvimento⁴².

A resposta epitelial à fumaça do cigarro, na DPOC, pode representar uma tentativa do epitélio das vias aéreas se proteger e reparar a lesão sofrida⁴³. A lesão pode levar ao desenvolvimento de metaplasia escamosa, um efeito que já foi correlacionado com a obstrução ao fluxo aéreo⁴⁴. As células epiteliais, ao serem ativadas pela fumaça de cigarro, produzem alguns mediadores inflamatórios, como o TNF- α e a IL-8, além do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), que induz fibrose local nas pequenas vias aéreas⁴⁵. Além disso, a expressão dos fatores de crescimento de fibroblastos 1 e 2 está aumentada no epitélio brônquico de pacientes com DPOC⁴⁶.

A lesão pulmonar inflamatória pode romper a matriz extracelular, liberando, assim, alguns produtos que resultam na produção de quimiocinas e citocinas por macrófagos e células dendríticas, estabelecendo, assim, condições para ativação do sistema imune adaptativo⁴⁷. As células dendríticas maduras, quando ativadas, são direcionadas para os linfonodos locais, onde apresentam antígenos para as células T naive⁴⁸ induzindo sua diferenciação em células T efetoras CD4⁺ Th1 e CD8⁺ citolíticas⁴⁷.

2.6. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo e a diminuição da capacidade antioxidante têm um papel fundamental na patogênese da DPOC, tendo sido documentados aumentos nos parâmetros de estresse oxidativo no ar expirado condensado, escarro e sangue de pacientes com DPOC⁴⁹. A alta concentração de radicais livres na fumaça do cigarro desempenha um papel importante no desenvolvimento da DPOC, já que esses radicais são capazes de danificar as células epiteliais do trato respiratório inferior por meio da lesão oxidativa de lipídios de membrana, proteínas, carboidratos e DNA⁵⁰.

As células inflamatórias geram espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que levam ao estresse oxidativo quando há um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes⁵¹. Há muitas evidências de que um aumento do estresse oxidativo ocorre nos pulmões de pacientes com DPOC, levando à lesão direta às células pulmonares, hipersecreção de muco, inativação de antiproteases e aumento da inflamação pulmonar⁵². Medições diretas da carga oxidativa em espaços aéreos mostraram aumento das concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)⁵³ e de isoprostano-8⁵⁴ no condensado expiratório de pacientes com DPOC, especialmente nas exacerbações da doença⁵³. Macrófagos alveolares de fumantes liberam mais EROs do que células de não fumantes e a capacidade antioxidante do plasma é diminuída pelo tabagismo⁵¹. O tabagismo também foi associado ao influxo de neutrófilos nos espaços aéreos e alterações no equilíbrio oxidante/antioxidante no plasma e nos espaços aéreos de indivíduos fumantes⁵⁵.

2.7. Apoptose

A apoptose é um mecanismo regulador de morte celular, que permite a eliminação pelo organismo de células indesejadas, danificadas ou infectadas. Ela é fundamental na manutenção da homeostase dos tecidos e se mantém em equilíbrio com a proliferação e diferenciação celulares⁵⁶. É considerada um mecanismo importante na patogênese da DPOC⁵⁶, podendo persistir mesmo após a cessação do tabagismo¹⁸. Na DPOC, a inflamação persistente e o estresse oxidativo causados pela exposição à fumaça de cigarro levam a destruição tecidual devido a uma ruptura do equilíbrio entre

apoptose e reposição de células estruturais do parênquima pulmonar^{17;56} incluindo células alveolares, epiteliais brônquicas e endoteliais¹⁸

O aumento da apoptose em células alveolares do enfisema foi verificado em pulmões de pacientes com DPOC²⁴ e em um modelo de enfisema pulmonar dependente de apoptose pelo bloqueio do Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) em roedores⁵⁷. Em outro estudo, os autores encontraram aumento de apoptose e diminuição da proteína VEGF nos pulmões de pacientes com enfisema induzido pelo cigarro⁵⁸. Tuder *et al.* (2003)⁵⁹ demonstraram a interação entre o estresse oxidativo e a apoptose no enfisema experimental. Seu grupo induziu enfisema em ratos Sprague-Dawley através do bloqueio dos receptores do VEGF e verificou que a inibição do estresse oxidativo por meio da administração de um mimético da superóxido dismutase anulou a apoptose de células alveolares, impedindo o desenvolvimento do enfisema.

2.8. Manifestações sistêmicas da DPOC

A DPOC está associada à inflamação pulmonar e sistêmica, e é provável que esta última contribua significativamente para a fisiopatologia de numerosos efeitos extrapulmonares da doença, ou componentes sistêmicos da DPOC⁶⁰. A inflamação sistêmica tem sido implicada na patogênese da maioria (senão de todos) dos efeitos sistêmicos da DPOC descritos até o momento, incluindo perda de peso, disfunção do músculo esquelético, doença cardiovascular, depressão e osteoporose^{61;62;63;64;65}.

Um estudo de espirometria da DPOC severa a muito severa mostrou que a redução do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) estava associada à inflamação sistêmica, detectada pelo aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 e proteína C reativa (PCR), que foi associada à diminuição da resistência ao exercício e a pior estado de saúde⁶⁶. O estresse oxidativo associado à inflamação, leva à apoptose, disfunção e perda de massa muscular esquelética, o que pode explicar a relação entre inflamação e perda de massa magra na DPOC⁶⁷. Em pacientes com DPOC estável e comprometimento da musculatura respiratória, foi relatado aumento da expressão muscular do TNF- α e do gene e proteína IL-6⁶⁸.

A fumaça do cigarro, por si só, pode causar inflamação sistêmica. No entanto, foram demonstradas evidências de inflamação sistêmica em ex-fumantes⁶⁹, e que a

persistência da inflamação após a cessação do tabagismo também ocorre nos pulmões de pacientes com DPOC^{70:71}. Isso indica que o tabagismo pode não ser o único fator que induz a inflamação sistêmica na DPOC e que pode ser que a patogênese da DPOC inclua um componente autoimune⁷².

A osteoporose é altamente prevalente em pacientes com DPOC, sendo uma das principais comorbidades sistêmicas da doença, no entanto, a relação causal e o elo molecular entre a DPOC e a osteoporose ainda não foram bem estabelecidos⁷³. O “extravasamento” do processo inflamatório pulmonar para a circulação, tem sido considerado como a causa das várias alterações inflamatórias sistêmicas e comorbidades na DPOC, incluindo a osteoporose⁷⁴. Estudos confirmaram que a osteopenia é uma característica da DPOC e está associada a um aumento do TNF- α circulante⁷⁵ o qual, juntamente com a IL-1, foi implicado na fisiopatologia da osteoporose⁷⁶ Baixa densidade mineral óssea e altas taxas de fratura têm sido demonstradas em pacientes com DPOC que não estão recebendo glicocorticoides sistêmicos⁷⁷.

2.9. Modelos experimentais para estudo da DPOC

Os modelos experimentais de DPOC representam uma ferramenta de grande importância, uma vez que possibilitam um melhor conhecimento dos mecanismos e respostas integradas de todo o organismo na evolução da doença e nas novas abordagens terapêuticas⁷⁸ Entretanto, a utilização destes modelos apresenta algumas limitações, visto que a doença não ocorre de forma espontânea e nem todas as características apresentadas em seres humanos conseguem ser mimetizadas experimentalmente^{78:79}.

A metodologia de instilação intratraqueal de papaína, proposto por Gross *et al.* (1964)⁸⁰ foi o primeiro modelo original que conseguiu reproduzir enfisema pulmonar experimental em ratos. A partir desse modelo, derivaram uma série de estudos, que levaram ao desenvolvimento de diferentes modelos de enfisema pulmonar induzido por instilação ou nebulização de outras enzimas proteolíticas, que resultaram em alterações histológicas e fisiológicas semelhantes às encontradas no enfisema em humanos⁸¹.

Existem atualmente três principais abordagens experimentais que visam mimetizar a DPOC, compreendendo a inalação de estímulos nocivos, a instilação

traqueal de enzimas degradantes de tecido para induzir lesões semelhantes às do enfisema e técnicas de manipulação genética que conduzem a um fenótipo semelhante ao da DPOC⁷⁸. O modelo que aparenta ser o mais próximo da doença humana é a exposição prolongada à fumaça de cigarro, já que é esta a principal responsável pelo desenvolvimento de enfisema em humanos^{78;21}. O primeiro modelo animal induzido pela fumaça de cigarro foi desenvolvido por Wright *et al.* (1990)⁸². Apesar de ser considerado o padrão ouro para modelos de enfisema, esse é um modelo caro e de progressão lenta da doença⁸² já que utiliza em geral uma exposição de 6 a 12 meses⁸³.

A predisposição genética para a DPOC é uma importante área de pesquisa, tendo sido caracterizadas diversas linhagens animais propensas a desenvolver lesões similares ao enfisema^{84;85;86}. Manipulações genéticas têm sido amplamente propostas como possíveis mimetizantes da DPOC^{87;88}. Estes modelos podem ser de grande ajuda na identificação das funções fisiológicas de genes distintos e dos mecanismos envolvidos na DPOC⁷⁸. Entretanto, as lesões similares ao enfisema ocorrem, nesses modelos, principalmente devido a uma deficiente maturação pulmonar e não por uma lesão do tecido adulto^{86;89}. Em alguns desses modelos, a deficiência de uma proteína também pode proteger o animal de indução de enfisema, ajudando a identificar mediadores pró-inflamatórios ou protetores importantes da doença^{78;90;91}.

O enfisema induzido por elastase é um modelo de fácil aplicação, altamente reprodutível e de baixo custo, já que uma única administração resulta rapidamente em características morfológicas e histológicas semelhantes à do enfisema, com distribuição homogênea das lesões^{18;92}. Este modelo se correlaciona com a deficiência genética de α 1-AT em humanos²¹. O enfisema induzido por elastase pancreática de porco (PPE) leva a alterações da função pulmonar, hipoxemia, redução na capacidade de exercício, perda de massa corpórea, hipertensão pulmonar e hipertrofia ventricular direita, que são características da DPOC em humanos^{90;93;94;95}. Após a lesão elastolítica, inicia-se imediatamente um alargamento dos espaços aéreos, seguido de inflamação, que progride, provavelmente, devido ao efeito de proteinases inflamatórias⁹⁶. Esse modelo leva a um quadro mais acentuado de enfisema, com importante inflamação e lesão tecidual^{78;90}, no entanto, os mecanismos de instalação do enfisema não são os mesmo encontrados na doença humana⁷⁸.

Os modelos experimentais de DPOC que melhor se aproximam dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença humana são os modelos de exposição à fumaça de cigarro⁹⁷. Já foi demonstrado que a fumaça de cigarro reproduz muitas características da DPOC em animais, incluindo infiltrado pulmonar inflamatório, atividade de proteases, estresse oxidativo e apoptose, com desenvolvimento de fibrose das vias aéreas e enfisema^{97,98}. Embora as alterações nos modelos murinos de exposição à fumaça de cigarro se diferenciem em parte das humanas, tendo mediadores com efeitos funcionais diferentes, esses modelos são úteis para investigar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao desenvolvimento e progressão da DPOC⁷⁸. Classicamente, modelos crônicos, com duração maior que 6 meses de exposição, foram bastante utilizados por seu resultado consistente no remodelamento das vias aéreas e desenvolvimento de enfisema. Porém, o tempo prolongado necessário para induzir essas características restringe bastante o uso desses modelos para extensas pesquisas terapêuticas e mecânicas⁹⁹. Mais recentemente, visando compreender melhor os mecanismos subjacentes da DPOC e reduzir custos e o consumo de tempo, modelos de curta duração têm sido mais empregados por pesquisadores em todo o mundo¹⁰⁰⁻¹⁰³. Tendo em vista que é o cigarro o principal fator causal da DPOC, faz sentido utilizar um método de exposição à fumaça de cigarro para os estudos em modelos experimentais da doença.

2.10. A matriz extracelular no pulmão

A MEC é uma rede tridimensional complexa de macromoléculas, que não apenas fornece o arcabouço estrutural físico em que as células se inserem, mas também regula muitos processos celulares incluindo crescimento, migração, diferenciação, sobrevivência, homeostase e morfogênese¹⁰⁴. Entre as macromoléculas do parênquima pulmonar estão o colágeno, elastina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos (GAGs) e glicoproteínas de adesão, que se distribuem em meio aquoso, determinando as propriedades mecânicas do tecido pulmonar. Os GAGs e proteoglicanos formam uma substância hidratada tipo gel, que é altamente resistente a forças compressivas. Nesse gel se inserem as proteínas fibrosas que conferem ao tecido resistência às forças de estiramento¹⁰⁵.

Através da quantificação de elementos da MEC, verificou-se que a composição de macromoléculas no interstício pulmonar é de cerca de 60 a 70% de colágeno, 25 a 30% de elastina, menos de 1% de glicosaminoglicanos, cerca de 0,5% de fibronectina, além de outros componentes¹⁰⁶ A MEC determina as propriedades biomecânicas do parênquima pulmonar através da interação de seus componentes com as células do trato respiratório, tendo importante papel regulatório na fisiologia e cinética destas células¹⁰⁷ Hoffman *et al.* (2010)¹⁰⁸ demonstraram que características da MEC, como conteúdo de elastina, estresse mecânico e integridade alveolar, influenciam não só a capacidade regenerativa como também os padrões de proliferação celular de pulmões de camundongos adultos.

2.11. Os tipos de colágeno da matriz extracelular no pulmão

O colágeno é a principal glicoproteína da MEC e do tecido conjuntivo¹⁰⁹ sendo responsável por grande parte das propriedades físicas teciduais. A maioria das características biomecânicas dos tecidos resultam da organização do colágeno em macromoléculas, que fornecem suporte, e apresentam importante papel funcional. Sabe-se que, além de exercer função de suporte, o colágeno participa na diferenciação, adesão, migração e proliferação celular, podendo exercer atividade antigênica, variando com o tipo e órgão envolvido¹¹⁰

O colágeno é a proteína mais abundante nos mamíferos, totalizando cerca de 30% da massa total de proteínas¹¹¹ sendo que cerca de 80 a 90% consiste nos tipos I, II e III, localizados principalmente nos tecidos conjuntivos¹⁰⁹ A característica estrutural comum dos tipos de colágeno é a presença de uma tripla hélice, formada por três cadeias polipeptídicas denominadas cadeias α , que pode variar da maior parte de sua estrutura (96% para o colágeno I) até menos de 10% (colágeno XII)¹¹¹.

São descritos na literatura pelo menos 28 tipos de colágeno, divididos em subfamílias com base em seu arranjo supramolecular: fibrilares, associados a fibrilas, fibrilas de ancoragem e formadores de redes¹¹¹ Os tipos de colágeno fibrilares, tipos I, II, III, V e XI, são encontrados em praticamente todos os tecidos conjuntivos da maioria dos organismos multicelulares, sendo bastante abundantes nos ossos, cartilagens e pele¹¹². Sua principal função é de manter a arquitetura dos tecidos e órgãos, conferindo

força mecânica a eles, o que é conseguido através de interações entre as próprias moléculas de colágeno e delas com outros componentes da MEC, tais como os proteoglicanos¹¹³.

O colágeno do tipo I (Col I) e do tipo III (Col III) formam suas fibrilas em associação com o colágeno tipo V (Col V), que ocupa a parte interna dessas fibrilas, sendo quase ocultado dentro das mesmas¹¹⁴. A associação do Col V com o Col I e Col III leva a formação de fibrilas heterotípicas, nas quais o papel do Col V é a regulação do diâmetro destas fibrilas de colágeno, fator fundamental na determinação das características funcionais de um tecido¹¹³.

Nos pulmões, as proteínas mais abundantes são os colágenos fibrilares, que constituem 15 a 20% do peso seco do tecido¹¹⁵. As fibras de colágeno estão presentes nas principais estruturas, incluindo vias aéreas, vasos sanguíneos, interstício do parênquima pulmonar, e membrana basal das células epiteliais e endoteliais¹¹⁶. O interstício pulmonar contém principalmente colágeno dos tipos I e III, que fornecem estrutura para a parede alveolar¹⁰⁷. O colágeno fibrilar é vital para manter a arquitetura pulmonar normal, sendo o colágeno do tipo I o principal elemento estrutural do pulmão¹¹⁷.

As fibras de colágeno do parênquima pulmonar se organizam de modo a formar uma rede de fibras axiais que se estende das vias aéreas centrais até os ductos alveolares, uma rede de fibras periféricas que se estende a partir da pleura visceral e um interstício parenquimatoso que conecta os anteriores¹⁰⁷. A integridade desta estrutura depende da síntese dos tipos de colágeno presentes no pulmão, que são responsáveis por transmitir sinais únicos para as células, interferindo nos processos traducionais que controlam a migração, proliferação e apoptose.

2.12. O colágeno tipo V no pulmão

O Col V compõe a maioria dos tecidos, mas é, quantitativamente, o menor componente colagênico, variando de 2 a 5% do total do total de colágeno¹¹⁸. É encontrado no interstício pulmonar na sua isoforma heterotrimétrica [$\alpha 1(V)_2, \alpha 2(V)$], copolimerizado com o colágeno dos tipos I e III para formar fibrilas heterotípicas (I, III, V)¹¹⁹. Ele é responsável pela regulação da fibrilogênese, e pela nucleação das fibrilas de

colágeno em formação¹²⁰. A porção fibrilar tripla hélice helicoidal do Col V se encontra oculta do interior das fibrilas, e o domínio globular NH₂- terminal da cadeia $\alpha 1(V)$ se projeta para a superfície, o que dificulta fisicamente a agregação das outras moléculas de colágeno à fibrila, e deste modo, o Col V é o responsável por regular o diâmetro fibrilar¹²⁰. Quantidades variáveis de Col V interferem no diâmetro das fibrilas heterotípicas, portanto, os tecidos com menos Col V têm fibrilas com diâmetro maior e os tecidos com mais Col V têm fibrilas mais finas^{119;121}.

O pró-peptídeo terminal NH₂- do Col V possui alta imunogenicidade^{118;119}. Quando os epítomos do Col V são expostos, eles podem funcionar como um antígeno desconhecido e ativar o sistema imune, tornando o Col V num autoantígeno potencial¹²². Em episódios de rejeição em transplante de pulmão, foram encontradas células T específicas para o Col V, e estas células estavam envolvidas na patogênese da rejeição¹²². No processo de rejeição e inflamação pulmonar, o tecido pulmonar sofre ação de MMPs (MMP-2, MMP-3, MMP-9) que clivam e expõem o Col V, tornando-o imunogênico e, desse modo, os peptídeos fragmentados perpetuam o processo autodestrutivo, levando à rejeição e remodelamento pulmonar^{122;123}.

2.13. Indução de tolerância periférica pela via das mucosas

A superfície das mucosas contém o maior e mais complexo sistema imunológico do organismo, o tecido linfóide associado às mucosas (MALT, “*mucosal-associated lymphoid tissue*”). Este protege o organismo contra antígenos microbianos patológicos ou de origem tumoral, mas também gera tolerância para antígenos inofensivos ou micróbios comensais. O MALT congrega os tecidos linfóides associados às mucosas intestinal (GALT, “*gut-associated lymphoid tissue*”; tecido linfóide associado à mucosa intestinal), naso-faríngea (NALT, “*nasal-associated lymphoid tissue*”; tecido linfóide associado à mucosa nasal), brônquica (BALT, “*bronchial-associated lymphoid tissue*”; tecido linfóide associado à mucosa brônquica) e de outros tecidos linfóides associados com os sistemas lacrimal, mamário, glandular, gênito-urinário, cutâneo e outros¹²⁴. Considerando as características tolerogênicas do MALT, as vias oral e nasal são utilizadas experimentalmente e na clínica médica para gerar tolerância periférica a antígenos específicos, com o intuito de prevenir e/ou tratar doenças autoimunes e alérgicas ou evitar rejeição de transplantes^{125;126;127;128;129}.

A tolerância da mucosa nasal é altamente relevante como um mecanismo de tolerância periférica nas vias aéreas, uma vez que as vias respiratórias são continuamente expostas a antígenos presentes no ar¹³⁰. Vários trabalhos mostram a eficiência do trato respiratório e seus tecidos linfoides associados na indução de tolerância da mucosa e/ou mudança no perfil das populações de células T patológicas em modelos experimentais¹²⁶. Nas vias aéreas superiores, os roedores apresentam um NALT que consiste em acúmulos de células linfoides em forma de sino na entrada do trato nasofaríngeo, considerados equivalentes ao anel linfóide faríngeo de Waldeyer em humanos^{131;132}. Já nas vias aéreas inferiores, o BALT parece ser dispensável para o estímulo de células T, uma vez que os linfonodos mediastinais que drenam o trato respiratório inferior representam os principais locais para o estímulo destas células¹³³.

A instilação nasal ou inalação de antígenos aerossolizados podem levar à apresentação de antígenos nos nódulos linfáticos cervicais e peribrônquicos, que drenam da cavidade nasal e das vias aéreas inferiores, respectivamente^{134;130}. Nestes locais existem células apresentadoras de antígenos, denominadas células dendríticas (DC), que englobam os antígenos nos revestimentos da mucosa e, em seguida, migram para os linfonodos de drenagem, contando com a orientação de quimiocinas, como a CCR7¹³⁴. As vias aéreas superiores e inferiores abrigam 4 populações de DCs diferentes: epiteliais (CD103⁺; DC1 convencional ou cDC1), estromais convencionais (CD11b⁺ CD24⁺ CD64⁻; cDC2) e derivadas de monócitos (CD11b⁺ CD24⁻ CD64⁺) e de plasmocitóides (B220⁺; pDCs)^{135;136}. Destas, as cDC2¹³⁶ e pDCs¹³⁷ parecem ser responsáveis pela tolerância da mucosa nos pulmões.

Embora a tolerância oral/nasal se refira à indução fisiológica de tolerância ao antígeno inócuo que ocorre no GALT / NALT, a maioria dos estudos experimentais que avaliam os efeitos de antígenos aplicados pelas mucosas oral/nasal, influenciando a autoimunidade e doenças inflamatórias, identificaram células T regulatórias (Treg), secretoras de interleucina 10 (IL-10) e TGF- β , como principais agentes no desenvolvimento de tolerância periférica¹²⁶. As células Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, que expressam uma grande quantidade de IL-10, induzidas de células T convencionais na periferia (pTreg), tem um papel dominante na imunossupressão e parecem ser necessárias para a tolerância periférica¹³⁸. Outras subpopulações de células Treg foram descritas, incluindo as células Th3 e Tr1¹³⁹. As Th3 expressam TGF- β e o marcador de

superfície LAP (latencyactivated peptide) (LAP^+CD4^+) e as Tr1 ($CD49b^+LAG-3^+CD4^+$) suprimem a resposta imune, através da produção de IL-10^{140;141;142;138}. Foi descrita uma plasticidade entre as subclasses de células Treg e acredita-se que a natureza do antígeno ou modelo usado nos estudos experimentais possa determinar o fenótipo destas células¹³⁸.

2.14. Colágeno tipo V e autoimunidade em processos patológicos

O Col V tem sido descrito como relacionado a autoimunidade em diversos processos patológicos, dentre os quais a rejeição em transplantes de pulmão^{122;123}, a fibrose pulmonar idiopática^{143;127}, a hiperresponsividade na asma¹⁴⁴, a aterosclerose¹⁴⁵ e a esclerodermia experimental^{146;147}.

A indução de tolerância oral ao Col V, anterior ao transplante, diminuiu as respostas de rejeição em receptores de aloenxerto pulmonar¹⁴⁸. Foi demonstrado previamente, em um modelo experimental, que a tolerância nasal ao Col V pode reverter o remodelamento axial broncovascular na bronqueolite obliterante, provavelmente como resultado da supressão das células T¹⁴⁹. Recentemente, em um ensaio clínico fase 1, Wilkes *et al.* (2015)¹²⁷ demonstraram que pacientes com fibrose pulmonar idiopática submetidos a imunoterapia oral com doses diárias de 1,0 mg de Col V, por 30 dias, tiveram uma estabilização da função pulmonar e da MMP-7, além de redução na ligação de C1q para anticorpos anti-Col V.

Em aterosclerose experimental, Park *et al.* (2016)¹²⁹ demonstraram que a tolerância, pela via das mucosas, com Col V diminuiu a placa aterosclerótica num modelo em camundongos *Ldlr*^{-/-}, submetidos a uma dieta rica em colesterol, de modo dependente da IL-35, uma citocina anti-inflamatória descrita mais recentemente. Além disso, os autores determinaram dois epítopos da região fibrilar da cadeia $\alpha 1(V)$, relacionados à autoimunidade para o Col V neste modelo de aterosclerose.

Trabalhos têm demonstrado que a autoimunidade para Col V é direcionada principalmente para a cadeia $\alpha 1$ ^{150;151;152;129}. Em pacientes com transplante de pulmão foi mostrado que no período de 1 a 2 anos antes do desenvolvimento da bronquiolite obliterante (BO), os pacientes apresentam resposta imunológica para alguns dos epítopos as cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$, associados à presença de células Treg e expressão de

IL-10. Entretanto, 6 meses após o desenvolvimento de BO houve uma mudança na autoimunidade para o Col V, sendo voltada especificamente para 3 epítomos antigênicos da cadeia $\alpha 1(V)$, com presença de células Th1 e Th17 e das citocinas pró-inflamatórias interferon gama (INF- γ) e interleucina 17 (IL-17), além do aumento na atividade de MMPs¹⁵¹. Nessa mesma linha de pesquisa foi demonstrado uma relação entre HLA-DR15 e autoimunidade para alguns epítomos específicos da cadeia $\alpha 1(V)$ em pacientes com BO, decorrente de transplante de pulmão¹⁵².

Está bem estabelecido que a DPOC é caracterizada por intenso remodelamento da MEC pulmonar resultante de um processo inflamatório crônico. Os danos causados diretamente pela fumaça do cigarro e pela inflamação resultam na liberação de fragmentos da degradação do colágeno na circulação sistêmica¹⁵³. Esses fragmentos têm sido investigados como marcadores sistêmicos da DPOC e de sua progressão¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. Estudos apontam para os fragmentos de Col I, Col III e Col V como os melhores discriminadores entre DPOC leve e controles saudáveis¹⁵³, com os fragmentos Col V tendo uma correlação positiva com a gravidade da DPOC¹⁵⁷. Pacientes com DPOC apresentam remodelamento acelerado da MEC durante exacerbações¹⁵⁸, e os fragmentos Col V aumentam ainda mais nessas situações¹⁵⁷. Além disso, foi demonstrada a presença de linfócitos T reativos para Col V no sangue periférico de pacientes com DPOC e fumantes, com a autoimunidade específica para Col V associada à história de tabagismo em pacientes com DPOC¹⁵⁴.

Considerando que a homeostase imune pulmonar depende de uma rede de interações entre células imunes que incluem o epitélio das vias aéreas, macrófagos, neutrófilos e linfócitos residentes em tecidos, células Treg, entre outras, e que o Col V está relacionado à autoimunidade em patologias pulmonares, este tipo de colágeno pode ser um grande candidato à imunoterapia em doenças pulmonares.

2.15. Justificativa

Apesar da importância da DPOC, as terapias existentes atualmente são insuficientes para tratar os doentes, tendo efeitos modestos na redução de sintomas e exacerbações, além de quase nenhum efeito no declínio da função pulmonar a longo prazo, ou ainda na mortalidade. Nesse contexto, o desenvolvimento de melhores

abordagens terapêuticas é fundamental, devendo ser fortemente estimulado. O Col V tem sido associado à autoimunidade em diversas doenças, inclusive pulmonares e, em contrapartida, a indução de tolerância ao Col V tem se mostrado promissora na prevenção do desencadeamento dos processos patológicos de várias dessas doenças, tanto em estudos em humanos quanto em modelos experimentais. Presumindo que os danos causados na MEC pulmonar, pela fumaça de cigarro, devem levar à exposição do Col V ao sistema imune, a autoimunidade desencadeada provavelmente contribui para a progressão da DPOC. Sabendo que DPOC se caracteriza por uma resposta imune anormal, e tendo em vista os já conhecidos benefícios da terapia com Col V no controle da inflamação e remodelamento tecidual pulmonar, é provável que uma indução de tolerância ao Col V possa modular a inflamação pulmonar e sistêmica induzidas pela fumaça de cigarro num modelo experimental de DPOC.

3. OBJETIVOS

Os objetivos gerais desse estudo foram:

- a. Investigar o papel da autoimunidade contra o Col V na fisiopatologia da DPOC através da avaliação dos efeitos de um protocolo de indução de tolerância nasal ao Col V no remodelamento do tecido pulmonar e na modulação das respostas inflamatórias local e sistêmica em um modelo murino de DPOC;
- b. Fornecer informações sobre as principais alterações fisiológicas, estruturais e inflamatórias, de um modelo murino subagudo de indução de DPOC por exposição à fumaça de cigarro por 4 semanas, a fim de mapear indicadores que possibilitem a avaliação dos efeitos de uma intervenção terapêutica.

Objetivos específicos:

- Avaliar o grau de destruição alveolar pulmonar (enfisema) através da mensuração do intercepto linear médio (Lm);
- Avaliar o perfil inflamatório nas vias aéreas através da quantificação de células inflamatórias no FLBA;
- Avaliar a inflamação pulmonar através da medida do grau de edema peribroncovascular;
- Avaliar a mecânica do sistema respiratório;
- Analisar do perfil inflamatório e anti-inflamatório pulmonar, através da quantificação de células imunológicas e mediadores inflamatórios no parênquima alveolar;
- Analisar o perfil de células imunológicas sistêmicas através de imunofenotipagem de células T do baço;
- Analisar o perfil inflamatório pulmonar e sistêmico através da dosagem de citocinas inflamatórias no pulmão, no baço e FLBA por ELISA e CBA;
- Analisar e o perfil de dano e remodelamento tecidual através da quantificação de fibras constituintes da MEC pulmonar (colágeno dos tipos I, III, e V e fibras elásticas totais), além da expressão gênica para as cadeias de colágeno I, III e V, Fibrilina 1, MMPs e fatores de transcrição Foxp3 e Rorγt nesse tecido.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local do Estudo

Os experimentos desse estudo foram todos realizados nas dependências do Laboratório de Investigação em Reumatologia (LIM/17), do Laboratório de Terapêutica Experimental (LIM/20) e do Biotério de Manutenção e Experimentação da Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

4.2. Aspectos Éticos

Este trabalho foi desenvolvido após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob protocolo número 1200/2018 (**Anexo 1**). Os animais do estudo receberam os cuidados necessários de acordo com o “Guia de cuidados e uso de animais de laboratório” (NIH *publication* 85-23, revisado em 1985) e com a Lei Arouca (Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008).

4.3. Modelo Animal

O protocolo foi todo desenvolvido em modelo murino, com utilização de camundongos machos (n=57) da linhagem C57BL/6, com idade de 6-8 semanas, pesando 20-25g, provenientes do Centro de Bioterismo da FMUSP.

Por uma semana de ambientação e mais 6 semanas de duração do protocolo experimental, os animais foram mantidos no Biotério de Manutenção e Experimentação da Clínica Médica da FMUSP. Na chegada, foram aleatoriamente divididos e acondicionados em gaiolas específicas para camundongos (até 5 animais/gaiola, com as seguintes medidas: 425 x 266 x 185 mm), tendo sido alimentados com ração peletizada padronizada e água filtrada *ad libitum*, e mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas cada, em condições controladas de temperatura ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), cuidados por profissionais treinados e capacitados durante todo o período do estudo.

4.4. Grupos Experimentais

Após a divisão inicial dos animais, os grupos experimentais foram determinados de forma aleatória, para cada gaiola, conforme descritos na tabela abaixo:

Tabela 1. Relação dos grupos experimentais.

Grupos Experimentais	Descrição dos Grupos
F (Grupo Fumo) N=20 (10+10)	Animais que foram expostos à fumaça de 10 cigarros durante 1 hora, 2 vezes por dia, 5 dias por semana, por 4 semanas
FT (Grupo Fumo/Tolerado) N=17 (10+7)	Animais que receberam instilação nasal de colágeno tipo V por 5 dias na semana prévia à exposição à fumaça de cigarro e 3 vezes por semana durante as 4 semanas do protocolo de exposição à fumaça de cigarro, que foi idêntico ao do Grupo Fumo.
C (Grupo Controle) N=20 (10+10)	Animais expostos ao ar ambiente por 4 semanas, no mesmo local dos outros grupos, e que não receberam nenhum tratamento

O protocolo experimental foi desenvolvido em duas etapas, com metade dos animais em um primeiro experimento e a outra metade em um segundo experimento (n1=30 e n2=27; total de animais, C+F+FT), a fim de possibilitar o melhor acondicionamento dos animais no biotério e viabilizar os experimentos de coleta e análise dos tecidos biológicos.

Cada grupo experimental foi dividido em subgrupos pela necessidade de diferentes métodos de processamento na coleta dos tecidos biológicos, de acordo com as análises previamente determinadas no estudo. De um dos subgrupos (C, n=10; F, n=10; FT, n=10) foram coletados pulmões, linfonodos mediastinais, baço e soro para as análises bioquímicas e moleculares. Os animais do outro subgrupo (C, n=10; F, n=10; FT, n=7) foram submetidos à avaliação de mecânica respiratória e, após indução de eutanásia, foram coletados FLBA, soro e baço para dosagem de citocinas e os pulmões para as análises histológicas.

4.5. Protocolo para indução de tolerância nasal ao colágeno tipo V

A indução de tolerância ao Col V foi realizada por meio da administração por via nasal de 20 µl de uma solução de 0,5mg/ml/dia/animal de Col V (Colágeno de placenta humana, Bornstein and Traub Type V (Sigma Type IX) powder, Sigma-Aldrich, USA) em ácido acético 0,01N, com auxílio de uma micropipeta e ponteira plástica¹⁴⁹. Os animais receberam as instilações de Col V por cinco dias consecutivos na semana anterior ao início do protocolo de exposição à fumaça de cigarro, e continuaram recebendo as instilações por 3 x/semana durante as 4 semanas de duração do protocolo experimental, pelo menos 30 minutos antes da primeira exposição à fumaça de cigarro do dia (Linha do tempo do protocolo na **figura 1**).

4.6. Modelo de exposição à fumaça de cigarro

Para a indução da DPOC por exposição à fumaça de cigarro, nos baseamos no protocolo estabelecido em estudos prévios, realizados por pesquisadores do LIM-20^{159;160}. Foi realizada uma adaptação do modelo de exposição, seguindo as avaliações mais recentes de toxicidade que foram realizadas por Buccheri de Oliveira (2021)¹⁶¹, que dosou a carboxihemoglobina dos animais expostos por diferentes tempos e quantidades de cigarros. A partir desses dados, foi definida a exposição à fumaça de 10 cigarros, para manter a dose preconizada anteriormente, durante 1 hora, a fim de permitir que cada cigarro fosse queimado e houvesse uma pausa antes do próximo, visando menor toxicidade de monóxido de carbono (CO) durante as exposições.

Os animais foram expostos de corpo inteiro à fumaça de cigarro por 60 minutos (10 cigarros comerciais com filtro, duas vezes por dia, cinco dias na semana, durante 4 semanas (**Figura 1**). As exposições foram realizadas em uma caixa plástica de inalação com volume de aproximadamente 27L, contendo 8 baias divididas por tela metálica, dentro de uma capela de exaustão. Cada grupo de camundongos (5 animais), foi alocado em uma das baias, com rotação diária entre as baias, para que a exposição à fumaça de cigarro fosse a mais homogênea possível entre os grupos. A baia utilizada para as entradas de ar sintético e da fumaça de cigarro não acomodou nenhum camundongo durante todo o experimento.

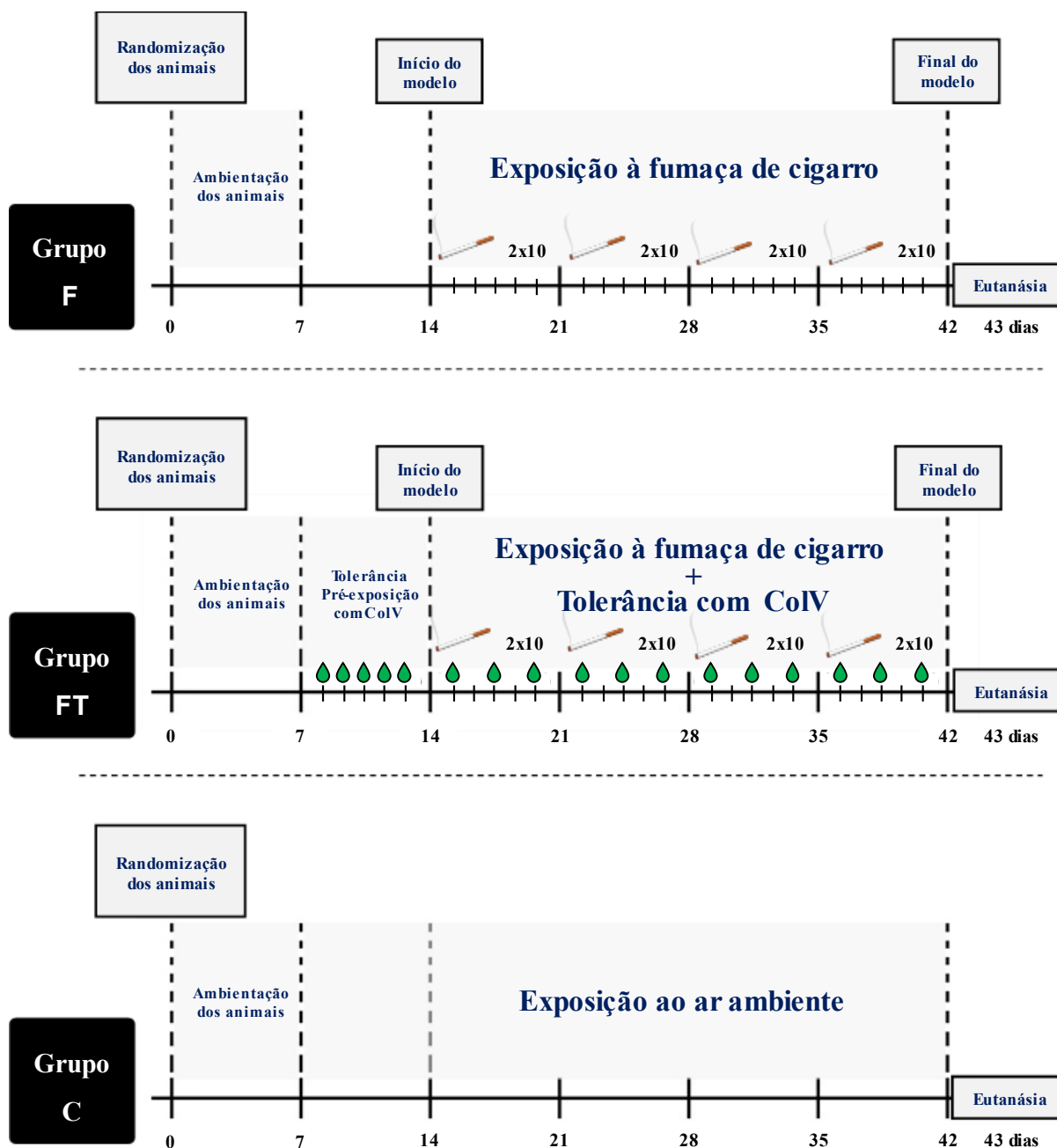


Figura 1. Linha do tempo do protocolo experimental.

A caixa de inalação continha duas entradas de ar: uma para ar sintético medicinal puro (gás inerte, incolor e inodoro, que simula as condições do ar atmosférico) e outra para ar sintético medicinal misturado à fumaça de cigarro¹⁶². O fluxo de ar sintético foi controlado por um fluxômetro conectado ao cilindro de ar comprimido e mantido em 5 L/min. A outra entrada de ar recebeu uma mistura do ar sintético e fumaça de cigarro, que foi aspirada por um sistema Venturi conectado ao

cigarro aceso (**Figura 2**), com fluxo de ar mantido em 1 L/min. O sistema Venturi é composto por uma mangueira cristal conectada a um cilindro de ar comprimido em uma das extremidades e na outra extremidade conectada a um aparato de redução do fluxo de ar e a uma coluna de água. O fluxo laminar de ar sintético, ao passar por uma região de menor diâmetro, sofre uma aceleração e conseqüente redução da pressão neste ponto (efeito Venturi), dependente do fluxo de ar, o que permite a aspiração da fumaça do cigarro.¹⁶² Os níveis de CO dentro da câmara foram mantidos a cerca de 350 partes por milhão (ppm) (Carbon Monoxide Meter AS8700A), o que gerou cerca de 25% (\pm 6%) de concentração de carboxihemoglobina (COHb) nos camundongos expostos (dosagem realizada em 200 μ l de sangue coletados cerca 20 a 30 minutos após a exposição, por punção caudal ou coleta arterial via aorta - ABL800 FLEX Analyser, Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Denmark).

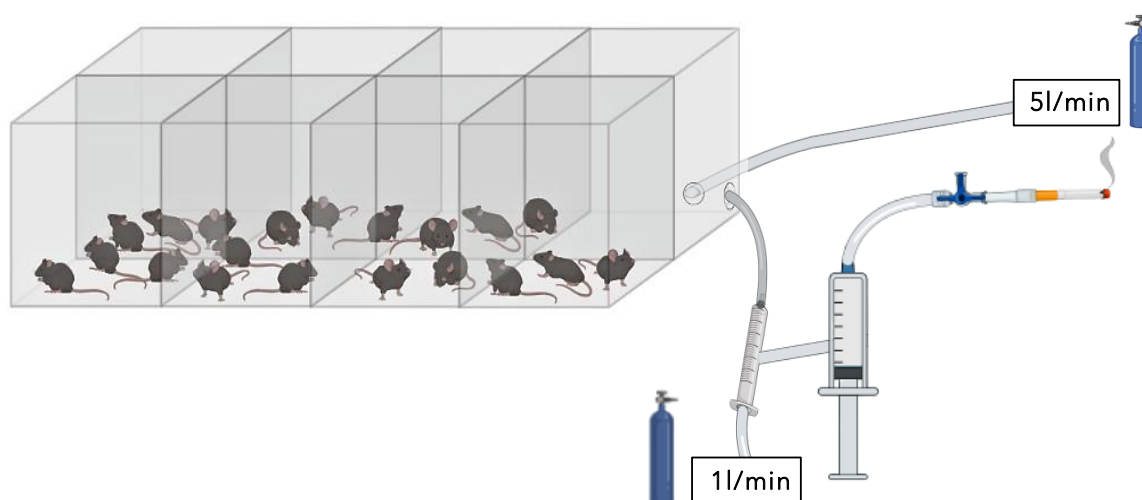


Figura 2. Esquema ilustrativo da caixa de exposição à fumaça de cigarro.

4.7. Avaliação da mecânica do sistema respiratório

No dia seguinte à última exposição à fumaça de cigarro, os animais foram submetidos à avaliação da função pulmonar. Para isso, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, Thiopentax[®], Cristália, Itapira, SP, Brasil), por via intraperitoneal, e traqueostomizados para inserção de uma cânula, adaptada de cateter intravascular 20G, que foi fixada à traqueia por meio de fio de algodão e conectada a

um ventilador para pequenos animais (flexiVent™; SCIREQ, Montreal, QC, CAN) (Figura 3).

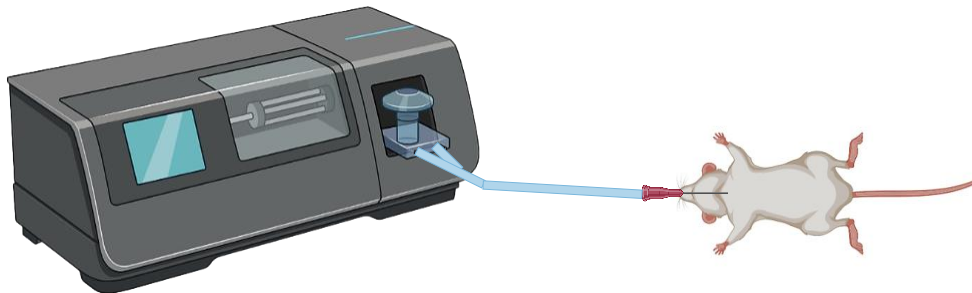


Figura 3. Esquema ilustrativo da avaliação da mecânica do sistema respiratório.

Os animais foram ventilados com um volume corrente de 10 ml/kg e frequência respiratória de 120 ciclos/minuto. Para calcular a impedância do sistema respiratório (Z_{rs}) foi utilizado um sinal de perturbação em volume de 16 segundos. A ventilação mecânica foi interrompida somente para a aplicação das perturbações, e após isso os dados foram coletados. Para análise das impedâncias obtidas, foi utilizado o modelo de fase constante, descrito por Hantos *et al.* (1992)¹⁶³:

$$Z(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}$$

R_{aw} é a resistência de vias aéreas, I_{aw} é a inertância das vias aéreas, G_{tis} caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares, H_{tis} caracteriza a energia acumulada nos tecidos do pulmão, i é a unidade imaginária, f é a frequência e $\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan\left(\frac{H}{G}\right)$. O parâmetro R_{aw} nos permite analisar isoladamente as vias aéreas, sem a interferência do tecido pulmonar. O parâmetro G_{tis} avalia a resistência tecidual e H_{tis} a elastância do tecido pulmonar.

4.8. Coleta e processamento de amostras de sangue

Dos animais avaliados quanto a mecânica, logo após a coleta dos parâmetros da função pulmonar, foi realizada punção da veia cava inferior para coleta do sangue, que foi imediatamente colocado em gelo. Em seguida, foi realizada eutanásia desses animais

por exsanguinação, através da secção completa da aorta abdominal. Os animais selecionados ao acaso para análises bioquímicas e moleculares, foram anestesiados por via intraperitoneal, com uma mistura de cloridrato de cetamina (Ketalar® - 50 mg/Kg de peso corporal) e cloridrato de xilazina (Rompum® - 10 mg/Kg peso corporal) e, eutanasiados por deslocamento cervical ou exsanguinação, através da secção completa da aorta, de onde foi coletado sangue para as análises. As amostras de sangue, de cerca de 500µl, obtidas dos camundongos foram centrifugadas a 1.500rpm, por 10 minutos a 4°C, para separação do soro, que foi aliquotado e congelado a -70°C, para posterior pesquisa de anticorpos anti-Col V, por ELISA.

4.9. Coleta e análise do fluido do lavado broncoalveolar (FLBA)

Após a avaliação da mecânica pulmonar, coleta do sangue e eutanásia, os pulmões dos animais foram lavados 2x com 1ml de tampão fosfato-salino (PBS), infundido nos pulmões por meio da cânula traqueal, sendo boa parte desse volume recuperado para as análises seguintes (~1,5ml). O volume recuperado (FLBA) foi então centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a 5°C. O sobrenadante foi armazenado a -70°C, em alíquotas de 200µl, e o botão celular ressuscitado em 300µl de PBS para contagem das células totais em câmara de Neubauer (aumento de 400x). Alíquotas de 100µl da suspensão celular foram centrifugadas por 6 minutos, a 450 rpm, em lâminas de vidro, usando uma citocentrífuga. Essas lâminas foram coradas com Diff-Quik (Medion Diagnostics, Dundingen, Switzerland) e a contagem diferencial de 300 células foi feita em campos selecionados aleatoriamente, em microscópio óptico, com objetiva de imersão (aumento de 1000x). Para obtenção do número absoluto de cada população celular no FLBA, as percentagens de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, macrófagos e células epiteliais foram multiplicadas pelo número total de células encontradas no volume. O sobrenadante armazenado foi, posteriormente, avaliado por citometria de fluxo para dosagem de citocinas.

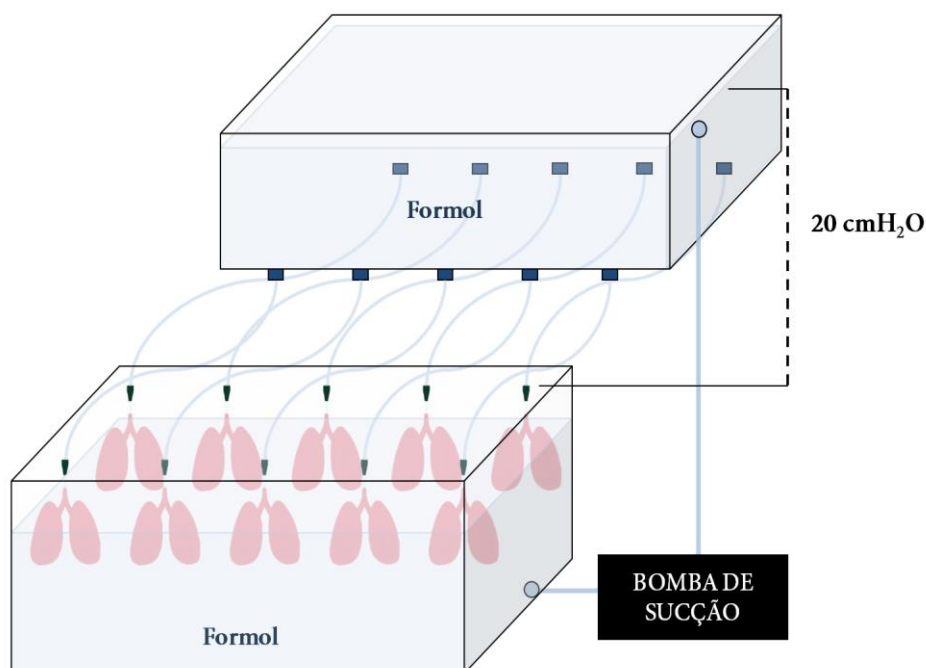
4.10. Análises histológicas

4.10.1. Coleta e fixação dos pulmões para análise histológica

Após a coleta do FLBA, foi realizada esternotomia mediana para retirada dos pulmões e coração, em bloco, com a cânula ainda fixada à traqueia dos animais. Os

baços desses animais também foram coletados e congelados em nitrogênio líquido para posterior armazenamento em freezer -75°C até o preparo do homogenato desse tecido. Após a coleta dos tecidos biológicos, as carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos brancos identificados com etiqueta para descarte de carcaças, devidamente preenchida, de acordo com a Cartilha de orientação de descarte de resíduo do sistema FMUSP-HC¹⁶⁴, para serem posteriormente enviadas para cremação.

Os pulmões dos animais foram então fixados em formaldeído (10%), infundido através da cânula traqueal, sob pressão constante de $20\text{ cmH}_2\text{O}$, por 24 horas, com o objetivo de homogeneizar a distensão do parênquima pulmonar (**Figura 4**)¹⁶⁵. Após a fixação, os pulmões foram seccionados em fragmentos menores, colocados em molde plástico e submetidos aos procedimentos histológicos de rotina para inclusão em parafina. Os blocos parafinados contendo as amostras de pulmão foram cortados numa espessura de $5\mu\text{m}$, sendo estes cortes aderidos a lâminas com silano (3-Aminopropiltriétoxissilano, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), para a realização das marcações específicas por imuno-histoquímica e imunofluorescência. Parte dessas lâminas, uma correspondente a cada animal, foi corada com hematoxilina-eosina (H&E) para avaliação do intercepto linear médio (Lm).



Fabiola S. Z. Robertoni, 2015

Figura 4. Esquema ilustrativo da caixa utilizada para fixação dos pulmões.

4.10.2. Avaliação Morfométrica - Intercepto linear médio

O índice Lm é o método morfométrico mais comumente utilizado na avaliação do enfisema, pois estima a área de trocas gasosas no pulmão¹⁶⁶. É um valor médio que representa a medida da área de superfície em relação ao volume dos espaços aéreos acinares¹⁶⁷. Em um retículo, é o comprimento médio de segmentos de reta em rândômicas linhas-teste que medem o espaço aéreo entre intersecções da linha com a superfície alveolar. Quanto maior o valor do Lm, maior é a destruição alveolar, já que os espaços aéreos entre as paredes alveolares estarão aumentados.

Para a avaliação do Lm em todos os grupos experimentais, foi utilizado um retículo de Weibel¹⁶⁸ (**Figura 5**), com 100 pontos e 50 retas, acoplado à ocular de um microscópio óptico comum (Nikon Eclipse - E200, Japão).

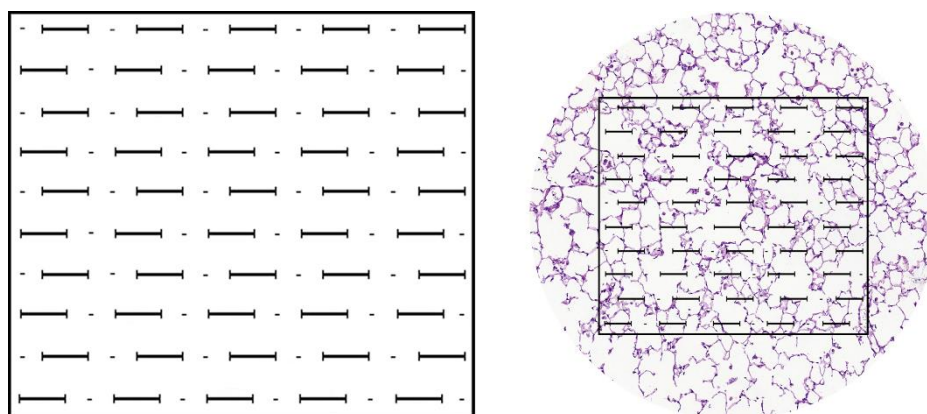


Figura 5. Modelo do retículo de Weibel utilizado nas análises morfométricas e exemplo de sua aplicação na avaliação do enfisema. Fonte: Adaptado de Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. 1966, p. 29¹⁶⁸.

Para quantificar o Lm foi utilizada uma lâmina corada em H&E referente a cada animal. Inicialmente foi realizada a contagem do número de vezes que as retas do retículo interceptaram as paredes alveolares em 10 campos aleatórios e não coincidentes, no aumento de 200X. Então, foram calculadas as médias dos números de intersecções entre os campos de cada lâmina. O Lm foi calculado através da seguinte equação:

$$Lm = L_{total} / MI$$

Ltotal é a somatória de todos os segmentos do retículo, realizada através da medida de cada segmento com uma régua do fabricante Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha) em um microscópio com o retículo. Já o MI é a média do número de vezes que as retas interceptam as paredes dos alvéolos em cada lâmina examinada. Os valores de Lm foram expressos em micrometros (μm)¹⁶⁹.

4.10.3. Análise Morfométrica do Edema Pulmonar

Para a quantificação do edema pulmonar, foi realizada a análise da região peribroncovascular, utilizando uma lâmina corada em H&E referente a cada animal. As lâminas foram digitalizadas em scanner digital de alta resolução (Pannoramic 250, 3DHISTECH Ltd., Budapeste, HUN). Posteriormente, através do software SlideViewer 2.5 (3DHISTECH Ltd., Budapeste, HUN), foram selecionados e fotografados digitalmente, em resolução de 40x, cerca de 7 campos aleatórios na região do eixo broncovascular, contendo ao menos um brônquio e o vaso sanguíneo adjacente em cada campo.

Para quantificar o edema foi utilizado o método estereológico de contagem de pontos de acordo com Gundersen et al. (1988)¹⁷⁰, com modificações, utilizando um sistema de análise de imagem (Image-Pro Plus 6.0 para Windows, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MS, EUA). Utilizando-se os recursos de medidas do Image-Pro Plus 6.0, foi construído um retículo com 100 pontos, distribuídos ortogonalmente sobre a imagem adquirida. Um observador, cego para os grupos do estudo, avaliou as imagens, e a quantificação do edema foi determinada de acordo como o número pontos positivos para edema, sendo o resultado expresso como uma proporção de positividade para edema em relação à área de tecido analisado. O resultado de cada lâmina foi dado como a média de todos os seus campos avaliados.

4.10.4. Imuno-histoquímica para Células e Citocinas

Os ensaios de imuno-histoquímica foram realizados para avaliação de células positivas para Galectina-3 (MAC-2), CD3, TGF- β , FOXP3, IL-17 e IL-10, através do método da biotina-estreptoavidina-peroxidase. As lâminas silanizadas com os cortes histológicos de tecido pulmonar foram desparafinizadas em xilol quente, em estufa a 60 – 65° C, durante 15 minutos e passadas rapidamente em 3 banhos de xilol frio. Para

hidratação dos cortes as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95°C e um banho de álcool 70°C e mergulhadas em ácido fórmico por 3 minutos. Ao final, foram lavadas em água corrente e colocadas em água destilada.

O próximo passo foi a recuperação dos sítios antigênicos, realizada em alta temperatura em tampão Citrato pH 6 ou TRIS_EDTA pH 9, conforme cada marcador, de acordo com a tabela 2, em panela de pressão (Pascal), por 1 minuto à 125°C. O bloqueio da peroxidase endógena, presente nas hemácias, foi feito com água oxigenada 10v (3%) e metanol (v/v), com 2 banhos de 10 minutos cada, ou 4 banhos de 5 minutos. O bloqueio específico para a marcação de CD4 foi realizado com metanol, PBS e água oxigenada 30v por 10 minutos. Após o bloqueio, os cortes foram lavados em água corrente, um banho de água destilada e, por fim, colocadas em solução de TBS, para serem incubadas com os anticorpos primários (Tabela 2), durante a noite, em câmara úmida à 4°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em TBS e incubadas com os anticorpos secundários (VECTASTAIN® Elite® ABC Kit - Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), de acordo com cada anticorpo primário, por 30 minutos à 37°C, em câmara úmida. Foi utilizado como cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB - Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha). Para revelar a reação, os cortes foram lavados em água corrente por cerca de 5 minutos e contra-corados com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Então, os cortes foram desidratados e as lâminas montadas com lamínula.

Tabela 2. Anticorpos primários utilizados nos estudos de imuno-histoquímica.

Anticorpo	Especificação	Diluição	Recuperação	Bloqueio
MAC-2	Anticorpo monoclonal de rato anti-MAC2 (CL8942AP) (Cedarlane Labs)	1:25000	pH 6	H ₂ O ₂ + Metanol
CD3	Anticorpo policlonal de coelho anti-CD3 (A0452) (Dako)	1:1000	pH 6	H ₂ O ₂ + Metanol
TGF-β1	Anticorpo policlonal de coelho anti-TGF-β1 (SC-146) (Santa Cruz Biotechnology)	1:1500	pH 6	H ₂ O ₂
FOXP3	Anticorpo policlonal de coelho anti-FOXP3 (SC-28705) (Santa Cruz Biotechnology)	1:100	pH 6	H ₂ O ₂ + Metanol
IL-10	Anticorpo policlonal de coelho anti-IL-10 (BS20373R) (Bioss Antibodies Inc.)	1:3000	pH 9	H ₂ O ₂ + Metanol
IL-17	Anticorpo policlonal de coelho anti-IL-17 (sc-7927) (Santa Cruz Biotechnology)	1:100	pH 9	H ₂ O ₂ + Metanol

4.10.5. Imunofluorescência para o colágeno dos tipos I, III e V

Para a imunomarcagem do colágeno dos tipos I, III e V, as lâminas com tecido pulmonar foram desparafinizadas em xilol quente, em estufa a 60 – 65°C, por 30 minutos, e passadas por mais 3 banhos em xilol frio. Posteriormente, os cortes histológicos foram reidratados em concentrações decrescentes de etanol, seguido de banho em água corrente e PBS pH 7,4.

Os epítomos antigênicos foram recuperados através do tratamento enzimático com pepsina bovina (10,000 UTD; Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA), na concentração de 8mg/ml, diluída em ácido acético 0,5M, pH 2,2, por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, os cortes foram lavados três vezes com PBS pH 7,4 e os sítios inespecíficos reativos a oxidação foram bloqueados com solução a 5% de albumina bovina (BSA) em tampão PBS pH 7, durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Finalmente, os cortes foram incubados com os anticorpos primários (Tabela 3), diluídos em BSA 0,1%, durante a noite, em geladeira a 4°C. Posteriormente, os cortes foram submetidos a 3 lavagens com PBS 0,05% Tween20 e incubados por 60 minutos com anticorpo secundário policlonal de cabra anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em temperatura ambiente, na diluição de 1:200, em azul de Evans 0,006%. Após lavagem com PBS 0,05% Tween20 as lâminas foram montadas em tampão glicina/PBS (v/v), e armazenadas em freezer a -20C até a aquisição de imagens.

Tabela 3. Anticorpos primários utilizados nos estudos de imunofluorescência.

Anticorpo Primário	Especificação	Diluição
Col I	Anticorpo policlonal de coelho anti-colágeno tipo I (600-401-103-0.5) (Rockland, Limerick, PA, USA)	1:2500
Col III	Anticorpo policlonal de coelho anti-colágeno tipo I (600-401-105-0.5) (Rockland, Limerick, PA, USA)	1:5000
Col V	Anticorpo policlonal de coelho anti-colágeno V (Laboratório de Matriz Extracelular, FMUSP, São Paulo, BR)	1:1800

4.10.6. Método de resorcina-fucsina de Weigert

Para a avaliação das fibras elásticas do tecido pulmonar, foi realizada a coloração pelo método resorcina-fucsina de Weigert modificado, com oxidação prévia pela Oxona (RFO) (Fullmer *et al*, 1974)¹⁷¹. Esse método cora todas as fibras do sistema elástico na cor púrpura, incluindo fibras elásticas completamente desenvolvidas, fibras oxitalânicas e fibras eulanínicas, mas não permite identificar separadamente os tipos de fibras. Para coloração, primeiramente as lâminas foram desparafinadas e hidratadas da maneira convencional, permanecendo 20 minutos em xilol aquecido a 95°C, seguido de três banhos de xilol à temperatura ambiente. Em seguida, o tecido foi hidratado, submergindo-se as lâminas em álcool absoluto, álcool 95% e álcool 70%, respectivamente, seguido de lavagem em água corrente e depois em água destilada e deionizada. Sobre os cortes, foi depositada uma solução aquosa de Oxona 10% (DuPont, Delaware, USA) por 40 minutos para promover a oxidação. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos e, em seguida, com álcool 70% e 95%, respectivamente. Em seguida, as lâminas foram coradas pela resorcina-fucsina de Weigert por uma hora à temperatura ambiente, seguida por cinco minutos de lavagem em água corrente e de duas trocas de dez minutos em álcool 70%. A coloração de fundo foi removida com uma passagem em solução álcool-ácido a 1% e lavadas em água corrente. Finalmente, as lâminas foram desidratadas, diafinizadas e montadas com lamínulas.

4.10.7. Quantificação de células do sistema imune

Para quantificar as células do sistema imune imunomarcadas foi utilizado o método estereológico de contagem de pontos de acordo com Gundersen *et al*. (1988)¹⁷⁰, com modificações, utilizando um sistema de análise de imagem (Image-Pro Plus 6.0 para Windows, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MS, EUA). Em resumo, o sistema de análise de imagem consiste em uma câmera fotográfica Olympus QColor 5 (Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canada), acoplada a um microscópio Olympus (Olympus BX-51, Olympus Corporation, Tóquio, Japão), a partir dos quais as imagens foram enviadas para um monitor, através de um sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canada) e transferido para um computador (Pentium 1330 Mhz). Utilizando-se os recursos de medidas do Image-Pro Plus 6.0, foi construído

um retículo com 100 pontos, distribuídos ortogonalmente sobre a imagem adquirida. Um observador, cego para os grupos do estudo, avaliou cerca de 10 campos aleatórios do parênquima pulmonar distal e 10 campos aleatórios do parênquima pulmonar proximal ao eixo broncovascular, num aumento de 1000X, para verificar a expressão celular de Galectina-3 (MAC-2), IL-10, IL-17, TGF- β e FOXP3. Para a quantificação das células CD3⁺, foram avaliados, por observador cego para os casos, cerca de 5 espaços peribroncovasculares (compreendendo a adventícia entre uma via aérea e seu vaso sanguíneo adjacente) por caso, em aumento de 400x. A quantificação no parênquima foi dada de acordo como o número de células positivas coincidentes com os pontos do retículo em cada campo, sendo expressas como uma proporção de células positivas por células totais. Para o espaço peribroncovascular, a quantificação foi dada pelo número total de células positivas dividido pela área do seu respectivo espaço peribroncovascular delimitado, e expressa em células/ μm^2 (**Figura 6**). O resultado de cada amostra foi dado como a média de todos os campos avaliados.

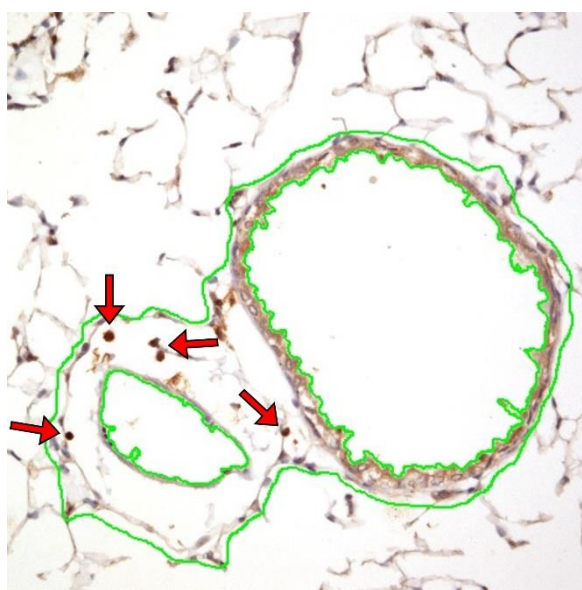


Figura 6. Representação da delimitação do espaço peribroncovascular e células CD3 positivas (setas).

4.10.8. Quantificação do colágeno dos tipos I, III e V

A análise morfométrica das lâminas para quantificação das fibras de colágeno foi realizada por meio de análise de imagens. Para essa metodologia, foram fotografadas as lâminas imunomarcadas para colágeno tipo I, colágeno tipo III e colágeno tipo V,

para todos os grupos experimentais. Para a aquisição de imagens das imunomarcações foi utilizado o microscópio de fluorescência Olympus BX-51, sendo a captura de imagens realizada por máquina fotográfica digital Olympus QColor 5 acoplada ao microscópio. Para análise de todas estas imagens utilizamos recursos do software Image Pro Plus 6.0. Um observador, cego para os grupos do estudo, avaliou 10 campos aleatórios e não coincidentes do parênquima pulmonar, para cada caso, no aumento de 400x. A quantidade de cada tipo de fibra foi calculada pelo software, e sua proporção determinada através da relação de área imunomarcada por área de tecido, e dada em percentual (%). O resultado de cada lâmina foi dado como a média de todos os seus campos avaliados.

4.10.9. Quantificação das fibras elásticas

Para quantificação das fibras elásticas, coradas com RFO, foi utilizado o método estereológico de contagem de pontos, conforme a metodologia de quantificação de células imunológicas, descrita anteriormente. Um observador, cego para os grupos do estudo, avaliou 10 campos aleatórios do parênquima pulmonar, num aumento de 400X. A quantidade de fibras elásticas oxidadas foi determinada de acordo como o número de regiões de tecido marcado coincidentes com os pontos do retículo em cada campo, sendo o resultado expresso como uma proporção da área total do tecido analisado. O resultado de cada lâmina foi dado como a média de todos os seus campos avaliados.

4.11. Avaliação da expressão gênica

4.11.1. Criopreservação dos tecidos e extração de RNA

Para a realização dos estudos moleculares, os pulmões direitos dos animais foram coletados, lavados com solução de SF 0,9% e imediatamente imersos em nitrogênio líquido, em tubos de criopreservação. Em seguida, as amostras foram armazenadas em um freezer a -70°C até os procedimentos de análise.

O RNA total das amostras foi isolado pelo método de Chomezynski e Sacchi¹⁷², com a utilização de uma solução comercial de caráter ácido, preparada com base no método de isotiocianato de guanidina/fenol/clorofórmio em etapa única (Reagente Trizol® - Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções

fornecidas pelo fabricante. Esse método se baseia no fato de que, em condições ácidas, o RNA total permanece na fase aquosa superior, enquanto a maioria do DNA e as proteínas permanecem na interfase ou na fase orgânica inferior.

Cerca de 50mg de tecido pulmonar proveniente do pulmão direito de cada animal foi separado e pesado em balança analítica. Esse tecido, ainda congelado em nitrogênio líquido, foi submetido a um processo de pulverização por impacto, adquirindo aspecto de um pó fino e transferido para um microtubo plástico. A esse tubo foi acrescentado 1ml de Trizol, gelado, e as amostras foram homogeneizadas com auxílio de um agitador de tubos (Vortex), até adquirirem um aspecto viscoso rosado e homogêneo. Para a separação do RNA, foram adicionados 200µl de clorofórmio e as amostras foram rapidamente homogeneizadas por agitação em Vortex, e mantidas à temperatura ambiente, por 10 minutos. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm), por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para outro microtubo plástico. Para a precipitação do RNA, foram adicionados 500µl de isopropanol, gelado, às amostras, as quais foram homogeneizadas por inversão e mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos, sendo, então, submetidas à centrifugação (12.000 rpm), por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de RNA lavado com 1ml de etanol (80%) e submetido a nova centrifugação (10 minutos/12.000 rpm / 4°C). Esse processo foi repetido 1 vez. Então, o sobrenadante foi descartado e os precipitados de RNA foram secos, por inversão, em um fluxo laminar.

As amostras de RNA foram ressuspensas em 30µl de H₂O deionizada livre de RNase, tratada com dietilpirocarbonato (DEPC; Merck, Alemanha), um forte inibidor de ribonucleases. Todas as amostras foram tratadas com DNase (Invitrogen, Life Technologies), para evitar contaminação com qualquer tipo de DNA remanescente, e guardadas em freezer -20°C até o dia seguinte para melhor dissolução das moléculas de RNA. Então, as amostras foram armazenadas em freezer -70°C.

4.11.2. Avaliação da integridade do RNA

A qualidade do RNA extraído foi verificada como controle de qualidade do método de extração, em parte das amostras, por eletroforese em gel de agarose. A

eletroforese é um método usado em biologia molecular para separar macromoléculas, tais como proteínas ou ácidos nucleicos, baseado em propriedades físicas como o tamanho, forma e carga elétrica.

O gel de agarose foi preparado em cuba de eletroforese na concentração de 0,8% (massa/volume) com tampão TBE 1X (Tris/Borato/EDTA), sendo 0,8g de agarose em 100ml de tampão. Foram adicionados à solução 5µl de solução de Brometo de etídio na concentração de 10mg/ml, para visualização das bandas de RNA pela emissão de fluorescência, sob luz ultravioleta. Após a solidificação do gel, o tampão de corrida (TBE 1X) foi adicionado à cuba e o espaçador de poços retirado. Em cada poço do gel, já submerso no tampão, foram adicionados 1,5µg de RNA de cada amostra e o volume necessário para completar 20µl de volume final de um tampão corante azul para carregamento de RNA. Foi aplicada uma corrente elétrica de 100 volts por 40 minutos. Então, os géis foram visualizados e fotografados em câmara de detecção de quimioluminescência (ChemiDoc™ Touch Imaging System, Bio-Rad Laboratories, USA). Amostras que apresentaram as bandas de RNA ribossomal 28S e 18S bem definidas foram consideradas de boa qualidade e puderam ser utilizadas nas etapas seguintes.

4.11.3. Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras

A avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA mensageiro foi realizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda no espectro ultravioleta (NanoVue Plus Spectrophotometer, GE Healthcare, UK), a partir de 2µl da amostra de RNA dissolvida em H₂O DEPC (Merck, Alemanha). O valor de concentração de RNA (ng/µl) dado pelo equipamento foi anotado para possibilitar o cálculo do volume de cada amostra necessário para a transcrição reversa em cDNA. As amostras que apresentaram relações da absorbância de 260 nm e 280 nm (260/280) entre 1,7 e 2,0 foram consideradas de boa qualidade e utilizadas nos experimentos subsequentes.

4.11.4. Transcrição Reversa

Após o controle de qualidade, o RNA total de cada amostra foi submetido à transcrição reversa para a síntese de cDNA (Ácido desoxirribonucléico complementar), que é uma molécula muito mais estável para manipulação.

A partir de 1µg de RNA total, as amostras foram reversamente transcritas em cDNA, em termociclador, utilizando um kit SuperMix (SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR, Invitrogen, USA) otimizado para a síntese de cDNA de primeira fita, a partir de RNA total. Alvos de RNA de 100 bp a >12 kb podem ser detectados com este sistema. Os volumes dos componentes de cada reação foram determinados de acordo com o manual do fabricante.

4.11.5. Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR

Para a reação em cadeia da polimerase em tempo real por transcriptase reversa (RT-qPCR), foram selecionados os seguintes genes de interesse: *Coll1a1* (cadeia α1 do colágeno I), *Col3a1* (cadeia α1 do colágeno III), *Col5a1* (cadeia α1 do colágeno V), *Col5a2* (cadeia α2 do colágeno V), *Fbn1* (fibrilina 1), *Mmp8* (metaloproteinase de matriz 8), *Mmp12* (metaloproteinase de matriz 12), *Mmp13* (metaloproteinase de matriz 12), *Foxp3* (fator de transcrição Forkhead box P3) e *Roryt* (fator de transcrição da família ROR). As sequências de todos os genes foram adquiridas no site www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide (Tabela 5). As expressões dos genes foram avaliadas por RT-qPCR, executadas em placas de 96 poços, utilizando-se o StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Life Technologies, USA).

Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes, exceto a amostra). A expressão diferencial dos transcritos alvos foi determinada através do método de quantificação relativa em relação a um controle endógeno ou gene normatizador. Para esse fim foram testados o *Gapdh* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), o *B2m* (beta-2 microglobulina) e o *Hprt1* (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase), sendo o *B2m* selecionado para as análises de expressão gênica por ser o mais expresso nas amostras avaliadas. As reações de RT-qPCR foram padronizadas para encontrar a melhor temperatura de anelamento para cada gene em estudo, permitindo a identificação de um único pico de fluorescência para cada gene das amostras analisadas.

Tabela 4. Relação das sequências de oligonucleotídeos estudados.

Gene	<i>Sense 3' – 5'</i>	<i>Antisense 5' – 3'</i>
<i>Gapdh</i>	ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG	ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA
<i>Hprt1</i>	AGC TAC TGT AAT GAT CAG TCA ACG	AGA GGT CCT TTT CAC CAG CA
<i>B2m</i>	CAT GGC TCG CTC GGT GAC C	AAT GTG AGG CGG GTG GAA CTG
<i>Col1a1</i>	GAG CGG AGA GTA CTG GAT CG	GCT TCT TTT CCT TGG GGT TC
<i>Col3a1</i>	GCA CAG CAG TCC AAC GTA GA	TCT CCA AAT GGG ATC TCT GG
<i>Col5a1</i>	GGT CCC TGA CAC ACC TCA GT	TGC TCC TCA GGA ACC TCT GT
<i>Col5a2</i>	CCT CAG GGA ATT GAT GGA GA	AGA GCC AGG CAT GAG TCC TA
<i>Fbn1</i>	TGA GAT CGG AGC ACA CAA CT	GCC ATC CCC TGT ATA GCC AT
<i>Mmp8</i>	TCG CCT GAA GAC ACT TCC AT	GCG CTG CAT CTC TTT AAG CT
<i>Mmp12</i>	GCT GCT CCC ATG AAT GAC AG	TGC CAG AGT TGA GTT GTC CA
<i>Mmp13</i>	ACC AGA GAA GTG TGA CCC AG	AAG GTC ACG GGA TGG ATG TT
<i>Foxp3</i>	AAT AGT TCC TTC CCA GAG TTC TTC	ATG GTA GAT TTC ATT GAG TGT CCT
<i>Roryt</i>	TAG CAC TGA CGG CCA ACT TA	TCG GAA GGA CTT GCA GAC AT

A expressão diferencial dos genes de interesse foi determinada utilizando o método de cálculo do Delta Ct (ΔCt), que corresponde ao número de Ct (Cycle Threshold) do gene de interesse normalizado pelo Ct do gene de controle endógeno *B2m*, através da seguinte fórmula matemática: $\Delta Ct = Ct \text{ gene de interesse} - Ct \text{ gene referência}$. O valor de Ct corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente da reação cruze o limiar (*threshold*) acima do ruído de fundo (*background*), ou seja, a expressão do gene só é detectada quando o sinal fluorescente acumulado ultrapassa o *threshold*. Seguindo esse raciocínio, quanto menor o Ct, menor o número de ciclos de PCR necessários para detectar um gene, portanto maior sua expressão. Os valores de Ct para as amostras foram obtidos pela análise dos resultados dados pelo StepOne™ Software v2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A expressão relativa, usada para as análises estatísticas, foi calculada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ da amostra} - \Delta Ct \text{ médio das amostras do grupo controle}$$

4.12. Imunofenotipagem de células T por citometria de fluxo

Dos mesmos subgrupos de animais dos quais foram retirados os pulmões para congelamento, foram coletados os linfonodos mediastinais e o baço para realização de imunofenotipagem de células T regulatórias. Estes tecidos foram imersos em cerca de 5 ml de meio RPMI 1640 gelado, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB – Soro Fetal Bovino, Sigma). Para o isolamento das células esplênicas e linfócitos, com o auxílio de um êmbolo, os baços e linfonodos foram macerados e homogeneizados em peneiras de nylon de 40 µm (Cell Strainer, BD, San Diego, CA, USA), encaixadas em placas de petri, contendo o meio enriquecido com 10% de SFB. As amostras de meio contendo as células foram transferidas para tubos tipo falcon de 15 ml e mantidas em gelo. Em seguida, foram centrifugadas e lavadas com RPMI 1640, por duas vezes, e ressuspensas em 1 ml de PBS.

Para cada amostra, um volume contendo cerca de 1×10^6 células foi transferido para tubos de ensaio de 5ml, específicos para citometria de fluxo. Primeiramente, as células foram incubadas com o anticorpo anti-CD16/CD32 (Fc block) por 10 minutos a 4°C, a fim de bloquear os receptores Fc. As células foram então incubadas no escuro, por 30 min, com 20 µl de um mix de anticorpos monoclonais de superfície (**Tabela 6**), marcados com fluorocromos para identificação das diferentes populações celulares, diluídos em PBS. Após esse período, foram adicionados 500 µl de PBS, e as amostras foram centrifugadas com posterior descarte do sobrenadante. No pellet de células foram adicionados 250 µl do tampão de fixação/permeabilização (eBioscience™ Fixation/Permeabilization Diluent, Invitrogen), realizada agitação em Vortex e incubação por 30 min à 4°C, no escuro. Na próxima etapa, as células foram lavadas por duas vezes com 250 µl do tampão de permeabilização (eBioscience™ Permeabilization Buffer (10X) and Concentrate, Invitrogen), por centrifugação a 1500 rpm, durante 5 min à 4°C. Posteriormente, os pellets de células foram ressuspensos com 3 µl do anticorpo FOXP3 diluído em 50 µl do tampão de permeabilização, agitados em Vortex e incubados por 30 min à 4°C, no escuro.

Por fim, as amostras foram lavadas com 250 µl do tampão de permeabilização, centrifugadas a 1500 rpm por 5 min e o sobrenadante descartado. Para a leitura no citômetro de fluxo (LSR Fortessa, BD), as amostras foram ressuspensas em 300 µl de

PBS. Para cada amostra foram adquiridos 500.000 eventos no citômetro de fluxo. Os dados obtidos foram analisados no programa FlowJo X 10.0.6.

Tabela 5. Painel para marcação de Linfócitos T e Treg.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Marca
CD16/CD32	-	2.4G2	BD Pharmingen™
CD3	PercP-Cy5	17A2	BD Pharmingen™
CD4	FITC	H129.19	BD Pharmingen™
CD8	APC-Cy7	53-6.7	BD Pharmingen™
CD25	APC	PC61	BD Pharmingen™
CD62L	Alexa Fluor 700	MEL-14	BD Pharmingen™
CD44	BV 605	IM7	BD Horizon™
LAP	PE	TW7-16B4	BD Pharmingen™
PD1	PE-Cy7	J43	eBioscience™
FOXP3	V450	MF23	BD Horizon™

4.13. Preparo das amostras biológicas e dosagem de citocinas

4.13.1. Preparo dos homogenatos e dosagem de proteínas totais

Para preparo dos homogenatos de tecido foram separados os 2/3 superiores do pulmão esquerdo e o baço inteiro dos animais. As amostras de tecido foram pesadas individualmente, em balança analítica, e separadas em microtubos contendo PBS com inibidor de proteases (SIGMA P2714-1BTL, solução 1:10). Os pulmões (peso médio de 43,89mg) foram preparados com 750µl da solução de PBS com inibidor e os baços (peso médio de 32,62mg) com 500µl dessa mesma solução. As amostras foram homogeneizadas no PowerLyzer® 24 Homogenizer (QIAGEN), em 3 ciclos de 5 segundos de agitação para 15 segundos de pausa, depois centrifugadas (10min, 4000RCF, 4°C), e o sobrenadante aliquoteado em microtubos de 200µl, que foram armazenados em freezer -75°C. Posteriormente, um kit baseado em Ácido bicinconícnico

foi utilizado para dosar a quantidade de proteínas totais nos homogenatos de pulmão e baço (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit - BCA1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguindo os procedimentos preconizados pelo fabricante do kit.

4.13.2. Quantificação de citocinas por citometria de fluxo

O perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias solúveis foi avaliado no soro, FLBA, e nos homogenatos do pulmão e do baço, por citometria de fluxo (CBA - cytometric bead array), utilizando o kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Enhanced Sensitivity Master Buffer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). O ensaio de CBA consiste na utilização de *beads* acopladas a fluorocromos, e permite a detecção de múltiplas citocinas em uma mesma amostra, simultaneamente. As amostras foram processadas e os protocolos de preparo foram seguidos conforme preconizado no manual do fabricante do kit. Foram avaliadas as seguintes citocinas: IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-6 e TNF e a leitura realizada em citômetro de fluxo (LSR Fortessa, BD). Os resultados foram expressos em fentograma de citocina por miligrama de proteínas totais dosadas nos homogenatos.

4.13.3. Quantificação de citocinas por ELISA

A dosagem de IL-10 e IL-17A foi realizada também pelo método imunoenzimático (ELISA). Microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, conforme manual do fabricante do kit (ELISA MAXTM Deluxe Set Mouse IL-10 e ELISA MAXTM Deluxe Set Mouse IL-17A; BioLegend, Inc), e incubadas de um dia para outro (16-18 h), em geladeira (4°C). A seguir, todas as etapas do ensaio foram realizadas em temperatura ambiente. O bloqueio foi realizado com solução disponível no kit, por 1 hora, com agitação em agitador de placas. As amostras de homogenatos de pulmão e baço foram preparadas conforme instruções do fabricante e incubadas por 2 horas, com agitação. O anticorpo de detecção foi, então, incubado por 1 hora, mantendo agitação. A complexo Avidina-HRP do kit foi incubado por 30 minutos, com agitação e, em seguida, o substrato TMB do kit por 20 minutos, no escuro. A reação foi interrompida com a solução ácida de parada, e as placas foram lidas em leitor de ELISA (Spectra Max 190; Molecular Devices), nas absorvâncias de 450nm e 570nm. A curva padrão foi gerada usando um algoritmo de ajuste de curva

logística de 5 ou 4 parâmetros, e as concentrações calculadas das amostras foram dadas automaticamente pelo software do equipamento (SoftMax Pro v5.4). Os resultados foram expressos em picograma de citocina por miligrama de proteínas totais dosadas nos homogenatos.

4.14. Quantificação de colágeno total pela dosagem de 4-hidroxirolina

No mesmo procedimento de coleta dos pulmões direitos para análises por RT-qPCR, o terço inferior do pulmão esquerdo dos animais foi separado e congelado em freezer -75°C para a posterior dosagem de 4-hidroxirolina. Foi utilizado o método colorimétrico de Bergmann e Loxley (1963)¹⁷³, que segue as etapas de hidrólise ácida, neutralização, oxidação e coloração. As frações dos pulmões foram então retiradas do freezer, pesadas, colocadas em microtubos plásticos de 1,5 ml, e liofilizados por aproximadamente 17 horas.

Os tecidos liofilizados foram pesados em balança de precisão, fracionados, e solubilizados em 2 ml de HCl 6N em tubos pirex, resistentes à alta temperatura, e mantidos em estufa por 22 horas a 100°C , para realização de hidrólise ácida. As amostras hidrolisadas foram filtradas e 1 ml do filtrado passou por neutralização (pH~7,0), com solução 100% saturada de hidróxido de lítio. Posteriormente, foi transferido 1 ml dessa amostra para cada um dos tubos de duplicata, e a esses tubos foram adicionados 2 ml de isopropanol e 1 ml de solução oxidante, contendo cloramina T 7%. Essa mistura foi mantida por 4 minutos em temperatura ambiente, para que ocorresse a reação de oxidação. A seguir, foram adicionados 2 ml do reagente de Ehrlich (ácido perclórico, álcool isopropílico e 4-dimetilaminobenzaldeído), para o desenvolvimento da reação colorimétrica. Os tubos foram vedados e colocados em banho Maria, a 60°C , por 20 minutos. Foram preparadas 2 soluções-padrão para o controle do ensaio: 1. Duplicatas de solução padrão de 4-hidroxirolina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) na concentração de $4\ \mu\text{g/ml}$, dissolvida em 1 ml de água destilada; 2. Controle Branco com 1 ml de água destilada. A estas soluções foram acrescentados os mesmos reagentes utilizados nas amostras, nas mesmas proporções e condições. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro (Evolution 60S UV-Visible, Thermo Scientific, Madison, WI, USA), em comprimento de onda de 560 nm.

Como controle de qualidade da reação foi adotado um fator (F) de variância entre 9 e 13, calculado através da divisão de 4 pela absorbância da média dos padrões de 4-hidroxirolina do ensaio. O cálculo da concentração de 4-hidroxirolina foi dado pela relação abaixo e o resultado foi apresentado em μg de 4-hidroxirolina por mg de tecido:

$$\frac{F \times \text{Absorbância da amostra} \times \text{Volume neutralizado} \times 2 \text{ ml}}{\text{Peso seco da amostra}}$$

4.15. Análise Estatística

Os dados obtidos foram armazenados em banco de dados elaborado em planilhas eletrônicas do Microsoft Excel e analisados mediante testes estatísticos para comparação, baseados na distribuição das variáveis. A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Para a comparação entre os três grupos amostrais foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações Holm-Sidak, para variáveis de distribuição normal, e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn, para variáveis de distribuição não-normal. Para que fosse considerada diferença entre as variáveis, foi utilizado o valor de significância estatística menor que 5% ($p < 0,05$). Os dados foram representados em mediana, interquartis e distribuição das variáveis numéricas, através de gráficos do tipo *violin plot*. O gráfico do tipo *violin plot* combina a visualização do *box plot* com um *plot* de densidade semelhante a um histograma, tendo sido escolhido por sua eficiência em demonstrar a distribuição de dados individuais e sua densidade em um conjunto de dados, de forma clara e intuitiva.

5. RESULTADOS

5.1. Mecânica do sistema respiratório

Na análise dos parâmetros de mecânica do sistema respiratório, não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais para nenhum dos parâmetros avaliados (Raw, Gtis e Htis). Os valores obtidos para os parâmetros avaliados estão representados na **Figura 7**.

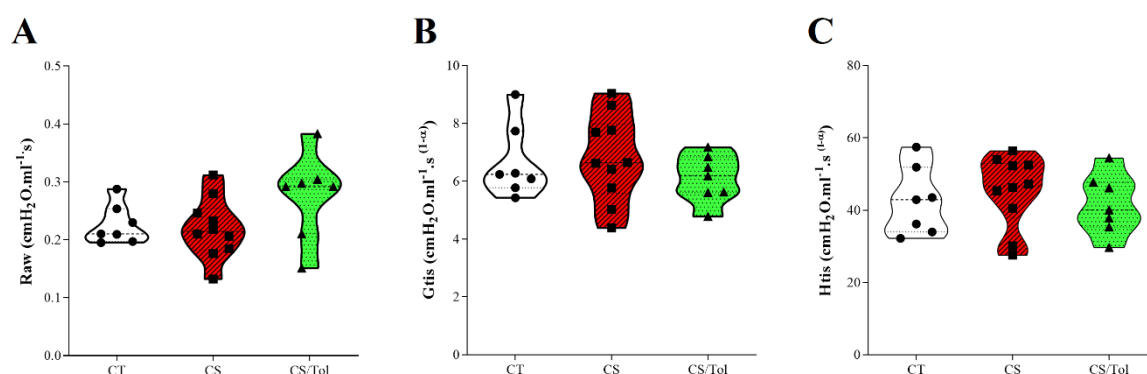


Figura 7. Mecânica do sistema respiratório nos grupos experimentais. Raw (A), Htis (B) e Gtis (C). Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos três parâmetros avaliados. (Grupo Controle, n=7; Grupo Fumo, n=10; Grupo Fumo Tolerado, n=7). Teste one-way ANOVA seguido teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Gráficos em *violin plot*, mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

5.2. Análise das células inflamatórias no lavado broncoalveolar

O infiltrado inflamatório presente na luz das vias aéreas foi avaliado através da quantificação das células presentes no FLBA. Observamos um influxo importante de células inflamatórias no FLBA dos grupos expostos à fumaça de cigarro (F e FT), com aumento de células totais nesses grupos com relação ao grupo C ($p=0,0027$ e $p=0,0035$, respectivamente - **Figura 8A**). A avaliação diferencial mostrou predomínio de macrófagos, e aumento significativo desse tipo celular no grupo F ($p=0,0017$) e no grupo FT ($p=0,0093$) com relação ao C (**Figura 8B**). O tratamento de tolerância com Col V (grupo FT) não parece ter influenciado a migração de macrófagos para a luz dos alvéolos, que foi similar ao grupo F. Outras células do sistema imunológico, como neutrófilos, eosinófilos e linfócitos, não apresentaram quantidades suficientes em nenhum dos grupos estudados para viabilizar análises estatísticas (**Figura 8C-E**).

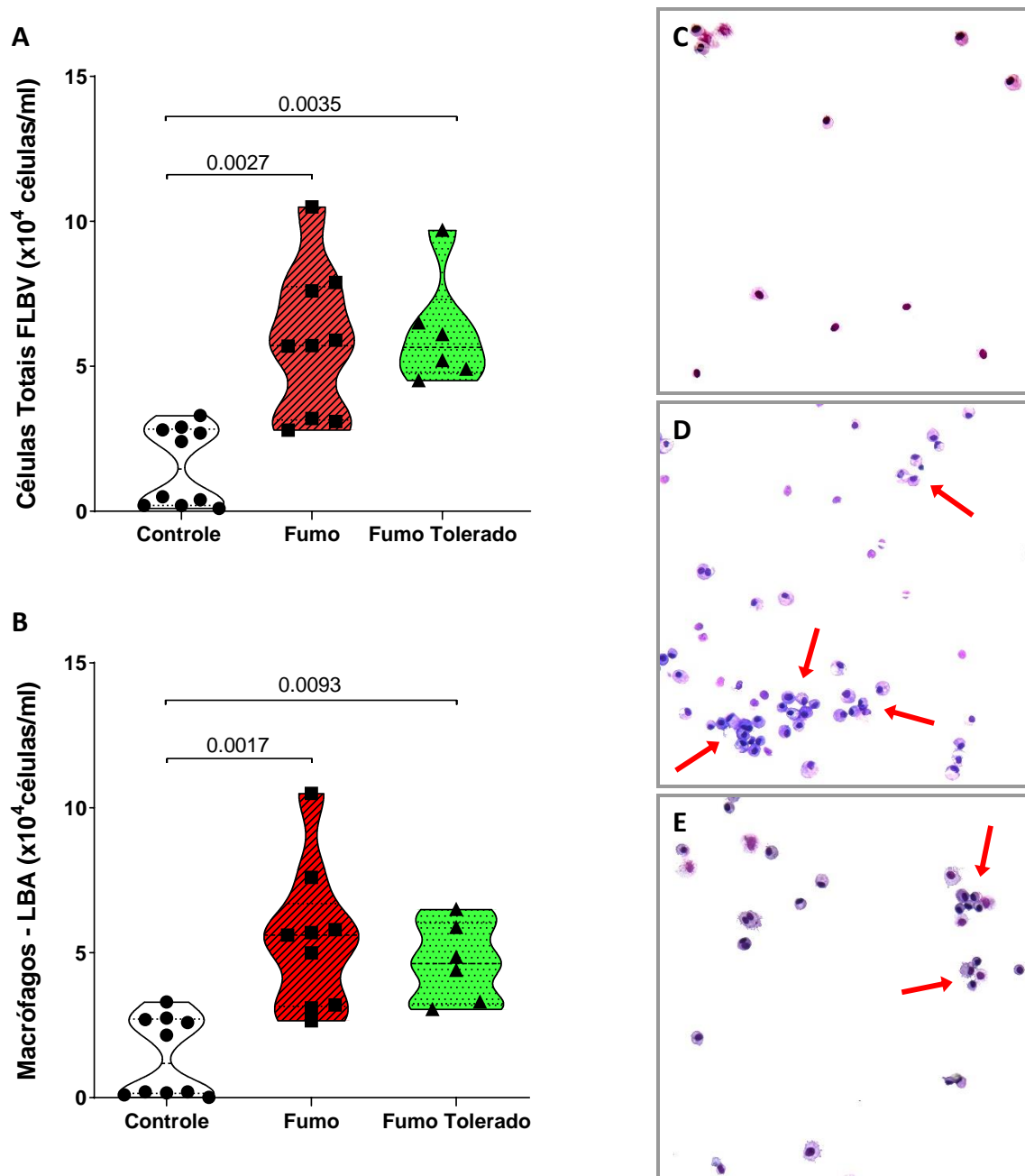


Figura 8. Contagem de células totais e macrófagos no BALF e fotomicrografias representativas de células totais no BALF. Grupos Controle, Fumo e Fumo Tolerado. (A) aumento significativo de células totais no FLBA nos grupos Fumo ($p=0,0027$) e Fumo Tolerado ($p=0,0035$), quando comparado ao grupo Controle. (B) aumento significativo no número de macrófagos no FLBA no grupo Fumo ($p=0,0017$) e no grupo Fumo Tolerado ($p=0,0093$) quando comparado ao grupo Controle. (Grupo Controle, $n=10$; Grupo Fumo, $n=9$; Grupo Fumo Tolerado, $n=6$). Teste de Kruskal-Wallis seguido teste de comparações múltiplas de Dunn. Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados. Fotomicrografias representativas do infiltrado inflamatório no FLBA do grupo controle (C), grupo fumo (D) e fumo tolerado (E), mostrando aumento do influxo de células nos grupos expostos à fumaça de cigarro (200x). As setas mostram acúmulo de macrófagos. Coloração Diff-Quik.

5.3. Avaliação da estrutura do parênquima pulmonar

Após quatro semanas, os camundongos expostos à fumaça de cigarro (Grupo F) já apresentaram alterações na estrutura do parênquima alveolar e das vias aéreas. Estas alterações foram caracterizadas por um evidente alargamento dos espaços aéreos e perda de unidades alveolares, resultantes da destruição de paredes dos alvéolos (**Figura 9D, E, F**), lesões localizadas principalmente nas porções mais distais do parênquima pulmonar, comparação ao parênquima pulmonar nos animais do grupo controle (**Figura 9A, B, C**).

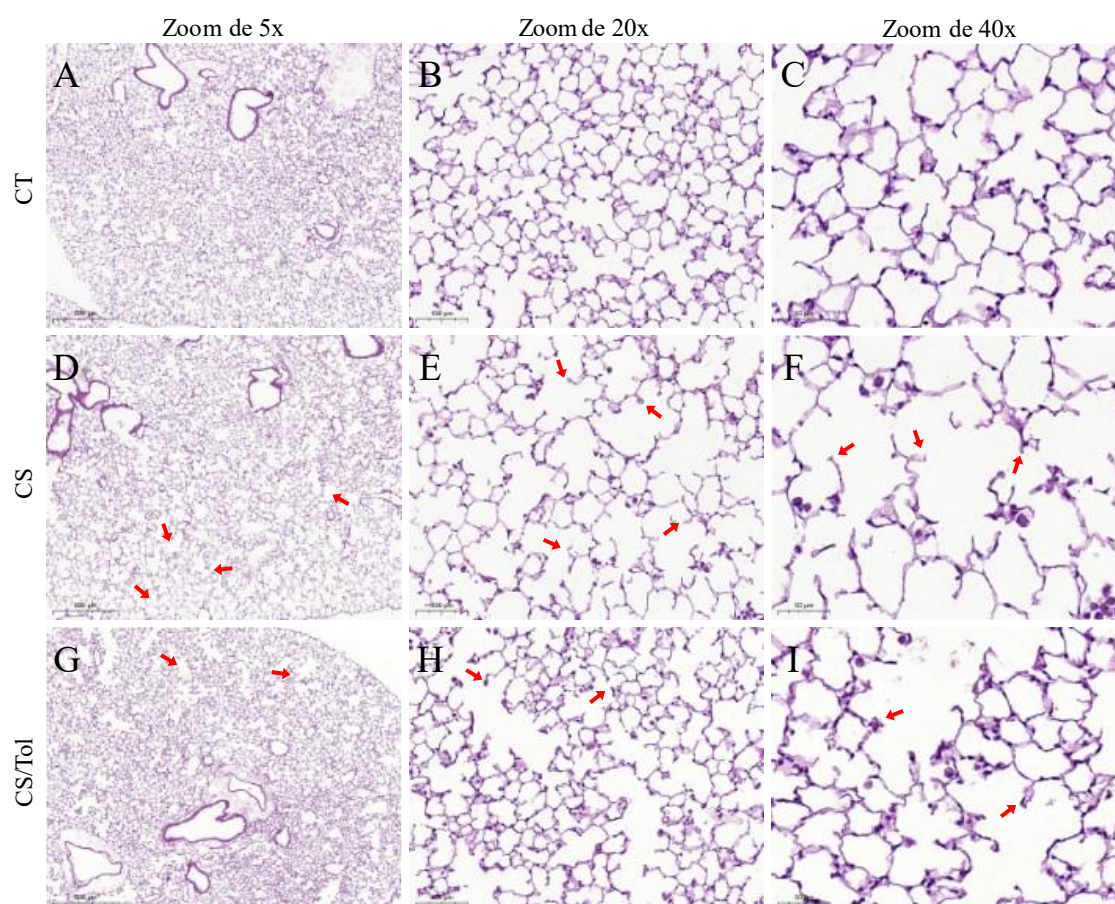


Figura 9. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar distal dos animais do estudo. (A, B e C) Controle-C, (D, E e F) Fumo-F e (G, H e I) Fumo Tolerado-FT. As setas indicam áreas de alargamento alveolar. Identificamos alargamento dos espaços aéreos distais nos grupos expostos à fumaça de cigarro (F e FT), comparados ao grupo C. Notar no grupo FT, diminuição do alargamento dos espaços aéreos quando comparado ao grupo F. Imagens escaneadas em zoom de 5x, 20x e 40x. Coloração H&E.

Essa alteração na estrutura do parênquima ocorreu nos dois grupos expostos à fumaça de cigarro (F e FT). No entanto, as lesões foram difusas e frequentes somente no grupo F, e mais discretas e esparsas no grupo que recebeu o tratamento de tolerância ao

Col V (FT) (**Figura 9G, H, I**). Essa diferença na destruição do parênquima entre os grupos foi confirmada através da quantificação do Lm, que apresentou aumento somente no grupo F ($p=0,0064$), porém não no grupo FT com relação ao grupo C (**Figura 10**). Inclusive, houve uma redução significativa do Lm no grupo FT quando comparado ao grupo F ($p=0,0032$). A distribuição dos dados mostra que os pulmões dos animais do grupo FT eram semelhantes aos dos animais do grupo C, indicando que a tolerância com colágeno V preveniu a destruição do parênquima pulmonar causada pela fumaça do cigarro.

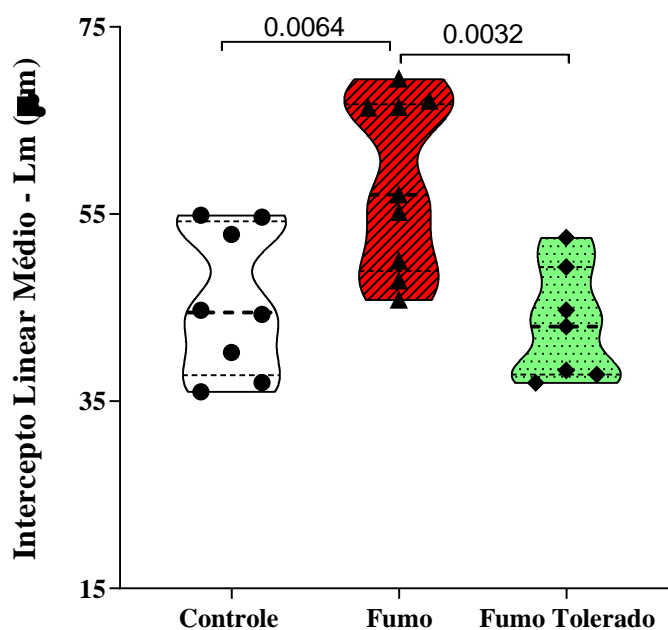


Figura 10. Representação gráfica dos valores do Intercepto Linear Médio. Lm no parênquima pulmonar dos grupos Controle-C, Fumo-F e Fumo Tolerado-FT. Observamos diferença significativa entre o grupo C e F ($p=0,0064$), e entre os grupos F e FT ($p=0,0032$). O grupo FT não apresentou aumento do Lm quando comparado ao grupo C. (Grupo Controle, $n=8$; Grupo Fumo, $n=9$; Grupo Fumo Tolerado, $n=7$). Teste one-way ANOVA seguido teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

5.4. Avaliação do edema no eixo peribroncovascular

A avaliação das fotomicrografias coradas com H&E mostrou presença de edema no parênquima e na região peribroncovascular, com aumento do influxo de células inflamatórias (macrófagos e linfócitos), nos camundongos expostos à fumaça de cigarro F (**Figura 11C, D**) e FT (**Figura 11E, F**), comparados ao grupo C (**Figura 11A, B**). A

presença de edema no tecido pulmonar corrobora com as alterações anteriormente vistas no parênquima pulmonar dos grupos F e FT (**Figura 9D-I**). Também foi observado um discreto espessamento do epitélio brônquico dos animais expostos à fumaça de cigarro (F e FT) (**Figura 11D, F**), além de áreas edemaciadas na região peribroncovascular e na microvasculatura dos septos alveolares, especialmente no grupo F (**Figura 11C**).

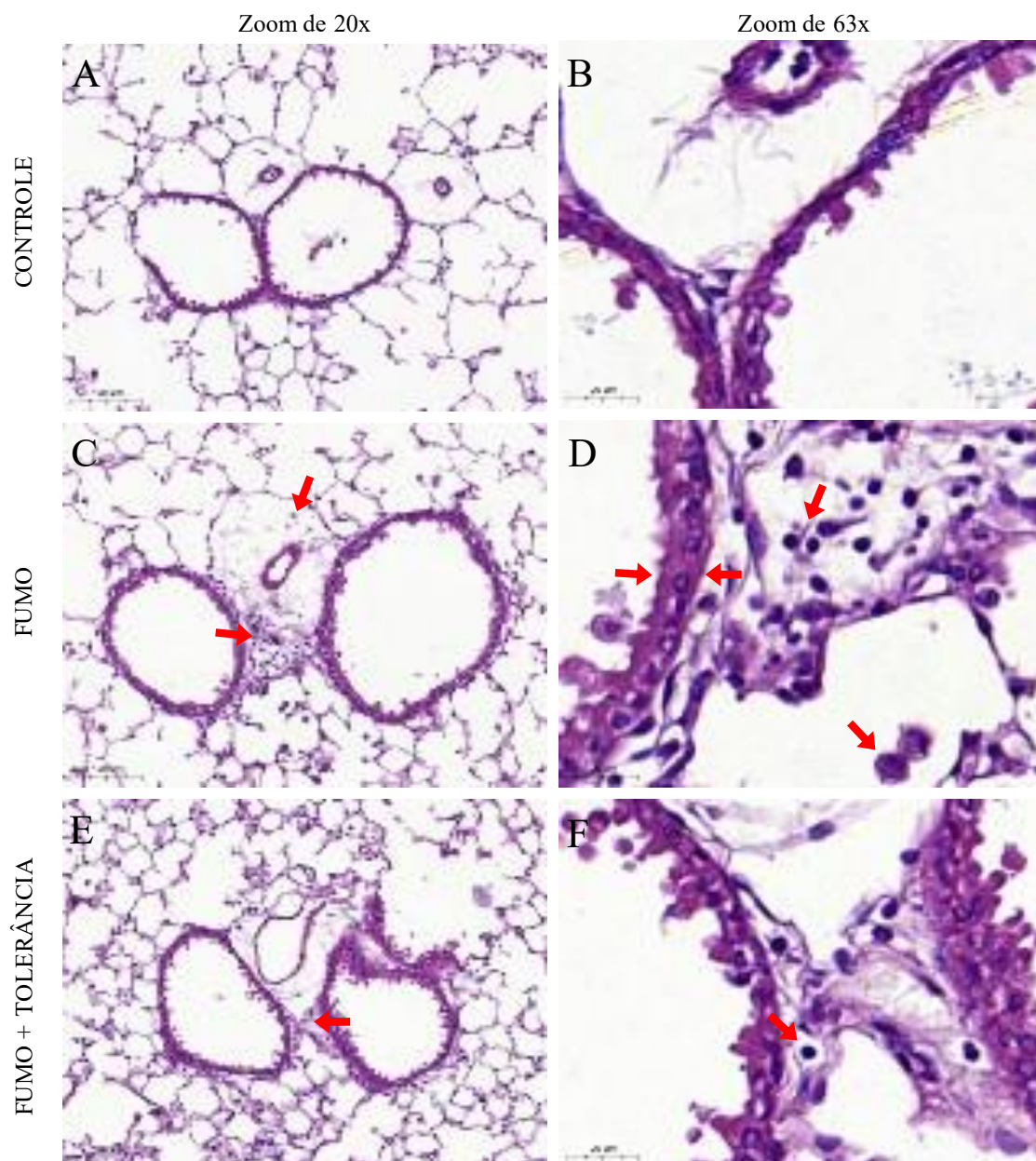


Figura 11. Fotomicrografias representativas da região broncovascular dos animais. Grupos Controle (A e B), Fumo (C e D) e Fumo Tolerado (E e F). As setas chamam atenção para áreas de edema, células inflamatórias e espessamento do epitélio brônquico. Observamos a presença de edema perivascular nos grupos expostos ao fumo (F e FT) comparados ao grupo controle C, além do aumento de células inflamatórias e discreto espessamento do epitélio brônquico. Imagens escaneadas em zoom de 20x e 63x. Coloração H&E.

A análise histomorfométrica confirmou o aumento de áreas de edema na região peribroncovascular nos animais do grupo F, sendo o edema significativamente maior no grupo F quando comparado ao grupo C ($p=0,0082$), e significativamente menor no grupo FT quando comparado ao grupo F ($p=0,043$) (**Figura 12**).

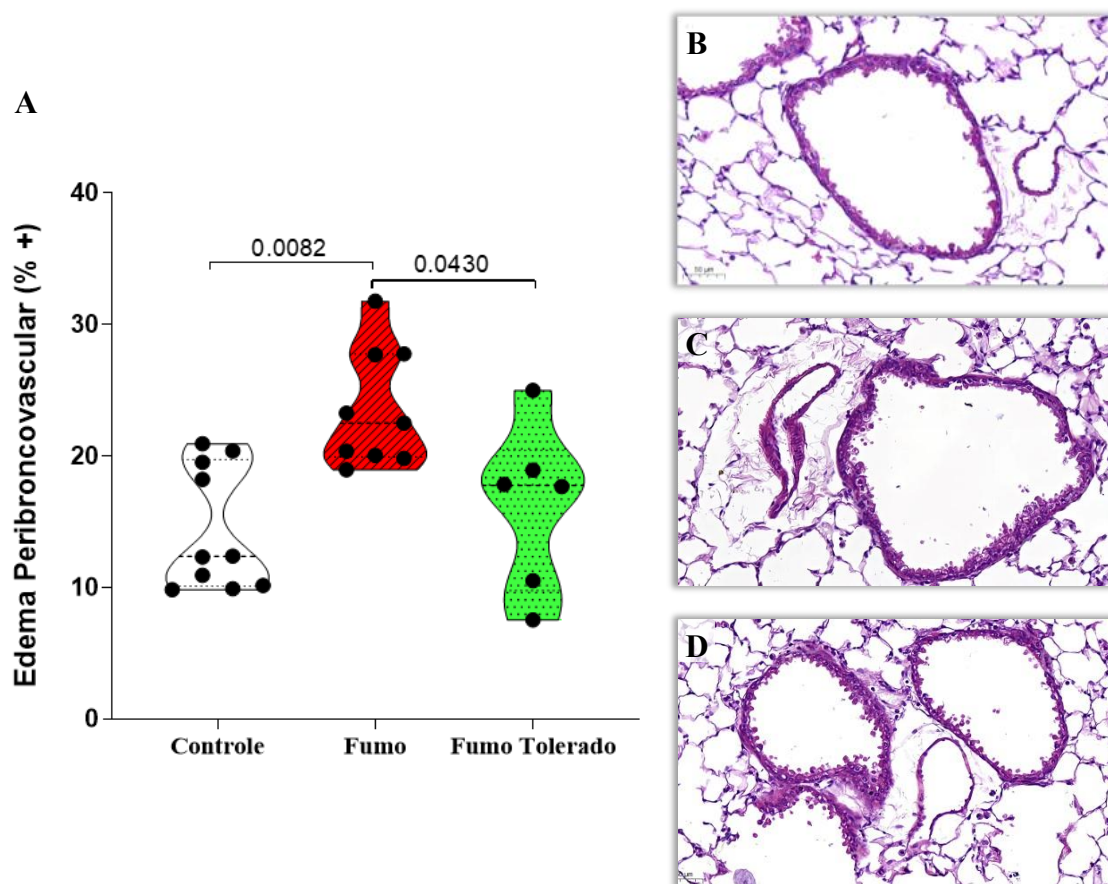


Figura 12. Quantificação do edema peribroncovascular e fotomicrografias representativas da região broncovascular dos pulmões. Grupos Controle-C, Fumo-F e Fumo Tolerado-FT. (A) aumento do edema peribroncovascular nos animais do grupo F, quando comparado ao grupo C ($p=0,0082$) e ao grupo FT ($p=0,043$). (Grupo Controle, $n=10$; Grupo Fumo, $n=9$; Grupo Fumo Tolerado, $n=6$). Teste de Kruskal-Wallis seguido teste de comparações múltiplas de Dunn. Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados. Fotomicrografias da região peribroncovascular dos grupos Controle (B), Fumo (C) e Fumo Tolerado (D), evidenciando aumento da área de edema na região peribroncovascular nos animais expostos à fumaça de cigarro. Aumento de 200x. Coloração H&E.

5.5. Proteínas fibrilares da matriz extracelular do pulmão

Após um mês de exposição à fumaça de cigarro, houve alteração na proporção dos tipos de colágeno no parênquima pulmonar dos animais dos grupos F e FT, quando comparados ao grupo C, principalmente na proporção do Col I (**Figura 13A, D e G**) e do Col V (**Figura 13C, F e I**).

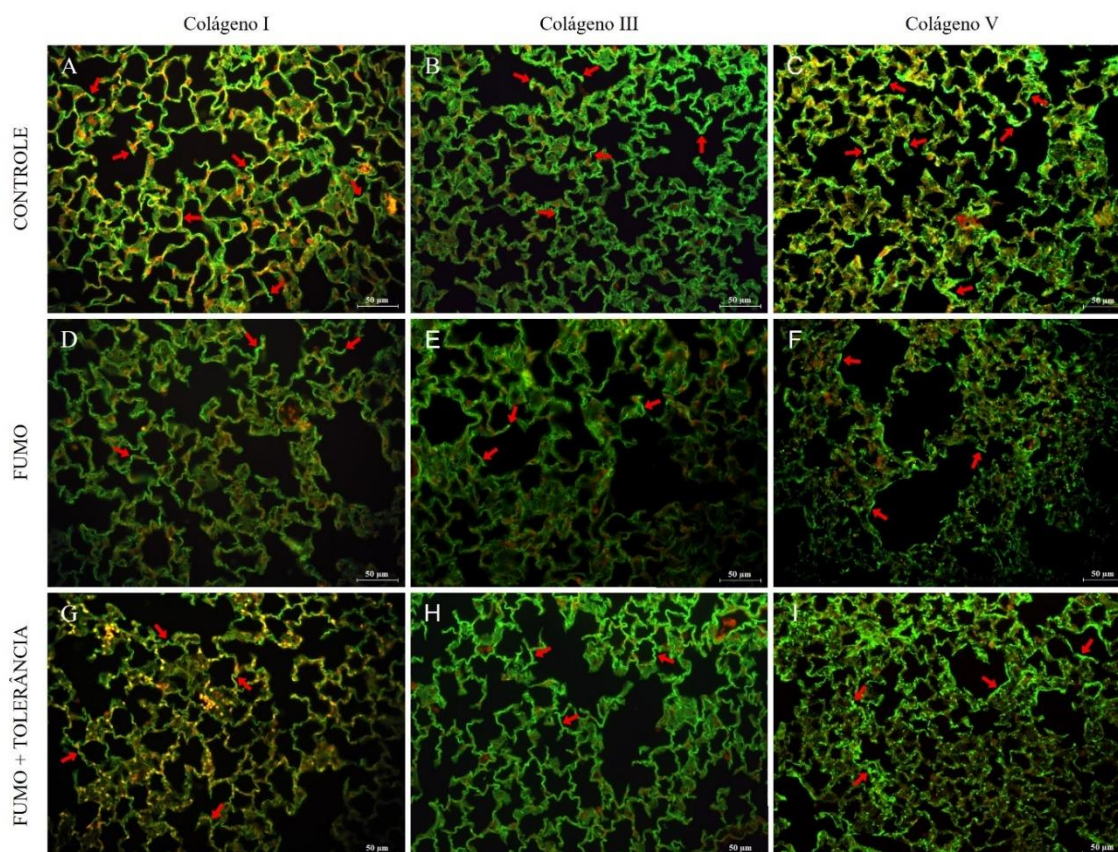


Figura 13. Imunofluorescência dos colágenos I, III e V no parênquima pulmonar. Imunomarcado com anti-colágeno I (A, D e G), anti-colágeno III (B, E e H) e anti-colágeno V (C, F e I) dos animais dos grupos Controle (A, B e C), Fumo (D, E e F) e Fumo Tolerado (G, H, I). As setas indicam algumas áreas de marcação positiva, na cor verde. Notamos discreta redução do colágeno III nos grupos F e FT, e redução mais expressiva do colágeno I e do colágeno V, principalmente no grupo F, quando comparados ao grupo C. Aumento de 400x. Imunofluorescência.

Observamos uma redução na proporção de fibras do colágeno do tipo I (**Figura 14A-C**) nos grupos expostos à fumaça de cigarro, e essa redução foi significativa no grupo F, quando comparado ao grupo C ($p=0,0012$), conforme demonstrado na representação gráfica na **Figura 14D**. Com relação ao colágeno do tipo III, embora tenha havido uma discreta redução na sua proporção em animais expostos à fumaça de cigarro, essa redução não foi significativa, não havendo diferença entre os grupos na análise estatística (**Figura 15A-D**). A proporção de Col V no parênquima do grupo F teve redução significativa quando comparado ao grupo C ($p=0,0015$), e no grupo FT comparado ao grupo C ($p=0,0361$) (**Figura 16A-D**). Houve uma tendência de aumento do Col I ($p=0,0513$) e Col V ($p=0,07$) no grupo FT quando comparado ao grupo F.

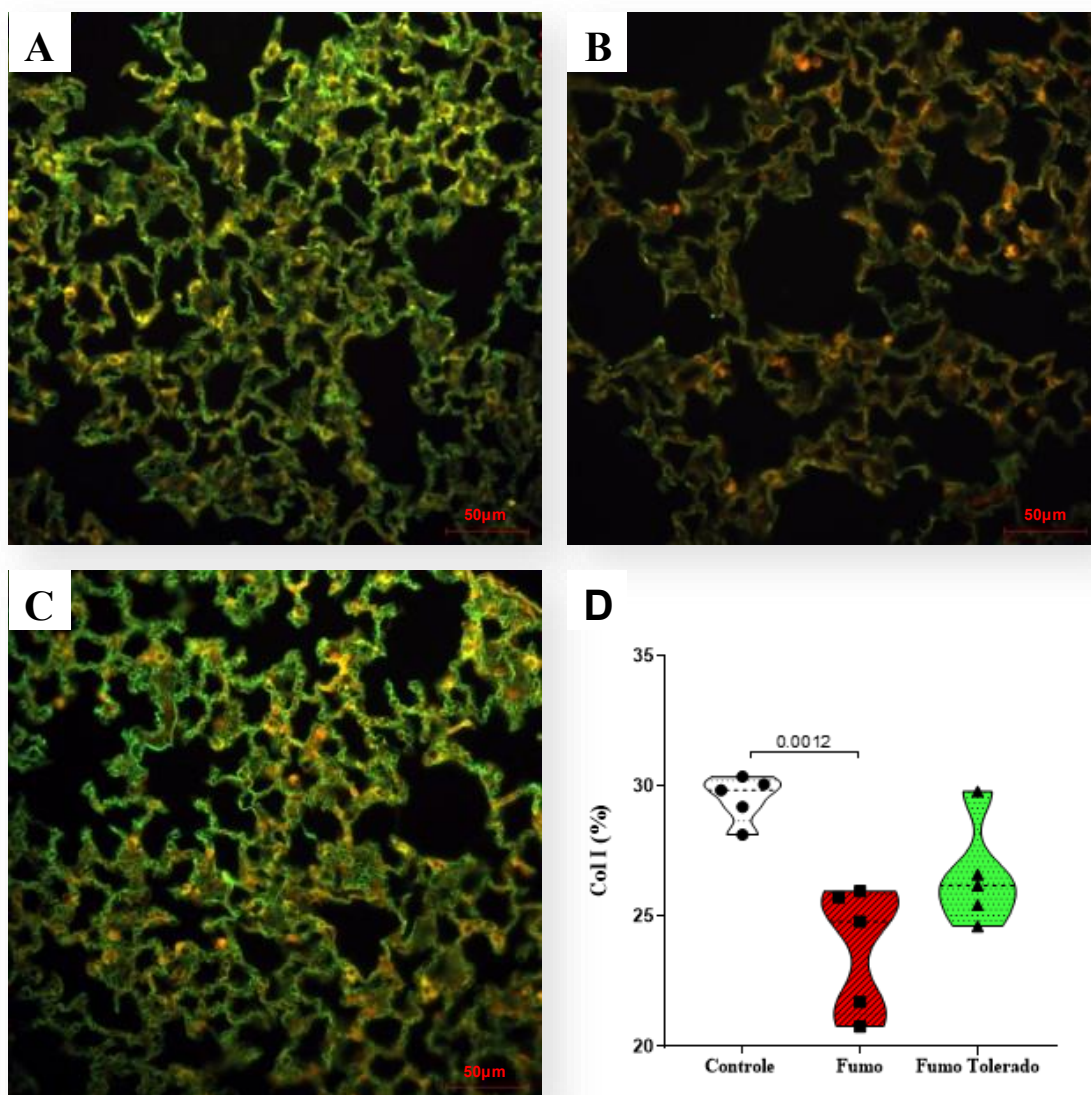


Figura 14. Quantificação da proporção de colágeno tipo I no pulmão. Fotomicrografias do parênquima pulmonar dos grupos Controle-C (A), Fumo-F (B) e Fumo Tolerado-FT (C), evidenciando redução da expressão de colágeno tipo I com relação à área de tecido no grupo F. Aumento de 400x. Imunofluorescência, marcação positiva em verde fluorescente. (D) Representação gráfica da análise histomorfométrica da expressão de Col I nos três grupos experimentais; houve redução na proporção desse colágeno nos grupos expostos à fumaça de cigarro, e essa redução foi significativa no grupo Fumo em relação ao grupo Controle ($p=0,0012$) ($n=5$ em cada grupo experimental). Teste one-way ANOVA seguido teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

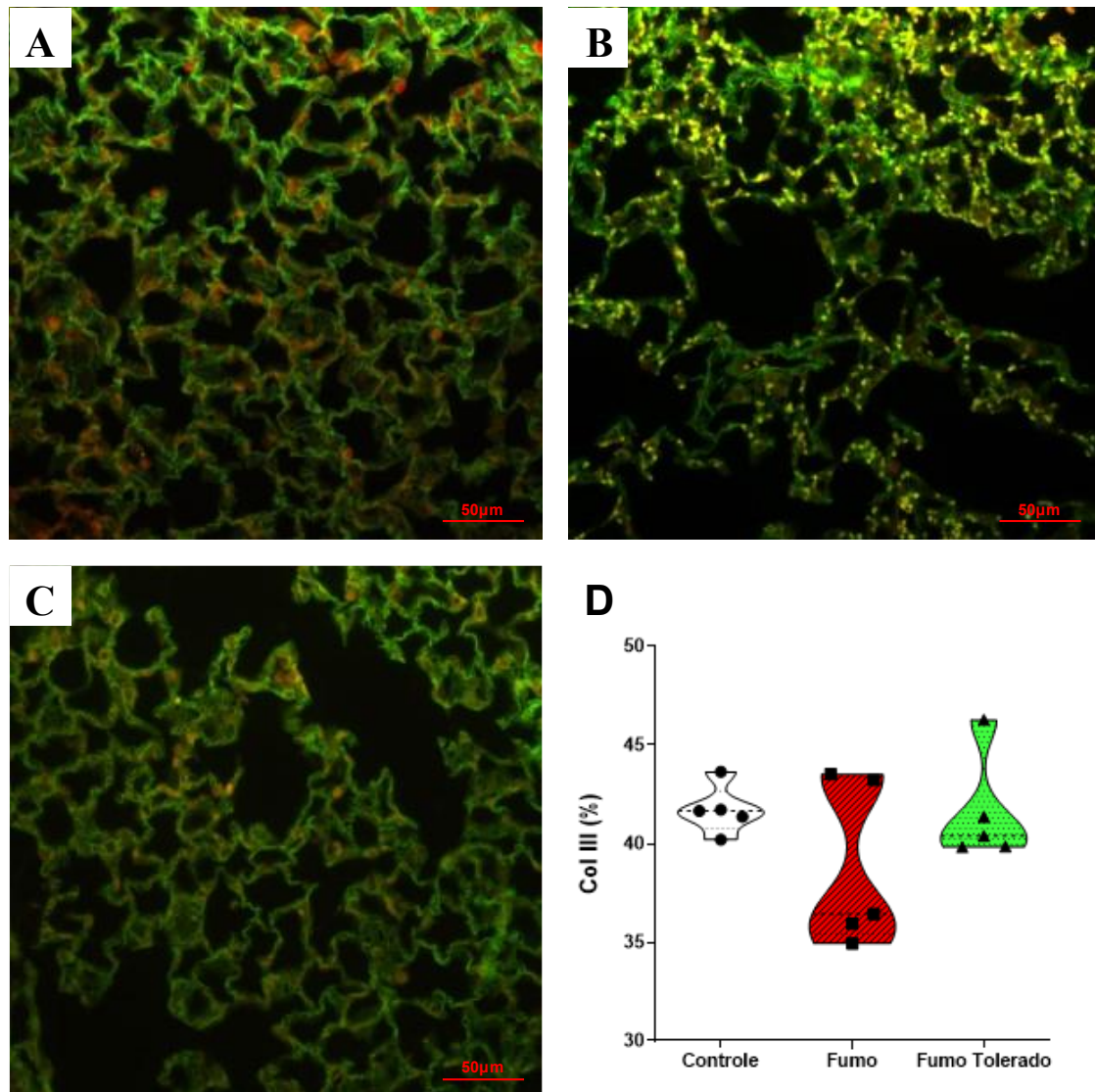


Figura 15. Quantificação da proporção de colágeno tipo III no pulmão. Fotomicrografias do parênquima pulmonar dos grupos Controle-C (A), Fumo-F (B) e Fumo Tolerado-FT (C), evidenciando discreta redução da proporção de colágeno tipo III com relação à área de tecido no grupo F. Aumento de 400x. Imunofluorescência, marcação positiva em verde fluorescente. (D) Representação gráfica da análise histomorfométrica da proporção de Col III nos três grupos experimentais; não houve diferença estatística entre os 3 grupos (n=5 em cada grupo experimental). Teste Kruskal-Wallis seguido teste de comparações múltiplas de Dunn. Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

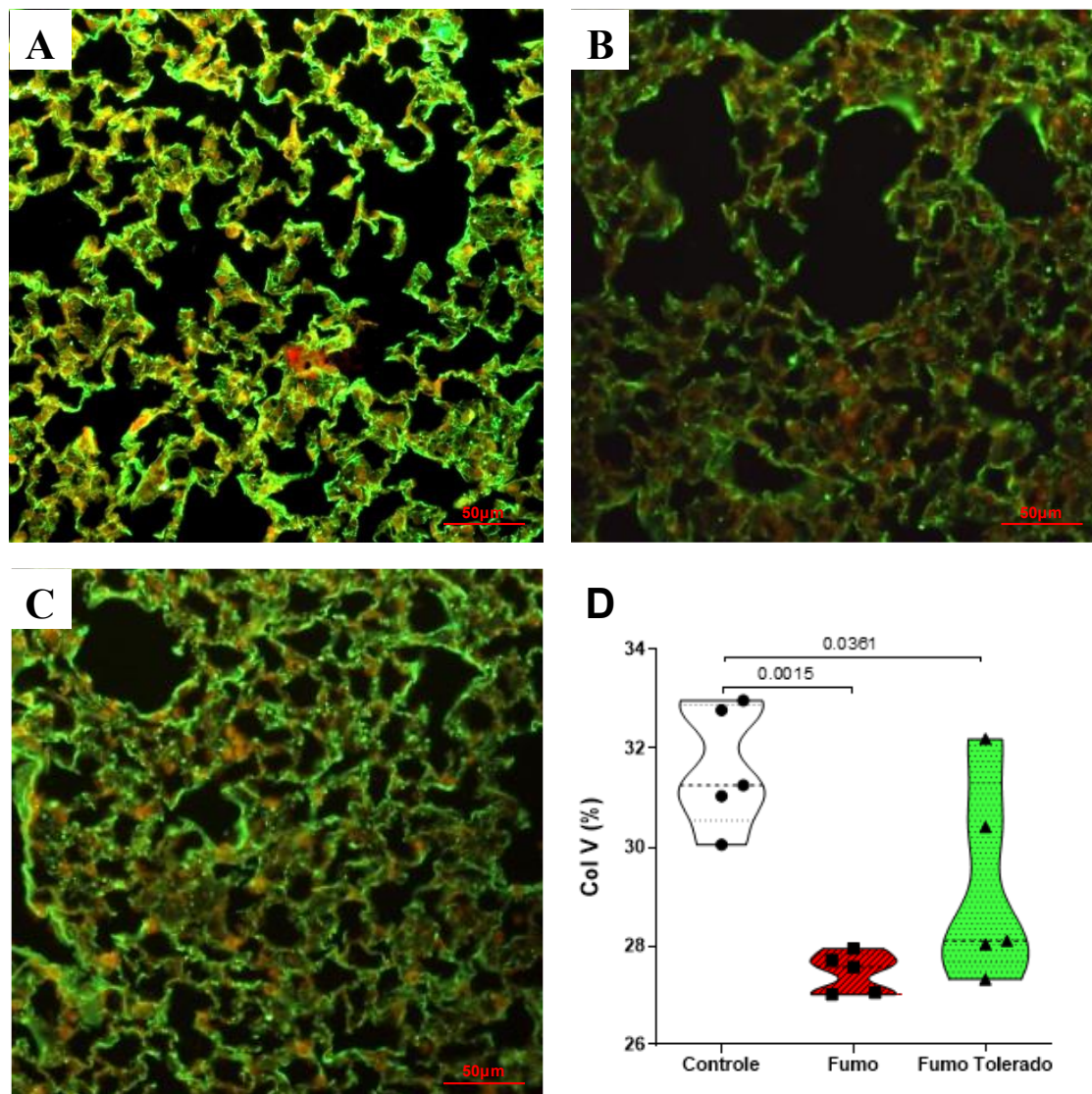


Figura 16. Quantificação da proporção de colágeno tipo V no pulmão. Fotomicrografias do parênquima pulmonar dos grupos Controle-C (A), Fumo-F (B) e Fumo Tolerado-FT (C), evidenciando redução da proporção de colágeno tipo V com relação à área de tecido no grupo F e FT. Aumento de 400x. Imunofluorescência, marcação positiva em verde fluorescente. (D) Representação gráfica da análise histomorfométrica da proporção de Col V nos três grupos experimentais; houve redução na proporção desse colágeno nos grupos expostos à fumaça de cigarro, e essa redução foi significativa no grupo F em relação ao grupo C ($p=0,0015$) e no grupo FT em relação ao grupo C ($p=0,0361$) ($n=5$ em cada grupo experimental). Teste one-way ANOVA seguido teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

No que se refere à avaliação histomorfométrica das fibras elásticas coradas por resorcina-fucsina oxidada, encontramos aumento na proporção dessas fibras no parênquima pulmonar dos animais de ambos os grupos expostos à fumaça de cigarro, caracterizado pela intensidade de coloração pela resorcina-fucsina (**Figura 17A - C**). Entretanto, esse aumento na proporção de fibras elásticas só foi significativo no grupo Fumo (F), quando comparado ao grupo Controle (C) ($p=0,0386$) (**Figura 17D**).

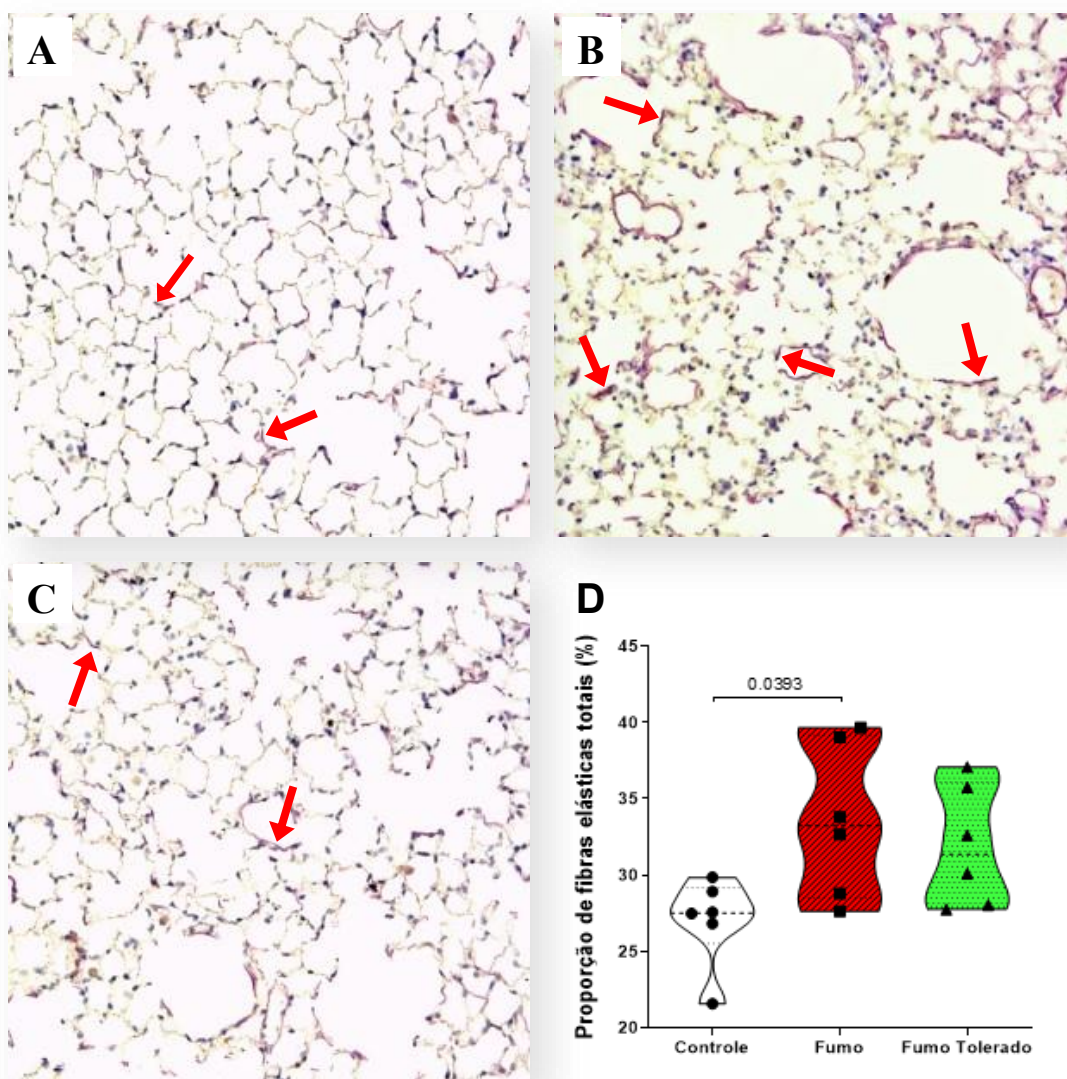


Figura 17. Fotomicrografias representativas das fibras elásticas no parênquima pulmonar. Grupos Controle-C (A), Fumo-F (B) e Fumo Tolerado-FT (C), coradas pela resorcina-fucsina. As setas indicam áreas de coloração positiva, na cor púrpura. Aumento de 400x. (D) Observamos aumento dessas fibras nos grupos expostos à fumaça de cigarro, significativo para o grupo F ($p=0,0393$) quando comparado ao grupo C. ($n=6$ camundongos por grupo experimental). Teste one-way ANOVA seguido teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Gráfico em *violin plot*, mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

Por outro lado, conforme representado graficamente na **Figura 18**, a quantificação do colágeno total, através da dosagem pela 4-hidroxirolina, revelou não haver diferença entre os grupos estudados na quantidade desta proteína no fragmento de tecido pulmonar avaliado.

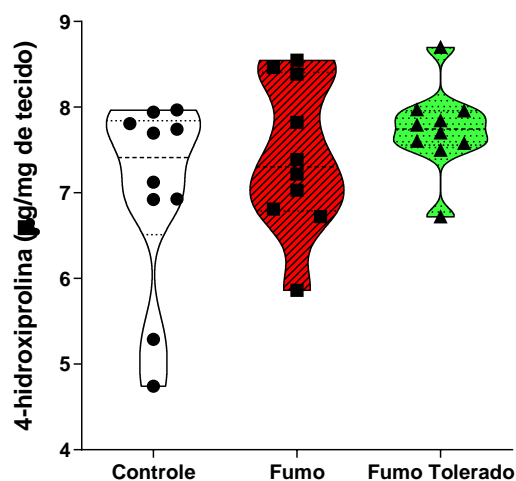


Figura 18. Representação gráfica da concentração de 4-hidroxirolina no tecido pulmonar. Grupos Controle-C, Fumo-F, Fumo Tolerado-FT. Não observamos diferença significativa entre os grupos estudados. (n=10 camundongos por grupo experimental). Teste de Kruskal-Wallis seguido teste de comparações múltiplas de Dunn. Gráfico em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

5.6. Resposta imunológica

Após as quatro semanas de exposição à fumaça de cigarro, observamos aumento de células Galectina-3⁺ (macrófagos), distribuídas em todo o parênquima pulmonar (proximal e distal) nos animais dos grupos F e FT (**Figura 19A-C**), quando comparado ao grupo C. Entretanto, a análise estatística identificou aumento significativo somente do grupo F ($p=0,0020$) em relação ao C (**Figura 19D**). Houve uma tendência de redução desse tipo celular no grupo FT quando comparado ao grupo F ($p=0,0721$).

Não foi possível notar diferença na marcação de TGF- β entre os grupos do estudo ao observar o parênquima pulmonar dos animais e, corroborando as observações, a avaliação da imunomarcação para TGF- β não mostrou diferença estatística entre os grupos para esse marcador, embora tenha havido um discreto aumento nos grupos expostos à fumaça de cigarro F e FT quando comparados ao grupo C (**Figura 20A-D**).

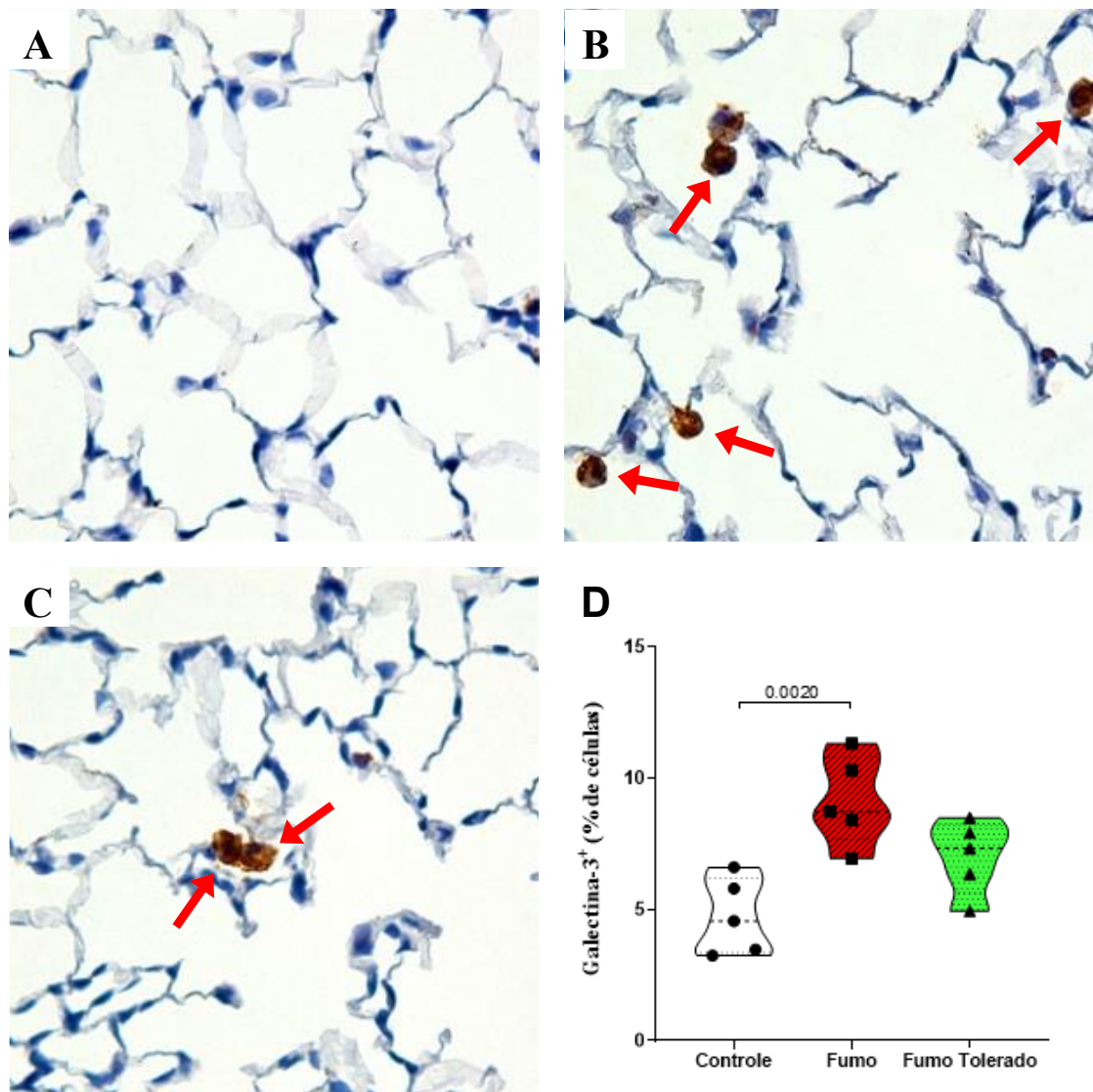


Figura 19. Imunomarcção para células Galectina-3⁺ no parênquima pulmonar. Grupos Controle-C (A), Fumo-F (B) e Fumo Tolerado-FT (C). As setas mostram as células positivas (coloração acastanhada com padrão citoplasmático homogêneo) no interstício pulmonar. Aumento de 1000x. (D) Representação gráfica evidenciando aumento de macrófagos Galectina-3⁺ nos grupos expostos à fumaça de cigarro, que foi estatisticamente significativo no grupo F ($p=0,002$), quando comparado ao grupo C. ($n=5$ camundongos por grupo experimental). Teste one-way ANOVA seguido teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Gráfico em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

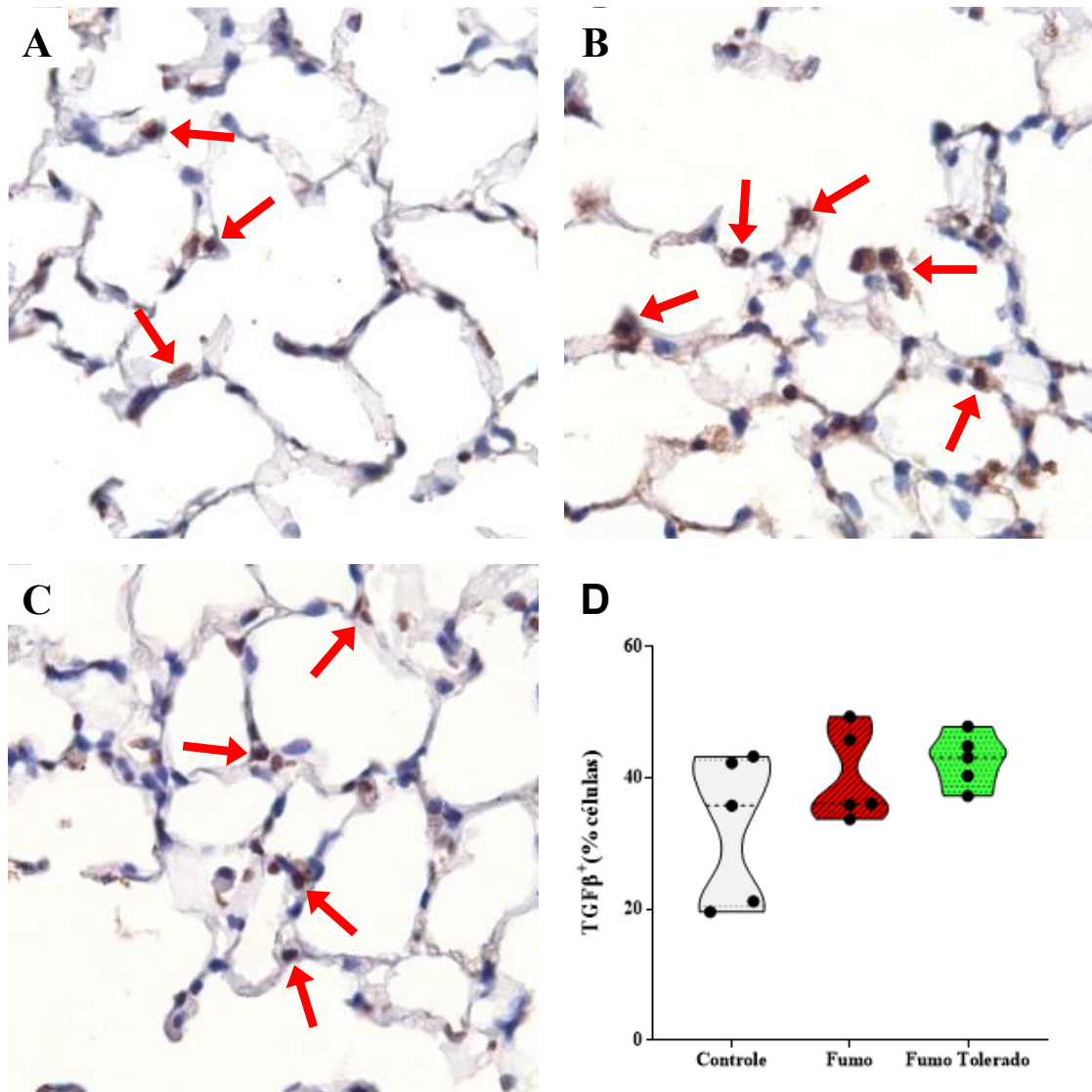


Figura 20. Imunomarcção para células TGF- β ⁺ no parênquima pulmonar. Grupos Controle-C (A), Fumo-F (B) e Fumo Tolerado-FT (C). As setas mostram exemplos de células positivas (coloração acastanhada) no interstício pulmonar. Aumento de 1000x. (D) Representação gráfica evidenciando discreto aumento de células positivas para TGF- β nos grupos expostos à fumaça de cigarro F e FT, mas sem identificação de diferença estatística, quando comparados ao grupo C. (n=5 camundongos por grupo experimental). Teste one-way ANOVA seguido teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Gráfico em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

Observamos também o aumento de células positivas para IL-17 no parênquima alveolar dos camundongos dos grupos expostos à fumaça de cigarro (F e FT), em relação aos animais do grupo controle (C) (Figura 21A-C). A análise estatística revelou aumento significativo desse marcador somente no grupo F ($p=0,0044$) quando comparado ao grupo C (Figura 21D), mas sem diferença estatística entre os grupos F e FT. Adicionalmente, conforme demonstrado na Figura 22A-C, identificamos aumento

de células positivas para IL-10 em todo o parênquima alveolar nos grupos expostos à fumaça de cigarro (F e FT). A quantificação destas células no parênquima alveolar mostrou aumento significativo somente no grupo FT ($p=0,0034$), em relação ao controle (**Figura 22D**), sem diferença estatística entre os grupos F e FT.

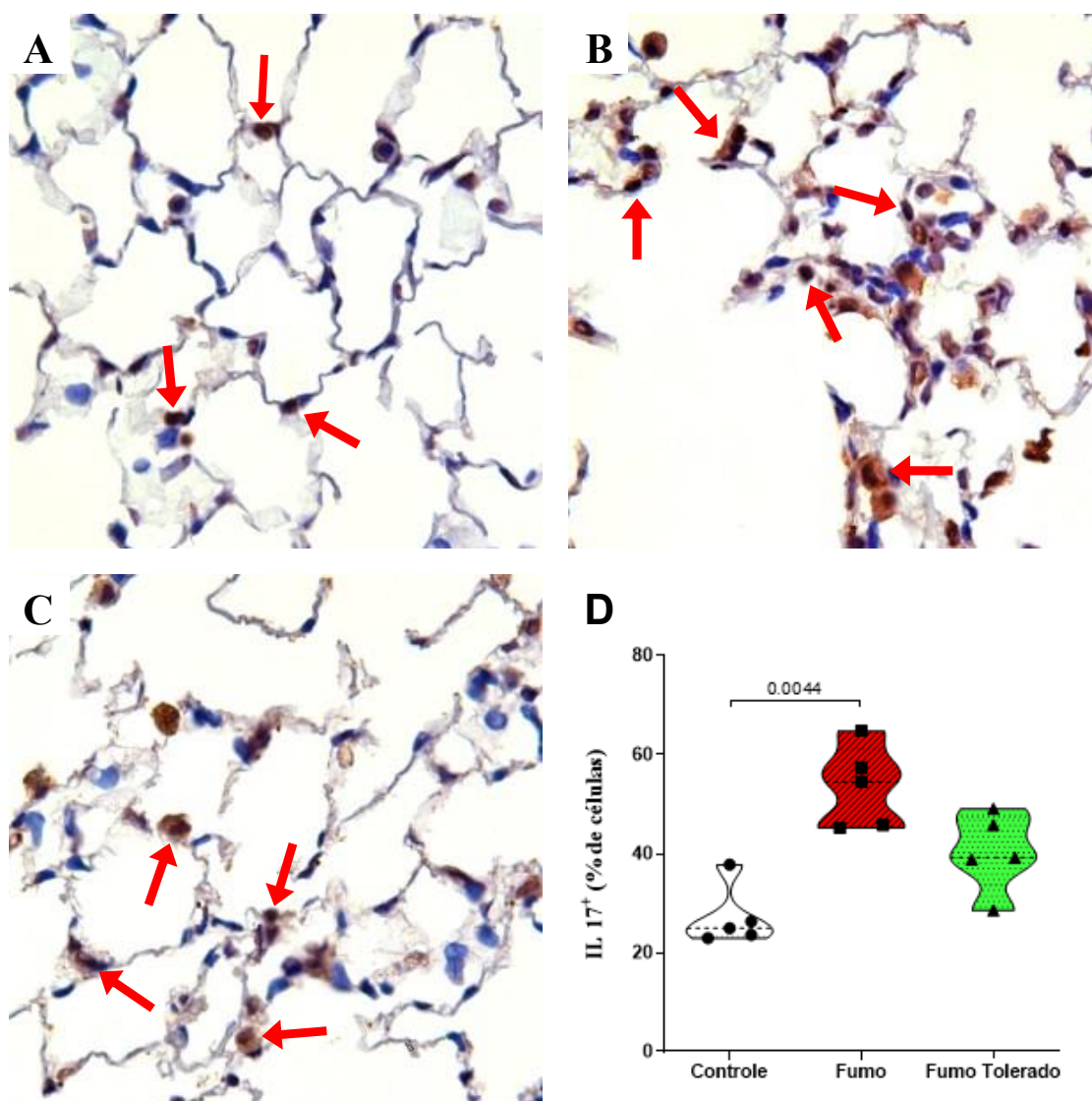


Figura 21. Imunomarcção para células IL-17⁺ no parênquima pulmonar. Grupos Controle-C (A), Fumo-F (B) e Fumo Tolerado-FT (C). As setas mostram as células positivas (coloração acastanhada com padrão citoplasmático homogêneo) no interstício pulmonar. Aumento de 1000x. (D) Representação gráfica evidenciando aumento de células positivas para IL-17 nos grupos expostos à fumaça de cigarro, que foi estatisticamente significativo no grupo F ($p=0,0044$), quando comparado ao grupo C. ($n=5$ camundongos por grupo experimental). Teste Kruskal-Wallis seguido teste de comparações múltiplas de Dunn. Gráfico em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

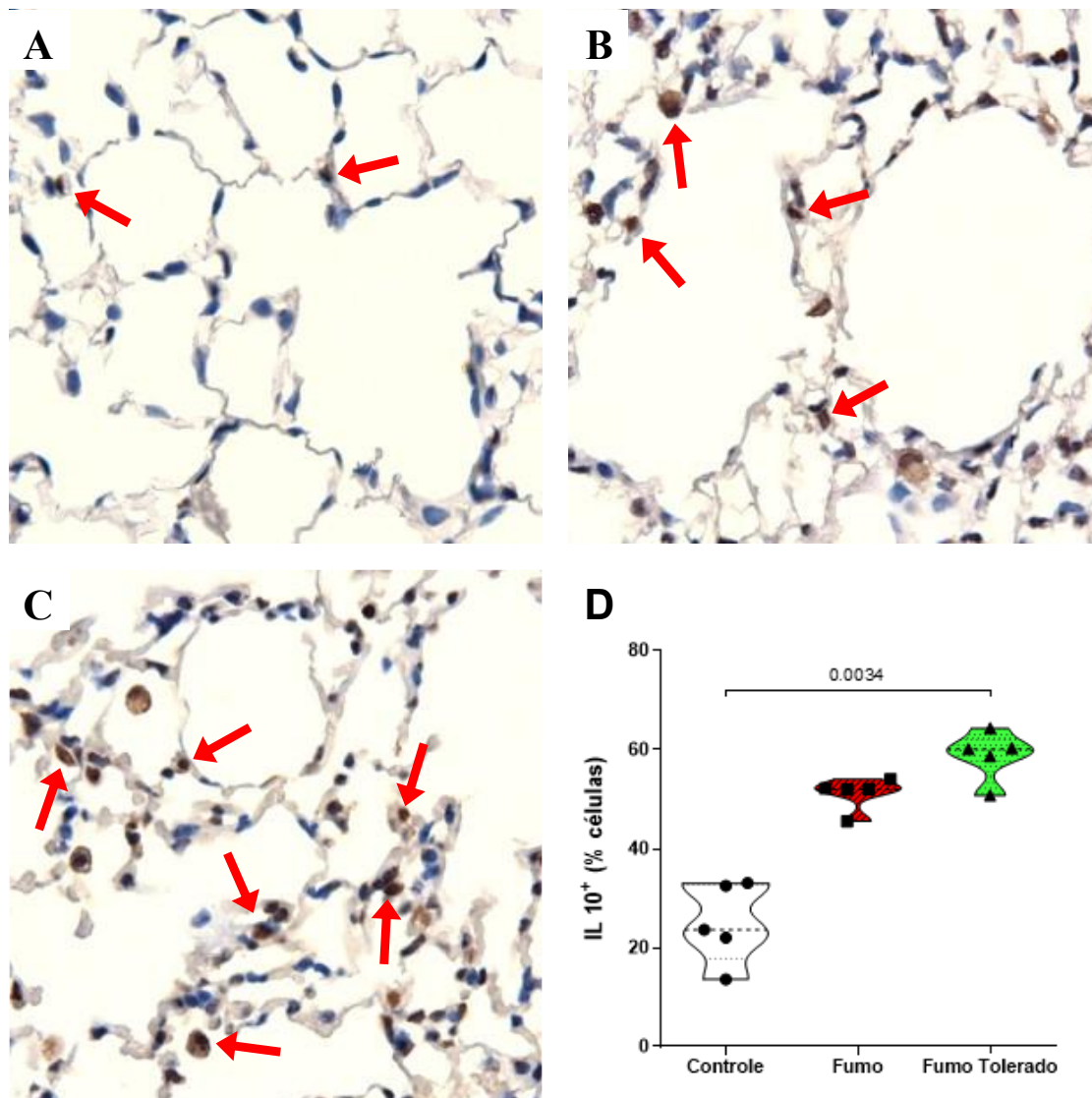


Figura 22. Imunomarcção para células IL-10⁺ no parênquima pulmonar. Grupos Controle-C (A), Fumo-F (B) e Fumo Tolerado-FT (C). As setas mostram exemplos de células positivas (coloração acastanhada) no interstício pulmonar. Aumento de 1000x. (D) Representação gráfica evidenciando aumento de células positivas para IL-10 nos grupos expostos à fumaça de cigarro, que foi estatisticamente significativo no grupo FT ($p=0,0034$), quando comparado ao grupo C. ($n=5$ camundongos por grupo experimental). Teste Kruskal-Wallis seguido teste de comparações múltiplas de Dunn. Gráfico em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

Foi observado ainda, um aumento de células expressando FOXP3 no parênquima pulmonar dos animais expostos à fumaça de cigarro, conforme demonstrado a **Figura 23A-C**. A análise estatística da quantificação revelou aumento significativo nos grupos expostos à fumaça de cigarro F (0,0209) e FT (0,0005) em relação ao grupo C. Houve, também, diferença significativa entre os grupos FT e F ($p=0,034$) (**Figura 23D**).

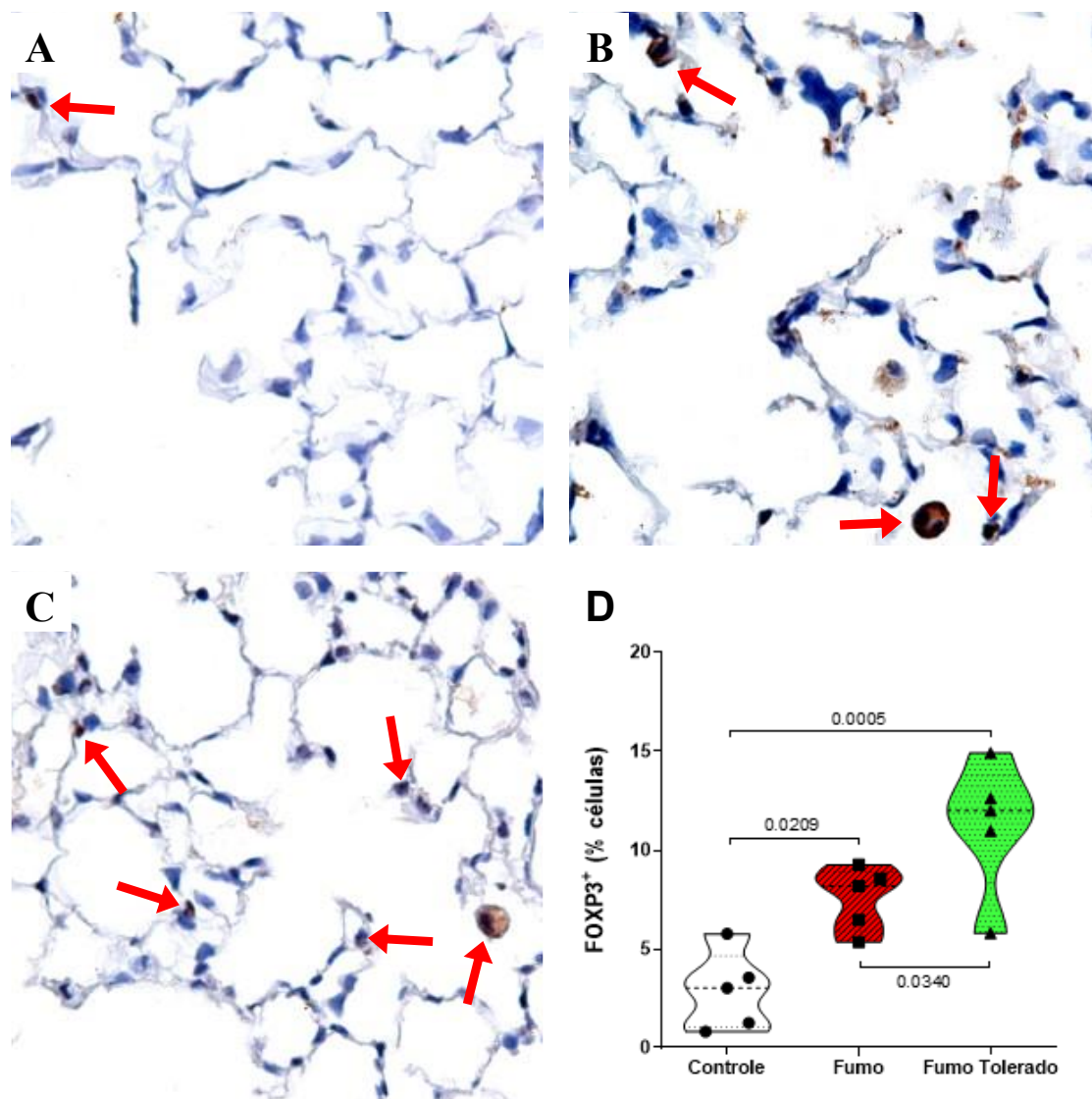


Figura 23. Imunomarcção para células FOXP3⁺ no parênquima pulmonar. Grupos Controle-C (A), Fumo-F (B) e Fumo Tolerado-FT (C). As setas mostram exemplos de células positivas (coloração acastanhada) no interstício pulmonar. Aumento de 1000x. (D) Representação gráfica evidenciando aumento de células positivas para FOXP3 nos grupos expostos à fumaça de cigarro, que foi estatisticamente significativo no grupo F ($p=0,0209$) e FT ($p=0,0005$), quando comparado ao grupo C, havendo diferença significativa também entre os grupos F e FT ($p=0,034$) ($n=5$ camundongos por grupo experimental). Teste one-way ANOVA seguido teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Gráfico em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

A avaliação de células CD3⁺, realizada na região peribroncovascular, mostrou um aumento do infiltrado inflamatório linfocitário nessa região nos grupos expostos à fumaça de cigarro F e FT em relação ao grupo C (Figura 24A-C). A análise estatística da quantificação mostrou aumento significativo desses linfócitos T nos grupos F ($p=0,0001$) e FT ($p=0,0109$) quando comparados ao grupo C (Figura 24D).

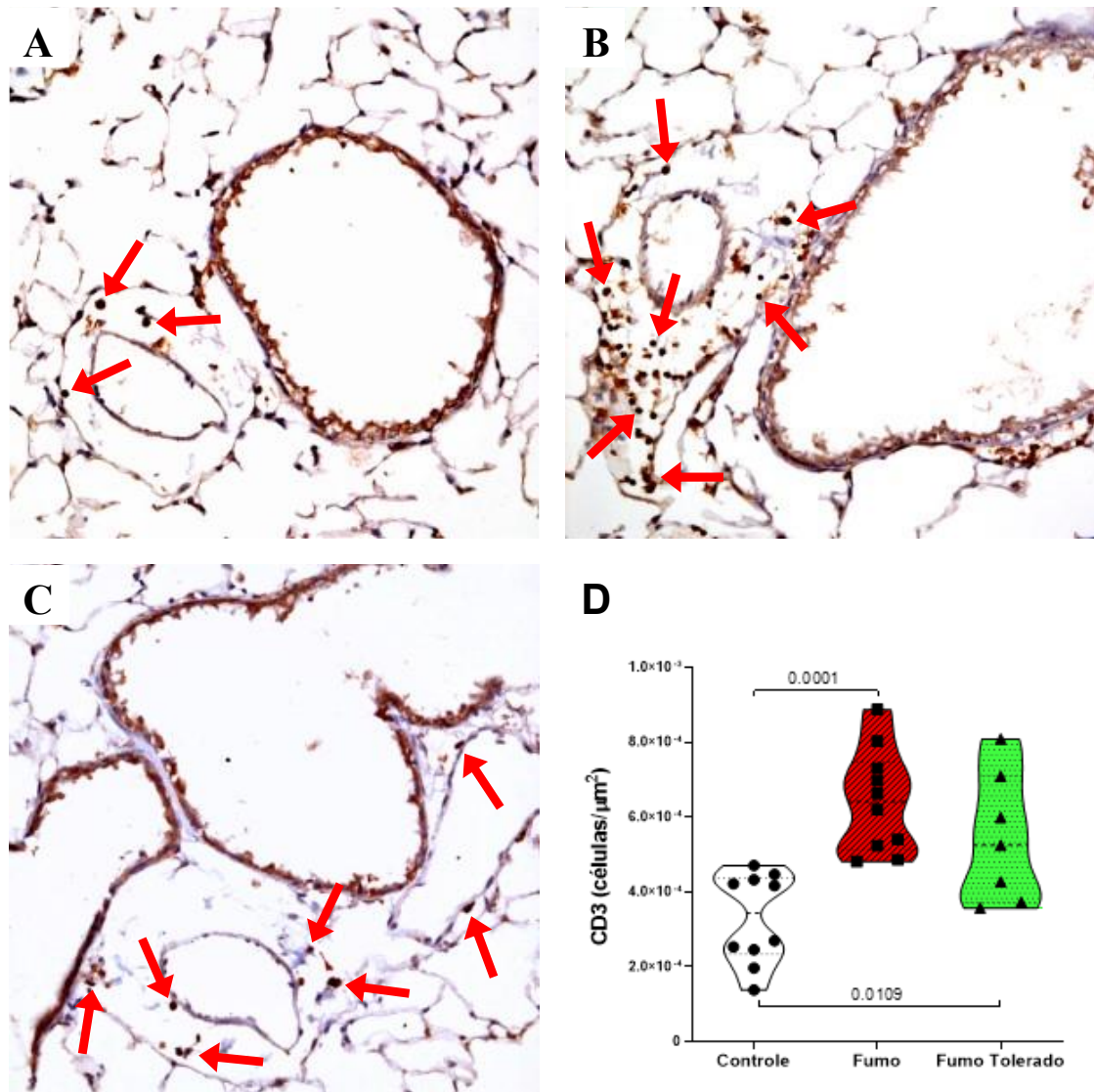


Figura 24. Imunomarcção para células CD3⁺ na região peribroncovascular. Grupos Controle (A), Fumo (B) e Fumo Tolerado (C). As setas mostram exemplos de células positivas (coloração acastanhada escura) no espaço perivascular. Aumento de 400x. (D) Representação gráfica evidenciando aumento de células positivas para CD3 nos grupos expostos à fumaça de cigarro, que foi estatisticamente significativo no grupo F ($p=0,0001$) e FT ($p=0,0109$), quando comparados ao grupo C. (Grupo Controle, $n=10$; Grupo Fumo, $n=10$; Grupo Fumo Tolerado, $n=7$). Teste one-way ANOVA seguido teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Gráfico em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

5.7. Análise de Expressão Gênica no Tecido Pulmonar

A análise da expressão gênica para as cadeias de colágeno avaliadas revelou haver uma tendência de aumento na expressão do gene *Coll1a1* nos animais de ambos os grupos expostos à fumaça de cigarro, sendo esse aumento significativo no grupo FT quando comparado ao grupo C ($p=0,0452$), e não havendo diferença entre os grupos F e FT (**Figura 25A**). Para a expressão de *Col3a1*, não foi identificada diferença entre os

três grupos experimentais (**Figura 25B**). A expressão gênica para a cadeia $\alpha 1$ de colágeno tipo V (*Col5a1*) não teve diferença entre os grupos (**Figura 25C**), assim como para a cadeia $\alpha 2$ do colágeno tipo V (*Col5a2*) (**Figura 25D**).

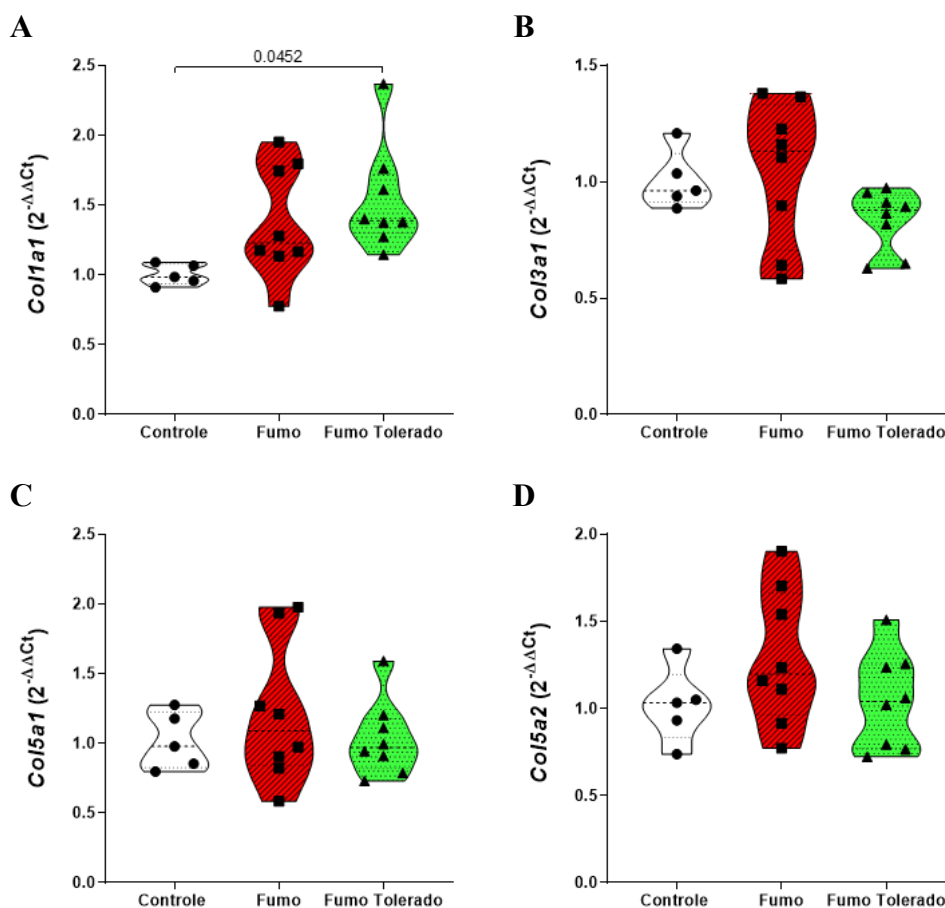


Figura 25. Ilustração gráfica da expressão gênica das cadeias de colágeno. Cadeia $\alpha 1$ do Col I (A), $\alpha 1$ do Col III (B), $\alpha 1$ (C) e $\alpha 2$ (D) do Col V, nos três grupos experimentais. (A) Observa-se aumento da expressão do gene para a cadeia $\alpha 1$ do Col I nos grupos expostos à fumaça de cigarro, que foi significativo no grupo FT quando comparado ao grupo C ($p=0,0452$). (B) Não houve diferença na expressão gênica das cadeias $\alpha 1$ do Col III, (C) $\alpha 1$ do Col V e (D) $\alpha 2$ do Col V entre os três grupos experimentais. Dados normalizados para níveis de transcrição de *B2m* e expressos como unidades de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). (Controle, $n=5$; Fumo, $n=8$; Fumo Tolerado, $n=8$). Teste one-way ANOVA seguido teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

A expressão do gene *Fbn1* teve uma tendência de aumento nos grupos expostos à fumaça de cigarro, F e FT, quando comparados ao grupo C, no entanto, a diferença entre os três grupos não foi estatisticamente significativa (**Figura 26**).

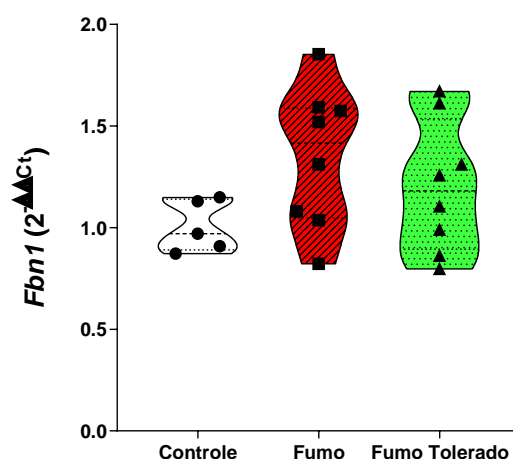


Figura 26. Ilustração gráfica da expressão gênica para a fibrilina 1. Embora tenha havido uma tendência de aumento na expressão de Fbn1 nos grupos expostos à fumaça de cigarro, Fumo e Fumo Tolerado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos; teste one way ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Os dados foram normalizados para níveis de transcrição de *B2m* e expressos como unidades de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). (Controle, n=5; Fumo, n=8; Fumo Tolerado, n=8). Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

A avaliação na expressão gênica das metaloproteinases de matriz, revelou não haver diferença na expressão de *Mmp8* entre os três grupos experimentais (**Figura 27A**), apesar de uma discreta redução da mediana dos grupos expostos à fumaça de cigarro ($M_d F = 0,7580$ e $FT = 0,8898$; contra $M_d C = 1,135$). Para a expressão gênica da *Mmp12*, a análise mostrou um aumento significativo na expressão dessa proteína nos dois grupos expostos à fumaça de cigarro F ($p=0,0064$) e FT ($p=0,0014$), quando comparados ao grupo C (**Figura 27B**). A expressão de *Mmp13* apresentou o mesmo comportamento, com aumento significativo da sua expressão nos grupos expostos à fumaça de cigarro F ($p=0,0007$) e FT ($p=0,0007$), quando comparados ao grupo C (**Figura 27C**).

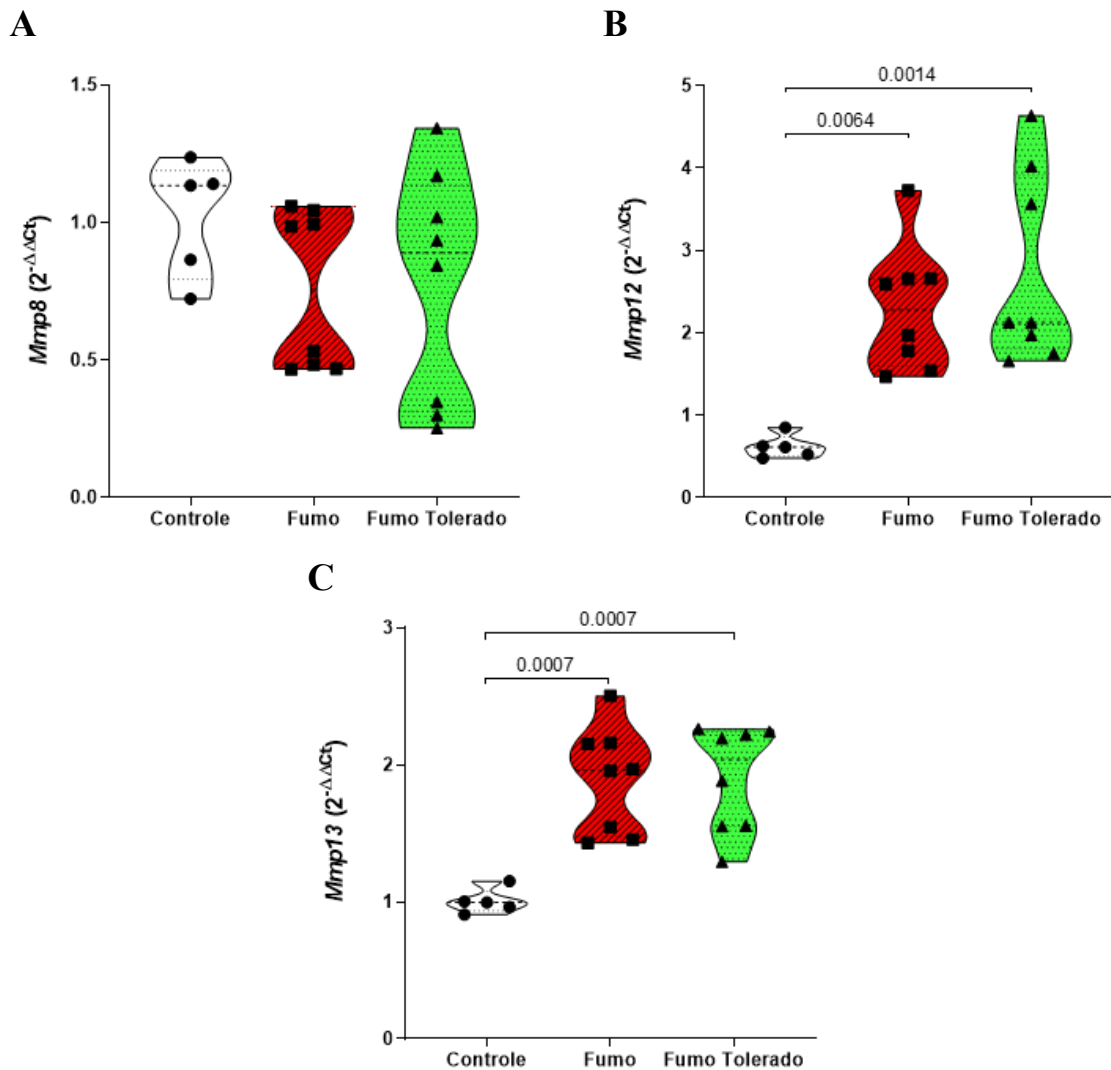


Figura 27. Ilustração gráfica da expressão gênica para as metaloproteinases de matriz. (A) Não houve diferença na expressão gênica de *Mmp8* entre os grupos experimentais; teste de Kruskal-Wallis seguido teste de comparações múltiplas de Dunn. (B) Houve aumento significativo na expressão de *Mmp12* nos grupos expostos à fumaça de cigarro, Fumo ($p=0,0064$) e FT ($p=0,0014$), quando comparados ao grupo Controle; (C) Houve aumento significativo na expressão de *Mmp13* nos grupos Fumo ($p=0,0007$) e Fumo Tolerado ($p=0,0007$), quando comparados ao grupo Controle; teste one way ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Os dados foram normalizados para níveis de transcrição de *B2m* e expressos como unidades de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). (Controle, $n=5$; Fumo, $n=8$; Fumo Tolerado, $n=8$). Gráficos em violin plot mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

A avaliação da expressão gênica para *Foxp3* e *Roryt* mostrou não haver diferença, para ambos os genes, entre os três grupos experimentais, embora alguns animais expostos à fumaça de cigarro tenham expressado mais esses genes que os animais do grupo Controle (**Figura 28A e 28B**).

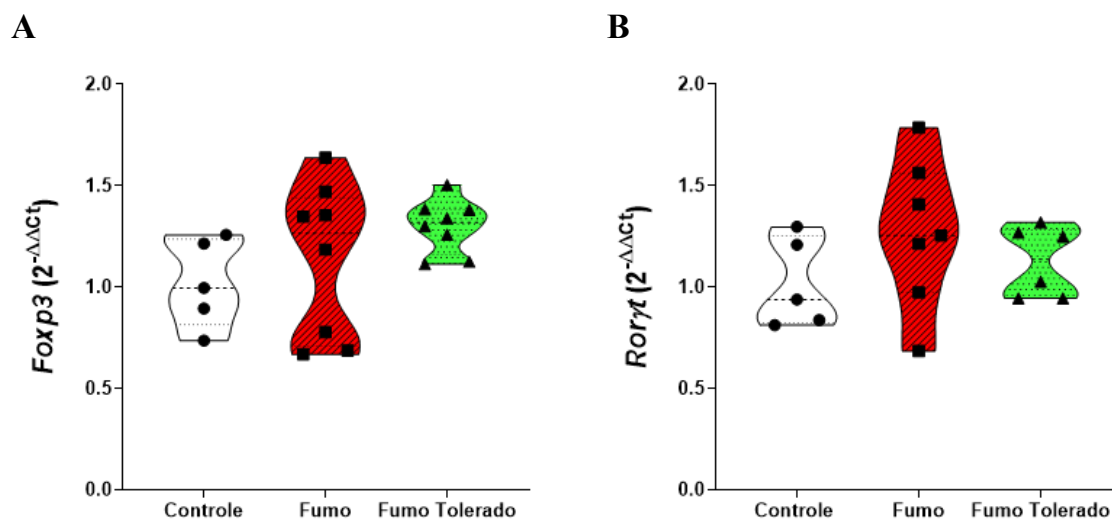


Figura 28. Ilustração gráfica da expressão gênica para *Foxp3* e *Roryt*. (A) Não houve diferença na expressão gênica de *Foxp3*, entre os 3 grupos experimentais, embora haja uma tendência no aumento da expressão nos animais expostos à fumaça de cigarro (Fumo e Fumo Tolerado) (Controle, n=5; Fumo, n=8; Fumo Tolerado, n=8). (B) Não houve diferença na expressão gênica de *Roryt*, entre os 3 grupos experimentais, embora em alguns animais do grupo Fumo tenha havido aumento da expressão desse gene (Controle, n=5; Fumo, n=7; Fumo Tolerado, n=6).; teste one way ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Os dados foram normalizados para níveis de transcrição de *B2m* e expressos como unidades de expressão relativa (2^{-ΔΔCt}). Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

5.8. Imunofenotipagem de células T no baço e linfonodos mediastinais

A imunofenotipagem de células T nos linfonodos mediastinais e no baço foi realizada por citometria de fluxo, de acordo com a estratégia de análise ilustrada na **Figura 29**. Foram coletados os baços de 5 animais por grupo do estudo, mas somente coletados com sucesso os linfonodos mediastinais de 3 animais do grupo Controle e 4 de cada um dos outros grupos, Fumo e Fumo Tolerado.

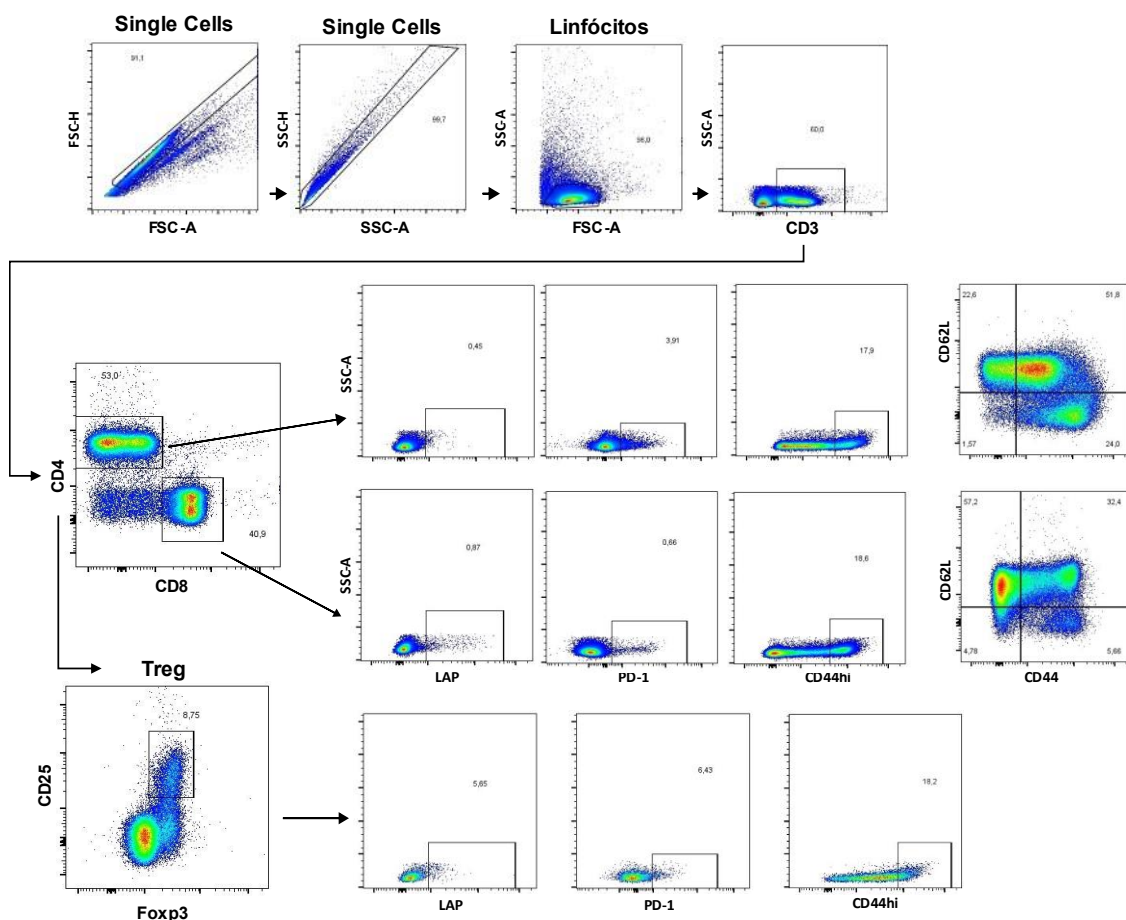


Figura 29. Estratégia de análise para avaliação de linfócitos T no baço e nos linfonodos mediastinais. Estratégia para análise de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e Treg (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) presentes no baço e nos linfonodos mediastinais.

Caracterização de subpopulações de linfócitos TCD4 e TCD8 nos linfonodos mediastinais

A análise do perfil de linfócitos T, nos linfonodos mediastinais, revelou uma discreta redução na proporção de linfócitos TCD8 ($M_e FT 41,3 < M_e F 42,2 < M_e C 44,0$; $M_d F 40,6 < M_d FT 41,6 < M_d C 43,5$), em relação a TCD4, nos animais do grupo F e FT em relação ao grupo C (**Figuras 30A, 31A**). A análise dos percentuais das subpopulações de linfócitos TCD4, nos linfonodos mediastinais, não revelou diferenças entre os grupos quanto ao perfil dos fenótipos CD4⁺CD44^{high} e CD4⁺PD1⁺ (**Figura 30A-C**). Por outro lado, o fenótipo naïve (CD44⁻CD62L⁺) teve aumento significativo no grupo FT quando comparado ao grupo C ($p=0,0438$) (**Figura 30D**). Ainda, o fenótipo de memória central (CD44⁺CD62L^{high}) diminuiu significativamente nos grupos F ($p=0,0246$) e FT ($p=0,0037$), quando comparados ao grupo C (**Figura 30E**). Já o

fenótipo de memória efetora ($CD44^+CD62L^{low}$) teve aumento nos grupos F e FT, porém sem significância estatística (**Figura 30F**).

A avaliação dos percentuais das subpopulações de linfócitos TCD8, nos linfonodos mediastinais, revelou aumento significativo na expressão de células com o fenótipo $CD8^+CD44^{high}$ no grupo F em relação ao grupo C ($p=0,0339$) (**Figura 31A-B**). Não houve diferença entre os grupos em relação à percentagem de células com o fenótipo $CD8^+PD1^+$ (**Figura 31C**). O fenótipo naíve ($CD44-CD62L^+$) teve aumento no grupo FT quando comparado ao grupo C ($p=0,0231$) (**Figura 31D**). Não houve diferença na percentagem de células com os fenótipos de memória central ($CD44+CD62L^{high}$) (**Figura 31E**) e de memória efetora ($CD44+CD62L^{low}$) (**Figura 31F**) entre os grupos.

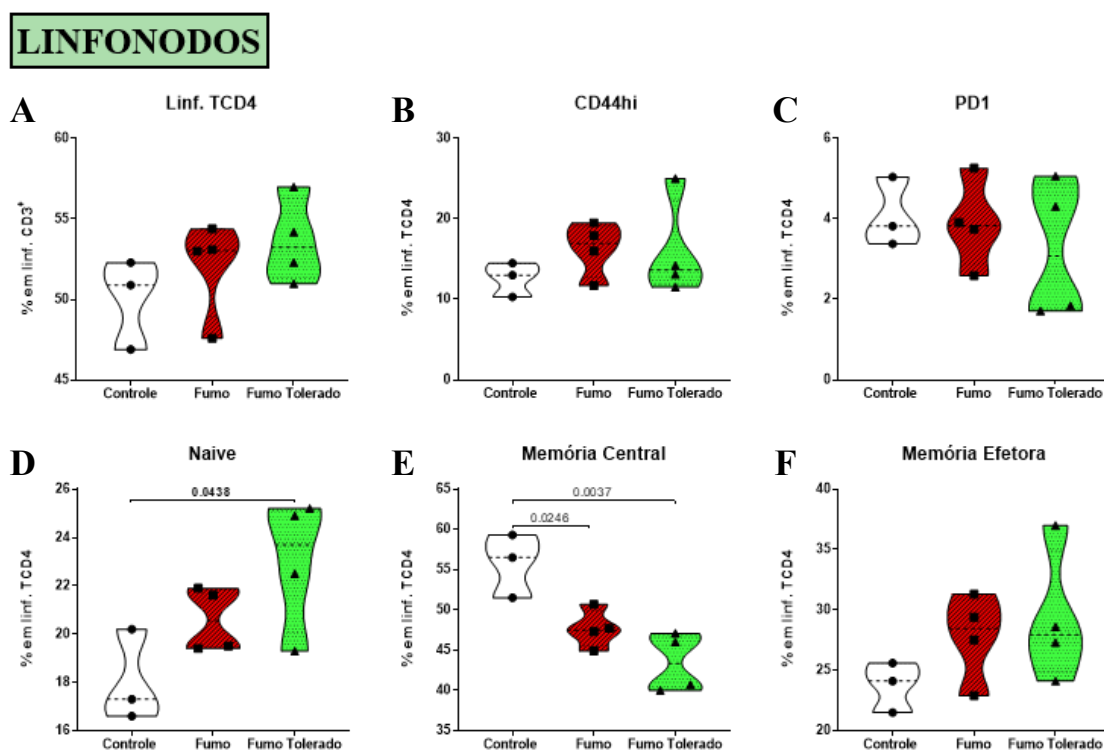


Figura 30. Subpopulações de linfócitos TCD4 nos linfonodos mediastinais. (A) Linfócitos TCD4; (B) Fenótipo $CD4^+CD44^{high}$; (C) Fenótipo $CD4^+PD1^+$; (D) Aumento significativo de células com fenótipo *naive* ($CD44-CD62L^+$) no grupo Fumo Tolerado, comparado ao grupo Controle ($p=0,0438$); (E) Redução significativa de células com fenótipo de memória central ($CD44+CD62L^{high}$) nos grupos Fumo e Fumo Tolerado, quando comparados ao grupo Controle ($p=0,0246$; $p=0,0037$); (F) Perfil ($CD44+CD62L^{low}$). (Controle, $n=3$; Fumo, $n=4$; Fumo Tolerado, $n=4$). Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

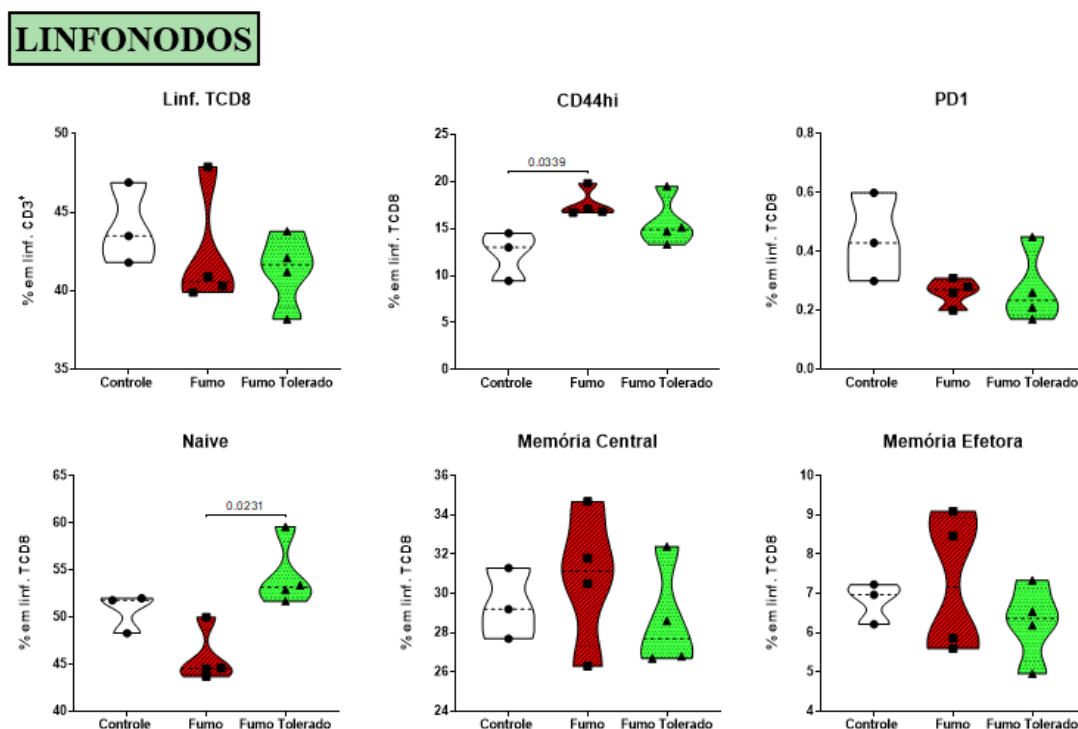


Figura 31. Subpopulações de linfócitos TCD8 nos linfonodos mediastinais. (A) Linfócitos TCD8; (B) Aumento de células com fenótipo CD8+CD44high no grupo Fumo, quando comparado ao Controle ($p=0,0339$); (C) Fenótipo CD8+PD1+; (D) Aumento significativo de células com fenótipo naïve (CD44-CD62L+) no grupo Fumo Tolerado, comparado ao grupo Controle ($p=0,0231$); (E) Fenótipo de memória central (CD44+CD62Lhigh); (F) Fenótipo de memória efetora (CD44+CD62Llow). (Controle, $n=3$; Fumo, $n=4$; Fumo Tolerado, $n=4$). Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

Caracterização de subpopulações de linfócitos TCD4 e TCD8 no baço

A análise do perfil de linfócitos T, no baço, revelou um discreto aumento na proporção de linfócitos TCD8 no grupo Fumo em relação aos grupos Fumo tolerado e Controle ($M_e F 36,4 > M_e FT 35,6 > M_e C 35,2$; $M_d F 36,4 > M_d FT 36,1 > M_d C 34,6$). A percentagem de linfócitos TCD4 no baço não apresentou diferença estatística entre os grupos, embora tenha sido observada ligeira diminuição no grupo F em relação aos demais grupos ($M_e F 56,8 < M_e FT 57,1 < M_e C 57,9$; $M_d F 56,4 < M_d FT 57,4 < M_d C 58,6$) (**Figuras 32A, 33A**). A análise dos percentuais das subpopulações de linfócitos TCD4, nos baços, mostrou aumento significativo de células com o fenótipo CD4⁺CD44high nos animais dos grupos F ($p=0,0015$) e FT ($p=0,006$) quando comparados ao grupo C (**Figura 32A-B**). Não houve diferença na percentagem de células com fenótipo CD4⁺PD1⁺ e fenótipo naïve (CD44-CD62L⁺) entre os grupos experimentais (**Figura 32C-D**). O fenótipo de memória central (CD44⁺CD62L^{high})

diminuiu significativamente nos grupos Fumo ($p=0,0458$) e Fumo Tolerado ($p=0,0206$) quando comparados ao grupo C (**Figura 32E**). Ao contrário, o fenótipo de memória efetora ($CD44^+CD62L^{low}$) teve aumento significativo nos grupos F ($p=0,0039$) e FT ($p=0,0043$), quando comparados ao grupo C (**Figura 32F**).

A análise dos percentuais das subpopulações de linfócitos TCD8, nos baços, revelou aumento da população com fenótipo $CD8^+CD44^{high}$ nos grupos F e FT, quando comparados ao grupo C ($p<0,0001$) (**Figura 33A-B**). Não houve diferença na percentagem de células $CD8^+PD1^+$ e fenótipos naïve ($CD44^-CD62L^+$), de memória central ($CD44^+CD62L^{high}$) e de memória efetora ($CD44^+CD62L^{low}$) entre os grupos experimentais (**Figura 33C-F**).

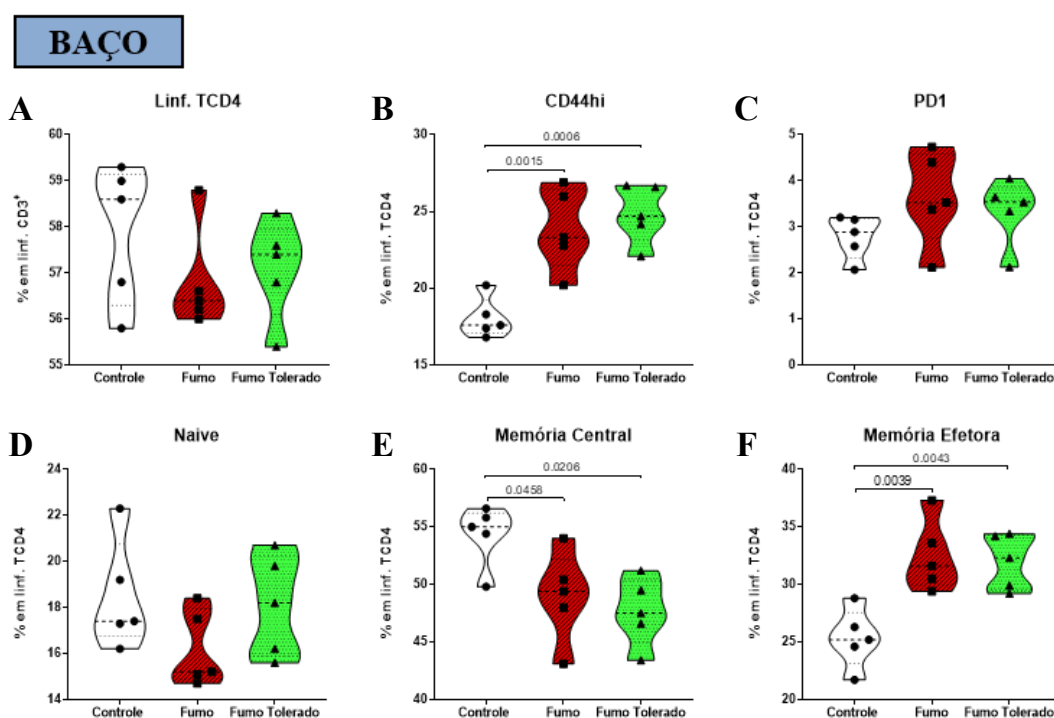


Figura 32. Subpopulações de linfócitos TCD4 nos baços. (A) TCD4; (B) Aumento significativo de células com fenótipo $CD4^+CD44^{high}$ nos grupos Fumo e Fumo Tolerado, quando comparados ao grupo C ($p=0,0015$; $p=0,0006$); (C) Fenótipo $CD4^+PD1^+$; (D) Fenótipo de células *naïve* ($CD44^-CD62L^+$); (E) Redução significativa de células de memória central ($CD44^+CD62L^{high}$) nos grupos Fumo e Fumo Tolerado, quando comparados ao grupo Controle ($p=0,0458$; $p=0,0206$); (F) Aumento significativo de memória efetora ($CD44^+CD62L^{low}$) nos grupo Fumo e Fumo Tolerado, quando comparados ao grupo Controle ($p=0,0039$; $p=0,0043$). ($n=5$ em cada grupo). Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

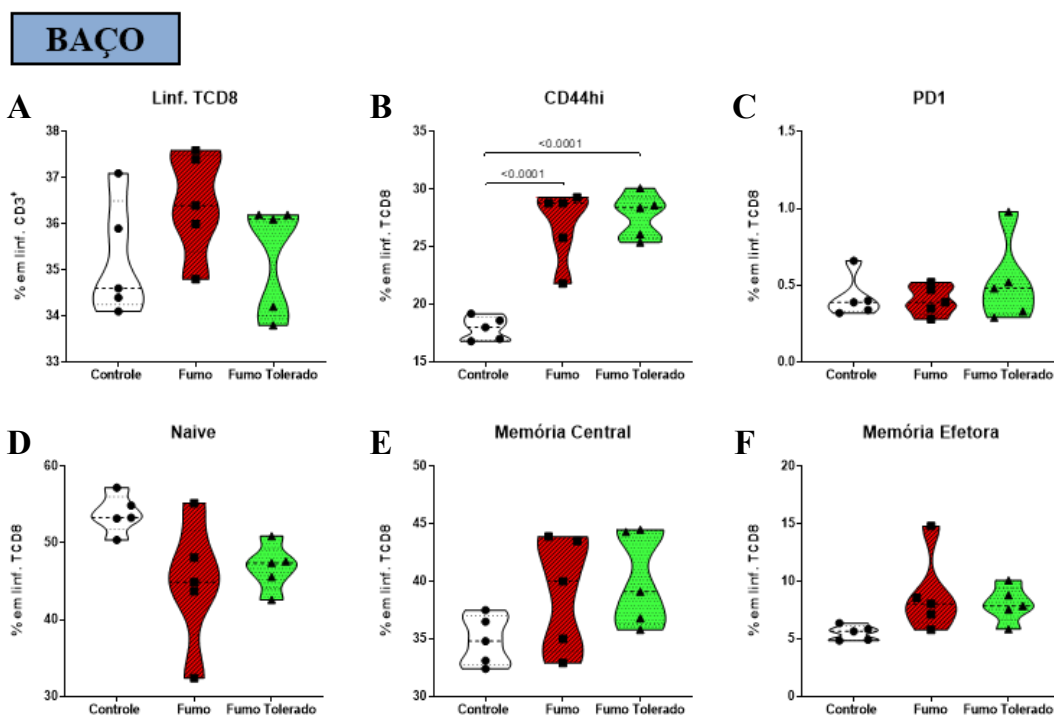


Figura 33. Subpopulações de linfócitos TCD8 nos baços. (A) TCD8; (B) Aumento de células com fenótipo $CD8^+CD44^{high}$ no grupo Fumo e no Fumo Tolerado, quando comparados ao Controle ($p < 0,0001$); (C) fenótipo $CD8^+PD1^+$; (E) fenótipo *naive* ($CD44^-CD62L^+$); (F) fenótipo de memória central ($CD44^+CD62L^{high}$); (G) fenótipo de memória efetora ($CD44^+CD62L^{low}$). ($n=5$ em cada grupo). Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

Caracterização de células com Fenótipo Treg FoxP3

A imunofenotipagem da população de linfócitos TCD4 mostrou discreto aumento de células com fenótipo Treg FoxP3⁺ ($CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$) nos grupos F e FT, quando comparado ao grupo C ($M_e F 9,2 > M_e FT 8,1 > M_e C 7,3$; $M_d F 9,1 > M_d FT 7,8 > M_d C 7,3$), porém sem significância estatística (**Figura 34A-B**). A avaliação de subpopulações de células Treg FoxP3⁺ com expressão de $CD44^{hi}$, PD1 e LAP nos linfonodos mediastinais não mostrou diferença estatística entre os grupos de estudo, conforme representado na **Figura 34C-E**. Houve somente uma tendência de redução do percentual da subpopulação Treg FoxP3⁺PD1⁺ nos grupos expostos à fumaça de cigarro F e FT, em relação ao grupo C, e de aumento da subpopulação Treg FoxP3⁺LAP⁺ no grupo FT em relação aos outros grupos do estudo (**Figura 34D-E**).

LINFONODOS

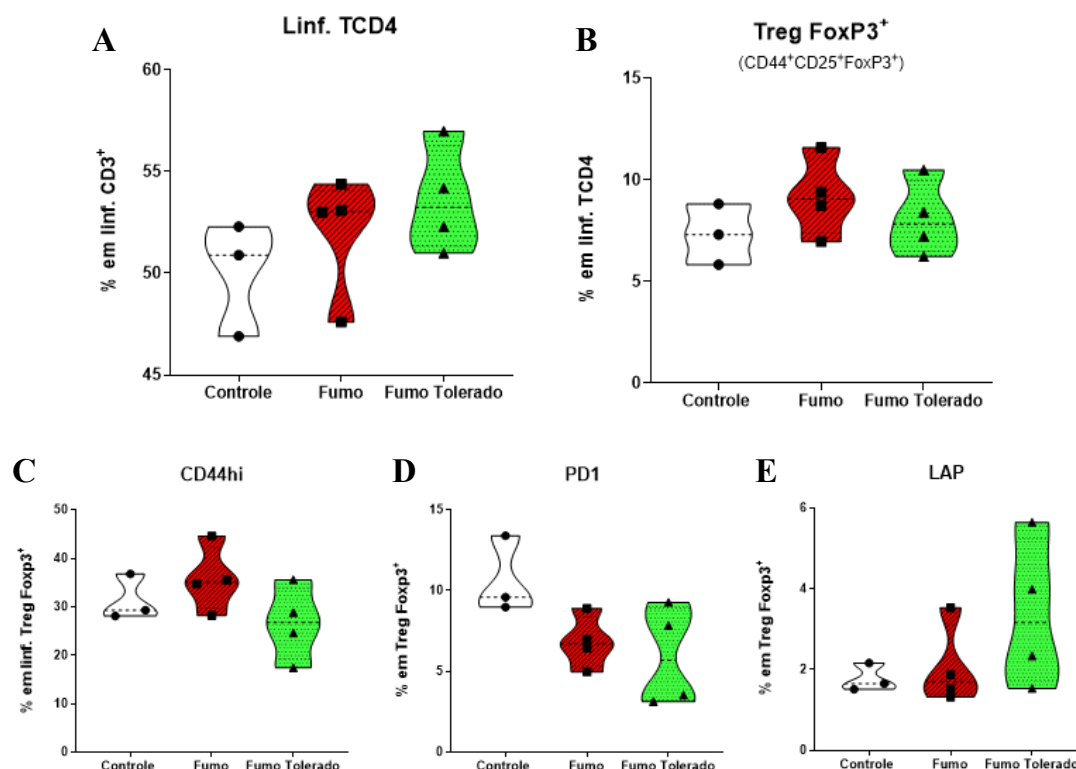


Figura 34. Caracterização de subpopulações de células Treg FoxP3⁺ (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) nos linfonodos mediastinais dos animais. (A) Linfócitos TCD4 (B) Aumento discreto no perfil Treg FoxP3⁺ nos animais expostos à fumaça de cigarro, Fumo e Fumo Tolerado. Percentuais das subpopulações de células Treg FoxP3⁺ com expressão de CD44^{hi} (C), PD1 (D) e LAP (E) nos linfonodos dos animais dos grupos estudados. (Controle, n=3; Fumo, n=4; Fumo Tolerado, n=4). Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

Além disso, a imunofenotipagem das células TCD4 no baço dos animais mostrou uma população de células com fenótipo Treg FoxP3⁺ (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺), com percentagem significativamente maior no grupo FT, quando comparado ao grupo C ($p=0,0465$) (Figura 35A-B). Também, observou-se discreto aumento do perfil de células Treg FoxP3⁺ nos animais do grupo F, quando comparado ao grupo C ($M_e F 5,7 > M_e C 4,7$; $M_d F 5,8 > M_d C 4,2$), sem significância estatística (Figura 35B). A avaliação de células Treg FoxP3⁺ com expressão de CD44^{hi}, PD1 e LAP no baço revelou não haver diferenças nas subpopulações de Treg FoxP3⁺ (CD44^{hi}, PD1 e LAP) entre os grupos (Figura 35 C-E).

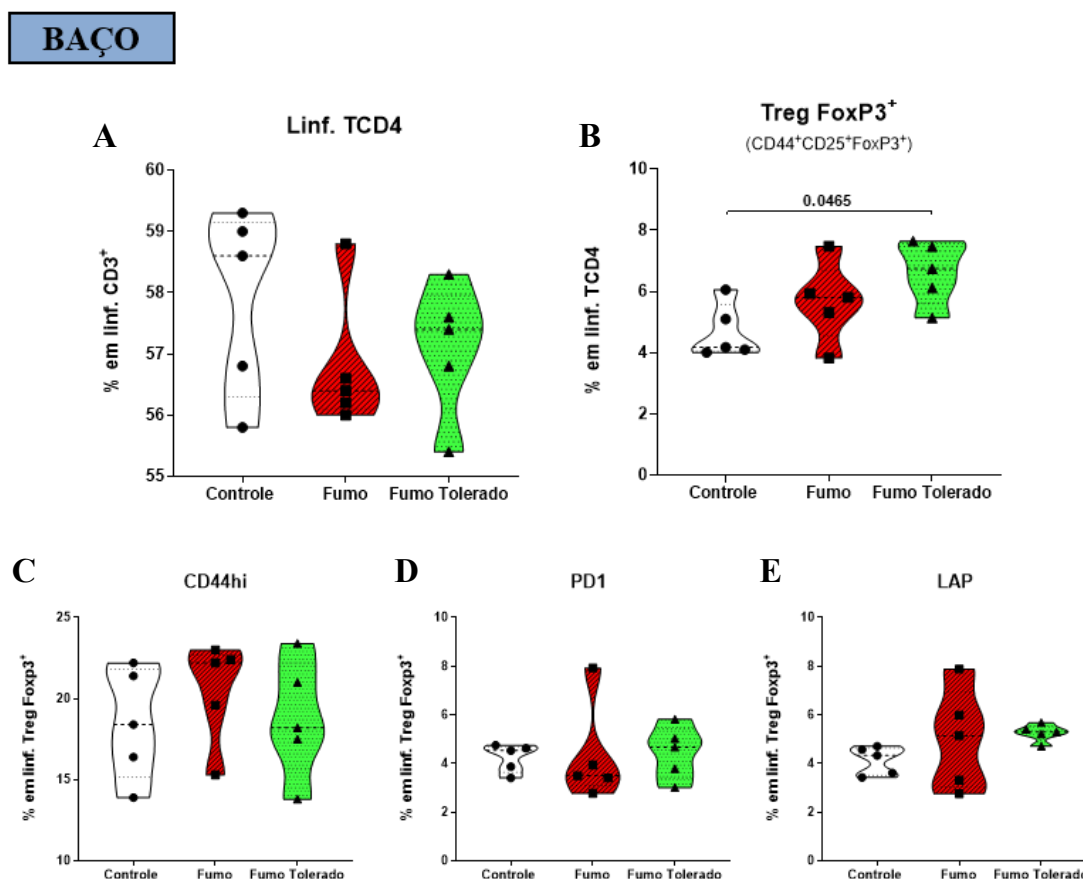


Figura 35. Caracterização de subpopulações de células Treg FoxP3⁺ (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) no baço dos animais. (A) Linfócitos TCD4; (B) Aumento de perfil Treg FoxP3⁺ no grupo Fumo Tolerado quando comparado ao grupo Controle (p=0,0465). Percentuais das subpopulações de células Treg FoxP3⁺ com expressão de CD44hi (C), PD1 (D) e LAP (E) no baço dos animais dos grupos estudados. (n=5 por grupo). Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

Caracterização de células com Fenótipo Treg LAP⁺

A análise de células Treg LAP⁺ na população de linfócitos TCD4 (CD4⁺LAP⁺) presentes nos linfonodos mediastinais mostrou uma discreta tendência de aumento nos animais do grupo FT em relação aos grupos F e C (M_e FT 0,62 > M_e F 0,46 > M_e C 0,36; M_d FT 0,50 > M_d F 0,43 > M_d C 0,39), porém sem significância estatística (**Figura 36A-B**). Em relação à expressão de LAP⁺ nas populações de linfócitos TCD4⁺ do baço, a análise imunofenotípica mostrou que não houve diferença na percentagem dessa subpopulação CD4⁺LAP⁺ entre os grupos experimentais (**Figura 36C-D**).

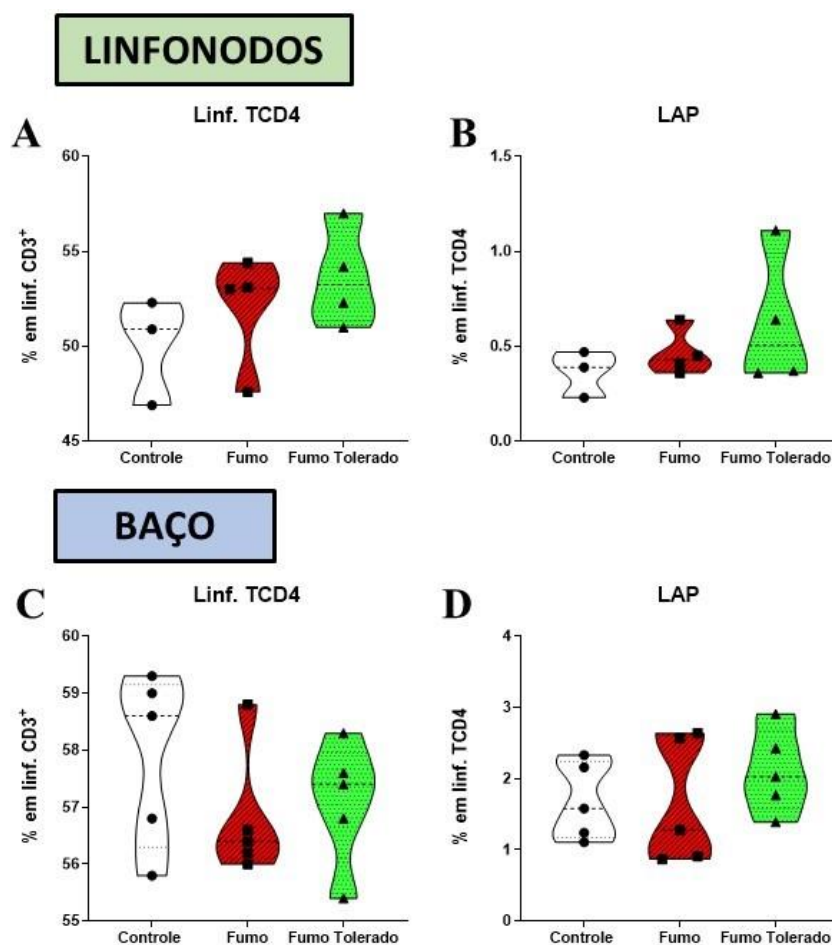


Figura 36. Caracterização de células Treg LAP⁺ nos linfonodos mediastinais e no baço dos animais. (A-B) Percentagem de células Treg com fenótipo CD4⁺LAP⁺ nos linfonodos mediastinais. (n=5 por grupo experimental) (C-D) Percentagem de células Treg com fenótipo CD4⁺LAP⁺ no baço. (Controle, n=3; Fumo, n=4; Fumo Tolerado, n=4). Gráficos em *violin plot* mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

5.9. Análise da dosagem de citocinas por CBA

A dosagem da concentração de citocinas (IFN- γ , IL-6, TNF, IL-10 e IL-17A) no FLBA e nos homogenatos de baço e pulmão foi realizada por citometria de fluxo (CBA). As interleucinas IL-10 e IL-17A também foram dosadas por ELISA nos homogenatos de pulmão e baço. As concentrações de citocinas nos tecidos foram corrigidas pela dosagem de proteínas totais quantificadas nos homogenatos.

A análise por CBA do perfil de citocinas nos homogenatos de pulmão revelou um perfil mais inflamatório nos animais do grupo F, em relação ao grupo C, e um perfil significativamente menos inflamatório nos animais do grupo FT, quando comparamos

aos animais do grupo F. Conforme representado na **Figura 37**, houve redução significativa do IFN- γ e do IL-6 no grupo FT, quando comparado ao grupo F ($p=0,0073$ e $p=0,0009$, respectivamente) (**Figura 37A-B**). A dosagem de TNF revelou um aumento significativo dessa citocina inflamatória no grupo F, quando comparado ao grupo C ($p=0,0169$) (**Figura 37C**).

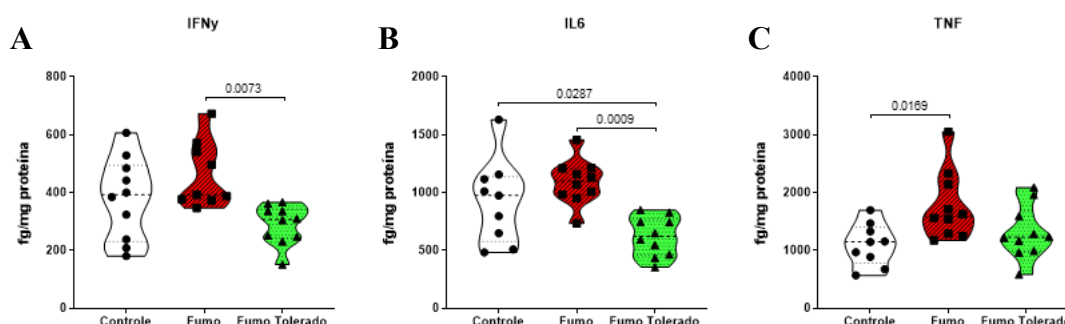


Figura 37. Citocinas inflamatórias dosadas por CBA em homogenatos de pulmão. (A) Redução significativa do IFN γ no grupo Fumo Tolerado em relação ao grupo Fumo ($p=0,0073$) ($n=10$, Controle; $n=9$, Fumo; $n=10$, Fumo Tolerado). **(B)** Redução significativa do IL-6 nos grupo Fumo Tolerado em relação ao grupo Fumo ($p=0,0009$) e ao grupo Controle ($p=0,0287$) ($n=9$, Controle; $n=10$, Fumo; $n=10$, Fumo Tolerado). **(C)** Aumento significativo do TNF nos animais do grupo Fumo em relação ao grupo Controle ($p=0,0169$) ($n=9$, controle; $n=10$, fumo; $n=10$, Fumo Tolerado). One-way ANOVA e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Gráficos em *violin plot*, mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

Conforme representado graficamente a seguir, observamos redução significativa do IL-10 no grupo FT, quando comparado ao grupo F ($p=0,0309$) (**Figura 38A**). Também houve redução significativa de IL-17A no grupo FT, quando comparado ao grupo F ($p=0,002$) e quando comparado ao grupo C ($p=0,0499$) (**Figura 38B**).

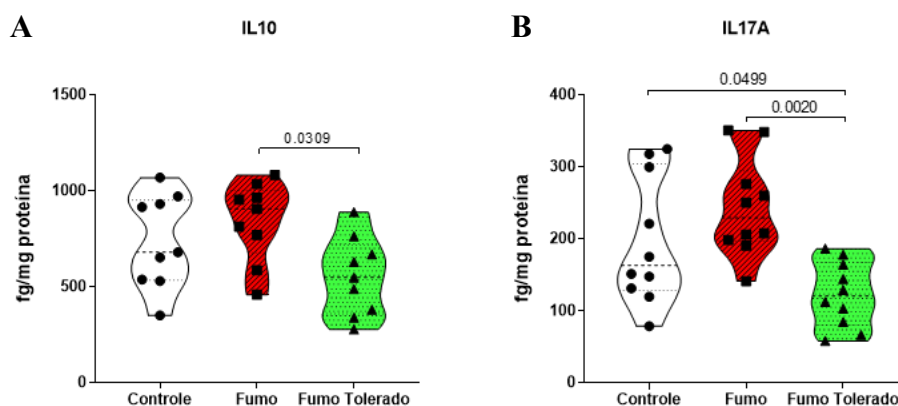


Figura 38. IL-10 e IL-17A dosadas por CBA em homogenatos de pulmão. (A) Redução significativa do IL-10 no grupo Fumo Tolerado em relação ao grupo Fumo ($p=0,00309$) ($n=9$ por grupo). (B) Redução significativa do IL-17A no grupo Fumo Tolerado em relação ao grupo Fumo ($p=0,002$) e em relação ao grupo Controle ($p=0,0499$) ($n=10$ por grupo experimental). Gráficos em *violin plot*, mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

A análise por CBA do perfil de citocinas nos homogenatos de baço não mostrou diferenças entre os grupos estudados para nenhuma das citocinas inflamatórias avaliadas, conforme demonstrado graficamente na **Figura 39A-C**. Também não houve diferença entre os grupos experimentais nas dosagens de IL-10 e IL-17A (**Figura 40A-B**).

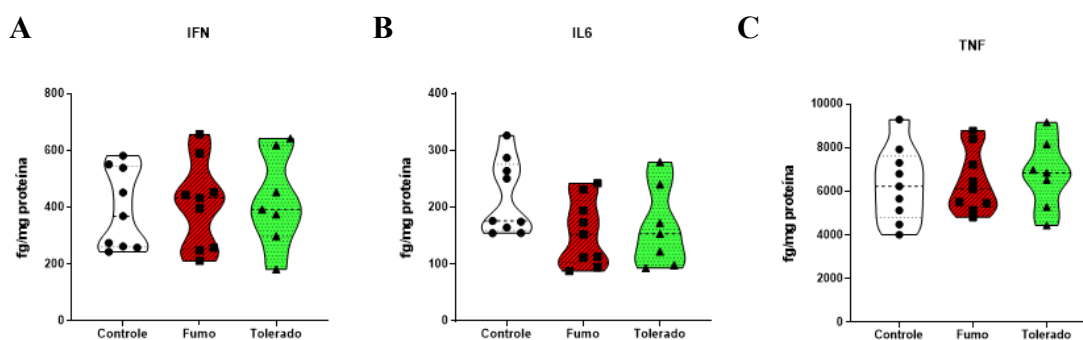


Figura 39. Citocinas inflamatórias dosadas por CBA em homogenatos de baço. (A) $INF\gamma$; (B) IL-6; (C) TNF ($n=9$, Controle; $n=9$, Fumo; $n=7$, Fumo Tolerado). Gráficos em *violin plot*, mostrando a frequência de distribuição dos dados.

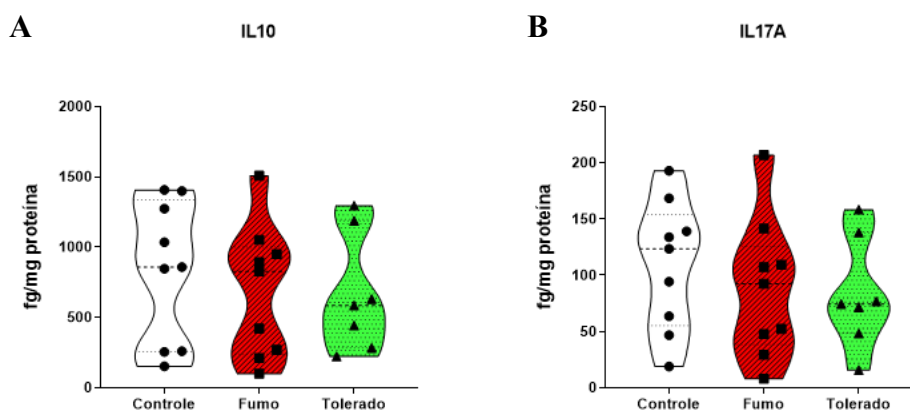


Figura 40. IL-10 e IL-17A dosadas por CBA em homogenatos de baço. (A) IL-10; (B) IL-17A (n=9, controle; n=9, fumo; n=7, Fumo Tolerado). Gráficos em *violin plot*, mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

A dosagem de citocinas realizadas por CBA no FLBA não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais, sendo que algumas citocinas não foram detectadas em muitas das amostras, conforme demonstrado na **Figura 41A-E**. Também foi realizada dosagem de citocinas nos soros dos camundongos, mas não houve detecção para a maioria das amostras, impossibilitando análises.

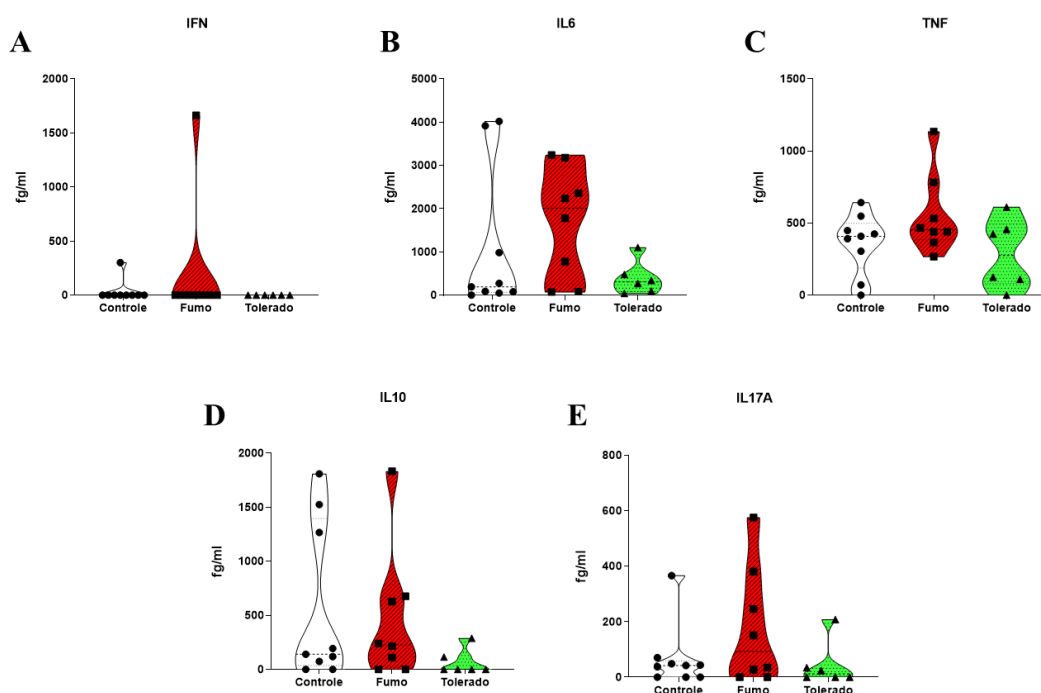


Figura 41. Citocinas inflamatórias dosadas por CBA no FLBA. (A) INF γ ; (B) IL-6; (C) TNF; (D) IL-10; (E) IL-17A; fg/ml. (n=9, controle; n=8, fumo; n=6, Fumo Tolerado). Gráficos em *violin plot*, mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

5.10. Análise da dosagem de citocinas por ELISA

A fim de confirmar os achados do CBA no que se refere às dosagens de interleucinas IL-10 e IL-17A, ensaios ELISA foram realizados para essas citocinas nos homogenatos de pulmão e baço. Os resultados se mostraram muito similares aos encontrados no CBA, com discreta redução destas citocinas nos animais do grupo FT quando comparados ao grupo F, tanto nos homogenatos de pulmão (**Figura 42**) quanto nos homogenatos de baço (**Figura 43**).

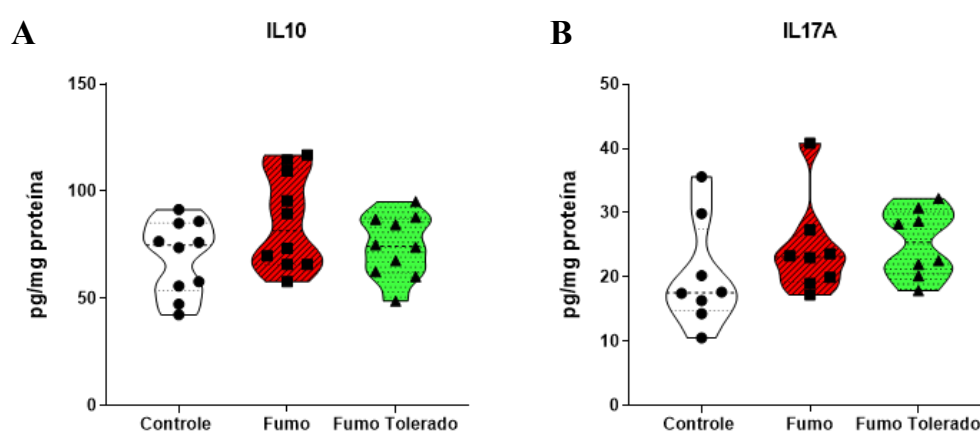


Figura 42. Citocinas inflamatórias dosadas por ELISA nos homogenatos de pulmão. (A) IL-10; (B) IL-17A (IL-10: n=10 todos os grupos) (IL-17A: n=8 em todos os grupos). Gráficos em *violin plot*, mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

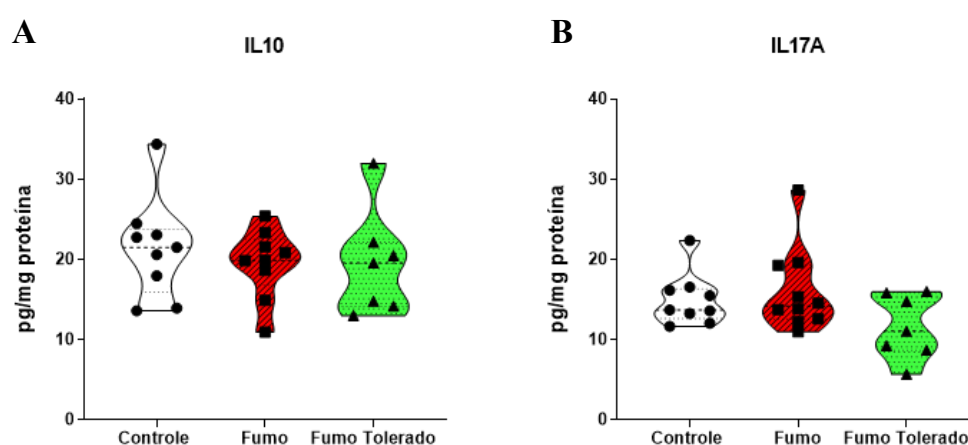


Figura 43. Citocinas inflamatórias dosadas por ELISA nos homogenatos de baço. (A) IL-10; (B) IL-17A (IL-10: n=9, Controle; n=9, Fumo; n=7, Fumo Tolerado) (IL-17A: n=9, Controle; n=10, Fumo; n=7, Fumo Tolerado). Gráficos em *violin plot*, mostrando a frequência de distribuição dos dados analisados.

5.11. Resumo dos achados

Os achados relevantes deste estudo estão resumidos na tabela a seguir, e os mecanismos envolvidos resumidos através de representação gráfica na **Figura 44**:

Tabela 6. Resumo dos resultados relevantes.

Variável	Controle	Fumo	Fumo Tolerado	p-Valor
Lm (Parênquima)	40,40 (35,65-50,81)	50,75 (40,92-60,42)	41,35 (34,47-47,25)	0,0397* ; 0,5291#; 0,0168§
Edema (Parênquima)	12,36 (9,84-20,93)	22,51 (18,96-31,78)	17,76 (7,53-25,00)	0,0082* ; >0,9999#; 0,043§
MAC2 (Parênquima)	4,57 (3,25-6,62)	8,74 (6,95-11,34)	7,34 (4,95-8,51)	0,002* ; 0,0721#; 0,0721§
IL-10 (Parênquima)	23,64 (13,61-33,05)	52,05 (45,57-54,10)	60,17 (50,82-64,40)	0,1209*; 0,0034# ; 0,688§
IL-17 (Parênquima)	24,95 (22,94-37,79)	54,54 (45,23-64,85)	39,24 (28,54-49,11)	0,0044* ; 0,1687#; 0,6093§
FOXP3 (Parênquima)	3,03 (0,82-5,77)	8,19 (5,35-9,27)	11,99 (5,81-14,92)	0,0209* ; 0,0005# ; 0,0304§
Col I (Parênquima)	29,85 (28,14-30,37)	24,80 (20,78-25,98)	26,19 (24,63-29,80)	0,0012* ; 0,0513#; 0,0513§
Col V (Parênquima)	31,25 (30,05-32,97)	27,58 (27,02-27,95)	28,10 (27,33-32,19)	0,0015* ; 0,0361# ; 0,07§
RFO (Parênquima)	27,53 (21,58-29,87)	33,24 (27,63-39,66)	31,36 (27,75-37,08)	0,0393* ; 0,108#; 0,4762§
CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ (Linfócitos - Baço)	4,18 (4,01-6,06)	5,81 (3,83-7,48)	6,75 (5,14-7,65)	0,3267*; 0,0465# ; 0,3267§
IFN- γ (Homogenato de Pulmão)	392,5 (180,6-606,7)	393,1 (347,0-672,4)	307,3 (151,4-367,2)	0,1599*; 0,1599#; 0,0073§
TNF α (Homogenato de Pulmão)	1148 (568,4-1698)	1595 (1173-3053)	1228 (581,7-2089)	0,0169* ; 0,3523#; 0,0845§
IL-6 (Homogenato de Pulmão)	974,6 (483,7-1631)	1100 (733,9-1455)	621,2 (355-850,5)	0,1636*; 0,0287# ; 0,0009§
IL-17 (Homogenato de Pulmão)	163,1 (78,48-324,7)	228,9 (141,1-350,3)	120,5 (58,03-186,4)	0,1507*; 0,0499# ; 0,002§
IL-10 (Homogenato de Pulmão)	679,8 (350,6-1068)	905,6 (458,3-1081)	548 (277,5-888,7)	0,3265*; 0,1684#; 0,0309§

Dados apresentados como mediana. Os valores de p significativos estão representados em negrito vermelho e os símbolos representam as diferenças entre os grupos conforme descrição a seguir: Controle vs. Fumo *; Controle vs. Fumo Tolerado #; Fumo vs. Fumo Tolerado §.

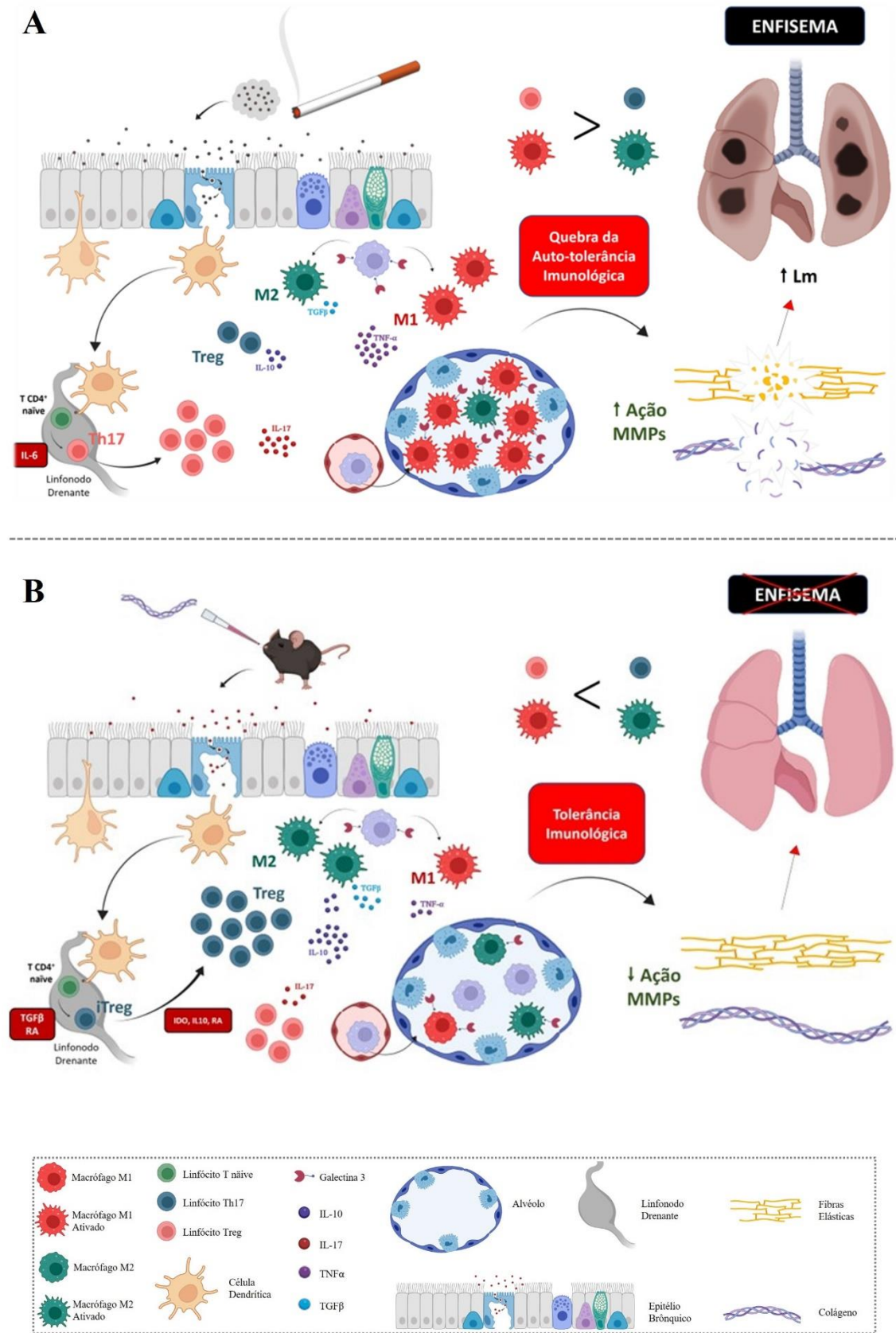


Figura 44. Esquema representativo dos mecanismos avaliados. (A) Resumo dos principais achados no modelo de DPCO; (B) Resumo dos principais achados no modelo de indução de tolerância nasal ao Col V.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos a ação da indução de tolerância ao Col V em um modelo murino de DPOC induzida por fumaça de cigarro. A tolerância ao Col V atenuou o desenvolvimento do enfisema e preveniu alterações estruturais na MEC pulmonar, promovendo um microambiente imunossupressor no pulmão e um perfil celular regulatório sistêmico. Estes resultados sugerem que a autoimunidade ao Col V pode desempenhar um papel no desenvolvimento da DPOC, uma vez que a indução de tolerância a ele pode prevenir a progressão da doença.

O Col V é uma proteína fibrilar presente no tecido pulmonar, numa proporção de 2-5%, que se copolimeriza com o Col I e o III para a formação das fibrilas heterotípicas de Col I/III/V¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Considerado o nucleador da fibrilogênese, o Col V é encontrado no interior destas fibrilas e devido às suas características imunogênicas e antigênicas tem o potencial de se tornar um autoantígeno, quando exposto ao sistema imunológico pela ação de metaloproteinases ou outros agentes indutores da lesão crônica^{122,148,177}. Vários estudos demonstraram a importância do Col V na autoimunidade em doenças como bronquiolite obliterante decorrente de transplante de pulmão, em modelo murino e em humanos, fibrose pulmonar idiopática, aterosclerose e em asma de hipersensibilidade. Ao contrário, a indução de tolerância oral/nasal ao Col V preveniu o desencadeamento destes processos patológicos em modelos experimentais e melhorou a função pulmonar em pacientes com fibrose pulmonar idiopática^{122,127-129,145,148,177-179}.

Considerando que a autoimunidade para Col V foi sugerida na patogênese da DPOC, nós partimos da hipótese de que a indução de tolerância ao Col V pela mucosa nasal poderia ter um efeito positivo sobre o remodelamento e injúria pulmonar no modelo murino de DPOC, induzido pela exposição à fumaça de cigarro. De fato, a administração de antígenos, relacionados à patogênese da doença, pela via das mucosas oral/nasal induz mecanismos de tolerância periférica, que suprimem a reatividade imune celular e/ou humoral específica, sem afetar o sistema imunológico como um todo. Embora não sejam mutuamente exclusivos, os mecanismos desencadeados pela tolerância são, em grande parte, determinados pelo regime de administração do antígeno, onde simples doses altas de antígeno favorecem a deleção ou anergia clonal, enquanto múltiplas doses baixas de antígeno estão ligadas com a supressão mediada por

células Tregs^{138,140,142}. As principais células Treg induzidas por tolerância periférica são: Treg FoxP3⁺, Treg LAP⁺ e células Tr1, que expressam quantidades variáveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- β , IL35, além de granzima^{138,142,180}.

A fim de estudar mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DPOC, a escolha por um modelo animal de indução da doença por exposição à fumaça de cigarro é natural, uma vez que este é seu principal fator de risco. Neste estudo, avaliamos um modelo murino de DPOC induzido pela exposição a fumaça de cigarro por um período de 1 mês. A opção pelo modelo de curta duração, se deve ao fato de estudos prévios mostrarem o desenvolvimento de alterações estruturais nesse tempo, caracterizando presença de enfisema pulmonar. Ainda, foram identificadas células inflamatórias ao redor das vias aéreas, diminuição de células Treg residentes e significativa diminuição de IL-10 no parênquima pulmonar, sugerindo o favorecimento de um ambiente tecidual pró-inflamatório¹⁰².

Nossa avaliação da fase mais precoce do enfisema pulmonar visa elucidar os mecanismos que podem induzir o microambiente inflamatório e as células envolvidas neste processo. Por outro lado, o estudo da ação da indução de tolerância ao Col V sobre o parênquima pulmonar neste período no modelo de DPOC, pode evidenciar a importância do Col V na patogênese da doença, além abrir a perspectiva de uma terapêutica coadjuvante ao tratamento dos pacientes.

A DPOC representa um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo^{181,5}, com altas taxas de morbidade e mortalidade². Esta doença tende a se agravar com o tempo e, embora uma farmacoterapia bem indicada possa retardar o declínio da função pulmonar¹⁸², ainda não é possível reverter a progressão da doença ou impedir os sintomas e suas exacerbações¹⁸³. Em comparação com outras doenças com morbidade e mortalidade semelhantes, o investimento para promover a compreensão da DPOC e desenvolver novas terapêuticas tem sido insuficiente frente a gravidade e incidência da doença¹⁸⁴. Nesse contexto, modelos animais são bastante relevantes, pois são os únicos que possibilitam estudos mecanicistas dentro da complexidade de um organismo inteiro, permitindo o desenvolvimento de novas terapêuticas¹⁸³. Modelos de DPOC desenvolvidos em camundongos são os mais utilizados por oferecem a maior capacidade de investigar vias patogênicas da doença, devido à abundância de

informações sobre o genoma desses animais à grande disponibilidade de sondas de anticorpos¹⁸⁵. Camundongos isogênicos C57BL/6 são os mais empregadas para modelos de DPOC, sendo considerados uma das linhagens mais suscetíveis ao desenvolvimento de enfisema pela fumaça de cigarro^{186,187}.

Neste estudo, submetemos camundongos isogênicos C57BL/6 a um mês de exposição à fumaça de cigarro e, como resultado, observamos a presença de enfisema pulmonar. O aumento do intercepto linear médio observado no grupo Fumo, indica que houve destruição alveolar e alargamento dos espaços aéreos em decorrência da exposição à fumaça de cigarro. Entretanto, esse aumento do Lm não foi observado no grupo que recebeu a indução de tolerância ao Col V antes das exposições. Em um estudo temporal prévio que utilizou este mesmo modelo experimental¹⁰², também foi demonstrada a presença de dano tecidual desde o primeiro mês de exposição, com um aumento progressivo das lesões ao longo do tempo. Outros estudos, com protocolos de 4 semanas de exposição, também tiveram sucesso em demonstrar destruição das paredes alveolares com aumento do Lm em camundongos C57BL/6^{103,188}.

Observamos, ainda, que o aumento do Lm no grupo Fumo foi acompanhado da presença de edema peribrônquico. Apesar de sinais clínicos de edema pulmonar não serem um achado frequente em pacientes com DPOC, estudos conduzidos em modelos animais demonstraram que uma exposição breve à fumaça de cigarro já é capaz de predispor os pulmões à inflamação e ao edema¹⁸⁹⁻¹⁹². A fumaça de cigarro parece causar disfunção da barreira endotelial pulmonar e aumento de permeabilidade na camada epitelial da membrana alvéolo-capilar, sugerindo que o edema pulmonar pode ser uma consequência do tabagismo^{190,193,194}. Provavelmente, o edema peribrônquico observado neste estudo se deve a essa disfunção da barreira endotelial já descrita. A avaliação do edema alveolar no parênquima não foi realizada nesse estudo, podendo ser um ponto de interesse para um futuro aprofundamento no entendimento da disfunção na membrana alvéolo-capilar.

A degradação da MEC pulmonar é um aspecto fundamental no desenvolvimento da DPOC. Para compreender a relação da constituição da MEC pulmonar com o desenvolvimento do enfisema, avaliamos sua composição através da quantificação bioquímica da 4-hidroxi prolina, da análise histoquímica das fibras elásticas totais pela

resorcina-fucsina, e da expressão tecidual das fibras de colágeno dos tipos I, III e V no pulmão por imunomarcção.

A dosagem da 4-hidroxirolina representa a quantificação do principal e mais específico aminoácido do colágeno, presente cerca de 13,5% da sequência de aminoácidos da cadeia α desta proteína.¹⁹⁵. Através da medida deste aminoácido é possível avaliar o conteúdo de colágeno total em um tecido¹⁹⁶. Neste estudo, não encontramos diferença na dosagem da 4-hidroxirolina no tecido pulmonar entre os grupos fumo e fumo tolerado, mostrando que neste tempo estudado, ainda não temos diferença expressiva no conteúdo de colágeno total. No enfisema em humanos, há um aumento na quantidade de hidroxiprolina nos pulmões, mesmo em indivíduos com doença leve, e o aumento de colágeno total ocorre nas áreas de alargamento dos espaços aéreos, havendo uma correlação positiva entre a quantidade deste aminoácido e o Lm medido^{197,198}.

Em modelos animais, a exposição à fumaça de cigarro por alguns dias (camundongos Swiss), ou poucos meses (C57BL/6), produziu um aumento significativo nos níveis de 4-hidroxirolina, relacionado à dose de exposição^{199,200}. Em contraste, outros autores não encontraram diferença na 4-hidroxirolina em camundongos transgênicos, nem em camundongos normais expostos por um ano à fumaça de cigarro^{201,202}. Essa heterogeneidade nos resultados quanto ao conteúdo de 4-hidroxirolina em modelos animais se deve, provavelmente, às diferenças entre os protocolos utilizados para dosagem e para a indução de DPOC.

Embora, não tenhamos demonstrado diferenças no conteúdo total de colágeno entre os grupos estudados, observamos uma diminuição significativa das fibras de colágeno do tipo I e do tipo V, e uma tênue redução das fibras de colágeno do tipo III, no parênquima pulmonar apenas dos animais do grupo Fumo. Esse resultado se deve, provavelmente, à baixa sensibilidade da reação colorimétrica em detectar pequenas quantidades de proteínas, e à diferença entre as metodologias de avaliação, uma bioquímica e a outra morfológica, mais sensível em detectar mudanças entre os compartimentos pulmonares avaliados. Ainda, a ocorrência de uma mudança na proporção dos tipos de colágeno já no início da instalação do enfisema é presumível, já que o dano alveolar progressivo que define o enfisema pulmonar está associado à

quebra e reorganização de componentes da MEC durante o desenvolvimento da doença^{95,203}.

Encontramos poucos estudos que avaliaram as proporções dos tipos de colágeno nos tecidos, especialmente nos estágios iniciais da DPOC em humanos ou em modelos animais de curta duração. Uma pesquisa recente avaliou o efeito temporal da exposição à fumaça de cigarro no colágeno tipo I ósseo em um modelo de DPOC, demonstrando redução progressiva do colágeno tipo I e redução na expressão do gene *Coll1a1*, a partir de um mês de exposição¹⁸⁸. Em um modelo de enfisema desenvolvido em cobaias, a morfometria ultraestrutural revelou uma diminuição na proporção de fibras de colágeno total nas paredes alveolares dos pulmões de animais expostos à fumaça por 1 mês, enquanto aos 6 e 12 meses de exposição, a proporção de colágeno aumentou significativamente²⁰⁴. A degradação de colágeno ocorre mesmo após uma exposição aguda à fumaça de cigarro, conforme demonstrado pelo aumento, dose dependente, de 4-hidroxiprolina no FLBA de camundongos²⁰⁵. Na avaliação temporal de um modelo experimental de enfisema induzido por instilação intranasal de elastase, observamos no parênquima alveolar uma redução precoce na proporção dos colágenos, principalmente do tipo I em 3 dias, e um aumento de colágeno tipo III após 21 dias da indução²⁰⁶.

A redução na expressão de fibras de colágeno do tipo I parece ser diretamente provocada pela fumaça de cigarro. Num estudo *in vitro*, pesquisadores expuseram fibroblastos de pregas vocais humanas a meio condicionado com extrato de fumaça de cigarro e as análises proteômicas, após 24 horas, revelaram que as cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno tipo I estavam entre as proteínas mais suprimidas pelo extrato²⁰⁷. Em um estudo que avaliou a composição da MEC na DPOC, os pesquisadores observaram redução da área ocupada por fibras de colágeno tipo I nas grandes e pequenas vias aéreas de pacientes com DPOC leve e moderada e nas pequenas vias aéreas de fumantes não obstruídos²⁰⁸. Outro estudo, que avaliou a quantidade de colágeno e a proteômica das moléculas da matriz nas paredes arteriais, encontrou diminuição de colágeno do tipo I e a redução dos níveis de decorina nas artérias de fumantes²⁰⁹.

Em contraposição aos achados precoces, estudos realizados em humanos mostram que, à medida que a doença progride, um remodelamento das paredes das vias aéreas, parênquima alveolar e vasos sanguíneos também se estabelece. Diversas

evidências sugerem que o aumento na deposição de fibras de colágeno deve ocorrer em fases mais avançadas da doença. Um estudo, que examinou padrões de expressão de vários componentes da MEC, revelou níveis aumentados de colágenos dos tipo I, III e IV na membrana basal epitelial superficial e dos colágenos tipo I e III na lâmina própria e na adventícia dos brônquios de pacientes com DPOC moderada a grave, e esse aumento foi proporcional à gravidade da doença²¹⁰. Outros estudos também demonstraram que a progressão da DPOC tem forte relação com o aumento da fibrose na parede das pequenas vias aéreas, decorrente do processo de remodelamento tecidual^{211,212}. O aumento de colágeno do tipo III ocorre também no parênquima alveolar em modelos animais de DPOC, mas esse aumento se dá numa fase mais avançada da doença, após 28 dias de instilação nasal de elastase ou 6 meses de exposição à fumaça de cigarro¹⁶⁵.

Ainda no que se refere à avaliação da composição da MEC pulmonar, observamos, neste estudo, um aumento importante da área corada para fibras elásticas totais no parênquima alveolar do grupo Fumo e aumento mais discreto dessa marcação no grupo Fumo Tolerado. A avaliação morfológica mostrou fibras bastante fragmentadas e um espessamento das áreas coradas, sugerindo uma alteração na composição das fibras elásticas, induzida pela fumaça de cigarro. Enquanto os colágenos fibrilares fornecem a base estrutural dos vários compartimentos pulmonares, as fibras elásticas são o principal componente da MEC responsável pelo fornecimento de recuo elástico nos pulmões⁵¹. Um importante mecanismo relacionado à obstrução das vias aéreas na DPOC é justamente a perda de retração elástica decorrente da destruição proteolítica do parênquima pulmonar²¹³. Muitos estudos já evidenciaram que a elastólise contribui significativamente para o início do enfisema pulmonar²¹⁴⁻²¹⁶.

A maioria das pesquisas que analisaram fibras elásticas pulmonares na DPOC, em humanos e modelos animais, apresentam resultados bastante distintos, visto que foram realizadas em pacientes com doença moderada a grave ou em modelos animais de tempo mais prolongado de indução da DPOC. Em um estudo que avaliou fumantes não obstrutivos e pacientes com DPOC leve a moderada, a fração de área das fibras elásticas, em todos os compartimentos pulmonares, foi maior em fumantes não obstrutivos do que em DPOC e controles não fumantes²⁰⁸. Na mesma linha, a avaliação de fibras elásticas nos pulmões de indivíduos com DPOC moderada, usando coloração

de Van Gieson, mostrou que as fibras elásticas estavam reduzidas não apenas nos alvéolos, mas também nas pequenas vias aéreas de pacientes com DPOC em comparação a fumantes²¹⁷. Por outro lado, em uma avaliação morfométrica realizada em tecido pulmonar de pacientes com DPOC leve a moderada, houve aumento de 3 a 4x no conteúdo de elastina nas paredes dos septos alveolares²¹⁸.

Em um modelo murino de indução do enfisema por elastase, onde avaliamos temporalmente a composição das fibras elásticas no parênquima pulmonar, a proporção de elastina apresentou declínio precoce com posterior aumento desse tipo de fibra, sem, no entanto, haver alteração na proporção de fibrilina²⁰⁶. Em um outro estudo, foi observado aumento da proporção de fibrilina no parênquima pulmonar de camundongos expostos à fumaça de cigarro por 6 meses. Já em um modelo murino de elastase, houve aumento do conteúdo de elastina no mesmo tecido¹⁶⁵. Também em modelo murino, um estudo mostrou proliferação de fibras elásticas nas vias aéreas dos camundongos após três meses de exposição à fumaça de cigarro²¹⁹. Em outro modelo experimental de DPOC, realizado em cobaias, a morfometria ultraestrutural mostrou aumento da proporção de fibras elásticas somente após 12 meses de exposição à fumaça de cigarro²⁰⁴.

As fibras elásticas são formadas principalmente por dois componentes morfológicamente distintos: a elastina e as microfibrilas, que tem como principal representante a fibrilina. A fibrilina constitui um arcabouço para deposição da elastina e formação de fibras maduras⁵¹. Uma associação entre a redução de fibrilina-1 no parênquima pulmonar e o desenvolvimento de enfisema já foi demonstrada, tanto em humanos quanto em camundongos^{220,221}. No nosso estudo, observamos aumento das fibras elásticas no parênquima alveolar, caracterizado pela coloração resorcina-fucsina. Esta coloração não permite distinguir qual tipo de fibra elástica se depositou nas paredes alveolares danificadas, portanto, o aumento da proporção da coloração de resorcina-fucsina no parênquima alveolar pode ter se dado tanto pelo aumento na quantidade de elastina ou fibrilina, quanto pela degradação de outros componentes da MEC do septo intralveolar, aumentando a proporção de fibras elásticas no tecido.

Por outro lado, nossos dados da expressão dos genes *Col1A1*, *Col3A1*, *Col5A1*, *Col5A2* e *Fbn1* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os

grupos, o que corrobora com os nossos dados da expressão das proteínas no parênquima alveolar, pois tanto o colágeno do tipo I quanto o V apresentaram diminuição no grupo Fumo. Este fato pode ser explicado pelo *turnover* dos componentes da matriz extracelular no tecido pulmonar. Apesar da expressão dos genes não se alterar, a proteína está constantemente sendo alvo da degradação enzimática estimulada pelo dano tecidual.

Apesar das mudanças estruturais que observamos na MEC pulmonar dos camundongos expostos à fumaça de cigarro, não encontramos diferenças para os parâmetros avaliados na mecânica respiratória desses animais. Um estudo anterior, que conduziu uma análise temporal de 1, 3 e 6 meses do mesmo protocolo de exposição que utilizamos, também não encontrou diferenças na resistência das vias aéreas (Raw) nem na resistência tecidual (Gtis), após um mês de exposição, apesar do aumento significativo do Lm. Entretanto, foi observado aumento da elastância tecidual (Htis) após 1 mês e, a partir de 3 meses de exposição, diminuição do Htis e do Gtis, mas sem nenhuma diferença no Raw¹⁰². Em outro estudo, que utilizou o mesmo modelo, os autores encontraram aumento do Raw após 2 meses de exposição à fumaça de cigarro, mas não encontraram diferenças nem no Gtis, nem no Htis¹⁶². Há, ainda, mais um estudo que avaliou a mecânica em tempos diferentes e, nesse caso, os autores encontraram aumento no Raw após 1 mês de exposição, e diminuição do Gtis e do Htis após 3 meses¹⁵⁹. Num estudo mais recente, a exposição à fumaça de cigarro por 1 mês também não promoveu alteração em nenhum dos parâmetros da mecânica respiratória¹⁸⁸.

Em modelos experimentais de DPOC, as alterações estruturais parecem preceder as alterações funcionais do tecido pulmonar. Isso ficou evidente em um modelo de indução do enfisema por elastase onde, embora alterações estruturais ocorram horas após a instilação²⁰⁶, diminuições significativas na elastância e resistência tecidual ocorrem apenas 21 dias depois²²². Também no modelo de exposição à fumaça de cigarro, a alteração estrutural do parênquima precede a redução da resistência e elastância do tecido pulmonar, que se estabelecem somente após 3 meses de exposição, perdurando em tempos maiores¹⁰². Os parâmetros funcionais da mecânica respiratória nem sempre refletem as alterações histológicas pulmonares no enfisema, sendo os

parâmetros morfométricos considerados mais confiáveis para detectar a presença de enfisema em modelos animais²²³.

Em síntese, os animais apenas expostos à fumaça de cigarro por 4 semanas, apresentaram alterações estruturais no parênquima pulmonar, incluindo o aumento do Lm aliado ao aumento do edema peribroncovascular, além de alterações na MEC, como diminuição na expressão de colágeno dos tipos I e V e aumento de fibras elásticas, embora não tenham sido observadas diferenças na mecânica pulmonar. Por outro lado, a indução de tolerância nasal ao Col V mostrou ter um efeito positivo na manutenção da arquitetura do parênquima pulmonar, visto que os animais do grupo Fumo Tolerado apresentaram diminuição do Lm e do edema perivascular em relação ao grupo Fumo. Ainda, observamos uma tendência no aumento de colágeno I e V e diminuição de fibras elásticas. Corroborando com os nossos achados, a indução de tolerância pela via das mucosas já se mostrou eficaz na prevenção e melhora de patologias envolvendo a injúria do tecido pulmonar. Neste aspecto, vários estudos já mostram que a indução de tolerância ao Col V, pela via das mucosas oral/nasal, foi efetiva na prevenção do início da rejeição de enxerto de pulmão em modelo de transplante de pulmonar em murinos isogênicos e não isogênicos, e ainda foi responsável por prevenir o desenvolvimento de bronquiolite obliterante, principal fator de rejeição do enxerto pulmonar^{128,148,224}. Já num modelo de fibrose pulmonar em camundongos C57BL/6, induzido por bleomicina, a indução de tolerância nasal diminuiu o depósito de colágeno no pulmão, aliado à diminuição de TGF- β e transcritos associados a fibrose pulmonar¹⁷⁹. Além disso, a imunoterapia oral com Col V em pacientes com fibrose pulmonar idiopática melhorou a função pulmonar¹²⁷. Ainda, num modelo de alergia das vias aéreas a indução de tolerância nasal ao Col V preveniu a hiperresponsividade, devido à redução da contração do músculo liso das vias aéreas¹⁴⁴. Numa outra linha de pesquisa, a indução de tolerância nasal ao Col V reduziu a placa aterosclerótica em modelo de aterosclerose e sugeriu um papel do Col V na autoimunidade nesta doença¹²⁹.

O nosso modelo de exposição à fumaça de cigarro por um mês, além de alterações estruturais, também mostrou sinais de inflamação, como o aumento de células inflamatórias nas vias aéreas e parênquima, e aumento da expressão gênica de metaloproteinasas e da secreção de citocinas no parênquima pulmonar. O aumento de células inflamatórias nas vias aéreas foi verificado através da análise do número de

células totais no FLBA. Além de estarem quantidade aumentada, essas células eram, em sua maioria, macrófagos. Em modelos experimentais de enfisema, esse é um achado bastante frequente²²⁵⁻²²⁷. A fumaça do cigarro é capaz de induzir aumento de células no FLBA, de forma consistente em modelos experimentais¹⁰⁰. Tanto na indução por elastase²²⁸, quanto na indução por fumaça de cigarro¹⁰¹, os macrófagos são as células predominantes no processo inflamatório observado no FLBA.

Em uma exposição subaguda à fumaça de cigarro por 5 semanas, somente as células inflamatórias inatas (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) aumentaram significativamente no FLBA de camundongos²²⁹. Mesmo uma exposição aguda de 4 horas já é capaz de provocar aumento de células inflamatórias totais no FLBA de camundongos BALB/c e C57BL/6, principalmente de monócitos, mas também de neutrófilos²³⁰. Os macrófagos são o principal grupo celular presente no FLBA de camundongos expostos à fumaça de cigarro, sendo a primeira população celular a aumentar numericamente, já em um dia após o início da exposição²³¹. Da mesma forma que no presente estudo, pesquisas anteriores encontraram aumento significativo de macrófagos no FLBA de camundongos, após um mês de exposição à fumaça de cigarro^{159,232}.

Esse aumento na população de macrófagos alveolares tem relação com sua função de sentinelas, estrategicamente posicionadas na interface entre o lúmen das vias aéreas e os espaços alveolares, atuando como a primeira linha de defesa contra partículas e patógenos inalados²³³. Em humanos, o aumento de macrófagos no escarro e pulmões de pacientes com DPOC é amplamente reconhecido²³⁴. Pesquisadores também identificaram uma correlação entre o número de macrófagos nas vias aéreas e a gravidade da DPOC³⁶. O tabagismo, isoladamente, está associado a um aumento de mais de cinco vezes no total de células recuperadas no FLBA, sendo os macrófagos cerca de 95-98% delas²³⁵.

Assim como na análise do FLBA, a avaliação da imuno-histoquímica do parênquima alveolar revelou também aumento de macrófagos no tecido pulmonar, demonstrado pelo aumento na marcação de células positivas para galectina-3 (conhecida anteriormente como MAC-2). A galectina-3 é altamente expressa em células imunes de todos os tecidos humanos, desempenhando um papel importante no impulsionamento da

inflamação e das respostas imunológicas²³⁶. Uma das suas principais funções descritas é de induzir a diferenciação monócito-macrófago²³⁷, sendo sua expressão aumentada consideravelmente em macrófagos diferenciados²³⁸. É proposto que galectina-3 também regule adesão, quimiotaxia e apoptose de macrófagos²³⁹, mas ela tem sido utilizada principalmente como um marcador de ativação macrofágica, já que sua expressão é regulada positivamente em macrófagos fagocíticos²⁴⁰. Além disso, foi especulado que a galectina-3 intracelular poderia contribuir para a persistência da inflamação, atuando como fator antiapoptótico na promoção da sobrevivência das células inflamatórias²⁴¹.

O desenvolvimento de inflamação crônica exagerada no pulmão em resposta à inalação de fumaça de cigarro é uma característica marcante que distingue pacientes com DPOC de fumantes sem doença pulmonar¹⁴. Em pacientes com DPOC, foi descrito um aumento acentuado de macrófagos em locais de destruição da parede alveolar no parênquima pulmonar, e esse aumento estava correlacionado à gravidade do enfisema¹⁵. O aumento dessas células também já foi demonstrado no parênquima pulmonar de camundongos após apenas 4 semanas de exposição à fumaça de cigarro¹⁰¹. Sua quantidade, no parênquima pulmonar, continua aumentada mesmo após três meses de exposição à fumaça de cigarro²⁴². De acordo com pesquisas anteriores, o acúmulo e a ativação de macrófagos nos pulmões são essenciais para o desenvolvimento do enfisema induzido por fumaça de cigarro¹⁰⁰.

Macrófagos parecem ter um papel fundamental na fisiopatologia da DPOC, e deles dependem boa parte das características da doença²¹⁶. Foi demonstrado que, mesmo em camundongos imunodeficientes para células B e T funcionais, o sistema imunológico inato é suficiente para desenvolver inflamação induzida pela fumaça de cigarro²²⁹. Os oxidantes presentes na fumaça de cigarro ativam os macrófagos residentes do pulmão, que secretam citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6, atraindo neutrófilos e células da imunidade adquirida²⁴³. Sabendo que os macrófagos são a primeira linha de defesa pulmonar e que são o primeiro tipo celular a aumentar nesse modelo de DPOC, o aumento significativo de macrófagos que observamos, tanto nas vias aéreas quanto no parênquima alveolar, indica que essas células são, provavelmente, as principais responsáveis pelos danos que encontramos na MEC alveolar.

Outro indício que implica os macrófagos no desenvolvimento do enfisema nesse modelo é o aumento encontrado na expressão gênica de MMP-12 nos pulmões dos camundongos expostos. Assim como no nosso estudo, outros autores também encontraram aumento da expressão gênica de MMP-12 associado ao aumento de macrófagos no tecido¹⁰¹. Em humanos, a MMP-12 é quase indetectável em macrófagos normais, mas é expressa em macrófagos alveolares de fumantes²³⁵. Em um modelo desenvolvido em camundongos deficientes para MMP-12, não houve desenvolvimento de enfisema em resposta à exposição prolongada à fumaça de cigarro. Esses camundongos foram incapazes de recrutar macrófagos para os pulmões em resposta à fumaça²⁴⁴. Alguns autores teorizaram que, em um modelo de exposição à fumaça de cigarro, os macrófagos constitutivos são induzidos a produzir MMP-12, gerando fragmentos de elastina, que são quimiotáticos para monócitos. Esse feedback positivo perpetuaria o acúmulo de macrófagos e destruição do parênquima pulmonar²³⁵.

No nosso estudo, é possível que a fragmentação de fibras elásticas observada tenha se dado em decorrência da ação da MMP-12, produzida por macrófagos. Entretanto, não é possível afirmar que a MMP-12 foi mesmo produzida no tecido pulmonar, dado que não avaliamos a expressão dessa proteína pelos macrófagos do parênquima alveolar por imuno-histoquímica. Apesar disso, podemos inferir que a MMP-12 foi produzida, visto que ela é predominantemente liberada por macrófagos e é considerada uma das principais enzimas envolvida na destruição de elastina e consequente desenvolvimento do enfisema em roedores²³⁵. Em um estudo anterior, realizado em modelo de indução de enfisema por elastase, observamos um aumento precoce na expressão gênica para MMP-12, poucas horas após a instilação, mas a alteração na proporção de elastina no parênquima se deu somente a partir do 3º dia²⁰⁶. Após 3 meses de exposição à fumaça de cigarro, pesquisadores do mesmo grupo observaram aumento de células MAC2⁺ (macrófagos) na mesma magnitude de um aumento de expressão proteica de MMP-12 no parênquima pulmonar¹⁶⁰.

Há ainda outra evidência implica os macrófagos como principais atores da inflamação pulmonar encontrada nesse modelo estudado, o aumento observado na expressão de IL-17 pelas células do parênquima pulmonar. A maioria das evidências aponta a IL-17 como fundamental na mediação inflamação e da imunidade tecidual, através da atuação na interface entre o sistema inato e o adaptativo²⁴⁵. Células IL-17⁺ se

acumulam na mucosa brônquica de fumantes crônicos e pacientes com DPOC²⁴⁶. Convencionalmente, se considera que a IL-17 se origina, predominantemente, de células CD4 Th17 (células T auxiliares 17)²⁴⁷. Atualmente, outras células têm sido reconhecidas como produtoras dessa interleucina, como CD8, células T NK e até granulócitos²⁴⁸. Num modelo murino de asma alérgica, pesquisadores observaram que os macrófagos, e não as células Th17, foram os principais produtores de IL-17 na inflamação alérgica²⁴⁹. Também foi demonstrada a produção de IL-17 por macrófagos peritoniais de camundongos deficientes em IL-10²⁵⁰. Pesquisadores sugeriram que a ativação de fontes celulares inatas da IL-17A é essencial para regular o acúmulo de macrófagos na inflamação pulmonar de camundongos expostos à fumaça de cigarro²⁴⁸. Essa interleucina também atua perpetuando a inflamação através da indução da produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos²⁵¹.

A hipótese de que macrófagos foram os principais responsáveis pela produção de IL-17 foi formulada a partir da observação de uma evidência anterior. Utilizando o modelo de exposição de 1 mês, outros pesquisadores do mesmo laboratório não observaram aumento da quantidade de células IL-17⁺ nos pulmões de animais expostos à fumaça de cigarro. No entanto, diferente da análise que realizamos, eles quantificaram somente linfócitos expressando IL-17 na região peribroncovascular¹⁰². Nossa análise foi realizada em outro compartimento do pulmão, o parênquima alveolar, e foram quantificadas todas as células positivas para IL-17, não só os linfócitos. Não foi possível, nesse primeiro momento, avaliar uma dupla marcação de macrófagos e IL-17 para confirmar nossa hipótese. Essa avaliação deve ser realizada num aprofundamento futuro desta pesquisa. No entanto, ao observar as células nos cortes histológicos imunomarcados, notamos que a maioria das células IL-17⁺ eram morfológicamente compatíveis com macrófagos.

Contribuindo para o ambiente pró-inflamatório observado nos pulmões dos camundongos expostos à fumaça de cigarro, detectamos um aumento na secreção de citocinas inflamatórias no tecido pulmonar, principalmente do TNF- α . Já é bem conhecido o papel do TNF- α na fisiopatologia da DPOC²¹³. Em resposta à fumaça de cigarro e outros irritantes, macrófagos liberam diversos mediadores inflamatórios, incluindo o TNF- α ¹⁸⁵. Na expectoração de pacientes com DPOC níveis aumentados de

TNF- α são observados³⁵. Pesquisadores já sugeriram considerar o TNF- α como biomarcador sistêmico de gravidade da DPOC, já que seus níveis aumentam progressivamente com a evolução da doença²⁵². O aumento significativo de TNF- α , no homogenato pulmonar, não foi verificado em um estudo anterior que aplicou o mesmo protocolo de um mês de exposição à fumaça de cigarro¹⁵⁹. Entretanto, essa análise foi conduzida por ELISA, um método menos sensível do que o ensaio de citometria que realizamos. Também nesse mesmo modelo de exposição à fumaça de cigarro, foi encontrado aumento da expressão gênica nos pulmões e de células imunomarcadas para TNF- α na região peribroncovascular, mas somente após 3 meses de exposição¹⁰². Camundongos sem receptores do TNF- α não desenvolvem infiltrado inflamatório ou quebra de MEC após uma exposição aguda à fumaça de cigarro, o que reforça ainda mais a importância desse fator no desenvolvimento do enfisema²⁵³.

O perfil de ativação inflamatória também foi observado sistemicamente, através da imunofenotipagem de linfócitos T no baço. Essa avaliação mostrou uma maior ativação de células T efetoras (CD4⁺CD44^{hi} e CD8⁺CD44^{hi}), tanto nos linfonodos, quanto nos baços dos camundongos expostos à fumaça de cigarro. Um aumento acentuado na expressão do marcador de ativação, CD69, também foi observado em células T nos pulmões de camundongos BALB/c e C57BL/6 após exposição por 4 dias ou 5 semanas à fumaça de cigarro²³⁰. Existe uma correlação entre o número de células T e a severidade da destruição alveolar e a gravidade da obstrução ao fluxo aéreo na DPOC, estando aumentadas na doença as células T CD4⁺ e, principalmente, T CD8⁺²¹⁶. As células CD8⁺ podem causar citólise e apoptose de células epiteliais alveolares através da liberação de perforinas, granzima-B e TNF- α ²⁵⁴.

Em contraposição ao aumento observado em todos esses marcadores inflamatórios, encontramos também um aumento de células com perfil regulatório nos camundongos expostos à fumaça de cigarro. Um aumento significativo de células FOXP3⁺ e uma tendência de aumento de células IL-10⁺ foi verificado no parênquima alveolar. Além disso, houve uma resposta sistêmica na tentativa de manter a homeostase, com aumento da resposta regulatória, expressa pela tendência de incremento do perfil de linfócitos Treg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) nos baços dos camundongos. Importante salientar que as células Treg são subconjuntos de células T

CD4⁺ que expressam CD25 e apresentam funções imunorreguladoras, tendo papel fundamental na manutenção da tolerância periférica e na prevenção da autoimunidade^{255,256}. Estas células podem se distinguir de acordo com a sua origem, sendo as células Treg residentes originadas no timo, com a função de manter a homeostase tecidual; já as células Treg periféricas, são induzidas pela tolerância a antígenos inócuos nas mucosas, sendo responsáveis pela homeostase nesses ambientes^{180,257}.

Em estudo prévio, um mês de exposição à fumaça de cigarro levou a discreta diminuição na expressão de FOXP3 e redução significativa na expressão de IL-10 por linfócitos na região peribroncovascular¹⁰². Esse resultado parece divergir das nossas observações. Entretanto, diferente da nossa avaliação que foi realizada no parênquima alveolar, esse estudo avaliou outro compartimento do pulmão, a região peribroncovascular, e somente os linfócitos foram considerados. Essa evidência nos leva a inferir que os macrófagos, maciçamente encontrados no parênquima, tenham sido as principais células a expressar IL-10. Além disso, a expressão de FOXP3 pelos macrófagos, embora controversa, não pode ser descartada, mas é mais provável que linfócitos Treg tenham expressado esse marcador.

O FOXP3 foi considerado, por muitos anos, um marcador altamente específico de células Treg (CD4⁺CD25⁺). Recentemente, foi sugerido que o FOXP3 possa ser expresso por outros tipos celulares. Num estudo mais atual, a expressão de FOXP3 foi avaliada em macrófagos de tecido normal e tumoral, e essa proteína foi detectada em macrófagos infiltrando tumores de câncer renal de camundongos. A expressão de FOXP3 pelos macrófagos foi demonstrada utilizando citometria de fluxo, *western blot*, e por RT-PCR²⁵⁸. Também já foi descrita a expressão condicional de FOXP3, em macrófagos, no sítio de lesão de acidente vascular cerebral, e a ablação dessa FOXP3 resultou em resultados prejudiciais no AVC, já que esses macrófagos tinham uma função fagocítica aprimorada²⁵⁹. As evidências de que macrófagos expressam FOXP3 são continuamente sugeridas como um achado verdadeiro, mas isso ainda é questionável e considerado por muitos como um artefato ou auto-coloração²⁶⁰.

Fumantes com DPOC têm significativamente menos células Treg nos pulmões, menos mRNA para FOXP3 e menos secreção de IL-10²⁶¹. Por outro lado, num estudo

que avaliou pacientes com DPOC, fumantes assintomáticos e não fumantes, observou-se que os fumantes com função pulmonar preservada apresentaram uma regulação positiva importante de Tregs no FLBA. Essa resposta foi ausente nos fumantes com DPOC. Ainda no mesmo estudo, os autores observaram uma maior presença de Treg no FLBA do que no sangue periférico²⁵⁵, o que sugere uma resposta de regulação inflamatória, mais local do que sistêmica. Aparentemente, a fumaça de cigarro induz uma resposta inflamatória no tecido pulmonar e essa resposta é seguida de uma regulatória na tentativa de reequilibrar a homeostase pulmonar. A agressão crônica da fumaça de cigarro, em algum momento, leva a inflamação a suplantarem a supressão das células regulatórias, levando a instalação e progressão do enfisema.

Em modelo animal, também foi demonstrado que a exposição à fumaça de cigarro por 5 semanas levou ao aumento significativo de células Treg nos pulmões de camundongos C57BL/6 e BALB/c, sendo elas aproximadamente 5% das células T CD4 encontradas nos pulmões²³⁰. Também em modelo de exposição subaguda à fumaça de cigarro, 4 semanas de exposição foram suficientes para aumentar as células Treg no pulmão, mas não nos linfonodos drenantes²⁶². No nosso estudo, não foi possível avaliar por citometria de fluxo os linfócitos pulmonares, entretanto, as análises dos linfonodos mediastinais e do baço mostraram uma tendência de aumento desse perfil celular, induzido pela exposição à fumaça de cigarro. Essas evidências apontam para que, também no pulmão dos camundongos expostos à fumaça de cigarro, linfócitos Treg estejam presentes no parênquima, e são essas as células que expressam FOXP3 e, pelo menos em parte, a IL-10 identificadas por imuno-histoquímica.

A diferenciação de células T CD4⁺ naíve em células T auxiliares Th1, Th2, Th17 ou Treg, é dependente do equilíbrio de citocinas no microambiente do tecido. Foi proposto, há alguns anos, que o balanço Th17/Treg desempenha um papel fundamental na patogênese de doenças autoimunes, incluindo a DPOC. Um estudo anterior mostrou que o desequilíbrio Th17/Treg desempenha um papel fundamental na progressão da DPOC, evidenciando a importância dos estímulos microambientais produzidos pelas citocinas¹⁰². Em um modelo animal, a prevalência do perfil Th17 (CD4⁺ IL-17A⁺) no tecido pulmonar e no sangue periférico aumentou em camundongos após exposição subaguda (4 semanas) e crônica (24 semanas) à fumaça de cigarro. Já a prevalência do perfil Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) no tecido pulmonar e no sangue periférico aumentou

na exposição subaguda e diminuiu na exposição crônica²⁶³. Esses autores também observaram aumento da expressão gênica de FOXP3 no tecido pulmonar, mas não de ROR γ t após 4 semanas de exposição, e uma redução na expressão de FOXP3 e aumento de ROR γ t após 24 semanas. No nosso estudo, embora tenha havido uma discreta tendência ao aumento de expressão gênica de FOXP3, essa diferença não foi significativa.

Em uma visão geral, hipotetizamos que a agressão provocada pela fumaça de cigarro estimulou as células epiteliais e macrófagos residentes do pulmão a expressarem mais galectina-3. Esse aumento promoveu diferenciação, migração e ativação de macrófagos no pulmão. Essas células aumentaram sua produção de metaloproteinases de matriz, promovendo degradação de componentes da MEC pulmonar, tanto de fibras de colágeno quanto de fibras elásticas. Associado a isso, um perfil mais pro-inflamatório foi promovido no tecido, com secreção de TNF- α e expressão de IL-17, que se sobrepôs à tentativa de controle da homeostase por células regulatórias FOXP-3⁺ e IL-10⁺. A expressão de galectina-3 pelos macrófagos os tornou resistentes a apoptose. Isso perpetuou um ciclo de retroalimentação para a manutenção de um estado inflamatório constante, levando a instalação das alterações patológicas encontradas nos pulmões dos animais expostos à fumaça de cigarro. Em paralelo a isso, a exposição do Col V ao sistema imune pela degradação da MEC, amplificou a inflamação por uma reação autoimune, e linfócitos T CD8 e CD4 foram ativados e agiram amplificando a resposta inflamatória no tecido, através do desenvolvimento de um perfil Th1 e Th17. Esses perfis inflamatórios superaram a ação supressora de células Treg, permitindo a instalação do enfisema no tecido pulmonar.

Por outro lado, a exposição controlada a antígenos do Col V foi capaz de induzir uma tolerância do sistema imune a esse colágeno, interferindo nesse ciclo de inflamação. Ao que parece, a tolerância ao Col V diminuiu a ativação e a atração de macrófagos galectina-3⁺ para locais de lesão, reduzindo a expressão desse marcador. Provavelmente, células Treg FOXP3⁺ periféricas, induzidas pela tolerância ao Col V, migraram dos tecidos linfoides periféricos para o pulmão, o que resultou num balanço imunorregulatório positivo e aumento na expressão de IL-10, suplantando a ação das células inflamatórias IL-17⁺. Como consequência disso, houve uma supressão da

inflamação e inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias, protegendo o pulmão das degradação extensa e prolongada dos componentes da MEC.

Com exceção do infiltrado de linfócitos T totais (CD3⁺) na região peribroncovascular, a quantificação de outros tipos celulares no parênquima pulmonar, além dos macrófagos, não foi realizada nesse estudo. Nosso foco foi de descrever as alterações estruturais e a fisiopatologia básica da inflamação nesse modelo, a fim de permitir verificar se havia eficácia da indução de tolerância na proteção do parênquima contra o enfisema. Em um estudo anterior, a exposição à fumaça de cigarro por um mês não promoveu aumento significativo de linfócitos TCD4, TCD8 e CD20 na região peribroncovascular¹⁰². Considerando essa informação, e sabendo que em um mês de exposição a imunidade inata provavelmente tem um papel mais determinante na gênese do enfisema, julgamos ser coerente dar atenção aos macrófagos, a princípio. Em uma continuação dessa linha de pesquisa, deverão ser avaliados os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, os linfócitos B (CD20⁺), os neutrófilos (NE⁺) e as células dendríticas, a fim de mapear o papel desses outros tipos celulares nesse modelo de DPOC de curta duração e no modelo de tolerância induzida por Col V.

Uma vez caracterizadas as células e citocinas responsáveis pelo processo inflamatório nos animais do nosso modelo de exposição à fumaça de cigarro, mostramos que o protocolo de indução de tolerância ao Col V resultou numa tendência de diminuição de células totais e macrófagos no FLBA. Além disso, os animais submetidos à indução de tolerância ao Col V apresentaram diminuição na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-17, IL-6 e IFN- γ) nos homogenatos de pulmão, além de uma tendência na diminuição de células IL-17⁺ no parênquima pulmonar. Mesmo não sendo observada diferença em relação à expressão do gene para MMP-12 entre os grupos Fumo e Fumo Tolerado, acreditamos que a diminuição na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como resultado da indução de tolerância ao Col V, tenha sido um fator crucial na proteção do parênquima pulmonar da injúria desencadeada pela fumaça de cigarro. Importante salientar que a diminuição de citocinas inflamatórias já foi observada por outros autores em decorrência da indução de tolerância ao Col V pela via das mucosas (oral/nasal)^{128,129,179}.

Sabe-se que em murinos a tolerância nas mucosas das vias aéreas superiores depende do NALT, que consiste em acúmulos de células linfoides emparelhadas em forma de sino na entrada do trato nasofaríngeo²⁶⁴. Já nas vias aéreas inferiores, no pulmão, os linfonodos mediastinais, que drenam a parte inferior do sistema respiratório, representam os principais locais para a diferenciação de células T¹³³. Considerando estes tecidos envolvidos na tolerância nasal, um achado importante foi o aumento na quantidade de células naíve nos linfonodos mediastinais, em decorrência da indução de tolerância ao Col V. Teoricamente, o Col V administrado por via nasal foi englobado por células dendríticas, que migraram para os linfonodos mediastinais, e sob a influência de TGF- β e ácido retinóico (AR) induziram a diferenciação das células naíve, específicas para o Col V, em células Treg periféricas, as quais podem expressar, ou não, o fator de transcrição FOXP3. Já é descrito que na periferia as células Treg se expandem ainda mais, sob a influência da IL-10, da enzima indoleamina 2,3-dioxygenase (IDO) e AR e exercem sua função reguladora (supressão de células T efectoras e apoptose) nos tecidos alvo¹²⁶.

No nosso estudo, não foi possível mostrar diferença na expressão de células Treg com o fenótipo CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ entre os grupos Fumo e Fumo Tolerado nos linfonodos mediastinais, provavelmente devido à pequena amostragem, do quais foi possível isolar os linfonodos. Por outro lado, mostramos aumento significativo das células Treg FOXP3⁺ (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) no baço dos animais do modelo de DPOC, submetidos à indução de tolerância ao Col V. Ainda, nos linfonodos mediastinais do grupo submetido à indução de tolerância ao Col V mostramos uma tendência de aumento de uma subpopulação de células Treg LAP⁺ (CD4⁺LAP⁺), conhecidas pela maior produção de TGF- β ¹⁸⁰. Corroborando com nossos achados, a presença de subpopulações de células Treg periféricas já foi mostrada após a indução de tolerância nasal/oral ao Col V, sendo eficazes na imunorregulação de processos patológicos, através da expressão de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β e IL-10^{128,265}.

O aumento sistêmico de células Treg FOXP3⁺ no grupo Fumo Tolerado parece ter se refletido no parênquima pulmonar, visto que foi identificado aumento na expressão de células positivas para FOXP3 e para IL-10. Entretanto, até o momento não identificamos no parênquima pulmonar a proporção de células T com a marcação concomitante para FOXP3⁺ e IL-10⁺. Porém, considerando o conjunto de dados que

mostram uma tendência à diminuição de células com marcação positiva para IL-17, junto com a diminuição de citocina pró-inflamatórias no grupo Fumo Tolerado, é possível inferir que a tolerância ao Col V interferiu positivamente na relação Th17/Treg FOXP3⁺ e pode ter sido um dos fatores protetores da injúria tecidual no grupo tolerado. Estes dados são de suma importância, visto que já foi descrito um equilíbrio entre as células Th17/Treg, tanto em camundongos expostos à fumaça de cigarro como em pacientes com DPOC^{102,242,263}.

Embora tenhamos mostrado aumento de células positivas para IL-10 no parênquima pulmonar, não conseguimos detectar aumento desta citocina no homogenato do tecido pulmonar no grupo de animais submetidos à indução de tolerância ao Col V. Este fato levanta a hipótese de uma imunorregulação restrita a microambientes do parênquima pulmonar. Realmente, as células Treg induzidas por tolerância periférica podem realizar a supressão de células T efectoras por contato, liberando citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, TGF- β , IL35 e granzima¹⁸⁰.

Um ponto fundamental a ser mencionado foi o grande número de células com marcação positiva para IL-10, no parênquima pulmonar dos animais do grupo Fumo Tolerado, com morfologia de macrófagos. Além disso, no grupo tolerado, também mostramos uma diminuição da marcação para galectina-3 em macrófagos, marcador importante de inflamação sistêmica e tabagismo em pacientes com DPOC²⁶⁶. Já está bem estabelecido na literatura o papel central dos macrófagos no desenvolvimento do enfisema pulmonar em modelos experimentais e em pacientes com DPOC^{233,234}. Ainda, em modelos experimentais e pacientes com DPOC foi mostrado que macrófagos intersticiais podem ser polarizados em fenótipos M1 ou M2, dependendo do microambiente do parênquima pulmonar^{267,268}. Os macrófagos M1 secretam citocinas pró-inflamatórias, as quais quando em excesso danificam o tecido pulmonar, e os macrófagos M2 apresentam um perfil anti-inflamatório, responsável pela resolução da inflamação e reparo tecidual²⁶⁸. De acordo com o exposto, é possível imaginar que a indução de tolerância ao Col V, aumentou a expressão de células Treg, responsáveis pela modulação do microambiente do parênquima pulmonar, pela produção de IL-10. Consequentemente, este microambiente imunossupressor favoreceu a polarização de macrófagos M1 (com maior expressão de galectina-3 em macrófagos no grupo Fumo) para M2, com expressão positiva de IL-10. Esta teoria, se apoia em estudo anterior que

mostrou que a tolerância nasal com um peptídeo mutante pneumocócico, induziu células Treg e IL-10, responsáveis pela polarização de macrófagos M1 para M2, e consequente diminuição da doença inflamatória intestinal em modelo de colite²⁶⁹.

Em resumo, mostramos que a autoimunidade contra o Col V pode de fato contribuir para a fisiopatologia da DPOC, uma vez que a indução da tolerância a ele previne a progressão do enfisema. Como as evidências sugerem, a tolerância induzida ao Col V produziu um microambiente imunossupressor no pulmão. Houve um estímulo à expansão clonal das células Treg, que superou a ação das células Th1 e Th17. Paralelamente, o ambiente imunossupressor parece favorecer a polarização M2 dos macrófagos. Isto contribuiu para suprimir a inflamação no tecido pulmonar, prevenindo assim lesões na MEC causadas pela exposição à fumaça do cigarro e, como resultado, o que impediu o desenvolvimento de enfisema. Nossas observações indicam que os macrófagos são críticos nesse processo, mas são necessárias mais pesquisas para confirmar se a tolerância induzida pelo Col V afeta de fato a polarização dos macrófagos nesse modelo experimental. Embora este estudo tenha limitações, como o pequeno tamanho da amostra, os resultados são promissores, e sugerimos que mais pesquisas sejam realizadas para confirmar nossos achados e explorar os mecanismos subjacentes aos efeitos da tolerância ao Col V no remodelamento pulmonar da DPOC. Além disso, são necessárias mais pesquisas para explorar a aplicabilidade da tolerância imunológica ao Col V como abordagem terapêutica para a DPOC.

Uma possibilidade de aplicação clínica poderia ser nas exacerbações agudas da DPOC, situações que levam à hospitalização e piora do prognóstico dos pacientes²⁷⁰. A farmacoterapia disponível pode reduzir essas exacerbações, mas está associada a muitos efeitos colaterais e riscos para os pacientes²⁷¹, tornando crítico o desenvolvimento de novas estratégias de manejo. Anteriormente, foi demonstrado aumento da galectina-3 sérica nas exacerbações da DPOC, e uma correlação positiva desse marcador com a inflamação sistêmica da doença e o tabagismo²⁶⁶. Além disso, há aumento da imunomarcagem epitelial para galectina-3 nas pequenas vias aéreas de pacientes com DPOC grave²⁷². Por outro lado, a depleção mielóide seletiva de galectina-3 oferece proteção contra lesões pulmonares agudas e crônicas²⁷³. Considerando que a autoimunidade contra o Col V e o aumento de galectina-3 marcam as exacerbações da DPOC, parece plausível propor que um tratamento de imuno tolerância ao Col V possa

ter algum efeito adjuvante no controle da ocorrência desses quadros, sem provocar os importantes efeitos deletérios normalmente associados à farmacoterapia disponível atualmente. Futuras investigações são necessárias para avaliar essa hipótese.

7. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que em apenas um mês de exposição à fumaça de cigarro já há indução de um significativo infiltrado celular nas vias aéreas e parênquima pulmonar, em especial de macrófagos, promovendo um desequilíbrio na homeostase do tecido. Houve o favorecimento de um ambiente mais inflamatório, o que desencadeou alterações estruturais na matriz extracelular pulmonar, com danos às fibras elásticas e colágenas. Esse dano resultou em alargamento dos espaços aéreos similar ao visto no enfisema em humanos. Em contraposição, a indução de tolerância ao Col V foi capaz de prevenir as lesões provocadas pela fumaça do cigarro no parênquima pulmonar. Aparentemente, o estímulo da mucosa nasal por doses regulares de Col V promoveu o desenvolvimento de um ambiente mais tolerogênico nos pulmões, o que contribuiu para a manutenção da homeostase tecidual. A proteção do parênquima pulmonar pela indução tolerância ao Col V sugere a participação da autoimunidade contra esse colágeno na fisiopatologia da DPOC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Soriano, J. B. *et al.* Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Respir Med* **8**, 585–596 (2020).
2. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *World Health Organization* [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)) (2021).
3. van Schayck, O. C. & Boudewijns, E. A. COPD and asthma: the emergency is clear, now is the time for action. *Lancet Respir Med* **5**, 668–669 (2017).
4. Mathers, C. D. & Loncar, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine* / *www* **3**, (2006).
5. Cruz, M. M. & Pereira, M. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Ciencia e Saude Coletiva* **25**, 4547–4557 (2020).
6. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde & Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. *Saúde Brasil 2018 uma análise da situação de saúde e das doenças e agravos crônicos: desafios e perspectivas*. (2019).
7. Jardim, J. R., de Oliveira, J. A. & Nascimento, O. II Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica - DPOC. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* **30**, (2004).
8. Venkatesan, P. GOLD COPD report: 2024 update. *Lancet Respir Med* **12**, 15–16 (2024).
9. Cazzola, M. From large clinical trials to management of COPD in the real world. *Ther Adv Respir Dis* **3**, 39–46 (2009).
10. Owen, C. A. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of COPD* **3**, 253–268 (2008).
11. McCloskey, S. C. *et al.* Siblings of Patients with Severe Chronic Obstructive. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 1419–1424 (2001).
12. Stoller, J. K. & Aboussouan, L. S. α -antitrypsin deficiency. *Lancet* **365**, 2225–2236 (2005).
13. Silverman, E. K. Genetics of COPD. *Annu Rev Physiol* **82**, 413–431 (2020).
14. Hogg, J. C. & Timens, W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **4**, 435–459 (2009).
15. Barnes, P. J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **138**, 16–27 (2016).

16. Suki, B., Lutchen, K. R. & Ingenito, E. P. On the progressive nature of emphysema: Roles of proteases, inflammation, and mechanical forces. *Am J Respir Crit Care Med* **168**, 516–521 (2003).
17. Cavalcante, A. G. de M. & de Bruin, P. F. C. O papel do estresse oxidativo na DPOC conceitos atuais e perspectivas. *J Bras Pneumol* **35**, 1227–1237 (2009).
18. Antunes, M. A., Rocco, P. R. M. & Chagas, C. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. *An Acad Bras Cienc* **83**, 1385–1395 (2011).
19. Baraldo, S., Turato, G. & Saetta, M. Pathophysiology of the small airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* **84**, 89–97 (2012).
20. Barnes, P. J. New Concepts in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annu Rev Med* **54**, 113–129 (2003).
21. Betsuyaku, T. *et al.* Neutrophil Elastase Associated with Alveolar Macrophages from Older Volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* **151**, 436–442 (1994).
22. Barnes, P. J. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* **56**, 515–548 (2004).
23. Finlay, G. A. *et al.* Matrix Metalloproteinase Expression and Production by Alveolar Macrophages in Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* **156**, 240–247 (1997).
24. Segura-Valdez, L. *et al.* Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* **117**, 684–694 (2000).
25. Lee, E. J. *et al.* Proteomic analysis in lung tissue of smokers and COPD patients. *Chest* **135**, 344–352 (2009).
26. Löffek, S., Schilling, O. & Franzke, C. W. Series ‘matrix metalloproteinases in lung health and disease’. Biological role of matrix metalloproteinases: A critical balance. *European Respiratory Journal* **38**, 191–208 (2011).
27. Shapiro, S. D. Elastolytic Metalloproteinases Produced by Human Mononuclear Phagocytes Potential Roles in Destructive lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* **150**, S160–S164 (1994).
28. Churg, A., Zhou, S. & Wright, J. L. Matrix metalloproteinases in COPD. *European Respiratory Journal* **39**, 197–209 (2012).
29. Janoff, A., Raju, L. & Dearing, R. Levels of Elastase Activity in Bronchoalveolar Lavage Fluids of Healthy Smokers and Nonsmokers. *Am Rev Respir Dis* **127**, 540–544 (1983).
30. Saetta, M. *et al.* CD8 T-Lymphocytes in Peripheral Airways of Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, 822–826 (1998).
31. Lee, S. H. *et al.* Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* **13**, 567–569 (2007).

32. Saetta, M. *et al.* Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **165**, 1404–1409 (2002).
33. Grumelli, S. *et al.* An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* **1**, 075–083 (2004).
34. Lacoste, J.-Y. *et al.* Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* **92**, 537–548 (1993).
35. Keatings, V. M., Collins, P. D., Scott, D. M. & Barnes, P. J. Differences in Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor- α in Induced Sputum from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease or Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **153**, 530–534 (1996).
36. Di Stefano, A. *et al.* Severity of Airflow Limitation Is Associated with Severity of Airway Inflammation in Smokers. *Am J Respir Crit Care Med* **158**, 1277–1285 (1998).
37. Meshi, B. *et al.* Emphysematous Lung Destruction by Cigarette Smoke The Effects of Latent Adenoviral Infection on the Lung Inflammatory Response. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* **26**, 52–57 (2002).
38. Finkelstein, R., Fraser, R. S., Ghezzi, H. & Cosio, M. G. Alveolar Inflammation and its Relation to Emphysema in Smokers. *Am J Respir Crit Care Med* **152**, 1666–1672 (1995).
39. Barnes, P. J. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD* **1**, 59–70 (2004).
40. Russell, R. E. *et al.* Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**, 867–873 (2002).
41. David, B., Bafadhel, M., Koenderman, L. & de Soyza, A. Eosinophilic inflammation in COPD: From an inflammatory marker to a treatable trait. *Thorax* **76**, 188–195 (2021).
42. Narendra, D. K. & Hanania, N. A. Targeting IL-5 in COPD. *International Journal of COPD* **14**, 1045–1051 (2019).
43. Puchelle, E., Zahm, J. M., Tournier, J. M. & Coraux, C. Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 726–733 (2006).
44. Cosio, M. *et al.* The relations between structural changes in small airways and pulmonary function tests. *N Engl J Med* **298**, 1277–1281 (1978).
45. Takizawa, H. *et al.* Increased Expression of Transforming Growth Factor- β 1 in Small Airway Epithelium from Tobacco Smokers and Patients with COPD. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* **163**, 1476–1483 (2001).

46. Kranenburg, A. R. *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease is associated with enhanced bronchial expression of FGF-1, FGF-2, and FGFR-1. *Journal of Pathology* **206**, 28–38 (2005).
47. Cosio, M. G., Saetta, M. & Agusti, A. Immunologic Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* **360**, 2445–54 (2009).
48. Lambrecht, B. N., Prins, J.-B. & Hoogsteden, H. C. Lung dendritic cells and host immunity to infection. *European Respiratory Journal* **18**, 692–704 (2001).
49. van der Toorn, M. *et al.* Cigarette smoke irreversibly modifies glutathione in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, 1156–1162 (2007).
50. Foronjy, R. & D’Armiento, J. The effect of cigarette smoke-derived oxidants on the inflammatory response of the lung. *Clin Appl Immunol Rev* **6**, 53–72 (2006).
51. Shifren, A. & Mecham, R. P. The stumbling block in lung repair of emphysema: Elastic fiber assembly. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 428–433 (2006).
52. MacNee, W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **2**, 50–60 (2005).
53. Dekhuijzen, P. N. R. *et al.* Increased Exhalation of Hydrogen Peroxide in Patients with Stable and Unstable Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* **154**, 813–816 (1996).
54. Montuschi, P. *et al.* Exhaled 8-Isoprostane as an In Vivo Biomarker of Lung Oxidative Stress in Patients with COPD and Healthy Smokers. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, 1175–1177 (2000).
55. Morrison, D., Rahman, I., Lannan, S. & Nee, W. M. A. Epithelial Permeability, Inflammation, and Oxidant Stress in the Air Spaces of Smokers. *Am J Respir Crit Care Med* **159**, 473–479 (1999).
56. Demedts, I. K., Demoor, T., Bracke, K. R., Joos, G. F. & Brusselle, G. G. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res* **7**, (2006).
57. Kasahara, Y. *et al.* Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* **106**, 1311–1319 (2000).
58. Kasahara, Y. *et al.* Endothelial Cell Death and Decreased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 737–744 (2001).
59. Tudor, R. M. *et al.* Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**, 88–97 (2003).
60. Agustí, A. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease: What we know and what we don’t know (but should). *Proceedings of the American*

- Thoracic Society* vol. 4 522–525 Preprint at <https://doi.org/10.1513/pats.200701-004FM> (2007).
61. Agustí, A. G. N. *et al.* Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* vol. 21 347–360 Preprint at <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00405703> (2003).
 62. Sin, D. D. & Paul Man, S. F. Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* **107**, 1514–1519 (2003).
 63. Wouters, E. F. M., Creutzberg, E. C. & Schols, A. M. W. J. Systemic effects in COPD. in *Chest* vol. 121 127S-130S (American College of Chest Physicians, 2002).
 64. Agustí, A. Chronic obstructive pulmonary disease: A systemic disease. in *Proceedings of the American Thoracic Society* vol. 3 478–481 (2006).
 65. Agustí, A. G. N. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. in *Proceedings of the American Thoracic Society* vol. 2 367–370 (2005).
 66. Broekhuizen, R., Wouters, E. F. M., Creutzberg, E. C. & Schols, A. M. W. J. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* **61**, 17–22 (2006).
 67. Agustí, A. G. N. *et al.* Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **166**, 485–489 (2002).
 68. Casadevall, C. *et al.* Upregulation of pro-inflammatory cytokines in the intercostal muscles of COPD patients. *European Respiratory Journal* **30**, 701–707 (2007).
 69. Vernooij, J. H. *et al.* Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med* **166**, 1218–1224 (2002).
 70. Hogg, J. C. *et al.* The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* **350**, 2645–2653 (2004).
 71. Retamales, I. *et al.* Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Amplification of Inflammation in Emphysema and Its Association with Latent Adenoviral Infection* **164**, 469–473 (2001).
 72. Agustí, A., MacNee, W., Donaldson, K. & Cosio, M. Hypothesis: Does COPD have an autoimmune component. *Thorax* **58**, 832–834 (2003).
 73. Inoue, D., Watanabe, R. & Okazaki, R. COPD and osteoporosis: Links, risks, and treatment challenges. *International Journal of COPD* **11**, 637–648 (2016).

74. Sinden, N. J. & Stockley, R. A. Systemic inflammation and comorbidity in COPD: A result of 'overspill' of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence. *Thorax* **65**, 930–936 (2010).
75. Bolton, C. E. *et al.* Associated loss of fat-free mass and bone mineral density in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 1286–1293 (2004).
76. Cenci, S. *et al.* Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . *J Clin Invest* **106**, 1229–1237 (2000).
77. Katsura, H. & Kida, K. A Comparison of Bone Mineral Density in Elderly Female Patients with COPD and Bronchial Asthma. *Chest* **122**, 1949–1955 (2002).
78. Groneberg, D. A. & Chung, K. F. Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* **5**, 18 (2004).
79. Barnes, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Clinical Investigation* **118**, 3546–3556 (2008).
80. GROSS, P., BABYAK, M. A., TOLKER, E. & KASCHAK, M. ENZYMATICALLY PRODUCED PULMONARY EMPHYSEMA; A PRELIMINARY REPORT. *J Occup Med* **6**, 481–4 (1964).
81. Fusco, L. B. *et al.* Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. *J Pneumol* **28**, 1–7 (2002).
82. Wright, J. L. & Churg, A. Cigarette Smoke Causes Physiologic and Morphologic Changes of Emphysema in the Guinea Pig. *Am Rev Respir Dis* **142**, 1422–1428 (1990).
83. Shapiro, S. D. *et al.* Neutrophil Elastase Contributes to Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *American Journal of Pathology* **163**, 2329–2335 (2003).
84. Martorana, P. A., van Even, P., Gardi, C. & Lungarella, G. A 16-Month Study of the Development of Genetic Emphysema in Tight-Skin Mice. *American Review of Respiratory Disease* **139**, 226–232 (1989).
85. Ranga, V., Grahn, D. & Journey, T. M. Morphologic and Phenotypic Analysis of an Outcross Line of Blotchy Mouse. *Exp Lung Res* **4**, 269–279 (1983).
86. Martorana, P. A., Gardi, C. & Santi, M. de. The pallid mouse: A model of genetic α 1-antitrypsin deficiency. *Laboratory Investigation* **68**, 233–241 (1993).
87. Shapiro, S. D. Animal Models for Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Age of Klotho and Marlboro Mice. *Perspective Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* **22**, 4–7 (2000).
88. Shapiro, S. D. Animal models for COPD. *Chest* **117**, 223S–227S (2000).
89. Ito, S. *et al.* Early emphysema in the tight skin and pallid mice: Roles of microfibril-associated glycoproteins, collagen, and mechanical forces. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**, 688–694 (2006).

90. Mahadeva, R. & Shapiro, S. Chronic obstructive pulmonary disease - 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax* **57**, 908–914 (2002).
91. Churg, A. *et al.* Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodeling in guinea pigs. *Thorax* **62**, 706–713 (2007).
92. Snider, G. L., Lucey, E. C. & Stone, P.J. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* **133**, 149–169 (1986).
93. KONONOV, S. *et al.* Roles of Mechanical Forces and Collagen Failure in the Development of Elastase-induced Emphysema. *American Journal of Respir Critical Care Medicine* **164**, 1920–1926 (2001).
94. Lüthje, L. *et al.* Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. *Respir Res* **10**, (2009).
95. Ito, S. *et al.* Mechanics, nonlinearity, and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: Possible role of collagen remodeling. *J Appl Physiol* **98**, 503–511 (2005).
96. Kuhn, C. & Starcher, B. C. The Effect of Lathyrogens on the Evolution of Elastase-Induced Emphysema. *Am Rev Respir Dis* **122**, 453–460 (1980).
97. Wright, J. L., Cosio, M. & Churg, A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**, (2008).
98. Ghorani, V., Boskabady, M. H., Khazdair, M. R. & Kianmehr, M. Experimental animal models for COPD: a methodological review. *Tob Induc Dis* **15**, 25 (2017).
99. Beckett, E. L. *et al.* A new short-term mouse model of chronic obstructive pulmonary disease identifies a role for mast cell tryptase in pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **131**, 752-762.e7 (2013).
100. Churg, A. *et al.* Acute Cigarette Smoke–Induced Connective Tissue Breakdown Requires both Neutrophils and Macrophage Metalloelastase in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**, 368–374 (2002).
101. Bracke, K. R. *et al.* Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation and Emphysema Are Attenuated in CCR6-Deficient Mice. *The Journal of Immunology* **177**, 4350–4359 (2006).
102. Ito, J. T. *et al.* Th17/Treg imbalance in COPD progression: A temporal analysis using a CS-induced model. *PLoS One* **14**, e0209351 (2019).
103. He, S. *et al.* A Novel Murine Chronic Obstructive Pulmonary Disease Model and the Pathogenic Role of MicroRNA-21. *Front Physiol* **9**, (2018).
104. Wong, H. *et al.* Multiscale modelling of the extracellular matrix. *Matrix Biol Plus* **13**, (2022).
105. Chung, K. F. & Adcock, I. M. Multifaceted mechanisms in COPD: Inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *European Respiratory Journal* **31**, 1334–1356 (2008).

106. Turino, G. M. The Lung Parenchyma-A Dynamic Matrix 1 ,2 J. Burns Amberson Lecture. *Am Rev Respir Dis* **132**, 1324–1334 (1985).
107. Suki, B. & Bates, J. H. T. Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases. *Respir Physiol Neurobiol* **163**, 33–43 (2008).
108. Hoffman, A. M. *et al.* Matrix modulation of compensatory lung regrowth and progenitor cell proliferation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **298**, 158–168 (2010).
109. Lodish, H. *et al.* *Molecular Cell Biology*. (2000).
110. Fratzel, P. *Collagen: Structure and Mechanics*. (2008).
111. Ricard-Blum, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, 1–19 (2011).
112. van der Rest, M. & Garrone, R. Collagen family of proteins. *The FASEB Journal* **5**, 2814–2823 (1991).
113. Chanut-Delalande, H. *et al.* Control of Heterotypic Fibril Formation by Collagen V Is Determined by Chain Stoichiometry. *J Biol Chem* **276**, 24352–24359 (2001).
114. Fichard, A., Kleman, J.-P. & Ruggiero, F. Another Look at Collagen V and XI Molecules. *Matrix Biology* **14**, 515–531 (1994).
115. Dunsmore, S. E. Treatment of COPD: A matrix perspective. *International Journal of COPD* **3**, 113–122 (2008).
116. Laurent, G. J. Lung collagen: more than scaffolding. *Thorax* **41**, 418–428 (1986).
117. Lang, M. R. *et al.* Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. *Thorax* **49**, 319–326 (1994).
118. Gopalakrishnan, B., Wang, W. M. & Greenspan, D. S. Biosynthetic processing of the pro- α 1(V)pro- α 2(V)pro- α 3(V) procollagen heterotrimer. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 30904–30912 (2004).
119. Konomi, H., Hayashi, T., Nakayasu, K. & Arima, M. Localization of Type V Collagen and Type IV Collagen in Human Cornea, Lung, and Skin Immunohistochemical Evidence by Anti-Collagen Antibodies Characterized by Immunoelectroblotting. *American Journal of Pathology* **116**, 417–426 (1984).
120. Birk, D. E. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron* **32**, 223–237 (2001).
121. Linsenmayer, T. E. *et al.* Type V Collagen: Molecular Structure and Fibrillar Organization of the Chicken α 1(V) NH₂-terminal Domain, a Putative Regulator of Corneal Fibrillogenesis. *J Cell Biol* **121**, 1181–1189 (1993).
122. Haque, M. A. *et al.* Evidence for Immune Responses to a Self-Antigen in Lung Transplantation: Role of Type V Collagen-Specific T Cells in the Pathogenesis of Lung Allograft Rejection. *The Journal of Immunology* **169**, 1542–1549 (2002).

123. Wilkes, D. S. Autoimmune responses to grafted lungs: Immune responses to a native collagen - Type V collagen. *Graft* **6**, 42–49 (2003).
124. Bueno, V. & Pacheco-Silva, A. Tolerância oral: uma nova perspectiva no tratamento de doenças autoimunes. *Rev Ass Med Brasil* **45**, 79–85 (1999).
125. Duan, W., So, T., Mehta, A. K., Choi, H. & Croft, M. Inducible CD4 + LAP + Foxp3 – Regulatory T Cells Suppress Allergic Inflammation. *The Journal of Immunology* **187**, 6499–6507 (2011).
126. Smole, U., Schabussova, I., Pickl, W. F. & Wiedermann, U. Murine models for mucosal tolerance in allergy. *Semin Immunol* **30**, 12–27 (2017).
127. Wilkes, D. S. *et al.* Oral immunotherapy with type V collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **45**, 1393–402 (2015).
128. Yamada, Y. *et al.* Type V Collagen-Induced Oral Tolerance Plus Low-Dose Cyclosporine Prevents Rejection of MHC Class I and II Incompatible Lung Allografts. *The Journal of Immunology* **183**, 237–245 (2009).
129. Park, A. C. *et al.* Mucosal administration of collagen V ameliorates the atherosclerotic plaque burden by inducing interleukin 35-dependent tolerance. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 3359–3370 (2016).
130. Galletti, J. G. & de Paiva, C. S. Age-related changes in ocular mucosal tolerance: Lessons learned from gut and respiratory tract immunity. *Immunology* **164**, 43–56 (2021).
131. Brandtzaeg, P. Potential of nasopharynx-associated lymphoid tissue for vaccine responses in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* **183**, 1595–1604 (2011).
132. Kuper, C. F. *et al.* The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today* **13**, 219–224 (1992).
133. Bienenstock, J. & Mcdermott, M. R. Bronchus-and nasal-associated lymphoid tissues. *Immunol Rev* **206**, 22–31 (2005).
134. Hintzen, G. *et al.* Induction of Tolerance to Innocuous Inhaled Antigen Relies on a CCR7-Dependent Dendritic Cell-Mediated Antigen Transport to the Bronchial Lymph Node. *The Journal of Immunology* **177**, 7346–7354 (2006).
135. Lee, H. *et al.* Phenotype and function of nasal dendritic cells. *Mucosal Immunol* **8**, 1083–1098 (2015).
136. Mansouri, S. *et al.* Lung IFNAR1hi TNFR2+ cDC2 promotes lung regulatory T cells induction and maintains lung mucosal tolerance at steady state. *Mucosal Immunol* **13**, 595–608 (2020).
137. de Heer, H. J. *et al.* Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *Journal of Experimental Medicine* **200**, 89–98 (2004).
138. Tordesillas, L. & Berin, M. C. Mechanisms of Oral Tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol* **55**, 107–117 (2018).

139. Weiner, H. L. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* **3**, 947–954 (2001).
140. Wang, X. *et al.* Mechanism of oral tolerance induction to therapeutic proteins. *Adv Drug Deliv Rev* **65**, 759–773 (2013).
141. Rubtsov, Y. P. *et al.* Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity* **28**, 546–558 (2008).
142. Rezende, R. M. & Weiner, H. L. History and mechanisms of oral tolerance. *Semin Immunol* **30**, 3–11 (2017).
143. Vittal, R. *et al.* Type V Collagen Induced Tolerance Suppresses Collagen Deposition, TGF- β and Associated Transcripts in Pulmonary Fibrosis. *PLoS One* **8**, (2013).
144. Lott, J. M. *et al.* Type V collagen-induced tolerance prevents airway hyperresponsiveness. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **187**, 454–457 (2013).
145. Dart, M. L. *et al.* Interleukin-17-dependent autoimmunity to collagen type v in atherosclerosis. *Circ Res* **107**, 1106–1116 (2010).
146. Teodoro, W. R. *et al.* Architectural remodeling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: A preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract* **200**, 681–691 (2004).
147. Callado, M. R. M. *et al.* Autoantibody profile in the experimental model of scleroderma induced by type V human collagen. *Immunology* **122**, 38–46 (2007).
148. Yasufuku, K. *et al.* Oral Tolerance Induction by Type V Collagen Downregulates Lung Allograft Rejection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* **25**, 26–34 (2001).
149. Garippo, A. *et al.* Nasal Tolerance with Collagen V Protein Reverts Bronchovascular Axis Remodeling in Experimental Bronchiolitis Obliterans. *Clinics* **62**, 499–506 (2007).
150. Burlingham, W., Wilkes, D. S. & Sullivan, J. A. Why is the patient out of breath? collagen V(α 1) and K- α 1-tubulin take center stage in lung transplantation. *American Journal of Transplantation* **14**, 2201–2203 (2014).
151. Tiriveedhi, V. *et al.* A shift in the collagen V antigenic epitope leads to T helper phenotype switch and immune response to self-antigen leading to chronic lung allograft rejection. *Clin Exp Immunol* **167**, 158–168 (2012).
152. Keller, M. R. *et al.* Epitope analysis of the collagen type V-specific T cell response in lung transplantation reveals an HLA-DRB1*15 bias in both recipient and donor. *PLoS One* **8**, e79601 (2013).
153. Leeming, D. J. *et al.* Serological Investigation of the Collagen Degradation Profile of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease or Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Biomark Insights* **7**, BMI.S9415 (2012).

154. Rinaldi, M. *et al.* Antielastin B-cell and T-cell immunity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **67**, 694–700 (2012).
155. Sand, J. M. B. *et al.* Characterization of serological neo-epitope biomarkers reflecting collagen remodeling in clinically stable chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Biochem* **49**, 1144–1151 (2016).
156. Bihlet, A. R. *et al.* Biomarkers of extracellular matrix turnover are associated with emphysema and eosinophilic-bronchitis in COPD. *Respir Res* **18**, 22 (2017).
157. Schumann, D. M. *et al.* Collagen Degradation and Formation Are Elevated in Exacerbated COPD Compared with Stable Disease. *Chest* **154**, 798–807 (2018).
158. Sand, J. M. B. *et al.* Accelerated extracellular matrix turnover during exacerbations of COPD. *Respir Res* **16**, 69 (2015).
159. Toledo-Arruda, A. C. *et al.* Time-course effects of aerobic physical training in the prevention of cigarette smoke-induced COPD. *J Appl Physiol* **123**, 674–683 (2017).
160. Lourenço, J. D. *et al.* The Tick-Derived rBmTI-A protease inhibitor attenuates the histological and functional changes induced by cigarette smoke exposure. *Histol Histopathol* **33**, 289–298 (2018).
161. Oliveira, R. B. de. Efeito da exposição crônica à fumaça de cigarro em modelo experimental murino na reativação da paracoccidioidomicose. Tese. (2021).
162. Biselli, P. J. C. *et al.* Short-term exposure of mice to cigarette smoke and/or residual oil fly ash produces proximal airspace enlargements and airway epithelium remodeling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **44**, 460–468 (2011).
163. Hantos, Z. *et al.* Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol* **72**, 168–178 (1992).
164. Tomazini, F. M. *Cartilha de orientação de descarte de resíduo no sistema FMUSP-HC. Diretoria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.*
165. Lopes, F. D. T. Q. S. *et al.* A comparative study of extracellular matrix remodeling in two murine models of emphysema. *Histol Histopathol* **28**, 269–76 (2013).
166. Jacob, R. E. *et al.* Comparison of two quantitative methods of discerning, airspace enlargement in smoke-exposed mice. *PLoS One* **4**, (2009).
167. Hsia, C. C. W., Hyde, D. M., Ochs, M. & Weibel, E. R. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for quantitative assessment of lung structure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* vol. 181 394–418 Preprint at <https://doi.org/10.1164/rccm.200809-1522ST> (2010).

168. Weibel, E. R., Kistler, G. S. & Scherle, W. F. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* **30**, 23–38 (1966).
169. Dunnill, M. S. QUANTITATIVE METHODS IN THE STUDY OF PULMONARY PATHOLOGY. *Thorax* **17**, 320–328 (1962).
170. Gundersen, H. J. G. *et al.* The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96**, 857–881 (1988).
171. Fullmer, H. M., Smeets, J. H. & Narkates, A. J. Oxytalan connective tissue fibers A review. *J Oral Pathol* **3**, 291–316 (1974).
172. Chomczynski, P. & Sacchi, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nat Protoc* **1**, 581–585 (2006).
173. Bergman, Imanuel. & Loxley, Roy. Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline. *Anal Chem* **35**, 1961–1965 (1963).
174. Birk, D. E., Fitch, J. M., Babiarz, J. P., Doane, K. J. & Linsenmayer, T. F. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci* **95**, 649–657 (1990).
175. Chanut-Delalande, H. *et al.* Development of a Functional Skin Matrix Requires Deposition of Collagen V Heterotrimers. *Mol Cell Biol* **24**, 6049–6057 (2004).
176. Kadler, K. E., Hill, A. & Canty-Laird, E. G. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 495–501 (2008).
177. Mares, D. C. *et al.* Type V Collagen Modulates Alloantigen-Induced Pathology and Immunology in the Lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* vol. 23 www.atsjournals.org (2000).
178. Braun, R. K. *et al.* Transfer of Tolerance to Collagen Type V Suppresses T-Helper-Cell-17 Lymphocyte-Mediated Acute Lung Transplant Rejection. *Transplantation* **88**, 1341–1348 (2009).
179. Vittal, R. *et al.* Type V Collagen Induced Tolerance Suppresses Collagen Deposition, TGF- β and Associated Transcripts in Pulmonary Fibrosis. *PLoS One* **8**, e76451 (2013).
180. Bertolini, T. B. *et al.* Role of orally induced regulatory T cells in immunotherapy and tolerance. *Cell Immunol* **359**, 104251 (2021).
181. Varmaghani, M. *et al.* Global prevalence of chronic obstructive pulmonary disease: systematic review and meta-analysis. *Eastern Mediterranean Health Journal* **25**, 47–57 (2019).
182. Welte, T., Vogelmeier, C. & Papi, A. COPD: early diagnosis and treatment to slow disease progression. *Int J Clin Pract* **69**, 336–349 (2015).

183. Vandivier, R. W. & Ghosh, M. Understanding the Relevance of the Mouse Cigarette Smoke Model of COPD: Peering through the Smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol* **57**, 3–4 (2017).
184. Stolz, D. *et al.* Towards the elimination of chronic obstructive pulmonary disease: a Lancet Commission. *The Lancet* **400**, 921–972 (2022).
185. Vlahos, R., Bozinovski, S., Gualano, R. C., Ernst, M. & Anderson, G. P. Modelling COPD in mice. *Pulm Pharmacol Ther* **19**, 12–17 (2006).
186. Guerassimov, A. *et al.* The Development of Emphysema in Cigarette Smoke-exposed Mice Is Strain Dependent. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 974–980 (2004).
187. Radder, J. E. *et al.* Variable Susceptibility to Cigarette Smoke-Induced Emphysema in 34 Inbred Strains of Mice Implicates *Abi3bp* in Emphysema Susceptibility. *Am J Respir Cell Mol Biol* **57**, 367–375 (2017).
188. Junqueira, J. J. M. *et al.* Decreased Bone Type I Collagen in the Early Stages of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* **17**, 575–586 (2020).
189. Sakhatskyy, P. *et al.* Double-hit mouse model of cigarette smoke priming for acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **312**, L56–L67 (2017).
190. Witten, M. L. *et al.* Acute Cigarette Smoke Exposure Causes Lung Injury in Rabbits Treated with Ibuprofen. *Exp Lung Res* **13**, 113–126 (1987).
191. Li, X. Y., Rahman, I., Donaldson, K. & MacNee, W. Mechanisms of cigarette smoke induced increased airspace permeability. *Thorax* **51**, 465–471 (1996).
192. Bhavsar, T. M., Cerreta, J. M. & Cantor, J. O. Short-Term Cigarette Smoke Exposure Predisposes the Lung to Secondary Injury. *Lung* **185**, 227–233 (2007).
193. Lu, Q. *et al.* Cigarette smoke causes lung vascular barrier dysfunction via oxidative stress-mediated inhibition of RhoA and focal adhesion kinase. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **301**, L847–L857 (2011).
194. Rounds, S. & Lu, Q. Cigarette smoke alters lung vascular permeability and endothelial barrier function (2017 Grover Conference Series). *Pulm Circ* **8**, 1–10 (2018).
195. NEUMAN, R. E. & LOGAN, M. A. The determination of hydroxyproline. *J Biol Chem* **184**, 299–306 (1950).
196. Kliment, C. R., Englert, J. M., Crum, L. P. & Oury, T. D. A novel method for accurate collagen and biochemical assessment of pulmonary tissue utilizing one animal. *Int J Clin Exp Pathol* **4**, 349–55 (2011).
197. Martin-Mosquero, C. *et al.* Increased collagen deposition correlated with lung destruction in human emphysema. *Histol Histopathol* **21**, 823–8 (2006).

198. Cardoso, W. V., Sekhon, H. S., Hyde, D. M. & Thurlbeck, W. M. Collagen and Elastin in Human Pulmonary Emphysema. *American Review of Respiratory Disease* **147**, 975–981 (1993).
199. Nesi, R. *et al.* Physical exercise is effective in preventing cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response in mice. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 603 (2016) doi:10.2147/COPD.S93958.
200. Rosenkrantz, H., Esber, H. J. & Sprague, R. Lung hydroxyproline levels in mice exposed to cigarette smoke. *Life Sci* **8**, 571–576 (1969).
201. Foronjy, R. F., Okada, Y., Cole, R. & D'Armiento, J. Progressive adult-onset emphysema in transgenic mice expressing human MMP-1 in the lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **284**, L727–L737 (2003).
202. Foronjy, R. F. *et al.* STRUCTURAL EMPHYSEMA DOES NOT CORRELATE WITH LUNG COMPLIANCE: LESSONS FROM THE MOUSE SMOKING MODEL. *Exp Lung Res* **31**, 547–562 (2005).
203. Gharib, S. A., Manicone, A. M. & Parks, W. C. Matrix metalloproteinases in emphysema. *Matrix Biology* **73**, 34–51 (2018).
204. Wright, J. L. & Churg, A. Smoke-induced emphysema in guinea pigs is associated with morphometric evidence of collagen breakdown and repair. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **268**, L17–L20 (1995).
205. Dhimi, R. *et al.* Acute Cigarette Smoke-Induced Connective Tissue Breakdown Is Mediated by Neutrophils and Prevented by α 1-Antitrypsin. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**, 244–252 (2000).
206. Robertoni, F. S. Z. *et al.* Collagenase mRNA Overexpression and Decreased Extracellular Matrix Components Are Early Events in the Pathogenesis of Emphysema. *PLoS One* **10**, e0129590 (2015).
207. Gugatschka, M. *et al.* Proteomic Analysis of Vocal Fold Fibroblasts Exposed to Cigarette Smoke Extract: Exploring the Pathophysiology of Reinke's Edema*. *Molecular & Cellular Proteomics* **18**, 1511–1525 (2019).
208. Annoni, R. *et al.* Extracellular matrix composition in COPD. *European Respiratory Journal* **40**, 1362–1373 (2012).
209. Faarvang, A.-S. A. *et al.* Smoking is associated with lower amounts of arterial type I collagen and decorin. *Atherosclerosis* **247**, 201–206 (2016).
210. Kranenburg, A. R. *et al.* Enhanced Bronchial Expression of Extracellular Matrix Proteins in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Clin Pathol* **126**, 725–735 (2006).
211. Hogg, J. C. *et al.* The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine* **350**, 2645–2653 (2004).

212. Wright, J. L. *et al.* Morphology of Peripheral Airways in Current Smokers and Ex-smokers. *American Review of Respiratory Disease* **127**, 474–477 (1983).
213. Barnes, P. J. Cellular and Molecular Mechanisms of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin Chest Med* **35**, 71–86 (2014).
214. Starcher, B. & Williams, I. The Beige Mouse: Role of Neutrophil Elastase in the Development of Pulmonary Emphysema. *Exp Lung Res* **15**, 785–800 (1989).
215. Cardoso, W. V., Sekhon, H. S., Hyde, D. M. & Thurlbeck, W. M. Collagen and Elastin in Human Pulmonary Emphysema. *American Review of Respiratory Disease* **147**, 975–981 (1993).
216. Barnes, P. J., Shapiro, S. D. & Pauwels, R. A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *European Respiratory Journal* **22**, 672–688 (2003).
217. Black, P. N. *et al.* Changes in elastic fibers in the small airways and alveoli in COPD. *European Respiratory Journal* **31**, 998–1004 (2008).
218. VLAHOVIC, G., RUSSELL, M. L., MERCER, R. R. & CRAPO, J. D. Cellular and Connective Tissue Changes in Alveolar Septal Walls in Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 2086–2092 (1999).
219. Cantor, J. O. *et al.* Therapeutic Effects of Hyaluronan on Smoke-induced Elastic Fiber Injury: Does Delayed Treatment Affect Efficacy? *Lung* **189**, 51–56 (2011).
220. Robbesom, A. A. *et al.* Aberrant fibrillin-1 expression in early emphysematous human lung: a proposed predisposition for emphysema. *Modern Pathology* **21**, 297–307 (2008).
221. Siracusa, L. D. *et al.* A tandem duplication within the fibrillin 1 gene is associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Res* **6**, 300–313 (1996).
222. Lourenço, J. D. *et al.* A Treatment with a Protease Inhibitor Recombinant from the Cattle Tick (*Rhipicephalus Boophilus microplus*) Ameliorates Emphysema in Mice. *PLoS One* **9**, e98216 (2014).
223. Anciães, A. M. *et al.* Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema. *Clinics (Sao Paulo)* **66**, 1797–803 (2011).
224. Yasufuku, K. *et al.* Prevention of bronchiolitis obliterans in rat lung allografts by type V collagen-induced oral tolerance¹. *Transplantation* **73**, 500–505 (2002).
225. Toledo, A. C. *et al.* Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *European Respiratory Journal* **39**, 254–264 (2012).
226. Braber, S., Henricks, P. A., Nijkamp, F. P., Kraneveld, A. D. & Folkerts, G. Inflammatory changes in the airways of mice caused by cigarette smoke exposure are only partially reversed after smoking cessation. *Respir Res* **11**, 99 (2010).
227. Awji, E. G., Seagrave, J. C. & Tesfaigzi, Y. Correlation of Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation and Emphysema in C3H and C57Bl/6 Mice. *Toxicological Sciences* **147**, 75–83 (2015).

228. Fujita, T. *et al.* Role of CD69 in the pathogenesis of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema. *Biochem Biophys Res* **7**, 400–407 (2016).
229. D’hulst, A. I. *et al.* Cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in scid-mice. Is the acquired immune system required? *Respir Res* **6**, 147 (2005).
230. Botelho, F. M. *et al.* Innate Immune Processes Are Sufficient for Driving Cigarette Smoke–Induced Inflammation in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**, 394–403 (2010).
231. Campos, K. K. D. *et al.* Temporal analysis of oxidative effects on the pulmonary inflammatory response in mice exposed to cigarette smoke. *Cell Immunol* **284**, 29–36 (2013).
232. Skerrett-Byrne, D. A. *et al.* Time-resolved proteomic profiling of cigarette smoke-induced experimental chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* **26**, 960–973 (2021).
233. Lugg, S. T., Scott, A., Parekh, D., Naidu, B. & Thickett, D. R. Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: mechanisms for lung disease. *Thorax* **77**, 94–101 (2022).
234. Finicelli, M., Digilio, F. A., Galderisi, U. & Peluso, G. The Emerging Role of Macrophages in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: The Potential Impact of Oxidative Stress and Extracellular Vesicle on Macrophage Polarization and Function. *Antioxidants* **11**, 464 (2022).
235. SHAPIRO, S. D. The Macrophage in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* **160**, S29–S32 (1999).
236. Dong, R. *et al.* Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med* (2017) doi:10.3892/ijmm.2017.3311.
237. de Oliveira, F. L. *et al.* Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases. *Exp Biol Med* **240**, 1019–1028 (2015).
238. Liu, F. T. *et al.* Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol* **147**, 1016–28 (1995).
239. Di Gregoli, K. *et al.* Galectin-3 Identifies a Subset of Macrophages With a Potential Beneficial Role in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **40**, 1491–1509 (2020).
240. Elliott, M. J., Strasser, A. & Metcalf, D. Selective up-regulation of macrophage function in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transgenic mice. *J Immunol* **147**, 2957–63 (1991).
241. Dunic, J., Dabelic, S. & Flögel, M. Galectin-3: An open-ended story. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1760**, 616–635 (2006).
242. Cervilha, D. A. B. *et al.* The Th17/Treg Cytokine Imbalance in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbation in an Animal Model of Cigarette

- Smoke Exposure and Lipopolysaccharide Challenge Association. *Sci Rep* **9**, 1921 (2019).
243. Wortham, B. W. *et al.* Cutting Edge: CLEC5A Mediates Macrophage Function and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Pathologies. *The Journal of Immunology* **196**, 3227–3231 (2016).
 244. Hautamaki, R. D., Kobayashi, D. K., Senior, R. M. & Shapiro, S. D. Requirement for Macrophage Elastase for Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *Science (1979)* **277**, 2002–2004 (1997).
 245. Ouyang, W., Kolls, J. K. & Zheng, Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity* **28**, 454–467 (2008).
 246. Di Stefano, A. *et al.* T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol* **157**, 316–324 (2009).
 247. Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133–1141 (2005).
 248. Bozinovski, S. *et al.* Innate cellular sources of interleukin-17A regulate macrophage accumulation in cigarette- smoke-induced lung inflammation in mice. *Clin Sci* **129**, 785–796 (2015).
 249. Song, C. *et al.* IL-17-Producing Alveolar Macrophages Mediate Allergic Lung Inflammation Related to Asthma. *The Journal of Immunology* **181**, 6117–6124 (2008).
 250. Gu, Y. *et al.* Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. *Eur J Immunol* **38**, 1807–1813 (2008).
 251. Chen, J. *et al.* IL-17A Induces Pro-Inflammatory Cytokines Production in Macrophages via MAPKs, NF- κ B and AP-1. *Cellular Physiology and Biochemistry* **32**, 1265–1274 (2013).
 252. Kubysheva, N. *et al.* Relationship of Serum Levels of IL-17, IL-18, TNF- α , and Lung Function Parameters in Patients with COPD, Asthma-COPD Overlap, and Bronchial Asthma. *Mediators Inflamm* **2020**, 1–11 (2020).
 253. Churg, A. *et al.* Tumor Necrosis Factor- α Drives 70% of Cigarette Smoke-induced Emphysema in the Mouse. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 492–498 (2004).
 254. HASHIMOTO, S. *et al.* Upregulation of Two Death Pathways of Perforin/Granzyme and FasL/Fas in Septic Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 237–243 (2000).
 255. Barcelo, B. *et al.* Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4⁺CD25⁺ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. *European Respiratory Journal* **31**, 555–562 (2008).

256. Brusselle, G. G., Joos, G. F. & Bracke, K. R. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* **378**, 1015–1026 (2011).
257. Cheru, N., Hafler, D. A. & Sumida, T. S. Regulatory T cells in peripheral tissue tolerance and diseases. *Front Immunol* **14**, (2023).
258. Devaud, C. *et al.* Foxp3 Expression in Macrophages Associated with RENCA Tumors in Mice. *PLoS One* **9**, e108670 (2014).
259. Cai, W. *et al.* FOXP3+ macrophage represses acute ischemic stroke-induced neural inflammation. *Autophagy* **19**, 1144–1163 (2023).
260. Vadasz, Z. & Toubi, E. FoxP3 Expression in Macrophages, Cancer, and B Cells—Is It Real? *Clin Rev Allergy Immunol* **52**, 364–372 (2017).
261. Lee, S.-H. *et al.* Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* **13**, 567–569 (2007).
262. Demoor, T., Bracke, K. R., Joos, G. F. & Brusselle, G. G. Increased T-regulatory cells in lungs and draining lymph nodes in a murine model of COPD. *European Respiratory Journal* **35**, 688–689 (2010).
263. Wang, H. *et al.* Imbalance of Th17/Treg cells in mice with chronic cigarette smoke exposure. *Int Immunopharmacol* **14**, 504–512 (2012).
264. HERITAGE, P. L., UNDERDOWN, B. J., ARSENAULT, A. L., SNIDER, D. P. & McDERMOTT, M. R. Comparison of Murine Nasal-associated Lymphoid Tissue and Peyer's Patches. *Am J Respir Crit Care Med* **156**, 1256–1262 (1997).
265. Mizobuchi, T. *et al.* Differential Expression of Smad7 Transcripts Identifies the CD4+CD45RChigh Regulatory T Cells That Mediate Type V Collagen-Induced Tolerance to Lung Allografts. *The Journal of Immunology* **171**, 1140–1147 (2003).
266. Feng, W. *et al.* Association of Serum Galectin-3 with the Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Medical Science Monitor* **23**, 4612–4618 (2017).
267. Kohler, J. B. *et al.* Microenvironmental stimuli induce different macrophage polarizations in experimental models of emphysema. *Biol Open* (2019) doi:10.1242/bio.040808.
268. Akata, K. & van Eeden, S. F. Lung Macrophage Functional Properties in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci* **21**, 853 (2020).
269. Iqbal, H. *et al.* Pneumococcal pep27-mutant inhibits Wnt5a expression via the regulation of T helper cells to attenuate colitis. *Int Immunopharmacol* **109**, 108927 (2022).
270. Hoogendoorn, M., Hoogenveen, R. T., Rutten-van Molken, M. P., Vestbo, J. & Feenstra, T. L. Case fatality of COPD exacerbations: a meta-analysis and statistical modelling approach. *European Respiratory Journal* **37**, 508–515 (2011).

271. Barnes, P. J. & Celli, B. R. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *European Respiratory Journal* **33**, 1165–1185 (2009).
272. Pilette, C. *et al.* Increased galectin-3 expression and intra-epithelial neutrophils in small airways in severe COPD. *European Respiratory Journal* **29**, 914–922 (2007).
273. Humphries, D. C. *et al.* Selective Myeloid Depletion of Galectin-3 Offers Protection Against Acute and Chronic Lung Injury. *Front Pharmacol* **12**, (2021).

ANEXO 1



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**ESTUDO DOS EFEITOS DA INSTILAÇÃO NASAL DE COLÁGENO TIPO V NA INFLAMAÇÃO E REMODELAMENTO PULMONAR NA DPOC EXPERIMENTAL**” registrada com o nº **1200/2018**, sob a responsabilidade de **Walcy Paganelli Rosolia Teodoro** e **Fabiola Santos Zambon Robertoni**, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 05.12.18.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-12-2018 Término: 01-12-2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57Bl/6
Nº de animais	60
Peso/Idade	6 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 05 de Dezembro de 2018

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais