



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

---

Karina Smidt Simon

*Linha de pesquisa: Interação Parasito/Hospedeiro*

**Título: EVOLUÇÃO DA FIBROSE PULMONAR EXPERIMENTALMENTE  
INDUZIDA EM CAMUNDONGOS DURANTE O TRATAMENTO COM PEPTÍDEOS  
IMUNOMODULADORES**

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Anamélia L. Bocca

Brasília-DF

2019

**Título: EVOLUÇÃO DA FIBROSE PULMONAR EXPERIMENTALMENTE  
INDUZIDA EM CAMUNDONGOS DURANTE O TRATAMENTO COM PEPTÍDEOS  
IMUNOMODULADORES**

**Título: EVOLUÇÃO DA FIBROSE PULMONAR EXPERIMENTALMENTE  
INDUZIDA EM CAMUNDONGOS DURANTE O TRATAMENTO COM PEPTÍDEOS  
IMUNOMODULADORES**

Documento referente à defesa da tese, etapa obrigatória para o prosseguimento das atividades para obtenção do título de doutor do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Anamélia L. Bocca

**Título: EVOLUÇÃO DA FIBROSE PULMONAR EXPERIMENTALMENTE  
INDUZIDA EM CAMUNDONGOS DURANTE O TRATAMENTO COM PEPTÍDEOS  
IMUNOMODULADORES**

Documento referente à defesa da tese, etapa obrigatória para o prosseguimento das atividades para obtenção do título de doutor do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Brasília 19 de agosto de 2019

Banca examinadora

---

Dr<sup>a</sup>. Anamélia L. Bocca, Orientadora

---

Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

---

Dr<sup>a</sup>. Mariana Castro,

---

Alfredo N. C. Santana

---

Dr<sup>a</sup>. Daniela Mara de Oliveira



Este trabalho é dedicado a todos àqueles que não desistiram em frente ao cansaço, desapontamentos que aos quais nos deparamos diariamente.

## **Agradecimentos**

Eu agradeço enormemente à todos aqueles que participaram da caminhada que levou até esse momento. Foram várias pessoas que contribuíram durante todo o percurso que me fez apta a chegar neste momento e gostaria de agradecer a todos pela ajuda e carinho.

Aos meus pais, Adolfo Simon e Cyntia Simon, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e me ajudaram da melhor forma que puderam, por mais difícil que algumas situações pudessem ser para eles.

À minha amiga irmã Joana Ricarte que nunca desistiu de mim, nem nos meus piores momentos. É difícil descrever o quanto ela sempre se faz presente mesmo de longe e o quanto ela é importante em todos os momentos da minha vida.

Agradeço às minhas amigas Carolina Nappo e Gabriela Correa por sempre estarem por perto.

À professora Anamélia Bocca que me deu a oportunidade de aprender e participar dos projetos do seu laboratório e que nos últimos dez anos sempre manteve a porta da sua sala aberta. Eu não sei nem como começar a agradecer por tudo.

À Professo Elizabeth Schwartz e toda da Rede INOVATOXIN que possibilitaram todo o trajeto de testes com os peptídeos antimicrobianos utilizados neste trabalho.

Ao professor Florêncio Figueiredo e à professora Leonora Vianna pelo auxílio com as análises histopatológicas. À eles, muito obrigada.

À professora Verônica Amado pela possibilidade de utilizar seu laboratório e equipamento e ao professor Cesar Melo-Silva pela participação em todos os experimentos de mecânica ventilatória. Sem eles trabalho não seria possível.

Ao professor Aldo Henrique Tavares pela sua ajuda durante o projeto.

Um agradecimento ao Pedro Silva e à Luísa Coutinho que me acompanharam nos experimentos e ajudaram muito durante o decorrer deste trabalho. Sua participação teve enorme importância e não sei se eu teria conseguido fazer tudo isto sem eles.

À todos os alunos que passaram pelo Laboratório de Imunologia Aplicada e auxiliaram no trabalho, sendo discutindo um artigo, sendo na bancada ou ainda compartilhando as preocupações. Em especial agradeço ao Paulo Henrique Veloso e ao Raffael Castro por toda a ajuda nos últimos quatro anos.

Ao Professor João Paulo Figueiró que permitiu o acesso ao equipamento de micro tomografia computadorizada cujo o uso complementou de forma tão interessante este trabalho.

À Universidade de Brasília, ao Instituto de Ciências Biológicas, à Faculdade de Medicina e ao programa de pós-graduação em Biologia Molecular, por concederem o espaço e parte dos recursos necessários para a realização desse projeto.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPDF e ao SUS pelo auxílio recebido para a realização deste trabalho. Sem o financiamento que recebemos nada relacionado a este trabalho ou qualquer outro realizado na UnB seria possível.

“A visão do microscópio é o ópio do trivial.”

Humberto Gessinger

## Resumo

A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é uma doença progressiva, inexorável e com alta taxa de mortalidade. Pouco se sabe a respeito dos seus mecanismos patogênicos e, portanto, há grande dificuldade no desenvolvimento de terapias farmacológicas eficientes. Atualmente, o principal modelo experimental da FPI é o que utiliza camundongos C57BL6 que sofrem instilação intratraqueal (IT) de belomicina (BLM). Estes animais desenvolvem um processo inflamatório robusto, que progride para um processo fibrótico nos pulmões, porém ou falecem precocemente ou evoluem para cura espontânea em aproximadamente 30 dias. Dessa forma, neste trabalho objetivou-se desenvolver um modelo crônico de FPI, que perdurasse mais de 30 dias e uma possibilidade terapêutica utilizando peptídeos imunomoduladores. Para isso, camundongos BALB/c sofreram instilação IT de BLM. Ao contrário do que a literatura tem descrito, esses animais desenvolveram um processo inflamatório que evoluiu para um contínuo depósito de colágeno nos pulmões, com alterações na produção de colágeno I, II, III e IV, que permaneceu por até 60 dias, associado à alteração significativas da mecânica ventilatória desses animais. Associados a essa observação da progressão da doença, foram avaliados o perfil das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-13, IL-17 e TGF- $\beta$  e a modulação dos genes característicos do desenvolvimento da doença fibrótica pulmonar. O resultados mostraram regulação do perfil de citocinas condizente com as alteração teciduais e funcionais observadas e conjunto com a relação positiva de *Itgb6* e regulação negativa de *Smad4* e de *Stat6* aos 15 dias após a instilação e posteriormente, 30 dias da instilação IT de BLM, os animais apresentaram regulação positiva de *Fasl*, *Itgb6* e *Mmp13* e regulação negativa de *Eng*. Uma vez observado que a fibrose pulmonar está associada a eventos da resposta imunológica (RI), utilizou-se os peptídeos imuno reguladores ToAP3 e ToAP4 para seu tratamento com o protocolo de aplicação intranasal a cada 3 dias, iniciando-

se no 5º dia após a instilação de BLM. Ambos os peptídeos foram bem sucedidos no controle da doença, não só conservando o tecido pulmonar e sua função próximo ao normal como também regulando a produção das citocinas associadas ao processo fibrótico, porém os dados de PCRarray e o padrão bastante distinto da possível regulação da expressão dos genes relacionas à fibrose pulmonar indica que suas atuações ocorrem por mecanismos distintos. Os dados obtidos neste trabalho apontam para a possibilidade de utilizar camundongos BALB/c como modelo experimental para FPI como mostram que a regulação da resposta imunológica por ToAP3 e ToAP4 é capaz de controlar as alterações causadas pela instilação IT da BLM que levam ao processo fibrótico nos pulmões, mostrando que esses peptídeos são potenciais alternativas terapêuticas para a FPI

## Abstract

The idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive, relentless, deadly disease. Still little is known about its pathogenetic mechanisms and, therefore, it is greatly difficult to develop efficient pharmacological therapies. The majorly used animal model for IPF is C57BL/6 mice intratracheally (IT) instilled with bleomycin (BLM). These animals develop a robust inflammatory process that leads to a fibrotic process. However, these mice either die early or heal spontaneously in approximately 30 days. So this work aimed to develop a chronic IPF animal model that would persist more than 30 days and a therapeutic alternative using immunomodulatory peptides. For that, BALB/c mice were IT instilled with BLM and observed for 60 days. Differently of what literature brings, these animals developed a mild inflammatory process followed by a fibrotic process with alterations on the production of collagen I, collagen II, collagen III and collagen IV, that were still observed in 60 days, in association with significant alterations on ventilatory mechanics of these animals. In association with these observations, there were evaluated the cytokine profile of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-13, IL-17 and TGF- $\beta$  and the alteration of gene expression that are characteristic of the pulmonary fibrotic disease. Results showed that the alteration on the cytokine profile are consistent with the tissue and functional alterations, in association with the positive regulation of *Itgb6* and negative regulation of *Smad4* and *Stat6* 15 days after BLM instillation and afterwards, 30 days after BLM instillation, positive regulation of *FasL*, *Itgb6* and *Mmp13* and negative regulation of *Eng*. Once there were possible the association of progressive fibrosis and IR, the immune modulatory peptides ToAP3 and ToAP4 were used as treatment, following the protocol of intranasal application each 3 days, starting at the 5th day after BLM instillation. Both peptides were able to control the experimental IPF, not only keeping the tissue characteristics and normal function properties but also regulating fibrotic



associated cytokines production, but PCRarray results and the different pattern of ToAP3 and ToAP4 gene modulation indicates that peptides' action is performed by different mechanism. Data obtained in this work show not only the possibility of using BALB/c mice as experimental model of IPF but also that the IR regulation by ToAP3 and ToAP4 is capable to control the alterations that causes the fibrotic process after BLM instillation, therefore making both peptides potential therapeutic alternatives for IPF.

**Sumário**

<b>Índice de Figuras</b>	<b>ix</b>
<b>Índice de tabelas</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de abreviações</b>	<b>xii</b>
<b>Capítulo 1: Introdução</b>	<b>1</b>
I. Contextualização	2
II. Sistema Respiratório	3
II. Resposta Imunológica nos pulmões	6
III. Fibrose pulmonar	10
IV. Abordagens terapêuticas para a FPI	15
V. Peptídeos antimicrobianos	18
VI. Objetivo	19
<b>Capítulo 2: Modelo experimental de Fibrose Pulmonar Idiopática</b>	<b>21</b>
I. Contextualização do modelo	22
II. Material e Métodos	23
1. Camundongos	23
2. Instilação intratraqueal	24
3. Avaliação histopatológica.	24
4. Curva de sobrevivência e curva de peso	25

5. Análise por Micro Tomografia Computadorizada	25
6. Mecânica ventilatória	26
7. Análise estatística	28
III.Resultados e discussão	29
1. Análise morfológica dos pulmões dos camundongos tratados com bleomicina	29
2. Curva de sobrevivência e curva de peso dos animais tratados com BLM	43
3. Avaliação da capacidade respiratória dos animais após o tratamento com bleomicina	44
<b>Capítulo 3: Toap3 e Toap4 como alternativas terapêuticas para a Fibrose Pulmonar</b>	
<b>Idiopática</b>	<b>53</b>
I. Contextualização do tratamento	54
II. Material e métodos	55
1. Peptídeos antiinflamatórios	56
2. Animais	57
3. Avaliação da indução de migração celular pelos peptídeos no peritônio	57
4. Tratamento com peptídeos antiinflamatórios	58
5. Mecânica ventilatória	58
6. Avaliação morfológica do pulmão	59
7. Análise por Micro Tomografia Computadorizada	59
8. Quantificação de citocinas	59

9. Reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa, quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	60
10. PCR array	61
11. Análises Estatísticas	61
III. Resultados e Discussão	62
1. Avaliação da indução de migração celular para o peritônio pelos peptídeos ToAP3 e ToAP4	62
2. Análise morfológica dos pulmões dos camundongos instilados com bleomicina e tratados com ToAP3 e ToAP4	63
3. Avaliação da mecânica ventilatória dos animais tratados com ToAP3 ou ToAP4 após indução de fibrose com BLM.	73
4. Quantificação de citocinas	79
5. Quantificação de transcritos Arginase 1, Nfkb, STAT4 and iNOS no tecido pulmonar	90
6. Verificação da alteração no acúmulo de transcrito de genes envolvidos no processo fibrótico por PCR array	94
<b>Capítulo 4: Conclusão e perspectivas</b>	<b>111</b>
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>114</b>
<b>Anexo I</b>	<b>xvii</b>
<b>Anexo II</b>	<b>xviii</b>
<b>Anexo III</b>	<b>xxii</b>

**Anexo IV**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 2.1: Diagrama do desenho experimental do modelo murino de FPI utilizando camundongo BALB/c.	32
Figura 2.2: Análise histológica dos pulmões dos animais instilados com BLM.	32
Figura 2.3: Imunohistoquímica dos animais instilados com BLM.	36
Figura 2.4: Quantificação do colágeno I, colágeno II, colágeno III, colágeno IV no tecido pulmonar dos animais instilados com bleomicina.	37
Figura 2.5: Imagens de $\mu$ CT dos animais instilados com BLM	41
Figura 2.6: Medidas da densidade pulmonar dos animais instilados com BLM.	42
Figura 2.7: Peso dos animais instilados com BLM e curva de sobrevivência.	44
Figura 2.8: Avaliação da mecânica ventilatória dos animais instilados com BLM.	46
Figura 3.1: Diagrama do desenho experimental do tratamento com os peptídeos imunorreguladores ToAP3 e ToAP4, utilizando o modelo murino de FPI em camundongos BALB/c.	56
Figura 3.2: Imagem de $\mu$ CT dos animais que sofreram instilação com BLM e foram tratados com ToAP3 e ToAP4.	65
Figura 3.3: Medidas da densidade pulmonar dos animais tratados com os peptídeos imunomodulatórios.	66
Figura 3.4: Avaliação histológica dos pulmões dos animais tratados com ToAP3 e ToAP4 após serem instilados intratraquealmente com BLM.	67
Figura 3.5: Análise imunohistoquímica dos pulmões dos animais tratados com ToAP3 e ToAP4 após serem instilados intratraquealmente com BLM.	69

- Figura 3.6: Quantificação de colágeno I, colágeno II, colágeno III e colágeno IV, tratados com ToAP3 ou ToAP4 após serem instilados intratraquealmente com BLM. 70
- Figura 3.7: Medidas da densidade pulmonar dos animais tratados com os peptídeos 30 dias após término do período de tratamento 72
- Figura 3.8: Avaliação da mecânica ventilatória dos animais tratados com ToAP3 ou ToAP4. 77
- Figura 3.9: Avaliação da mecânica ventilatória após 30 dias de do final do tratamento com ToAP3 ou ToAP4. 78
- Figura 3.10: Concentração de citocinas encontrada nos pulmões de animais tratados com BLM. 85
- Figura 3.11: Concentração de citocinas encontrada nos pulmões de animais com ToAP3 ou ToAP4 88
- Figura 3.12: Concentração de citocinas encontrada nos pulmões de animais tratados com ToAP3 ou ToAP4 após 30 dias do final do tratamento. 89
- Figura 3.13: Níveis do acúmulo de transcrito de *NFkb*, *Arginase 1* e *iNos* no tecido pulmonar de camundongos tratados com BLM e com ToAP3 ou ToAP4 93

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 2.1: Descrição histopatológica do tecido pulmonar dos animais tratados com bleomicina	30
Tabela 3.1: Primers utilizados para a reação de PCR	61
Tabela 3.2: Migração celular no peritônio dos camundongos induzida por ToAP3 e ToAP.	63
Tabela 3.3: Quantificação do acúmulo de transcrito de genes relacionados à fibrose pulmonar, verificado por PCR array, em relação aos animais no tempo 0.	97
Tabela 3.4: Quantificação do acúmulo de transcrito de genes relacionados à fibrose pulmonar, verificado por PCR array, em relação aos animais instilados com bleomicina há 15 dias.	98
Tabela 3.5: Quantificação do acúmulo de transcrito de genes relacionados à fibrose pulmonar, verificado por PCR array, dos animais tratados com ToAP3 ou ToAP4 em relação aos animais instilados com bleomicina há 30 dias.	102



## LISTA DE ABREVIACÕES

-  cido desoxirribonucleico (DNA)
-  cido ribonucleico (RNA)
- $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA)
- Amortecimento tecidual (G)
- Beta 2 microglobulina
- Bleomicina (BLM)
- Células dendríticas (DCs)
- Células epiteliais alveolares (CEAs)
- Células linfóides da imunidade inata (ILCs)
- Células T regulatórias (Treg)
- Comitê de  tica do Uso Animal (CEUA)
- Complacência do sistema respiratório (Crs)
- Complexo de histocompatibilidade de classe I (MHC I)
- Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)
- DNA complementar (cDNA)
- Elastância do sistema respiratório (Ers)
- Elastância do tecido pulmonar (H)
- Endoglina (ENG)
- Ensaio de imuno-absor o enzimática (ELISA)
- Erro padrão (SEM)

- Espécies reativas de oxigênio (ROS)
- Fas ligante (superfamília de TNF, membro 6) (FasL)
- Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )
- Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)
- Fator de crescimento derivado de plaquetas- alfa (PDGF- $\alpha$ )
- Fator de crescimento de endotélio vascular A (VEGF)
- Fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ )
- Fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B)
- Fibrose pulmonar (FP)
- Fibrose pulmonar idiopática (FPI)
- Fluido do lavado brônquio-alveolar (BALF)
- Homólogo de MAD 3 (SMAD3)
- Homólogo de MAD 4 (SMAD4)
- Impedância do sistema respiratório (Zrs)
- Imunohistoquímica (IHQ)
- Inibidor tecidual de metaloproteinases 4 (TIMP4)
- Intensidade fortemente positiva (ISP)
- Intensidade total positiva (IP)
- Interferon gama (IFN- $\gamma$ )
- Interleucina 1 (IL-1)
- Interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ )
- Interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ )

- Interleucina 4 (IL-4)
- Interleucina 10 (IL-10)
- Interleucina 13 (IL-13)
- Interleucina 17 (IL-17)
- Intratraqueal (IT)
- Intramuscular (IM)
- Isoforma  $\alpha$  do receptor de IL-4 (IL-4R $\alpha$ )
- Lipopolissacarídeo (LPS)
- Matriz extracelular (MEC)
- Medida da impedância do sistema respiratório (Zrs)
- Metaloproteinase de matriz 2 (MMP2)
- Metaloproteinase de matriz 13 (MMP13)
- Metaloproteinase de matriz 14 (MMP14)
- Micro tomografia computadorizada ( $\mu$ CT)
- Óxido Nítrico (NO)
- Padrões moleculares associados a dano (DAMPs)
- Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs)
- Proteína ligante de LPS (LBP)
- Proteína ligante de TGF- $\beta$  latente (LTBP)
- Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)
- Pneumonia intersticial usual (PIU)
- Pressão positiva de expiração final (PEEP)

- Proto oncogene vira de timoma (AKT1)
- Quimiocina motivo C-C 2 (CCL2)
- Quimiocina motivo C-C 6 (CCL6)
- Quimiocina motivo C-C 9 (CCL9)
- Quimiocina motivo C-C 11 (CCL11)
- Quimiocina motivo C-C 17 (CCL17)
- Quimiocina motivo C-C 18 (CCL18)
- Quimiocina motivo C-X-C 2 (CXCL2)
- Quimiocina motivo C-X-C 11 (CXCL11)
- Reação de polimerase em cadeia (PCR)
- Reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa, quantitativa em tempo real (qRT-PCR)
- Resistência do sistema respiratório (Rrs)
- Resistência newtoniana (Rn)
- Resposta imunológica (RI)
- Receptor de PDGF (PDGFR)
- Receptor de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ R)
- Receptor de TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ R)
- Receptor de VEGF (VEGFR)
- RNA mensageiro (mRNA)
- Sistema Imunológico (SI)
- Sistema Respiratório (SR)

- Solução tampão fosfato-salino (PBS)
- Tecido linfóide indutível associado aos brônquios (iBALT)
- Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT1)
- Transdutor de sinal e ativador da transcrição 4 (STAT4)
- Transdutor de sinal e ativador da transcrição 6 (STAT6)
- Tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR)
- Unidades de Hounsfield (HU)
- Voxels de interesse (VOIs)

## **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO**

## I. Contextualização

O sistema respiratório (SR) é estruturalmente dividido em vias aéreas superiores e inferiores, onde, dentre outras estruturas, encontram-se os alvéolos, regiões onde de fato ocorrem as trocas gasosas entre o sangue e a atmosfera. O SR tem uma grande superfície de contato que está virtualmente em contato direto com o ambiente externo e, desta forma, constantemente exposto a uma grande variedade de partículas e/ou substâncias não próprias (Iwasaki *et al.*, 2017). Por essa razão, as células do sistema imunológico (SI) presentes devem estar aptas a diferenciá-las entre as que são ou não potenciais causadores de danos (Tortora, 2000).

As células do SI residentes no SR possuem características fenotípicas de adaptações para seu micro ambiente único que favorecem um perfil antiinflamatório e pouco responsivo, evitando, assim, respostas inflamatórias persistentes aos diversos antígenos que estão constantemente em contato com o SR e danos tecidas causados pelo processo inflamatório (Holt *et al.*, 2008). Entretanto, alguns antígenos podem desencadear um processo inflamatório com danos teciduais pela migração de células para o pulmão. Quando esse processo de destruição tecidual ocorre em uma taxa superior àquela da sua substituição, o organismo não mais empregará os mecanismos regenerativos e sim os reparativos, desenvolvendo uma cicatriz fibrótica permanente. Existem diferentes tipos de fibrose pulmonar (FP), sendo que o processo fibrótico severo, cujo agente etiológico é desconhecido associado a um conjunto característico de sintomas, é chamado de fibrose pulmonar idiopática (FPI) (Raghu *et al.*, 2011; Wynn, 2011).

A FPI é uma doença crônica, com alta de mortalidade, refratária aos tratamentos disponíveis e que demanda atendimento ao paciente nos diversos níveis de complexidade do sistema de saúde (Hopkins *et al.*, 2016; Cottin, *et al.*, 2017). É caracterizada pela destruição

progressiva e irreversível da arquitetura do pulmão, devido ao depósito de colágeno decorrente do estabelecimento de um processo de cicatrização exacerbado e desregulado. Apesar dos avanços no conhecimento dos mecanismos patogênicos que levam ao estabelecimento desta doença, pouco se sabe sobre a sequência de eventos que levam ao processo fibrótico. Embora o SI seja fundamental para a cascata de eventos do processo de cicatrização e/ou fibrótico, por muito tempo foi pouco relacionado com a fisiopatologia da FPI, uma vez que não se costuma observar uma inflamação proeminente nos primeiros estágios da pneumonia intersticial usual (PIU) (padrão tecidual característico da FPI), embora os mecanismos de regulação dos fibroblastos pareçam estar alterados e um grande número de miofibroblastos estejam presentes em agregados subepiteliais na presença de mediadores da resposta imune (Aiello *et al.*, 2017; Allen & Spiteri, 2002, Glaudie *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 1994). Além disso, várias tentativas de terapias para FPI utilizaram imunossupressores sem êxito. Atualmente, as abordagens terapêuticas atuam diretamente no processo de fibrogênese e têm por objetivo retardar o estabelecimento de um processo fibrótico no parênquima, sem vislumbrar um caráter curativo (Belperio *et al.*, 2002; Borie, 2016; Sköld *et al.*, 2017).

## **II. Sistema Respiratório**

O SR, em conjunto com o sistema cardiovascular, é responsável pelo processo de respiração. É por meio desse processo que ocorrem as trocas gasosas entre o sangue e atmosfera. Estruturalmente, o SR é dividido em vias aéreas superiores e inferiores: a primeira porção compreende o nariz, a faringe e suas estruturas associadas, enquanto a segunda refere-se à laringe, à traqueia, aos brônquios e aos pulmões (Tortora, 2000). Na porção inferior do SR, encontram-se estruturas com funções condutoras, como traqueia, brônquios e



bronquíolos; e estruturas com função respiratória, como bronquíolos respiratórios, ductulos alveolares, sáculos alveolares e alvéolos.

"À medida que a árvore respiratória se prolonga no parênquima pulmonar, o número de alvéolos abrindo-se no bronquíolo respiratório vai aumentando até que a parede passa a ser constituída apenas de alvéolos, e o tubo passa a ser chamado de ducto alveolar. Tanto os ductos alveolares como os alvéolos são revestidos por epitélio simples plano cujas células são extremamente delgadas. (...) Os ductos alveolares mais distais não apresentam músculo liso. Uma matriz rica em fibras elásticas e contendo também fibras reticulares constitui o suporte para os ductos e alvéolos. (...) Os alvéolos são estruturas encontradas nos sacos alveolares, ductos alveolares e bronquíolos respiratórios; constituem as últimas porções da árvore brônquica, sendo os responsáveis pela estrutura esponjosa do parênquima pulmonar." (Junqueira & Carneiro, 2008)

Os alvéolos são as regiões onde de fato ocorrem as trocas gasosas entre o sangue e a atmosfera. Eles são estruturas semelhantes a pequenas bolsas cujas paredes são formadas por um epitélio fino que se apóia num delicado tecido conjuntivo, onde está presente uma rica rede de capilares sanguíneos (Junqueira & Carneiro, 2008). É esse contato entre a fina camada mesenquimal dos capilares e o interstício interalveolar que permite difusão dos gases entre as paredes alveolar e capilar (membrana alveolocapilar) (Junqueira & Carneiro, 2008; Tortora, 2000).

Por possuir uma superfície muito grande e constantemente exposta a microrganismos ou partículas capazes de causar lesões no tecido, o sistema respiratório

necessita de um elaborado sistema de defesa. Parte dessa proteção tecidual é realizada por barreiras mecânicas, compostas pela própria estrutura segmentada dos pulmões, filtração aerodinâmica e transporte muco-ciliar, compondo, assim, o primeiro mecanismo de defesa do aparelho respiratório (Lopes *et al.*, 2010). Ele inicia-se nas narinas, onde através dos cílios e do turbilhonamento aéreo dificultam a passagem de microrganismos, seguidos do fechamento da glote. Em seguida, podemos citar a filtração aerodinâmica, mecanismo que está relacionado com as dimensões das partículas para sua deposição na camada mucosa. Cerca de 90% das partículas maiores que 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro ficam retidas em algum ponto ao longo da traqueia ou brônquios de grosso calibre e são eliminadas pelos reflexos de tosse e espirro. O revestimento dessas regiões é composto por um epitélio colunar com células ciliadas, células caliciformes produtoras de muco, células de Club, secretoras de surfactante, todas dispostas de maneira muito próxima umas das outras na sua superfície apical, formando uma barreira regulada e impermeável, constituindo o aparelho muco-ciliar, cuja função é direcionar o muco produzido no local, juntamente com as partículas retidas, em direção à orofaringe por meio de um movimento ritmado desses cílios microscópicos (Lopes *et al.*, 2010; Lloyd & Marsland, 2017). Além disso, vários compostos antimicrobianos estão presentes na região da mucosa, incluindo proteínas surfactantes (colectinas), uma proteína que se liga ao lipopolissacrídeo bacteriano (LPS) chamada LBP, componentes do sistema complemento e peptídeos antimicrobianos (Iwasaki *et al.*, 2017). Muitos desses componentes são capazes de interagir com o SI.

Juntamente com as barreiras mecânicas e as moléculas citadas, atuam as células do SI residentes neste órgão: macrófagos, células dendríticas e células linfóides residentes (Cheng *et al.*, 2017; Lloyd & Marsland, 2017; Richards, 2017).

## II. Resposta Imunológica nos pulmões

Historicamente, imunidade significava proteção contra doenças infecciosas, sendo as células e moléculas responsáveis pela imunidade chamadas de sistema imunológico (ou sistema imune) e os processos decorrentes da ativação dessas células e da atuação dessas moléculas após exposição à substâncias não próprias é chamada de resposta imunológica (ou resposta imune) (RI) (Abbas, *et al.*, 2019). Atualmente, em uma visão mais ampla que a descrita originalmente, considera-se que o papel do SI é a manutenção da homeostase e, por consequência, defender o organismo de agentes que possuem o potencial para causar danos (Müller *et al.*, 1999).

O SR possui uma grande superfície que está em contato direto com o ambiente externo. Por estar constantemente exposto a uma grande variedade de partículas e/ou substâncias capazes de gerar danos ao tecido, as células do SI residentes devem estar aptas a diferenciá-las entre potenciais causadores de danos ou inofensivas (Nürnberg, T. *et al.* 2004; Cruvinel *et al.*, 2010; Miyagi *et al.*, 2011; Holgate, 2012; Ebener *et al.*, 2016). Da mesma maneira que o SR é dividido em vias aéreas superiores e inferiores, esta com suas porções condutoras cobertas por tecido mucoso e sendo a parte funcional do órgão formado pelo parênquima pulmonar. Assim como são encontradas diferenças funcionais e teciduais na porção inferior das vias aéreas, encontramos populações de células do SR distintas em cada uma dessas regiões (Holt *et al.*, 2008; Lloyd & Marsland, 2017; Stumbles *et al.*, 2003).

Nas mucosas das vias aéreas condutoras existem células secretoras que estão entremeadas por uma rede integrada de células dendríticas (DCs) capazes de capturar antígenos diretamente do lúmen das vias aéreas mesmo com o epitélio intacto (Holt *et al.*, 2008). Nessa região do SR, encontram-se duas populações distintas: DCs mielóides e DCs plasmocitóides. Estas são potentes produtoras de interferons do tipo 1, particularmente em

respostas anti-virais, mas também têm um importante papel na ativação de células T regulatórias (Treg) e na tolerância a antígenos inalados. As DCs mielóides são a população predominante nas mucosas localizadas na camada epitelial e são os seus dendritos que podem penetrar entre as células epiteliais das vias aéreas (Holt *et al.*, 2008; Lloyd & Marsland, 2017). Elas são especializadas na vigilância imunológica do local por meio da internalização de antígenos, entretanto não são capazes de apresentá-los eficientemente aos linfócitos T até sua migração para os linfonodos de drenagem (Holt *et al.*, 2008; Stumbles *et al.*, 2003).

Nos alvéolos, a população celular responsável pela RI é composta quase inteiramente por macrófagos alveolares, encontrados sobre o parênquima pulmonar. Essas células são a primeira linha de defesa contra os antígenos que chegam à porção alveolar. Além disso, elas têm papel central na manutenção da homeostase pulmonar por meio da sua interação com outras células residentes, principalmente com as células epiteliais alveolares (CEAs) (Lloyde & Marsland, 2017). No estado de repouso, sua principal função é o sequestro de antígenos por meio de fagocitose para diminuir o seu reconhecimento por outras células, diminuindo a chance do desenvolvimento de resposta imunes específicas. Os macrófagos alveolares não migram para os linfonodos de drenagem e possuem baixa capacidade de apresentação antigênica, além de suprimir ativamente a resposta adaptativa por meio da supressão da atividade das DCs e da indução da produção de  $\alpha_v\beta_6$  integrina nas CEAs, dependente de fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Holt *et al.*, 2008; Stumbles *et al.*, 2003). Embora em estado de repouso eles produzam pequenas quantidades de citocinas pro-inflamatórias, os macrófagos alveolares conservam a sua capacidade de ativação tanto por mecanismos extrínsecos como por mecanismos intrínsecos. Quando ativados, são capazes de produzir uma grande variedade de agentes anti-microbianos, incluindo espécies reativas de oxigênio, lisozimas, peptídeos antimicrobianos e proteases, além de serem capazes de

fagocitar e eliminar patógenos e produzir mediadores inflamatórios. Essas células são aptas a reconhecer padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e de iniciar um processo inflamatório, com produção de diversos mediadores e recrutamento de células para o local de inflamação (Nürnberg, T. *et al.* 2004; Cruvinel *et al.*, 2010; Miyagi *et al.*, 2011; Holgate, 2012; Ebener *et al.*, 2016).

Apesar de se encontrar majoritariamente macrófagos no espaço alveolar, outras células do SI podem ser encontradas no tecido pulmonar entre as células epiteliais, no interstício (inflamado ou em repouso). Neste local também estão presentes células dendríticas (DCs), células T, células linfóides da imunidade inata (ILCs) e linfócitos B que costumam estar organizados em folículos denominados tecido linfóide indutível associado aos brônquios (iBALT), além de alguns neutrófilos, todos capazes de responder aos estímulos aos quais o tecido pulmonar está constantemente exposto, contribuindo para o processo de RI e defesa do órgão (Cheng *et al.*, 2017; Lloyd & Marsland, 2017; Richards, 2017)

Linfócitos migram para o tecido pulmonar devido à secreção de quimiocinas produzidas pelas células residentes, após a apresentação antigênica. Entretanto, uma população de células T de memória permanece no tecido pulmonar, tornando-se células T de memória residentes. Essas células sozinhas são capazes de iniciar uma resposta inflamatória, formando um importante componente da barreira imunológica, promovendo uma resposta rápida e protetora durante o reencontro com antígenos (Lloyd & Marsland, 2017;). Além das células T de memória residentes, células Treg e ILCs estão presentes no interstício pulmonar trabalhando coletivamente com as células dendríticas, assegurando uma ativação eficiente tanto da imunidade inata como das respostas imunes adaptativas (Cheng *et al.*, 2017; Lloyd & Marsland, 2017).

As células Treg residentes nos pulmões são de fundamental importância para a manutenção da tolerância às partículas inaladas e sua depleção facilita respostas alérgicas. Elas estão presentes no tecido desde o nascimento e seu fenótipo é determinado pelas interações com a microbiota, macrófagos alveolares e células T (Lloyd & Marsland, 2017).

Por último, as ILCs constituem diversos fenótipos celulares, classificados como ILC1s, ILC2s e ILC3s, de acordo com as citocinas que produzem. Os marcadores que definem a linhagem usual dos linfócitos estão ausentes nessas células, principalmente os receptores antígeno-específicos e, portanto, as ILCs não são capazes de mediar respostas antígeno-específicas (Cheng *et al.*, 2017; Lloyd & Marsland, 2017). Elas estão distribuídas tanto em tecidos não linfóides como em tecidos linfóides, mas seu número é maior nas mucosas, participando tanto das respostas inflamatórias como da cicatrização. São células capazes de ser ativadas diretamente, com plasticidade entre os fenótipos e que são residentes. No pulmão, as ILCs estão localizadas no parênquima (Cheng *et al.*, 2017; Lloyd & Marsland, 2017; Richards, 2017).

Ocasionalmente, após a lesão tecidual e do processo inflamatório que a segue, verifica-se a destruição das unidades funcionais do parênquima pulmonar, compostas pelos alvéolos e pelo interstício pulmonar representado pelos septos alveolares, que compõem a unidade funcional desse órgão. Com essa destruição, inicia-se o processo de reparação do tecido lesado. Este mecanismo permite a substituição ordenada das células danificadas ou mortas em decorrência da reação inflamatória.

### **III.Fibrose pulmonar**

A FP pode resultar de uma série de agressões teciduais ou doenças intersticiais pulmonares (Zhang & Phan, 1996), cuja formação possui uma forte correlação com pneumoconioses, infecções, doenças auto-imunes e pneumonias de hipersensibilidade induzidas por drogas, agentes infecciosos, poeiras orgânicas, dentre outras (Brummer *et al.*, 1993; Wilson & Wynn, 2009). Quando o processo de destruição do tecido decorrente da resposta a agentes patogênicos ocorre em taxa superior àquela da substituição, o organismo não mais empregará os mecanismos regenerativos e sim os reparativos, desenvolvendo uma cicatriz fibrótica permanente, caracterizada pelo acúmulo de tecido fibroso no local da lesão que a depender da extensão do parênquima lesado, pode levar a uma importante limitação funcional do pulmão.

A FP tem como característica a progressiva e irreversível destruição da arquitetura do órgão, causada pelo depósito da matriz de colágeno. Esta deposição ocorre durante a cicatrização e pode levar a barreira alveolar a perder a capacidade de proceder às trocas gasosas, fundamentais para manter as necessidades de oxigenação dos tecidos, levando à morte do indivíduo por insuficiência respiratória. É uma doença refratária aos tratamentos atuais e que, apesar de sua baixa incidência, possui altas taxas de morbidade e de mortalidade em todo o mundo (Cottin, *et al.*, 2017; Fulton & Ryerson, 2015; Meltzer *et al.*, 2014; Mooney *et al.*, 2017; Wynn, 2011;). A maioria dos pacientes, por ocasião do diagnóstico, cursaram a fase inicial da doença de forma assintomática. Nesse estágio do dano tecidual, as células epiteliais e endoteliais liberam mediadores inflamatórios, com ativação da cascata antifibrinolítica-coagulativa, conseqüente formação de coágulo e desenvolvimento de uma matriz extracelular (MEC) provisória (du Bois & Wells, 2001; Wilson & Wynn, 2009). Nessa fase as alterações vasculares, como vasocongestão inicial seguida de proliferação de vasos da

microcirculação, têm como finalidade aumentar o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, promovendo influxo de leucócitos mono e polimorfonucleares para a área alterada, recrutados por agentes indutores da FP. Dentre os fenômenos observados, verifica-se, ainda, agregação plaquetária e sua desgranulação.

A participação de células inflamatórias que migraram para este local promoverá produção e liberação de várias citocinas e quimiocinas, cuja atuação resultará na ampliação da resposta inflamatória de caráter destrutivo (du Bois & Wells, 2001). Verifica-se ainda, recrutamento, ativação e proliferação de fibroblastos, produtores primordiais de MEC.

Fibroblastos são recrutados de uma variedade de fontes que incluem fibrócitos (derivados de progenitores da medula óssea), monócitos, células tronco mesenquimais residentes nos pulmões ou, ainda, via um processo chamado de transição epitélio-mesenquimal, onde células epiteliais se diferenciam em células semelhantes a fibroblastos (Bucala *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 2004; Sou *et al.*, 2019; Kuwana *et al.*, 2003; Postlethwaite *et al.*, 2004; Willis *et al.*, 2005).

As manifestações clínicas da FP são proporcionais à extensão da área acometida pelo depósito de colágeno. O diagnóstico é geralmente considerado a partir dos sintomas apresentados, em associação com possível exposição a agentes potencialmente causadores. Os exames de imagem são importantes e devem associar-se a provas de função pulmonar, que avaliam a gravidade e extensão da fibrose. Havendo dúvida quanto ao diagnóstico, a biópsia de fragmento pulmonar deverá ser realizada. Com isto pode-se estabelecer o diagnóstico, avaliar a extensão da área fibrótica e caracterizar as condições morfofuncionais que irão fundamentar um protocolo de acompanhamento clínico do paciente.



A FPI é uma forma particularmente severa de FP (Wynn, 2011). Ela é definida como uma forma específica de pneumonia intersticial crônica e fibrótica de etiologia desconhecida, que ocorre preferencialmente em adultos mais velhos e é limitada aos pulmões (Raghu *et al.*, 2011). Embora sua origem seja desconhecida, diversos fatores de risco, tais como tabagismo, infecções virais crônicas, refluxo gastroesofágico e algumas predisposições genéticas, já foram descritos como fatores predisponentes (Baumgartner *et al.* 1997; Desai *et al.*, 2018; Enomoto *et al.*, 2003; Hodgson *et al.*, 2002; Raghu *et al.*, 2006). Pouco se sabe sobre os mecanismos que levam ao processo fibrótico, uma vez que não se costuma observar uma inflamação proeminente nos primeiros estágios da PIU, porém verifica-se uma perda excessiva de CEAs por apoptose, que aparenta ser uma característica dessa doença (Aiello, *et al.*, 2017; Allen & Spiteri, 2002). Além disso, os mecanismos de regulação dos fibroblastos, que são normais durante o processo de cicatrização, parecem estar alterados e um grande número de células com morfologia semelhante aos fibroblastos, que são produtoras de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), com propriedades contráteis similares às das células da musculatura lisa, os miofibroblastos, estão presentes em agregados subepiteliais (Allen & Spiteri, 2002; Glaudie *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 1994).

Apesar de não ser uma doença comum, estudos mostram uma incidência e prevalência variando entre 2 e 42,7 para cada 100000 pessoas, dependendo da faixa etária estudada, região em que o estudo foi feito e do modelo do banco de dados utilizado nos estudos (Harari, *et al.*, 2016; Harari *et al.*, 2017; Hopkins, *et al.*, 2016; Jo *et al.*, 2017; Ley & Collard, 2013). A média de sobrevida dos pacientes após o diagnóstico é de 2 a 3 anos; entretanto sua história natural é variável e imprevisível, com a maioria dos indivíduos acometidos mostrando uma piora gradual, enquanto alguns se mantêm estáveis e outros apresentam rápido declínio (du Bois & Wells, 2001; Raghu *et al.*, 2015; Suzuki & Kondoh,

2017). Além disso, os pacientes com FPI frequentemente apresentam várias comorbidades, principalmente infecções pulmonares, além de hipertensão pulmonar, câncer de pulmão, doença cardiovascular e apnéia obstrutiva do sono, dentre outras (Raghu *et al.*, 2015; Fulton & Ryerson, 2015; Suzuki & Kondoh, 2017). Essas comorbidades podem associar-se a um maior risco de exacerbações agudas, entretanto o seu impacto na mortalidade ainda é discutido (Jo *et al.*, 2017; Suzuki & Kondoh, 2017).

Muitos estudos incluíam diversas formas de pneumonias intersticiais sob o termo FPI (du Bois & Wells, 2001; Gross & Hunninghake, 2001; Ley & Collard, 2013), porém no ano 2000 foi publicado o *International Consensus Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment* onde foram definidos diversos parâmetros para diagnóstico dessa doença. Ela foi definida como uma forma específica de pneumonia fibrosítica intersticial limitada ao pulmão e associada a um padrão histológico de PIU, caracterizado pela coexistência de fibrose e inflamação intersticial, com o progressivo desarranjo da arquitetura distal do parênquima pulmonar e formação de grandes espaços císticos de ar alinhados ao epitélio bronquiolar, chamado faveolamento (aparentando uma colmeia), que podem ser observados em biópsia ou em tomografias, com opacidades reticulares de predomínio periférico e basal, associado ao faveolamento, estando presentes ou não bronquiolectasias de tração (Torres *et al.*, 2017). O grau de inflamação ou de tecido fibrótico pode variar e a ausência de causas conhecidas, tais como toxicidade de drogas ou exposições ambientais, além de outros parâmetros patológicos que excluem as demais pneumonias intersticiais, formam o diagnóstico da FPI. Atualmente, o diagnóstico é dado a partir da constatação da presença do padrão da PIU por meio de tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) (quando os pacientes não foram submetidos à biópsia do pulmão) ou da combinação de padrões específicos observados na TCAR e na biópsia de pulmão de pacientes submetidos

à esse processo cirúrgico (Raghu *et al.*, 2015). As variações patológicas que caracterizam essa doença são distinguidas pela variação no local e idade das lesões fibróticas, com uma predileção pelo parênquima periférico subpleural. As características da PIU se somam à presença, nos exames histológicos, de focos de alta proliferação de células do tipo fibroblastos em locais de recente dano alveolar, sendo esta a principal característica da FPI (Gross & Hunninghake, 2001).

A resposta inflamatória está associada aos estágios iniciais da FPI e o fator nuclear kappa B (NFκB) é um dos fatores de transcrição com papel central na regulação de muitos genes responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas (Inayama *et al.*, 2006; Wilson and Wym, 2009; Hou *et al.*, 2018). Danos causados no tecido pulmonar induzem migração celular que corrobora com uma resposta inflamatória com altos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina 1β (IL-1β) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses mediadores inflamatórios podem induzir a apoptose de CEAs, crescimento de fibroblastos, aumento da produção de colágeno e produções de fatores de crescimento (Raines *et al.*, 1989; Vilček *et al.*, 1989; Duncan & Berman, 1989; Tashiro *et al.*, 2017). Essa resposta inflamatória pode levar à apoptose e eferocitose de diversos tipos celulares, além da produção de fatores de crescimento como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e TGF-β e outras citocinas relacionadas com o perfil pró-fibrótico e ao fenótipo M2 de macrófagos (Prasse *et al.*, 2006; Desai *et al.*, 2018).

TGF-β é uma citocina pró-fibrótica com papel importante para o desenvolvimento da doença, que pode ser ativada pela interleucina 13 (IL-13), que por sua vez também é capaz de induzir a apoptose de CEAs e, juntamente com TNF-α, induz a alteração do perfil de fibroblastos para miofibroblastos. Estas são células que expressam altos níveis de α-SMA e óxido nítrico (NO), juntamente com muitos fatores de crescimento, colágeno e

metaloproteinases que, em conjunto, formam um fenótipo secretório pró-fibrótico que é típico da fibrogênese crônica da FPI, caracterizada pelo dano epitelial e presença de agregados sub-epiteliais de fibroblastos ou foci de miofibroblastos (Powell *et al.*, 1999; Allen & Spiteri, 2002; Willis *et al.* 2005; Gauldie *et al.*, 2006; Grabarz *et al.*, 2018).

#### **IV. Abordagens terapêuticas para a FPI**

As propostas terapêuticas mais atuais incluem a utilização de duas drogas antifibróticas que recentemente tiveram seu uso aprovado em diversos países: Nintedanib e Pirfenidona. Essas drogas, embora haja muitas críticas em relação ao seu uso, mudar a perspectiva da terapia dos pacientes com FPI, prolongando sua sobrevivência.

O Nintedanib foi desenvolvido durante um projeto iniciado em 1998 pela farmacêutica Boehringer Ingelheim que tinha como intuito desenvolver inibidores da angiogênese para tratamento de câncer que tivessem perfil de inibidor seletivo do fator de crescimento do endotélio vascular 2 (VEGFR-2) (Roth *et al.*, 2015). O Nintedanib se mostrou capaz de inibir a ativação VEGF/VEGFR com a inibição simultânea do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e de PDGF, mostrando atividade anti tumoral e antifibrótica (Hilberg *et al.*, 2008). Mesmo que os mecanismos que levam ao desenvolvimento da FPI não estejam completamente elucidados, receptores tirosina-quinase (RKT) que são inibidos pelo nintedanib como FGFR-1, FGFR-2, PDGFR, e VEGFR são expressos em uma ampla variedade de células e o reconhecimento dos seus agonistas e a subsequente ativação da cascata de sinalização estão associados ao desenvolvimento da doença (Roth *et al.*, 2015). Essa droga atua ocupando a região intracelular desses onde o ATP se liga para iniciar a cascata de sinalização da via e, dessa maneira, regula a expressão de colágeno (Wollin *et al.*, 2015; Knüppel *et al.*, 2017). Além disso, o Nintedanib possui uma atividade anti-inflamatória

demonstrada pela redução da contagem de neutrófilos e linfócitos no BALF de modelos experimentais em conjunto com a redução de IL-1 $\beta$  no interstício desses animais (Wollin *et al.*, 2014).

A Pirfenidona é um segundo anti-fibrótico aprovado para o uso na FPI. Ela foi descoberta por Solomon B Margolin da Marnac, Inc. (TX, USA) em 1974, chamando a atenção pela sua atividade antiinflamatória sem inibição da ciclooxigenase (Azuma, 2010). Embora seu mecanismo de ação não seja totalmente compreendido, sua capacidade anti-fibrótica foi verificada em modelos animais de FPI, em parte, devido a sua capacidade de reduzir os níveis de TGF- $\beta$ , manter os níveis de IFN- $\gamma$  no tecido, controlar o aumento dos níveis de FGF e PDGF nos pulmões, suprimir IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2 e TNF- $\alpha$  juntamente com o edema pulmonar causado por BLM e a regulação negativa da expressão desses fatores pró-fibróticos (Gurujeyalakshmi *et al.*, 1999; Oku *et al.*, 2008; Betensley, *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2017). É interessante observar que, embora seja recente a reavaliação da importância da RI no desenvolvimento da FPI, um dos medicamentos anti-fibróticos no mercado tem ação imunomodulatória, com a regulação fatores que direta ou indiretamente atuam no processo da fibrogênese da doença. Além disso, a regulação dos fatores mencionados acima pela Pirfenidona explica a regulação da expressão de colágeno no tecido pulmonar de pacientes com FPI e apresenta fibras mais finas e em menor quantidade, além da inibição da formação de fibrilas na MEC (Knüppel *et al.*, 2017).

Associado aos tratamentos farmacológicos para a fibrose, são recomendados exercícios respiratórios que auxiliem na ventilação alveolar, contribuindo para uma melhor oxigenação sanguínea (re-habilitação pulmonar) através da expansão pulmonar que aumenta a área de trocas gasosas, além de alimentação adequada. Essa abordagem terapêutica tem por finalidade melhorar os transtornos ventilatórios causados pela doença e retardar o

estabelecimento de fibroses extensas no parênquima, sem vislumbrar um caráter curativo, nem ter alta eficiência na manutenção da qualidade de vida dos pacientes (Aiello *et al.*, 2017; Borie *et al.*, 2016; Collard, 2017; Hopkins *et al.*, 2016; Raghu *et al.*, 2015; Sköld *et al.*, 2017). Em relação às comorbidades, a indicação de tratamentos é avaliada caso a caso, sem um protocolo específico para cada uma (Borie *et al.*, 2016; Sköld *et al.*, 2017). Em situações extremas, o transplante pulmonar poderá ser indicado, porém mesmo com um transplante de sucesso, poucos pacientes alcançam 10 anos ou mais de sobrevida (Aiello *et al.*, 2017; Jatene *et al.*, 2009; Sköld *et al.*, 2017).

A terapêutica atualmente recomendada para indivíduos com FPI é, portanto, ainda pouco eficiente. Embora Nintedanib e a Pirfenidona tenham trazido uma nova perspectiva para o tratamento dessa doença, desde a aprovação do seu uso houve uma série de desapontamentos nos testes clínicos desses medicamentos em pacientes com FPI (Collard, 2017). Dessa forma, mesmo com esses recentes recursos terapêuticos, ainda há necessidade de hospitalizações frequentes dos pacientes, decorrentes tanto da piora gradual quanto das exacerbações agudas. Os custos gerados por essas internações para o sistema de saúde são muito elevados. Nos Estados Unidos, um desses pacientes, não transplantado, hospitalizado devido a dificuldades respiratórias representa um custo médio de 16000 dólares por internação, isto quando não há necessidade de utilização de ventilação mecânica, enquanto que na Europa o custo médio por estadia de cada paciente é de 6203 euros (Cottin, *et al.*, 2017; Mooney *et al.*, 2017). Além do alto custo dos pacientes por hospitalização, há uma alta taxa de mortalidade dentre os pacientes que dão entrada nos hospitais devido à FPI (Cottin, *et al.*, 2017; Hopkins *et al.*, 2016; Mooney *et al.*, 2017).

Assim, é necessário o entendimento da fisiopatologia e da regulação dos genes que levam ao processo de formação do padrão fibrótico na FPI, propiciando o

desenvolvimento de novas opções de tratamento que melhorem desfechos significativos para esses pacientes, tais como as baixas sobrevida e qualidade de vida, além da redução das recorrentes hospitalizações.

## V. Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas efetoras importantes da imunidade inata, envolvidas na defesa do organismo (Mookherjee & Hancock, 2007, Choi *et al.*, 2012). Eles são encontrados em todos os organismos pluricelulares, desde os clados mais basais até os mais derivados e atuam como são moléculas efetoras importantes da imunidade inata, envolvidas na defesa do organismo, uma vez que a sua ausência aumenta a suscetibilidade a infecções, enquanto a sua super expressão ou a introdução de PAMs exógenos confere proteção contra doenças (Mookherjee, N. *et al.* 2007).

Devido a ação antimicrobiana dos primeiros peptídeos isolados, as estruturas peptídicas catiônicas pequenas (de 12 a 50 resíduos de aminoácidos (aa)), que possuem características anfipáticas (até 50% dos aa com propriedades hidrofóbicas), ficaram conhecidas como peptídeos antimicrobianos (Steiner, H. *et al.* 1981; Hirsch, T. *et al.* 2008). Essas moléculas formam uma família de peptídeos cujas propriedades de matar microrganismos, ou impedir seu crescimento por meio de interações com suas biomembranas, são únicas características em comum desses peptídeos (Mookherjee & Hancock, 2007; Lai & Gallo, 2009).

Atualmente, além da atividade microbicida, é sabido que os PAMs possuem amplo espectro de ação, incluindo as atividades imunomodulatória e antitumoral (Sørensen *et al.*, 2008; Auvynet & Rosenstein, 2009; Steinstraesser *et al.* 2012; Ortiz *et al.*, 2014; Hancock

*et al.*, 2016; Hilchie *et al.*, 2016). De fato, alguns desses exercem sua função de proteção ao hospedeiro por mecanismos de atividade indireta contra os patógenos, criando um balanço no crescimento microbiano, estimulando a secreção de mediadores inflamatórios sendo capazes de atenuar as respostas inflamatórias quando estão exacerbadas. Para exemplificar as possibilidades de atuação dos AMPs, as duas famílias de AMPs de que se tem maior conhecimento da atividade protetora do hospedeiro, as das defensinas e as catalecidinas (Zanetti, 2004; Auvynet *et al.*, 2009; McMahon *et al.*, 2011). Membros dessas duas famílias estão relacionados com a atividade antimicrobiana de fagócitos, com a produção de mediadores pró-inflamatórios e com a regulação de secreções epiteliais (Befus *et al.*, 1999; Ganz, 2003; Zanetti, 2004; Niyonsaba *et al.*, 2007).

Peptídeos com propriedades semelhantes aos PAMs de mamíferos já foram encontrados em glândulas de veneno de uma grande variedade de espécies. Alguns desses peptídeos foram encontrados em glândulas de peçonha de escorpiões e possuem capacidade de modular a resposta inflamatória regulando a expressão de citocinas e outros mediadores da inflamação (Fialho *et al.*, 2011; Zoccal *et al.*, 2011; Zoccal *et al.*, 2013; Ortiz *et al.*, 2014).

## **VI.Objetivo**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a progressão da FP em modelo experimental, correlacioná-la com eventos da resposta imune que contribuem com o processo de fibrogênese e identificar os genes cujos produtos participem dos mecanismos de modulação do dano pulmonar, decorrente do progressivo depósito de matriz de colágeno que acarreta a perda funcional progressiva. A partir desses achados, pretendeu-se propor alternativas terapêuticas capazes de reduzir e/ou inibir o estabelecimento da FP.



Para isso, foram desenvolvidas as seguintes metas:

1. Induzir a formação de fibrose por bleomicina (BLM) em modelo experimental murino utilizando camundongos BALB/c e caracterizá-lo.
2. Desenvolver um tratamento para a FP nesse modelo murino, utilizando os peptídeos imunomoduladores ToAP3 e ToAP4, de *Tityus obscurus*, avaliando a função respiratória e alterações teciduais desses animais.
3. Analisar as alterações de acúmulo de mRNA de fatores relacionados à fibrose pulmonar no tecido pulmonar dos animais com FP induzida por BLM, tratados ou não com os peptídeos imunomoduladores.

**CAPÍTULO 2: MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROSE PULMONAR  
IDIOPÁTICA**

## I. Contextualização do modelo

Como descrito anteriormente, a FPI é uma doença que cursa com alta morbidade e mortalidade e é pouco compreendida em relação aos seus mecanismos patogênicos, além de possuir poucas opções de terapias farmacológicas. É caracterizada pelo contínuo depósito de colágeno no tecido pulmonar, que é causador da alteração da arquitetura tecidual, gerando severas consequências na capacidade respiratória. Para maior compreensão dessa entidade nosológica, diversos modelos animais já foram desenvolvidos. O principal modelo na atualidade é o que utiliza camundongos C57BL/6 tratados intratraquealmente com BLM (Tashiro *et al.* 2017). Esse modelo é de baixo custo e de alta reprodutibilidade. Entretanto, esses animais desenvolvem apenas um processo inflamatório agudo e intenso seguido de um processo fibrótico pouco persistente, que tende à cura espontânea em até 30 dias (Ruscitti *et al.* 2018), fazendo com que estudos pré-clínicos de alternativas farmacológicas sejam imprecisos. Neste projeto, iniciamos com o estabelecimento de um novo modelo animal para o estudo da FP em estágios tardios de desenvolvimento, pela instilação IT de BLM em camundongos BALB/c.

Os camundongos BALB/c são considerados pela literatura como resistentes à FP, entretanto dados anteriores do grupo do LIA/UnB mostraram formação de fibrose em pulmões de camundongos BALB/c após infecção com microrganismos em tempos tardios de evolução da doença (Phan *et al.*, 1992; Ribeiro *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2013; Bocca *et al.*, 2013; Tashiro *et al.*, 2017). Dessa maneira, foi revista a formação de FP nesses camundongos, após instilação IT de BLM, uma vez que acreditava-se que eles desenvolveriam FP após tratamento com BLM, porém com a doença cursando um período mais longo para o seu estabelecimento.

## II. Material e Métodos

Para contribuir com a elucidação dos mecanismos de desenvolvimento da FPI, foi adotado um modelo experimental no qual a doença tivesse uma progressão mais prolongada que no modelo com camundongos C57BL/6, o que facilitaria análises posteriores de terapia farmacológica para a doença. Com este fim, usamos camundongos BALB/c de ambos os sexos tratados com BLM intratraqueal e avaliamos o desenvolvimento da FP fazendo o acompanhamento desses animais quanto à manutenção de sua massa corporal e sobrevida. O desenvolvimento da fibrose foi acompanhado por imagens de tomografia e avaliação da função respiratória. Os grupos de animais foram eutanasiados em diferentes tempos, determinando-se o desenvolvimento da FP por análise histopatológica.

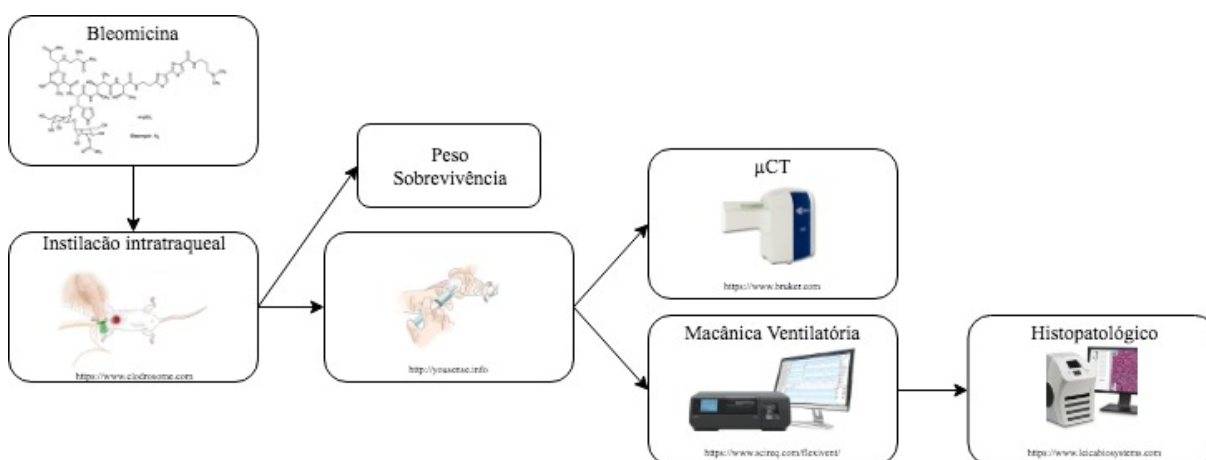


Figura 2.1 Diagrama do desenho experimental do modelo murino de FPI utilizando camundongos BALB/c

### 1. Camundongos

Os animais utilizados para o modelo de FP foram camundongos (*Mus musculus*) da linhagem BALB/c. No total foram utilizados 100 animais machos e fêmeas, com idade de 8 a 12 semanas. Todos foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, com água e comida *ad libitum*.

Para os ensaios, os camundongos foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB), documento de autorização UnBDoC nº 100166/2014. (Anexo 1).

## **2. Instilação intratraqueal**

Os camundongos foram sedados e anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina, utilizadas nas concentrações 15 mL/kg e 0,1 mL/kg, respectivamente, por via intramuscular (IM). Após esse procedimento, esses animais receberam tratamento único com 50 µl de BLM a 5 U/ml por via intratraqueal (IT).

## **3. Avaliação histopatológica.**

Para a avaliação histopatológica, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e, na sequência, fragmentos dos pulmões foram armazenados em solução de formol a 10% em tampão salino para fixação e posterior inclusão em parafina. Uma parte do material foi cortado na espessura de 5 µm, montado em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina ou usando o método do tricrômio de Masson.

Para a imunohistoquímica (IHQ), a marcação foi realizada com anticorpos anti colágeno I (*Collagen I alpha 1*, Novos Biologicals), anti colágeno II (*Collagen II*, Novos Biologicals), anti colágeno III (*Collagen III alpha 1/COL3A1*, Novus Biologicals) e anti colágeno IV (*Collagen IV alpha 1*, Novus Biologicals). O material já incluído em parafina foi cortado na espessura de 3 µm e armazenado por 24h em estufa a 60°C para desparafinização. A recuperação de antígeno foi realizada embebendo as cubas com o material cortado e desparafinizado com Trilogy™ (Cell Marque) em banho maria a 97° C por 30 min duas vezes,

com intervalo de 10 min entre os banhos, em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi lavado em água deionizada por 5 min. O bloqueio da peroxidase endógena, o anticorpo secundário, estreptavidina, revelação do cromógeno e contra coloração, todos foram realizados utilizando o kit Novocastra - Peroxidase Detection Systems (Ready-to-Use) (Leika Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. (Referência)

As imagens das lâminas foram adquiridas e analisadas utilizando o *scanner* de laminas Aperio CS2 (Leika Biosystems). Todas as fotografias foram tiradas utilizando-se o software ImageScope 12.3.3 e as quantificações foram realizadas por meio do algoritmo de contagem positiva de pixels, utilizando-se o mesmo software, com os parâmetros especificados no Anexo II para a obtenção das grandezas da intensidade total positiva (IP) e da intensidade fortemente positiva (ISP) para marcações.

#### **4. Curva de sobrevida e curva de peso**

Os animais foram observados diariamente para determinação da curva de sobrevida após o tratamento e pesados a cada 5 dias com auxílio de uma balança Pesola® com capacidade de até 30 g, para acompanhamento da perda de peso, que foi utilizada como um parâmetro de piora clínica dos animais.

#### **5. Análise por Micro Tomografia Computadorizada**

Imagens de micro tomografia computadorizada ( $\mu$ CT) foram adquiridas usando Albira CT system (PET/SPECT, Albira, Bruker, EUA) (Sánchez, 2013). Antes do tratamento (dia 0) e a cada 5 dias após a instilação de BLM, os camundongos foram sedados e colocados em posição de decúbito dorsal para a aquisição das imagens. Os dados foram obtidos usando *factory calibrated High Res Albira settings* (1000 projections; 70 mm FOV; 45 kVp; 400

mA). As reconstruções das imagens do  $\mu$ CT foram feitas com o *Albira Reconstruction module*, usando a opção padrão (Albira Software Suite, Bruker, EUA).

O programa PMOD (PMOD Technologies LLC) foi usado para a quantificação da densidade pulmonar em unidades de Hounsfield (HU), e a faixa escolhida para a determinação da densidade pulmonar e quantificação de voxels de interesse (VOIs) foi baseada nos parâmetros obtidos a partir do modelo artificial de camundongo XRM-5 X-ray Phantom Mouse (Caliper) (Anexo III).

## 6. Mecânica ventilatória

Após 5, 15 e 30 dias, os animais tratados com BLM foram sedados e anestesiados como descrito anteriormente. Após a realização da traqueostomia com uma cânula de metal de calibre 18, os camundongos foram paralisados com brometo de pancurônio (0.1 mg/kg *i.p.*), acoplados ao ventilador mecânico FlexiVent FX controlado por computador (Scireq, Montreal, Canada) e mecanicamente ventilados em modo de volume controlado, com volume relativo de 8 mL/kg do peso corporal com ar ambiente, com frequência respiratória de 100 sopros/min contra uma pressão positiva de expiração final (PEEP) de 3 cmH<sub>2</sub>O.m. (Rerência).

A resistência, a elastância e a complacência do sistema respiratório (Rrs, Ers e Crs, respectivamente) foram determinadas aplicando um sinal de perturbação de volume uma frequência e volume de montagem, sinais de pressão de abertura de fluxo de ar e de vias aéreas, à equação de motilidade do sistema respiratório (Guttmann *et al.* 1992). A medida da impedância do sistema respiratório (Zrs) foi obtida pela aplicação de oscilações de 13 ondas, com frequências variando de 0,25 a 19,63 Hz, na abertura das vias aéreas e a Zrs foi ajustada no modelo de fase constante para obter estimativas de resistência das vias aéreas (Rn), bem

como o amortecimento tecidual (G) e a elastância do tecido pulmonar (H) (Hantos *et al.*, 1992). Foram aceitos modelos ajustados apenas quando o coeficiente de determinação foi  $> 0.95$ . Dez medidas de Rrs, Ers e Zrs foram realizadas e foi utilizada a média destes valores.

As grandezas medidas têm as seguintes definições:

- Resistência do sistema respiratório (Rrs): é definida como a resistência dinâmica que acessa quantitativamente os níveis de constrição nos pulmões.
- Complacência do sistema respiratório (Crs): é definida como o conjunto de forças que se opõem à distensão na fase inspiratória, sendo, dessa forma, uma relação existente entre a alteração do volume gasoso pulmonar conseqüente a um determinado valor máximo de variação na pressão das vias aéreas. Portanto, descreve a facilidade com a qual o sistema respiratório pode ser distendido. Dessa forma, quanto maior a complacência do sistema respiratório, menor é o conjunto de forças que se opõem à distensão do tecido pulmonar, favorecendo a capacidade de expansão do órgão.
- Elastância do sistema respiratório (Ers): é uma grandeza inversamente proporcional à (Crs). É definida como a resistência de um objeto à deformação por forças estranhas, ou seja, ela captura a rigidez elástica do SR na frequência ventilatória. Dessa forma, quanto maior é a Ers, menor a capacidade respiratória do indivíduo.
- Impedância do sistema respiratório (Zrs): é o efeito combinado da resistência, complacência e inertância como uma função de frequência.
- Resistência newtoniana (Rn): é um parâmetro de modelo de fase constante que representa a resistência das vias aéreas condutoras e centrais.
- Amortecimento tecidual (G): é um parâmetro de modelo de fase constante que está intimamente relacionado com a resistência e reflete a energia de dissipação dos alvéolos.



- Elastância tecidual (H): é um parâmetro de modelo de fase constante que reflete a energia de conservação dos alvéolos.

## 7. Análise estatística

Os ensaios de mecânica ventilatória, percentual de VOIs, foram analisados usando two-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey, e os resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão (SEM) dos resultados mais representativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.0. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0.05$ .

A curva de frequência de VOIs para cada um dos tempos foi calculada por regressão não linear. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.0.

As medidas de densidade pulmonar obtida nas análises das imagens do  $\mu$ CT foram analisadas usando one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey e os resultados expressos como média  $\pm$  SEM dos dados representativos. Essas análises estatísticas também foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.0. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0.05$ .

A curva da massa corporal dos animais foi resultado da análise de regressão linear, também calculada utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.0.

### **III.Resultados e discussão**

#### **1. Análise morfológica dos pulmões dos camundongos tratados com bleomicina**

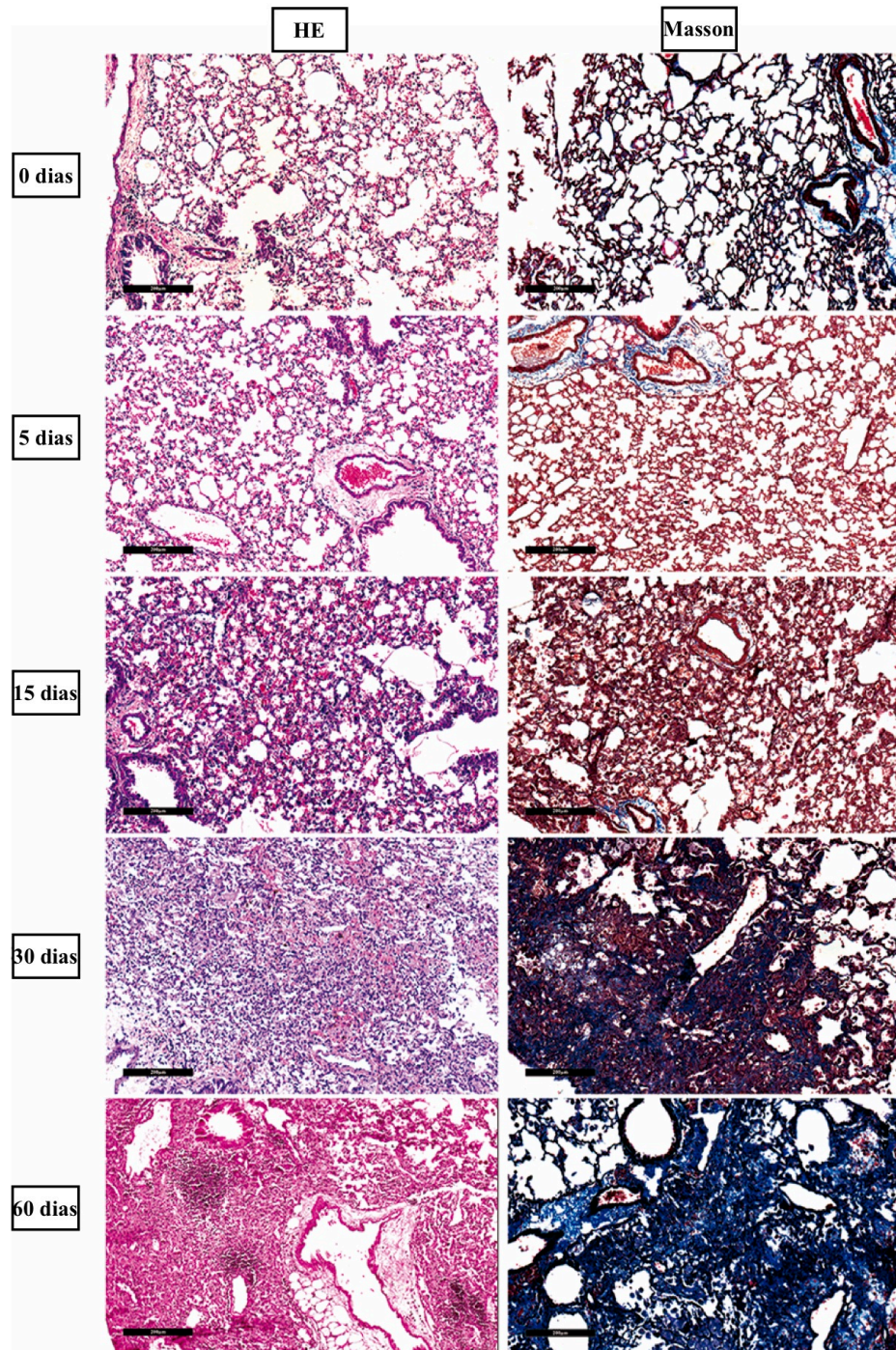
Os fragmentos do tecido pulmonar dos camundongos foram analisados nos dias 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 após o tratamento com BLM (Tabela 2.1), para se estabelecer o período no qual as alterações tecidas foram mais proeminentes. Após os 3 primeiros dias verificou-se espessamento dos septos alveolares com congestão vascular. No 5º dia, somou-se às características já vistas o edema intra-alveolar focal. Com o passar de mais 2 dias (7º dia) o edema intra-alveolar tornou-se difuso. Poucas diferenças puderam ser observadas no 10º dia após o tratamento. Porém, com 15 dias após a instilação IT, foi possível observar fibrose intersticial focal leve, que se manteve pouco alterada até o 25º dia, quando verificou-se focos de alterações adicionais, como fibrose e outras alterações alveolares. Aos 30 dias após a instilação IT foi possível observar a fibrose estabelecida, que se manteve até o 60º dia.

Considerando essas características observadas em todos os tempos testados, constatou-se que as alterações mais características foram nos tempos 5 dias, 15 dias e 30 dias após a instilação com BLM (Figura 2.2). A deposição de colágeno e a alteração da morfologia do tecido pulmonar observada já foi descrita para diversas espécies (como ratos, hamsters, ovelhas, cães, dentre outros) ao longo dos anos (Tashiro *et al.*, 2017). Essas alterações ocorrem como decorrência do dano causado pelo processo inflamatório e seus mediadores, que participam da indução e progressão da FP, que ocorre após o contato do tecido pulmonar com a BLM (Bringardner *et al.*, 2008).

Tabela 2.1: Descrição histopatológica do tecido pulmonar dos animais tratados com bleomicina

Tempo após o Tratamento (dias)	Descrição
0 (não tratados)	<p>Parênquima pulmonar representado por alvéolos com septos finos, nos quais são identificados vasos capilares delimitados por discreto estroma conjuntivo frouxo, onde se verifica a presença de alguns leucócitos mononucleares. Os espaços alveolares são amplos e revestidos internamente por pneumócitos e histiócitos.</p> <p>Verifica-se ainda, a presença de vias aérea de diferentes calibres, desde estruturas com parede constituída por fibromuscular e cartilagem e revestidas internamente por epitélio ciliado de padrão respiratório.</p>
3	<p>Parênquima pulmonar representado por alvéolos com septos discretamente alargados, nos quais são identificados vasos capilares dilatados. Os espaços alveolares são amplos e revestidos internamente por pneumócitos e histiócitos.</p> <p>Verifica-se ainda, a presença de vias aérea de diferentes calibres, desde estruturas com parede constituída por fibromuscular e cartilagem e revestidas internamente por epitélio ciliado de padrão respiratório.</p>
5	<p>Parênquima pulmonar representado por alvéolos com septos discretamente alargados, nos quais são identificados vasos capilares dilatados e com a luz preenchida por hemácias. Verifica-se delimitação por estroma conjuntivo frouxo, com a presença de alguns leucócitos mononucleares. Os espaços alveolares são amplos e revestidos internamente por pneumócitos e histiócitos.</p> <p>Verifica-se ainda, a presença de vias aérea de diferentes calibres, desde estruturas com parede constituída por fibromuscular e cartilagem e revestidas internamente por epitélio ciliado de padrão respiratório.</p>
7	<p>Parênquima pulmonar representado por alvéolos com septos discretamente alargados, nos quais são identificados vasos capilares dilatados e com a luz preenchida por hemácias. Verifica-se delimitação por estroma conjuntivo frouxo, com a presença de alguns leucócitos mononucleares. Os espaços alveolares são amplos e revestidos internamente por pneumócitos e histiócitos e o lumen parcialmente preenchido por líquido róseo aerado.</p> <p>Verifica-se ainda, a presença de vias aérea de diferentes calibres, desde estruturas com parede constituída por fibromuscular e cartilagem e revestidas internamente por epitélio ciliado de padrão respiratório.</p>
10	<p>Parênquima pulmonar representado por alvéolos com septos discretamente alargados, nos quais são identificados vasos capilares dilatados e com a luz preenchida por hemácias. Verifica-se delimitação por estroma conjuntivo frouxo, com a presença de alguns leucócitos mononucleares. Os espaços alveolares são amplos e revestidos internamente por pneumócitos e histiócitos e o lumen parcialmente preenchido por líquido róseo aerado.</p> <p>Verifica-se ainda, a presença de vias aérea de diferentes calibres, desde estruturas com parede constituída por fibromuscular e cartilagem e revestidas internamente por epitélio ciliado de padrão respiratório.</p>
15	<p>Parênquima pulmonar representado por alvéolos com septos alargados, nos quais são identificados vasos capilares dilatados com a luz preenchida por hemácias. Verifica-se delimitação por estroma conjuntivo denso, com a presença de leucócitos mononucleares, fibroblastos e depósito de matriz de colágeno. Os espaços alveolares estão discretamente reduzidos, revestidos internamente por pneumócitos tipo I e II e histiócitos. O lumen encontra-se parcialmente preenchido por colágeno.</p> <p>Verifica-se ainda, a presença de vias aérea de diferentes calibres, desde estruturas com parede constituída por fibromuscular e cartilagem e revestidas internamente por epitélio ciliado de padrão respiratório. Focalmente, nota-se cistificação de vias aéreas de pequeno calibre.</p>

<b>Tempo após o Tratamento (dias)</b>	<b>Descrição</b>
<b>20</b>	<p>Parênquima pulmonar representado por alvéolos com septos alargados, nos quais são identificados vasos capilares dilatados com a luz preenchida por hemácias. Verifica-se delimitação por estroma conjuntivo denso, com a presença de leucócitos mononucleares, fibroblastos e depósito de matriz de colágeno. Os espaços alveolares estão discretamente reduzidos, revestidos internamente por pneumócitos tipo I e II e histiócitos. O lumen encontra-se parcialmente preenchido por colágeno. Nenhuma alteração significativa em relação ao ponto anterior.</p> <p>Verifica-se ainda, a presença de vias aérea de diferentes calibres, desde estruturas com parede constituída por fibromuscular e cartilagem e revestidas internamente por epitélio ciliado de padrão respiratório. Focalmente, nota-se cistificação de vias aéreas de pequeno calibre.</p>
<b>25</b>	<p>Parênquima pulmonar representado por alvéolos com septos alargados, nos quais são identificados vasos capilares dilatados e luz preenchida por hemácias. Verifica-se delimitação por estroma conjuntivo denso, com a presença de leucócitos mononucleares. Os espaços alveolares estão preenchidos por estroma conjuntivo, com fibroblastos, histiócitos e linfócitos. O revestimento interno é constituído por pneumócitos hiperplasiados e hipertrofiados e por histiócitos. Verifica-se poucos focos de alterações características de processo fibrótico, onde o lumen encontra-se preenchido por estroma fibroconjuntivo denso. Verifica-se ainda, a presença de vias aérea de diferentes calibres, desde estruturas com parede constituída por fibromuscular e cartilagem e revestidas internamente por epitélio ciliado de padrão respiratório e com a presença de cistificação das vias aéreas menos calibrosas.</p>
<b>30</b>	<p>Parênquima pulmonar representado por alvéolos com septos alargados, nos quais são identificados vasos capilares dilatados e luz preenchida por hemácias. Verifica-se delimitação por estroma conjuntivo denso, com a presença de leucócitos mononucleares. Os espaços alveolares estão preenchidos por estroma conjuntivo, com fibroblastos, histiócitos e linfócitos. O revestimento interno é constituído por pneumócitos hiperplasiados e hipertrofiados e por histiócitos. O lumen encontra-se preenchido por estroma fibroconjuntivo denso.</p> <p>Verifica-se ainda, a presença de vias aérea de diferentes calibres, desde estruturas com parede constituída por fibromuscular e cartilagem e revestidas internamente por epitélio ciliado de padrão respiratório e com a presença de cistificação das vias aéreas menos calibrosas.</p>
<b>60</b>	<p>Parênquima pulmonar representado por alvéolos com septos alargados, nos quais são identificados vasos capilares dilatados e luz preenchida por hemácias. Verifica-se delimitação por estroma conjuntivo denso. O lumen encontra-se preenchido por estroma fibroconjuntivo denso.</p> <p>Verifica-se ainda, a presença de vias aérea de diferentes calibres, desde estruturas com parede constituída por fibromuscular e cartilagem e revestidas internamente por epitélio ciliado de padrão respiratório e com a presença de cistificação das vias aéreas menos calibrosas.</p>



**Figura 2.2:** Análise histológica dos pulmões dos animais instilados intratraquealmente com BLM. Camundongos BALB/c foram submetidos a instilação IT de BLM (50  $\mu$ L, 5 U/mL) e após 5 dias, 15 dias, 30 dias e 60 dias esses animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> para a coleta de tecido pulmonar para análise histológica. HE e tricrômio de Masson, 1000X. Barra preta equivalente a 200  $\mu$ m. Resultados são representativos de 2 experimentos independentes, cada um com 5 animais por ponto experimental.

Para investigar o tipo de colágeno depositado nos pulmões dos camundongos BALB/c após instilação IT de BLM, foi realizado IHQ dos pulmões dos camundongos. Foram feitas marcações para colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III e colágeno tipo IV e suas respectivas quantificações nas imagens adquiridas para comparação da sua presença na região das lesões.

O colágeno do tipo I é o tipo mais abundante no organismo, sendo amplamente distribuído. Ele forma longas fibras, as fibrilas de colágeno, que formam ossos, tendões, cápsulas de órgãos, derme e tecido conjuntivo, onde é o tipo mais abundante (Junqueira & Carneiro, 2008). Nos pulmões, ele é encontrado numa distribuição irregular nas paredes alveolares, encontrando-se também nas adjacências dos vasos sanguíneos (Raghu *et al.*, 1985). Na FPI, os focos fibroblásticos são ricos nesse tipo de colágeno, sendo encontrados no centro desses focos, juntamente com células positivas para  $\alpha$ -SMA e pró-colágeno I, particularmente em regiões onde os septos alveolares estão alargados, na interface da região central dos miofibroblastos e as estruturas alveolares morfológicamente normais (onde o colágeno do tipo I é menos proeminente). (Lomas *et al.*, 2012; Herrera *et al.*, 2019). Nos resultados da IHQ utilizando anticorpo anti-colágeno I é possível observar crescente deposição de fibras desse tipo de colágeno, à medida em que é observado o alargamento progressivo dos septos alveolares, até o 30º dia após instilação de BLM (Figura 2.3 A e B). Contudo, após 60 dias de tratamento com esse fármaco, a IP decaí, mesmo que nesse tempo tenha sido observada maior ISP nesse momento (Figura 2.3 C). Com dois meses após a instilação da BLM, observa-se, então, regiões com aglomerados de fibras de colágeno I, mas poucas fibras distribuídas no tecido, fora desses aglomerados.

As fibrilas de colágeno do tipo II são encontradas em grande abundância na cartilagem hialina e na cartilagem elástica; suas principais células são os condrócitos



(Junqueira & Carneiro, 2008). Anticorpos anti-colágeno II são encontrados no soro de paciente com FPI, podendo ser um marcador da sua atividade e, em conjunto com os anticorpos para colágeno I, III e IV encontrados no soro dos pacientes, pode ser um dos fatores de auxíliam na perpetuação da doença (Nakos *et al.*, 1993). Os dados apresentados neste trabalho mostram presença de colágeno II nos pulmões dos camundongos tratados com BLM, sendo que a sua deposição tem um aumento gradual até o 30º dia após a instilação, com queda significativa entre os dias 30 e 60 após tratamento (Figura 2.3 A e B). Entretanto, quando observada a ISP nesses animais há decaimento até o 30º dia, com um brusco aumento no 60º dia, que pode ser visualizado na imagens histopatológicas como regiões restritas de coloração mais amarronzada (Figura 2.3 A e C).

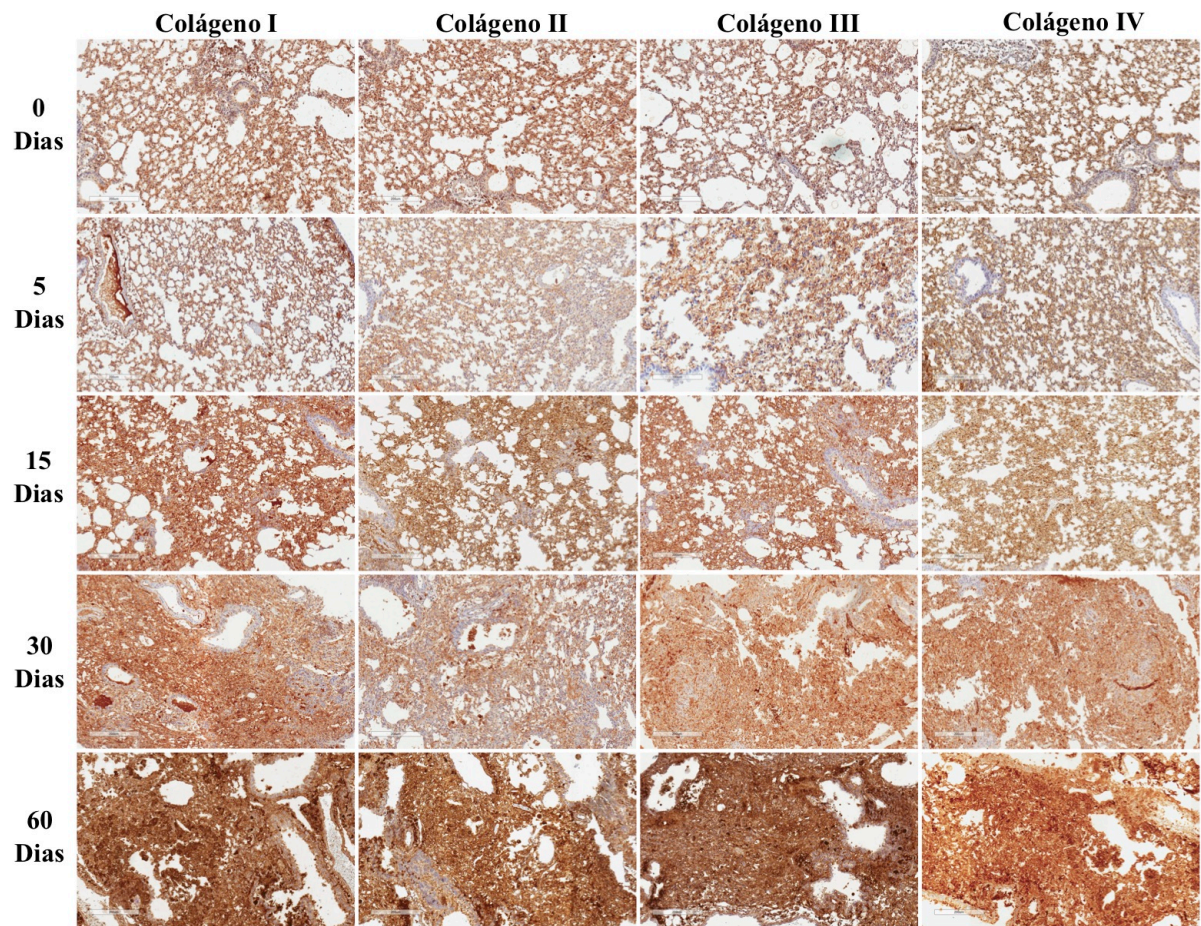
O colágeno do tipo III, assim como o colágeno I a quem está frequentemente associado, tem capacidade de se agregar para formar longas fibras que são encontradas na pele e nos músculos lisos, fazendo parte da manutenção da estrutura de órgãos expansíveis (Junqueira & Carneiro, 2008). Nos pulmões de indivíduos saudáveis, o colágeno III é mais abundante do que o colágeno do tipo I, encontrando-se em todo interstício pulmonar onde aparece no padrão de uma estrutura que aparenta uma fita ininterrupta e se agrega na entrada dos anéis alveolares, além de estar presente nas adjacências dos vasos sanguíneos. Na FPI, a estrutura delicada no padrão de fita é substituída por agregados densos e irregulares em todo o interstício expandido, onde são encontrados os focos fibroblásticos, associado ao colágeno I na região central dos miofibroblastos (Raghu *et al.*, 1985; Herrera *et al.*, 2019). Aqui, foi possível observar um acúmulo gradual de colágeno III no interstício pulmonar nas zonas de espessamento dos septos, com o seu ápice após 30 dias do tratamento com a BLM (Figura 2.3 e Figura 2.4). Aos 60 dias a IP volta aos mesmos níveis dos animais não tratados enquanto,

enquanto ISP foi crescente com o tempo com um aumento muito grande em ISP aos 60 dias (Figura 2.4).

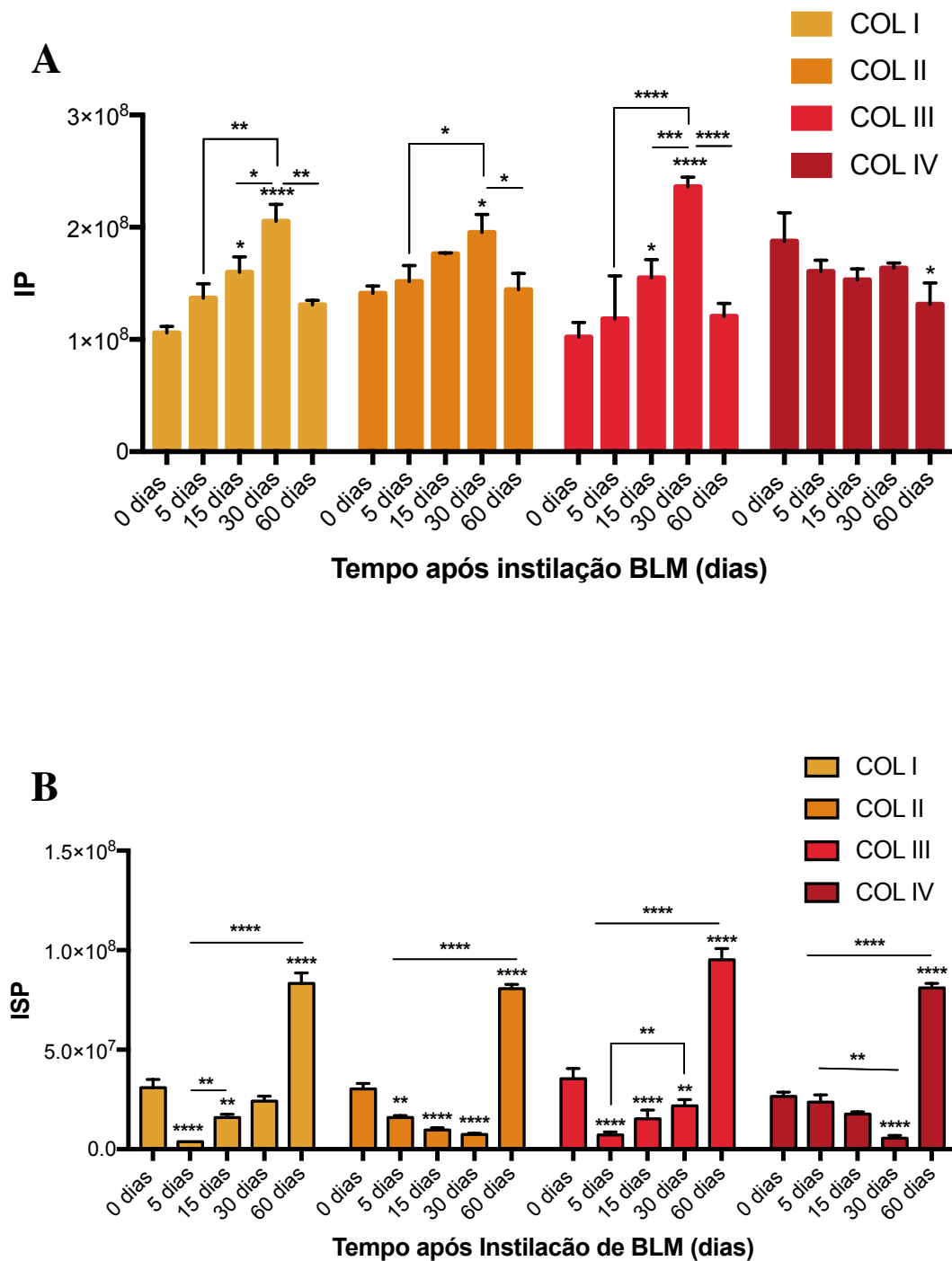
O colágeno do tipo IV está presente na lâmina basal de todos os tecidos. Ele é formado por moléculas capazes de se organizar em estruturas de rede, as quais têm o papel de aderência e filtração, e é distribuído de forma uniforme em um padrão suave e linear (Junqueira & Carneiro, 2008; Raghu *et al.*, 1985). Na FPI ele está presente dentro do centro de miofibroblastos, que também é rico em colágeno I em uma organização desigual, com múltiplas camadas ao longo do epitélio. Além disso, ele está presente nos septos alveolares alargados e adjacentes a estruturas alveolares normais (Herrera *et al.*, 2019). Os resultados aqui apresentados mostram o colágeno IV bem distribuído por todo o tecido, com exceção dos cortes feitos nos animais após 60 dias da instilação intratraqueal de BLM, quando são vistas regiões de coloração mais escura, que sugerem que há maior acúmulo desse colágeno em algumas regiões (Figura 2.3). De fato, IP é significativamente mais baixo em 60 dias, enquanto ISP tem uma queda significativa aos 30 dias, com um aumento muito grande aos 60 dias (Figura 2.4).

As alteração do padrão normal da distribuição dos 4 tipos de colágeno avaliados nesta trabalho são condizentes com as alterações necessárias para que haja infiltração de células inflamatórias e fibroblastos no tecido onde a BLM causou dano tecidual, com acúmulo de colágeno I, colágeno III e colágeno IV em regiões onde foi observado espessamento dos septos alveolares ao longo do período experimental e grande concentração de células no 30º dia. Além disso, o grande aumento na ISP de todos os tipos de colágeno em regiões específicas indica que o aumento da produção de colágeno nesses locais estaria relacionado a focos fibroblásticos formados nessas regiões.





**Figura 2.3: Imunohistoquímica dos animais tratados com BLM.** Camundongos BALB/c foram submetidos a instilação IT de BLM (50  $\mu$ L, 5 U/mL) e após 5 dias, 15 dias, 30 dias e 60 dias, esses animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> para a coleta de tecido pulmonar para análise histológica. (A) Imunohistoquímica do colágeno I, do colágeno II, do colágeno III e do colágeno IV, 1000X, barra branca equivalente a 200  $\mu$ m.



**Figura 2.4: Quantificação do colágeno I, colágeno II, colágeno III, colágeno IV no tecido pulmonar dos animais instilados com bleomicina.** Camundongos BALB/c foram submetidos a instilação IT de BLM (50  $\mu$ L, 5 U/mL) e após 5 dias, 15 dias, 30 dias e 60 dias, esses animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> para a coleta de tecido pulmonar para análise histológica e marcação do colágeno I, do colágeno II, do colágeno III e do colágeno IV. Os tipos de colágeno foram quantificados de acordo com (A) intensidade total positiva (IP) e (B) intensidade total fortemente positiva (ISP) das imagens adquiridas. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , em comparação com 0 dias.

O depósito de colágeno nos pulmões dos pacientes com FPI leva à fibrose e consequente dificuldade respiratória e às comorbidades características da doença. Para avaliar as contínuas alterações morfológicas do tecido pulmonar decorrentes da evolução do processo fibrótico, os animais tratados com BLM foram submetidos a análises de imagens de  $\mu$ CT. A figura 2.5 mostra as diferenças entre os tempos analisados. Os animais acompanhados em todos os tempos são os mesmos e devido ao equipamento permitir a observação *in vivo* foi possível acompanhar o desenvolvimento fibrótico em todos eles. Por convenção, valores altos de atenuação são representados em branco e valores baixos em preto, que é a maneira como vemos o ar dos pulmões. Além disso, as áreas fibróticas, representadas por áreas mais densas, estão indicadas por cabeças de setas brancas. Nas imagens adquiridas após 5 dias do tratamento com BLM foi possível observar acentuada opacificação difusa do parênquima pulmonar esquerdo, com discreta opacificação do campo pulmonar superior direito, que progrediu para uma acentuada opacificação difusa e bilateral do parênquima pulmonar após 15 dias da instilação. Passados 30 dias do tratamento, foi possível observar moderada a acentuada opacificação difusa e bilateral dos campos pulmonares. Aos 60 dias, ainda foi possível observar zonas de maior densidade nos pulmões desses animais nas imagens de  $\mu$ CT, sugerindo que dano tecidual foi mantido.

As imagens de tomografia computadorizada de pacientes com FPI são um componente essencial para o diagnóstico da doença (Rhagu *at al.*, 2011). Essa entidade nosológica é uma pneumonia intersticial fibrosante de causa desconhecida que possui o padrão radiológico de PIU, caracterizado pela presença de presença de opacidade reticulares, apresentando faveolamento tipicamente localizado na região subpleoral, muitas vezes associados a opacidade semelhantes a vidro fosco (Rhagu *at al.*, 2011). Nos camundongos que sofreram instilação IT de BLM, embora o padrão observado não fosse idêntico ao PIU e a

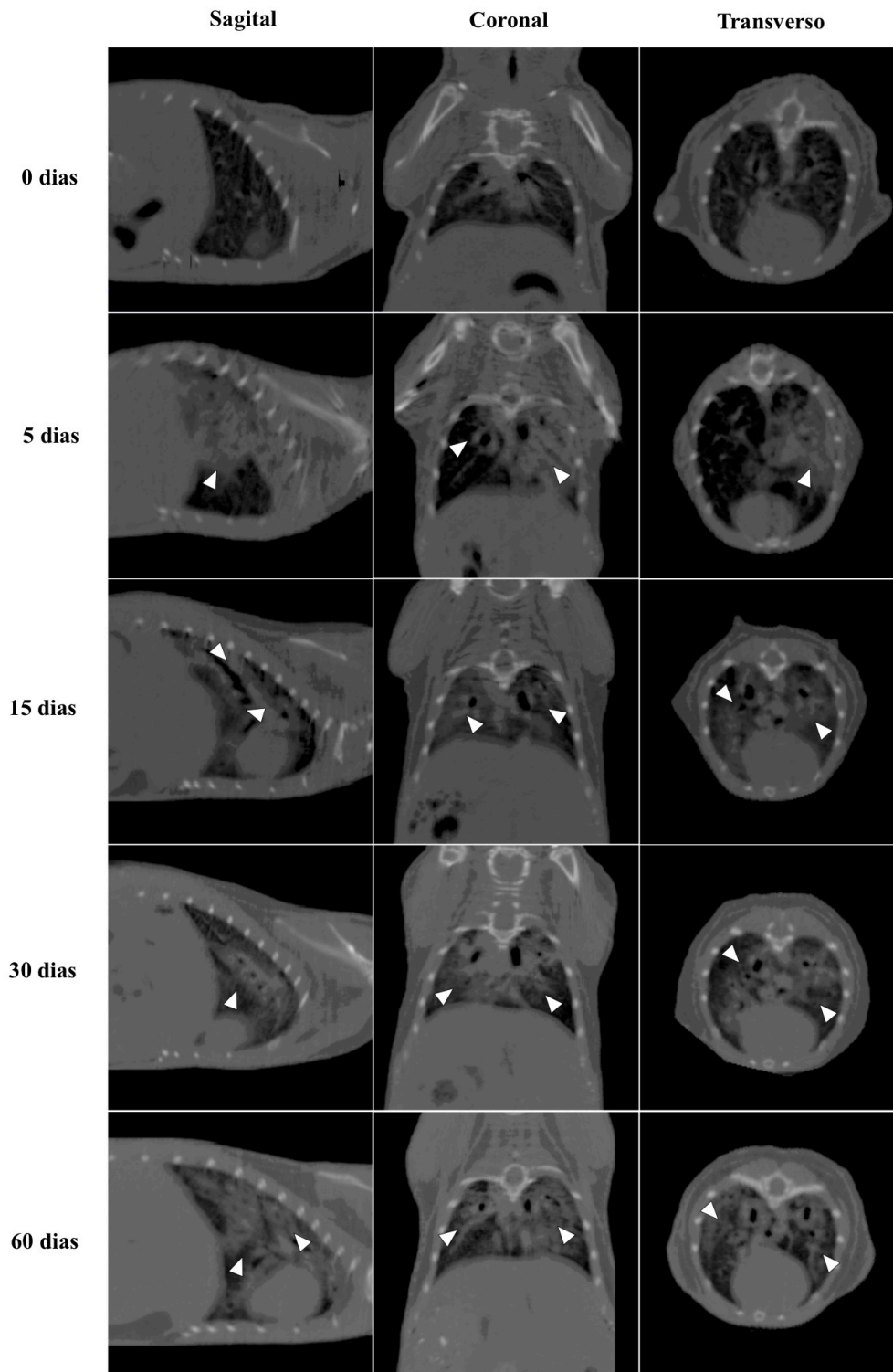
localização das áreas de opacidade fossem preferencialmente nas regiões mais próximas da árvore respiratória, foi possível observar opacificações que passaram a ocupar ambos os lados dos pulmões caracterizando um processo fibrótico contínuo com comprometimento tecidual do órgão.

Pela aquisição das imagens de  $\mu$ CT é possível também identificar e quantificar alterações na densidade do tecido pulmonar que sugerem o desenvolvimento e estabelecimento da FP após instilação IT de BLM em camundongos BALB/c. Os dados para a densidade tecidual são adquiridos a partir das unidades de volume, VOIs, que são quantificadas a partir da quantidade média de absorção de radiação do tecido analisado e que é diretamente proporcional ao coeficiente de atenuação calculado em HU. Esta escala para o coeficiente de atenuação é uma medida arbitrária criada por Godfrey Hounsfield para quantificar a atenuação do feixe de raios-X após atravessar o corpo. A escala vai de -1000 a 1000 HU, sendo 0 o valor equivalente ao coeficiente de atenuação da água. Tecidos com alta densidade, como os ossos, são capazes de absorver mais fótons que tecidos pouco densos, como o ar nos pulmões. Portanto, pudemos correlacionar o aumento de densidade do tecido pulmonar com o processo inflamatório gerado pela BLM e o desenvolvimento da fibrose nos animais tratados. Como cada equipamento pode gerar parâmetros ligeiramente diferentes, dependendo da sua radiação efetiva e na falta de parâmetros prévios para avaliação de fibrose, primeiramente estabelecemos quais seriam os valores para ossos, cartilagens, ar e água encontrados nos nossos ensaios a partir do camundongo XRM-5 X-ray Phantom Mouse (Caliper) (Anexo III).

A frequência de VOIs confirmou o dano tecidual nos tempos analisados (Figura 2.6). Primeiramente verificamos que a frequência de VOIs nas vias respiratórias tem picos para densidades que são de -200 a 140 HU, que foi considerado o padrão normal para o

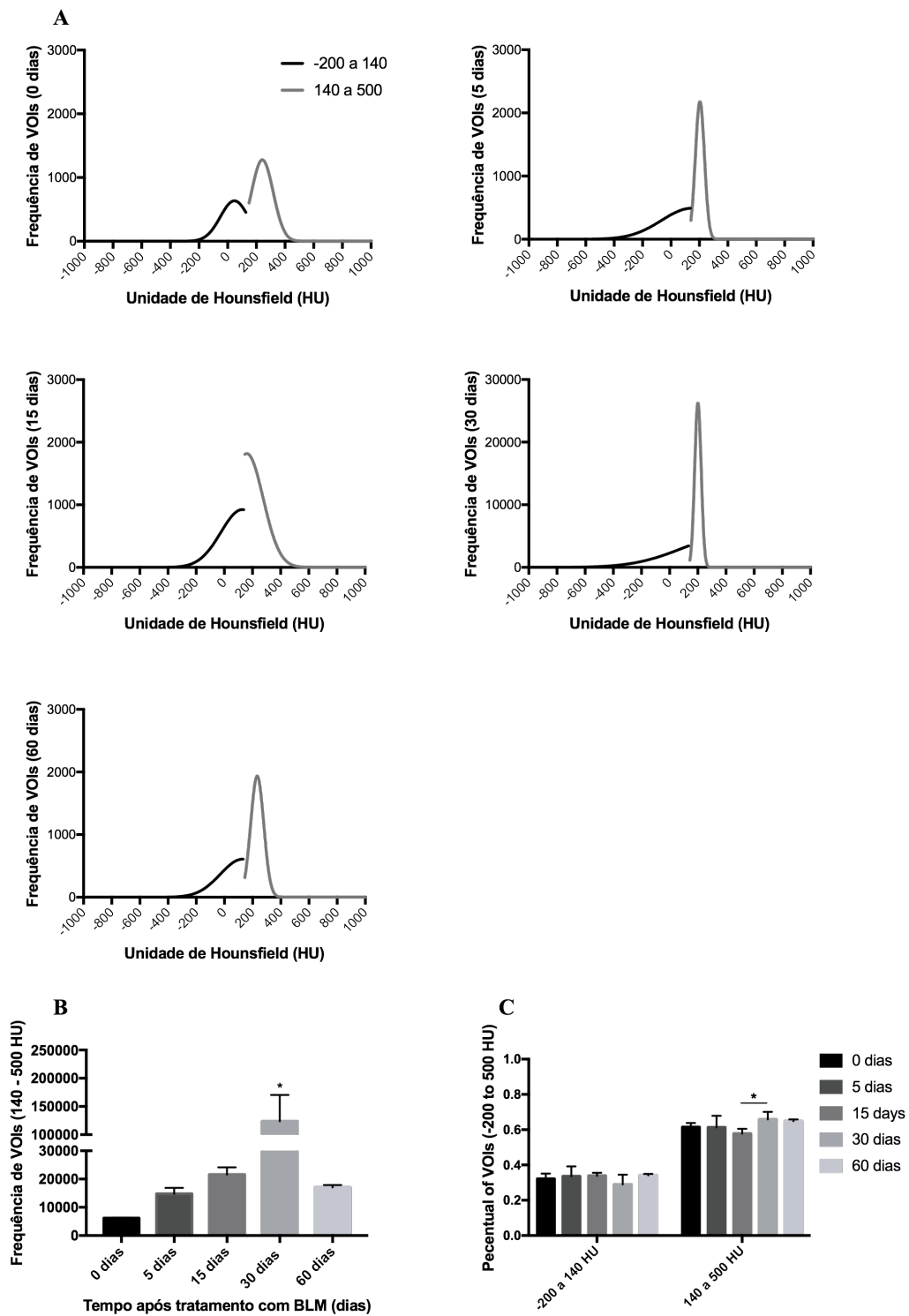
espaço alveolar, e de 140 a 500 HU, que foi considerado como medidas de estruturas mais densas e, portanto, das vias aéreas. Foi verificado o aumento de densidade no tecido pulmonar, associado ao aumento dos picos de densidade e seu deslocamento para a direita no gráfico (Figura 2.6). O aumento de densidade sugere alteração na composição do tecido onde encontrariam-se os alvéolos. A alteração do tecido alveolar por um tecido de maior densidade estaria associada com a diminuição da eficiência tecidual onde ocorrem as trocas gasosas. Isso, juntamente com as análises histopatológicas, pode indicar uma alteração do tecido que inicia com um processo inflamatório seguido por um crescente depósito de colágeno no órgão, responsáveis pela diminuição do espaço alveolar, levando à diminuição da capacidade respiratória.

Na figura 2.6 B, é possível observar um aumento gradual da frequência de VOIs entre 140 e 500 HU, corroborando com os achados histológicos, onde vemos um início de inflamação, também representado pela área de opacidade difusa discreta que aumenta até o 30º dia, quando encontramos uma grande quantidade de fibras de colágeno, associada a um grande infiltrado inflamatório que ainda se encontra no local. Aos 60 dias essas zonas de opacidade diminuem, permanecendo apenas pequenas áreas de alta densidade na imagem (Figura 2.5), porém sem a área de opacidade difusa, também corroborando com os dados histopatológicos, onde não são vistas grandes áreas com infiltrado inflamatório, mas apenas áreas com grandes depósitos de colágeno, evidenciado pelo tricrômio de Masson. Além disso, o percentual de VOIs de 140 a 500 HU aumenta significativamente entre 15 dias e 30 dias (Figura 2.6 C), quando supomos que haja um troca do perfil Th1 do pulmão para o perfil Th2, o que favorece a fibrogênese. Verifica-se o início da deposição de colágeno, que aumenta gradativamente aos 30 dias e tem a queda desse percentual de VOIs aos 60 dias, quando há ausência de infiltrados inflamatórios, porém a fibrose é mantida.



**Figura 2.5: Imagem de  $\mu$ CT dos animais tratados com BLM.** Camundongos BALB/c sofreram instilação IT com BLM (50 $\mu$ l, 5 U/ml). Para o acompanhamento da progressão da fibrose eles foram sedados e imagens adquiridas a cada 5 dias, ao longo de 60 dias. As cabeças de setas brancas marcam as regiões de opacificação que sugerem o desenvolvimento de fibrose. Resultados são representativos de 2 experimentos independentes, cada um com 5 animais por ponto experimental.





**Figura 2.6: Medidas da densidade pulmonar dos animais.** Camundongos BALB/c sofreram instilação IT com BLM (50 $\mu$ l, 5 U/ml) e durante 60 dias acompanhados para verificação do desenvolvimento fibrótico *in vivo*. (A) Foi medida a frequência de VOIs desses animais do dia 0 ao dia 60 e então determinado (B) o limite onde esses VOIs eram mais frequentes e (C) as diferenças na frequência. Resultados são representativos de 2 experimentos independentes. Frequência: One-way ANOVA, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , em comparação com 0 dias. Percentual: Two-way ANOVA, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , em comparação com 0 dias. Peso: regressão linear.

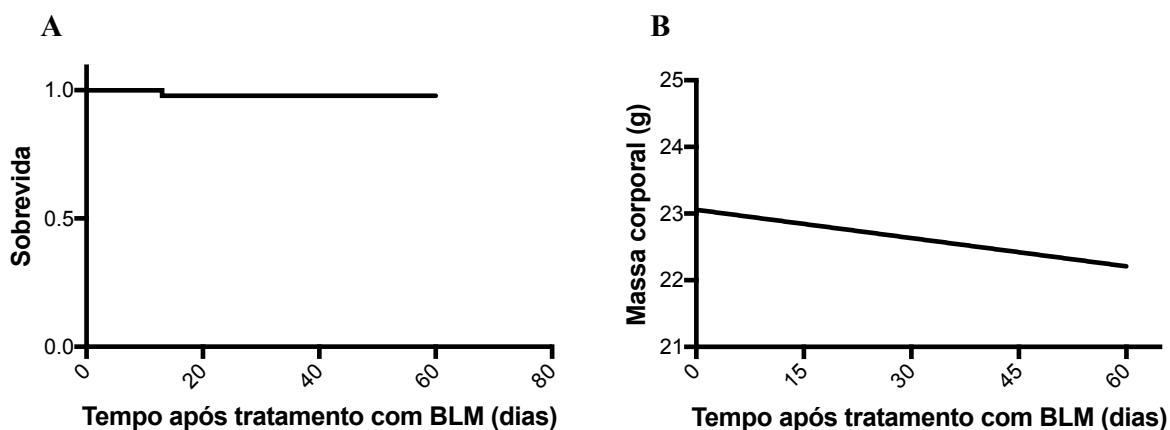
## 2. Curva de sobrevida e curva de peso dos animais tratados com BLM

O modelo que utiliza os animais C57BL6 tratados intratraquealmente com BLM, apresenta alta taxa de mortalidade. Cerca de 50% desses animais evoluem ao óbito por volta de 15 dias após o tratamento e os que sobrevivem se curam espontaneamente (Tashiro *et al.*, 2017). Em contrapartida, ao final dos 60 dias após os camundongos BALB/c terem sofrido a instilação IT de BLM o número de animais era bastante semelhante ao do início do acompanhamento, com apenas um óbito observado no grupo. Isso indica que essa linhagem de camundongos responde diferentemente dos camundongos C57BL6, sobrevivendo melhor após o procedimento (Figura 2.7 A). Isso pode acontecer pelas diferenças que as duas linhagens apresentam no desenvolvimento do processo inflamatório. Camundongos C57BL6 geram uma inflamação mais robusta que os BALB/c. Estes são considerados maus produtores de citocinas pro-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , que é um importante mediador da inflamação e sua produção está envolvida no início da resposta ao dano tecidual, que leva ao processo fibrótico (Haranaka *et al.*, 1984; Piguet & Vesin, 1994; Miyazaki *et al.*, 1995; Allen & Spiteri, 2002; Willis *et al.*, 2005). Provavelmente é essa inflamação mais robusta dos C57BL6 é o que leva grande parte dos animais a óbito e também faz com que eles apresentem as características do processo fibrótico mais precocemente que os BALB/c.

Além da curva de sobrevida, os animais foram acompanhados para a verificação da variação da sua massa corporal. Durante 60 dias acompanhamos as alterações da massa corporal dos animais tratados com BLM. Foi observada perda de peso dos animais ao longo do tempo de acompanhamento, porém ao final do período de observação, os animais chegam a um platô, diminuindo a perda de peso (Figura 2.7 B). Pacientes com FP tendem a perder peso devido à diminuição de apetite e à perda de massa muscular, ocasionada pela diminuição



das atividades normais decorrente da dificuldade respiratória. Os animais acompanhados não mostraram perda de peso progressiva como é observado em pacientes com FPI.



**Figura 2.7: Peso dos animais e curva de sobrevivida.** Camundongos BALB/c foram submetidos ao tratamento IT com BLM (50 $\mu$ l, 5 U/ml) e ao longo de 60 dias foram monitorados. (A) Os animais foram pesados com auxílio de uma Pesola  $\text{\textcircled{R}}$  a cada 5 dias e (B) observados diariamente para verificação da mortalidade. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , em comparação com 0 dias.

### 3. Avaliação da capacidade respiratória dos animais após o tratamento com bleomicina

Após a instilação com BLM, foi realizada a análise das alterações funcionais dos pulmões, encontradas na mecânica ventilatória dos animais. As grandezas avaliadas foram Rrs, Crs, Ers, Rn, G e H.

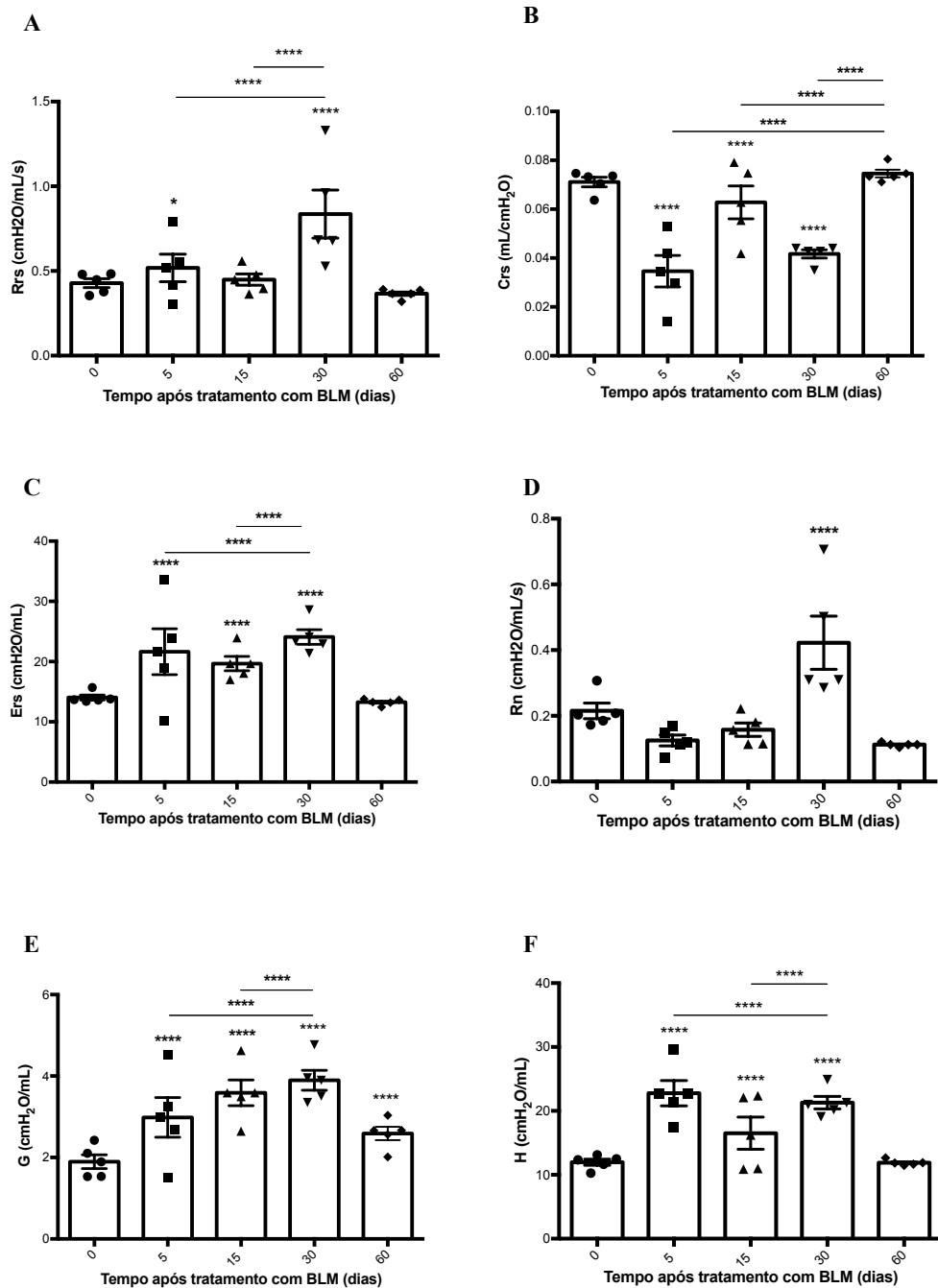
Ao analisar Rrs, foi observada uma diferença significativa entre os animais não tratados e após 30 dias de tratamento, sendo essa diferença um aumento em torno de 95% a mais (Figura 2.8 A). Entretanto, Crs diminuiu significativamente logo após o tratamento com BLM (por volta de 49% do valor dos animais não tratados) no 5º dia após o tratamento, e apresentou um pequeno aumento no 15º dia, mas ainda mantendo valores significativamente

menores que o controle (chegando a 85% do valor) e apresentando nova queda aos 30 dias (cerca de 62% do valor dos animais não tratados) (Figura 2.8 B).

Semelhantemente a Crs, Ers foi significativamente modificada logo após o tratamento com BLM. Após 5 dias da instilação, esse parâmetro aumentou cerca de 54% comparado com os camundongos não tratado, seguido por um pequeno decrescimento, mas ainda 40% maior que o controle, e tendo o seu pico aos 30 dias, quando o aumento chega a aproximadamente 72% (Figura 2.8 C).

De forma similar a Rrs, foi observado um aumento significativo em Rn apenas após 30 dias após a instilação IT com BLM (Cerca de 170% do valor dos animais não tratados) (Figura 2.8 D). Foi também possível observar diferenças significativas entre animais tratado e não tratados em G, com aumento das medidas desse parâmetro em 57% no 5º dia, 89% no 15º dia, 105% no 30º dia e de 40% no 60º dia (Figura 2.8 E). H também aumentou significativamente no 5º dia, no 15º dia e no 30º dia com taxas de 90%, 38% e 78% , respectivamente (Figura 2.8 F).

Aos 60 dias a a instilação não é possível observar diferenças entre o controle e os animais tratados em quase todos os parâmetros medidos, com exceção de G que se manteve mais alto que o controle (Figura 2.8).



**Figura 2.8: Avaliação da mecânica ventilatória dos animais tratados com BLM.** Camundongos BALB/c sofreram instilação IT de BLM (50 $\mu$ l, 5 U/ml) e depois de 5, 15 e 30 dias esses animais foram sedados e anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina (15 ml/kg e 0,1ml/kg, respectivamente) e submetidos a traqueostomia para serem acoplados ao ventilador mecânico. Foram avaliados os parâmetros de (A) resistência do sistema respiratório - Rrs, (B) complacência do sistema respiratório- Crs, (C) elastância do sistema respiratório - Ers, (D) resistência Newtoniana - Rn, (E) amortecimento tecidual - G e (F) elastância tecidual - H. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, em comparação com 0 dias..

Dentre os processos que são responsáveis pelas alterações nos fibroblastos pulmonares acúmulo excessivo de componentes de MEC e perda das células epiteliais observados na FP podemos citar (1) inflamação e mecanismos imunes: papel de citocinas e quimiocinas; (2) estresse oxidativo; e (3) distúrbios da coagulação no pulmão. O melhor entendimento e interação desses eventos é de fundamental interesse para a definição das bases patogênicas e fisiopatológicas para que se possa melhor conduzir os casos clínicos, promovendo melhoria na qualidade de vida e a definição de propostas terapêuticas mais eficazes. Atualmente, existem alguns medicamentos antifibróticos disponíveis no mercado que são utilizados no tratamento da FPI o Nintedanibe e a Pirfenidona. Estes fármacos são caros e capazes apenas de retardar a progressão da doença, sem caráter curativo, e causam fortes efeitos colaterais, que muitas vezes são responsáveis pela interrupção do seu uso (Ahluwalia *et al.*, 2014; Spagnolo *et al.*, 2015; Spagnolo, 2016; Aiello *et al.*, 2017; Collard, 2017; Harari *et al.*, 2017; Sköld *et al.*, 2017).

Diversos estudos vêm tentando elucidar os mecanismos patogênicos que levam à FPI. Para isso, diferentes modelos experimentais já foram desenvolvidos ao longo dos anos. Um dos primeiros modelos experimentais foi produzido, em 1974, por Adamson & Bowden quando utilizaram camundongos albinos que receberam semanalmente injeções de BLM por um período de quatro a oito semanas. As lesões endoteliais foram observadas seguidas por infiltrado leucocitário nos pulmões de hiperplasia intersticial do epitélio alveolar (Adamson & Bowden, 1974). Estes dados consolidaram a BLM como molécula indutora de lesões teciduais que levam à doença fibrótica nos pulmões. Entretanto, apenas no final de 1980 que foram publicadas comparações entre essas lesões observadas nos modelos animais e as observadas na FPI em humanos, passando-se assim a utilizar a BLM como indutora da FP experimental (Shen *et al.*, 1988). Mais recentemente, foram utilizadas outras espécies como ovinos e

caprinos nos modelos experimentais de FPI, que tem a indução da doença feita não só com BLM como também radiação. Em todos os casos, a doença foi caracterizada pelo contínuo depósito de colágeno, restrito ao tecido pulmonar, que levou à alterações na atividade funcional do órgão.

A maior parte do conhecimento a respeito da FPI vem de modelos experimentais, principalmente os que utilizam camundongos, nos quais é possível criar linhagens transgênicas para compreender melhor o papel de determinados receptores ou sinalizadores no desenvolvimento dessa entidade nosológica. No entanto, nenhum modelo experimental consegue reproduzir todos aspectos encontrados na doença humana (Borzzone *et al.*, 2001; Degryse *et al.*, 2010; Scotton & Chambers, 2010; Degryse & Lawson, 2011; Tashiro *et al.*, 2017). Graças aos estudos com modelos experimentais sabe-se que o desenvolvimento da FPI está associado à fatores genéticos predisponentes, fatores comportamentais e fatores ambientais (Ley & Collard, 2013; Lei *et al.*, 2014; Koo *et al.*, 2017). Em todos os casos, tanto modelos experimentais como humanos, o processo fibrótico ocorre como consequência de um processo de cicatrização aberrante que é decorrente de um dano pulmonar repetitivo, especialmente das CEAs. O dano no tecido pulmonar induz migração de células que são responsáveis pela resposta inflamatória inicial com altos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  e ROS (Suwabe *et al.*, 1988; Phan & Kunkel, 1992; Piguet *et al.*, 1993; Ahluwalia *et al.*, 2014; Agostini & Gurrieri, 2016; Hou *et al.*, 2018). Esses mediadores inflamatórios podem induzir a apoptose de CEAs, crescimento de fibroblastos, aumento da produção de colágeno e fatores de crescimento (Vilcek *et al.*, 1986; Tashiro *et al.*, 2017). Devido à essa resposta inflamatória pode ocorrer a apoptose de diversos outros tipos celulares, seguida por eferocitose dessas células, produção de fatores de crescimento induzido por essas citocinas que levam à produção de mediadores pró fibróticos como PDGF e TGF- $\beta$ ,

além de outras citocinas relacionadas com a polarização do fenótipo M2 de macrófagos (Desai *et al.*, 2018).

Na FPI, o modelo mais comum é o que utiliza camundongos C57Bl/6 e BLM, devido à alta susceptibilidade desses animais ao dano pulmonar após o tratamento IT (Tashiro *et al.*, 2017). Após tratamento único com BLM, esses camundongos desenvolvem exuberante processo inflamatório que progride para um processo fibrótico. Durante esse processo, é observada alta mortalidades para os animais nos primeiros 15 dias após o tratamento, e os que resistem a esse período evoluem para cura espontânea, o que dificulta a avaliação da eficácia de fármacos em testes pré clínicos (Agostini & Gurrieri, 2006; Tashiro *et al.*, 2017; Ruscitti *et al.*, 2018). Apesar dos camundongos C57BL6 serem amplamente usados para modelos experimentais de FPI, estes são passíveis de críticas, uma vez que apresentam diversas discrepâncias em relação à história natural da resposta pulmonar à BLM devido às vias de administração (mesmo sendo por instilação intratraqueal cirúrgica ou orofaríngea), doses de BLM utilizadas na literatura e idade dos animais, pois todos esses fatores geram divergências quanto ao curso da doença com a cura espontânea podendo ocorrer mais precocemente ou mais tardiamente (Scotton & Chambers, 2010). Esse modelo falha em recapitular uma serie de características importantes da PIU, como focos fibroblásticos, epitélio hiperplástico, heterogeinidade temporal e faveolamento. Além disso, após uma única dose de BLM, observa-se um processo inflamatório rico em neutrófilos, que é mais indicativo de um dano pulmonar agudo ou mediado por Th17 do que um modelo de fibrose (Scotton & Chambers, 2010; Degryse & Lawson, 2011).

Com todas as limitações dos modelos que utilizam a linhagem de camundongo C57BL6, com especial atenção à cura espontânea, e com a necessidade de novos estudos de eficácia das novas terapias farmacológicas, foi proposto, aqui, um modelo murino crônico

para FPI que utiliza camundongos BALB/c (Betensley *et al.*, 2016). Os camundongos BALB/c são considerados maus produtores de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , duas citocinas de grande importância para o desenvolvimento fibrótico nos pulmões, entretanto, esses animais ainda são capazes de produzir essas citocinas e desenvolver respostas inflamatórias normais (Haranaka *et al.*, 1984; Piguet & Vesin, 1994; Miyazaki *et al.*, 1995; Allen & Spiteri, 2002; Willis *et al.*, 2005; Tashiro *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2018). Portanto, avaliamos a habilidade dos camundongos BALB/c em desenvolver uma RI após a instilação IT de BLM, seguida pelo depósito de colágeno nos pulmões, perda da capacidade respiratória dos animais. Para isto, foram feitas análises morfológicas e funcionais do tecido pulmonar.

As primeiras análises realizadas nos animais tratados com BLM foram as morfológicas, dentre elas as análises de  $\mu$ CT, técnica na qual foi possível acompanhar os mesmos animais por 60 dias, uma vez que os camundongos precisam apenas ser sedados e a eutanásia não é necessária. Além disso, esse tipo de análise que o equipamento de  $\mu$ CT possibilita nos trás mais próximo dos exames aos quais os pacientes com FPI são submetidos para o diagnóstico da doença, possibilitando a ciência translacional. Em humanos, essa doença é caracterizada pelo padrão reticular, com predominância basal e periférica, com bronquioecstasia de tração periférica e a presença de um padrão favo de mel no TCAR, causado pelo depósito de colágeno nos tecidos (Raghu *et al.*, 2011). As análises de  $\mu$ CT feitas neste trabalho mostraram um aumento da opacidade nos pulmões dos camundongos BALB/c durante todo o período de acompanhamento após a instilação da BLM (Figura 2.4).

Os depósitos de colágeno são consequência de um processo de cicatrização desregulado, que ocorre após a injúria tecidual. Como já mencionado, ao longo dos anos esses depósitos de colágeno encontrados na doença fibrótica pulmonar já foram descritos para diversas espécies, além dos humanos (Shen *et al.*, 1988; Phan & Kunkel., 1992; Piguet &

Vesin, 1994; Tashiro *et al.*, 2017). Nesses animais, o processo fibrótico também ocorre como consequência de uma lesão tecidual e os mediadores inflamatórios envolvidos na RI a essa lesão, que por sua vez também podem levar a danos teciduais, participam do processo de indução e progressão da FP (Bringardner *et al.*, 2007). Dessa maneira, a instilação IT dos camundongos BALB/c com BLM causou uma perturbação na homeostase do tecido pulmonar que levou ao processo inflamatório que induziu o depósito de colágeno durante os 30 primeiros dias (Figuras 2.2, 2.3 e 2.4), associada a importantes alteração funcionais observadas na mecânica ventilatória desses animais (Figura 2.8). Após 60 dia do tratamento com BLM, os depósitos de colágeno observados nos cortes histológicos corroboram com as opacidade observadas nas imagens de  $\mu$ CT, porém os resultados observados na mecânica ventilatória e o perfil de citocinas sugerem que as mudanças entre o 30º dia e o 60º dia são decorrentes da diminuição do processo inflamatório permanecendo apenas os acúmulos de colágeno observados no tecido (Figuras 2.2, 2.3, 2.4, 2.7). Na FPI, os focos fibroblásticos são estrutura polarizadas que conta um centro com miofibroblastos que envolvem miofibroblastos não proliferativos, associado a macrófagos ativados e células progenitoras mesenquimais formando uma estrutura celular fibrótica ativa (Herrera *et al.*, 2019). Como uma estrutura dinâmica, as células mesenquimais progenitoras presentes na estrutura do foco fibroblástico invadem o tecido alveolar saudável adjacente, formando um novo foco fibroblástico e deixando para traz uma MEC completamente remodelada (Herrera *et al.*, 2019).

As alterações na mecânica ventolatória observadas no modelo experimental utilizado neste trabalho são consistentes com as que foram reportadas anteriormente em estudos que demonstraram FP e remodelamento do tecido dos pulmões com aumento do depósito de fibras de colágeno (Dolhnikoff *et al.*, 1999). O aumento da Ers e os aumentos dos parâmetros viscoelásticos G e H que seguiram o tratamento dos animais com BLM são



causados por inflamação que causa distorções do tecido pulmonar, modificações estruturais da matriz extracelular e disfunção do surfactante associada ao desrecrutamento alveolar progressivo. É interessante notar o aumento de Rn 30 dias após a instilação de BLM. Esse resultado está de acordo com Polosukhin e associados, que demonstraram em camundongos o aumento desse parâmetro em conjunto com remodelamento tecidual e uma fibrose peribronqueal proeminente após 4 semanas de instilação IT de BLM (Lutz *et al.*, 2015). Eles também observaram uma resolução parcial do remodelamento tecidual depois de 8 semanas de tratamento. Esses resultados podem estar associados às alterações do processo inflamatório, que tende a diminuir após 30 dias da instilação da BLM (Figura 2.2).

**CAPÍTULO 3: TOAP3 E TOAP4 COMO ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA A  
FIBROSE PULMONAR IDIOPÁTICA**

## I. Contextualização do tratamento

Como já mencionado no capítulo 1, a FPI não é uma doença de alta incidência. Entretanto, devido às suas características de alta mortalidade, baixa expectativa e qualidade de vida e de altos custos de internações, a busca do entendimento dos seus mecanismos patogênicos e a procura por alternativas terapêuticas são de grande importância (Aiello, 2017; Cottin, *et al.*, 2017; Mooney *et al.*, 2017; Suzuki & Kondoh, 2017).

Ao longo dos anos, protocolos e alternativas terapêuticas para essa doença foram desenvolvidos, porém com pouco sucesso na melhora da qualidade de vida ou cura da FPI. Embora muitos estudos tenham mostrado a importância de citocinas na regulação do processo inflamatório e sua influência em modelos experimentais de FPI, a maioria dos protocolos terapêuticos utilizando imunossupressores fracassou ainda nos testes pré clínicos (Belperio *et al.*, 2002; Borie, 2016; Sköld *et al.*, 2017). Isso levou, por anos, à crença de que o desenvolvimento da FPI não estaria relacionado à RI.

Devido a essa dissociação entre o processo fibrótico da FPI e a RI, as pesquisas para desenvolvimento de fármacos deixaram de ter como foco a regulação do SI e se voltaram para abordagens antifibróticas. Atualmente, existem dois fármacos antifibróticos utilizados para o tratamento da FPI: Nintedanib e Pirfenidona (Borie *et al.*, 2016; Sköld *et al.*, 2017). Ambos atuam, por diferentes mecanismos, na produção do colágeno e possuem algum efeito no prolongamento da vida do paciente (Aiello *et al.*, 2017; Sköld *et al.*, 2017). Entretanto, ambos os fármacos funcionam apenas no retardo da progressão da FPI e sua utilização não está associada à melhora da sua qualidade de vida (Spagnolo, 2016). Além disso, são medicamentos de alto custo, que geram fortes efeitos colaterais levando, muitas vezes, à necessidade interrupção do tratamento (Sköld *et al.*, 2017).

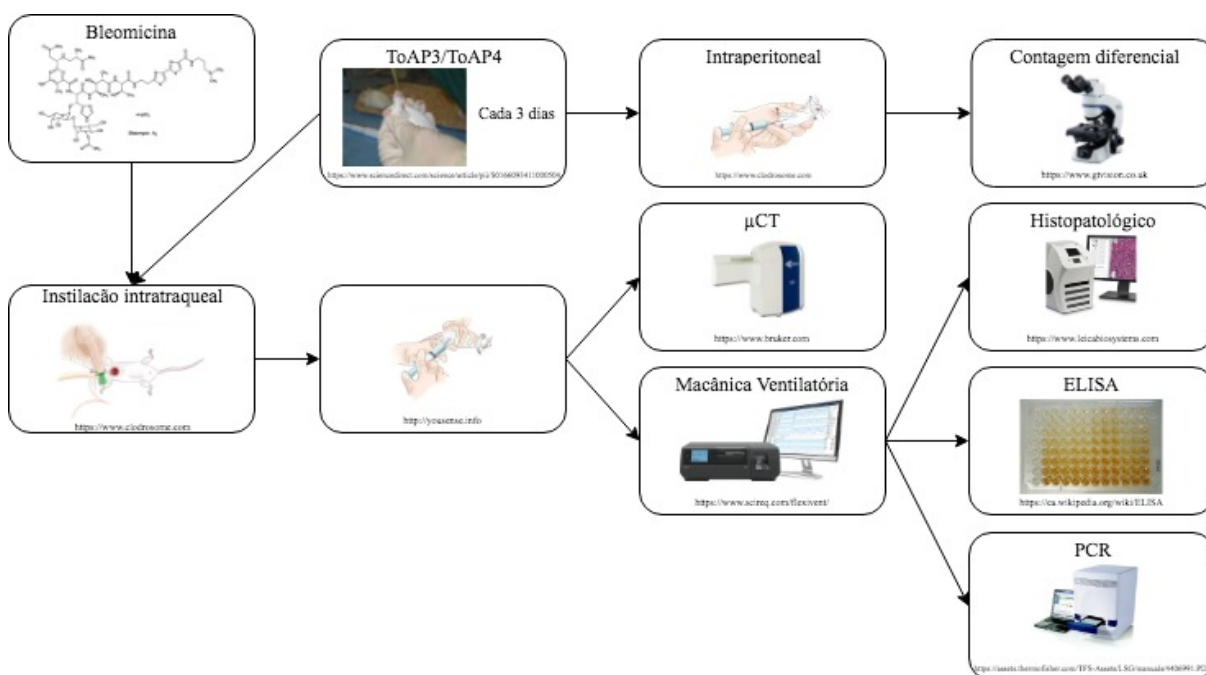
Atualmente, entende-se que o SI, embora possa não ser o principal desencadeador do processo da fibrogênese na FPI, é o responsável pelo processo fibrótico crônico (Desai *et al.*, 2018). Assim, tendo em vista que esse se dá pela desregulação dos mecanismos responsáveis pela cicatrização do tecido e que esta ocorre, normalmente, após lesão tecidual gerada durante o processo inflamatório local, a utilização de elementos reguladores da RI no início do processo fibrótico pode ser uma alternativa terapêutica interessante. Dessa forma, elementos como peptídeos antimicrobianos (PAMs), tais como ToAP3 e ToAP4, com potencial anti-inflamatório e ação regulatória na produção de citocinas, podem ter valor terapêutico nessa doença (Guilhelmelli *et al.*, 2016; Veloso *et al.*, 2019).

Tanto ToAP3 como ToAP4 são peptídeos com estrutura primária composta de 17 resíduos de aminoácidos, preditos a partir da biblioteca de cDNA de *Tityus obscurus* (Guilhelmelli *et al.*, 2016). Esses PAMs possuem capacidade de regular a produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias com TNF- $\alpha$  e IL-10, interagem com o receptor do tipo TOLL 4 (TLR4), além de interagir com DCs e alterar a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade do tipo I (MHC-I), mostrando sua paridade de regulação do SI por diversas vias (Veloso *et al.*, 2019).

## **II. Material e métodos**

Para avaliar se as propriedades imunomodulatórias de ToAP3 e ToAP4 interfeririam no desenvolvimento da FPI, foi utilizado o modelo descrito no capítulo anterior no qual a doença se desenvolveu a partir de uma única instilação IT de BLM em camundongos BALB/c, seguido do tratamento intranasal de ToAP3 ou ToAP4. Avaliamos o desenvolvimento da fibrose após o tratamento com os peptídeos, a partir do acompanhamento

desses animais quanto ao desenvolvimento de fibrose por imagens de tomografia e avaliação histopatológica, além da avaliação da função respiratória. Reações de polimerase em cadeia (PCR) e ensaios de imuno-absorção enzimática (ELISA) foram realizados para verificar a alteração do acúmulo de transcrito de genes e proteínas, ambos envolvidos no desenvolvimento do processo fibrótico, incluindo reguladores da inflamação.



**Figura 3.1** Diagrama do desenho experimental do tratamento com os peptídeos imunorreguladores ToAP3 e ToAP4, utilizando o modelo murino de FPI em camundongos BALB/c.

## 1. Peptídeos antiinflamatórios

Os peptídeos ToAP3 (FIGMIPGLIGGLISAIK-NH<sub>2</sub>) e ToAP4 (FFSLIPSLIGGLVSAIK-NH<sub>2</sub>) (Guilhelmelli, 2016) foram sintetizados pela empresa FastBio (Ribeirão Preto, SP, Brasil), utilizando a estratégia de fase sólida F-MOC (N-9-fluorophenylmethoxy-carbonyl). A análise dos peptídeos foi realizada por Maldi-TOF reflectron (MALDI Autoflex Speed TOF/TOF Bruker Daltronics) operado no modo positivo

com uso de reflexão positiva e as massas moleculares foram calculadas usando o programa Isotope Pattern (version 3.4 Build 76, Bruker Daltonics) como descrito em Veloso *et al.*, 2019.

Todas as concentrações escolhidas para os tratamentos com os peptídeos realizados neste trabalho foram baseadas no achados de Veloso e colaboradores (Veloso *et al.*, 2019).

## **2. Animais**

Camundongos Swiss (*Mus musculus*) de 8 a 12 semanas de vida foram utilizados para os ensaios de migração celular no peritônio, induzida por ToAP3 ou ToAP4. Os demais experimentos utilizaram animais BALB/c entre 8 e 12 semanas, como descrito no Capítulo 2.

Os animais foram mantidos com água e comida *ad libitum* no biotério do IB-UnB. Para a coleta do material para o ensaio esses animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as exigências do Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB), documento de autorização UnBDoC nº 100166/2014 (Anexo I).

## **3. Avaliação da indução de migração celular pelos peptídeos no peritônio**

Para esse ensaio foram preparadas soluções de ToAP3 e ToAP4 na concentração de 25 µM em solução de tampão fosfato-salino (PBS) para aplicação. Os animais receberam injeções intraperitoneais com 1 mL de PBS, tioglicolato a 4% ou um dos peptídeos.

Após 4, 24 ou 72 horas do tratamento, esses animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e foi realizado o lavado peritoneal dos mesmos com 3 mL de PBS gelado. Uma alíquota das células foi retirada e corada com azul de Tripán para a contagem de células

totais em câmara de Neubauer enquanto o restante do lavado peritoneal foi centrifugado a 300 g por 5 min a 4°C. O pellet ressuspendido em 500 µL de PBS e 50 µL foram depositados em lâmina de microscopia com o auxílio a citocentrífuga Cytospin 4 Shandon (Thermo Scientific) para a contagem diferencial das células. Elas foram coradas com o corante panótico e contadas em microscópio de luz comum.

#### **4. Tratamento com peptídeos antiinflamatórios**

Camundongos da linhagem BALB/c, foram sedados e anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina, utilizadas nas concentrações 15 mL/kg e 0,1 mL/kg, respectivamente, por via intramuscular. Após esse procedimento, esses animais receberam tratamento único com 50 µL de BLM a 5 U/mL por via IT e no quinto dia após a instilação esses iniciou-se o tratamento com 20 µL da solução ToAP3 ou ToAP4 na concentração de 31,25 µM, por via intranasal, em intervalos de 3 dias, até o 30º dia.

#### **5. Mecânica ventilatória**

Assim como descrito anteriormente, após 30 dias, os animais tratados com ToAP3 ou ToAP4 foram sedados e anestesiados como cetamina e xilazina e, após a realização da traqueostomia com uma cânula de metal de calibre 18, os camundongos foram paralisados com brometo de pancurônio (0.1 mg/kg *i.p.*), acoplados ao ventilador mecânico FlexiVent FX controlado por computador (Scireq, Montreal, Canada) e mecanicamente ventilados em modo de volume controlado, com volume relativo de 8 mL/kg do peso corporal, com ar ambiente, com frequência respiratória de 100 sopros/min contra uma pressão positiva de expiração final

(PEEP) de 3 cmH<sub>2</sub>O.m.A Rrs, Ers e Crs foram determinadas da mesma maneira que foi realizada para os animais do modelo experimental, descrito no Capítulo 2.

## **6. Avaliação morfológica do pulmão**

Para a avaliação morfológica do pulmão, foram realizados os ensaios de histopatologia e IHQ. Os camundongos tratados com ToAP3 ou ToAP4 foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e, em sequencia, fragmentos dos seus pulmões foram armazenados em solução de formaldeído a 10% em tampão salino para fixação e posterior inclusão em parafina, coloração com HE, tricrômio de Masson ou marcação para colágeno I, colágeno II, colágeno III e colágeno IV, da mesma maneira que foi descrita no Capítulo 2.

## **7. Análise por Micro Tomografia Computadorizada**

Imagens de  $\mu$ CT dos camundongos tratados com ToAP3 ou ToAP4 foram adquiridas usando o equipamento Albira CT system (PET/SPECT, Albira, Bruker, EUA). Os dados foram obtidos usando *factory calibrated High Res Albira settings* (1000 projections; 70 mm FOV; 45 KVp; 400 mA). As reconstruções das imagens do  $\mu$ CT foram feitas com o *Albira Reconstruction module*, usando a opção padrão (Albira Software Suite, Bruker, EUA). O programa PMOD (PMOD Technologies LLC) foi usado para a quantificação da densidade pulmonar em unidades de Hounsfield (HU) e as análises foram realizadas como descritas no Capítulo 2.

## **8. Quantificação de citocinas**

Foram dosadas as citocinas TNF- $\alpha$  e interleucinas (IL) 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 10 (IL-10), 13 (IL-13), 17 (IL-17) e TGF- $\beta$  das amostras do fluido brônquio-alveolar e do interstício



pulmonar dos animais, armazenadas a -20°C. Os sobrenadantes foram descongelado e dosados utilizando o método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), utilizando os kits Ready-SET-Go!® da eBioscience para cada uma das citocinas, seguindo as orientações do fabricante.

## **9. Reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa, quantitativa em tempo real (qRT-PCR)**

O ácido ribonucleico (RNA) total do tecido pulmonar dos animais dos grupos controle e grupos experimentais, tratados ou não como os peptídeos, foram extraídos empregando-se o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), seguido de tratamento com DNaseI para assegurar que o produto final esteja livre de contaminação pelo ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico. Após avaliação quantitativa e qualitativa da amostra, o RNA foi transcrito de forma reversa para DNA complementar (cDNA) usando o *RT<sup>2</sup> First Strand Kit* (SABiosciences) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. Posteriormente, a reação de transcriptase reversa para fazer o cDNA utilizado foi realizada usando o high capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Para a realização da reação de polimerase em cadeia (PCR), foi utilizado o kit GoTaq® qPCR e RT-qPCR Systems 1-step (Promega).

Os *primers* utilizados foram arginase 1 (*Arginase1*), óxido nítrico sintase induzível (iNos) e transdutor de sinal e ativador da transcrição 4 (*Stat4*), todos previamente validados de acordo como descrito por Livak and Schmittgen em 2001, e estão descritos na Tabela 1.

Os resultados foram calculados utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , normalizado pela expressão do gene *housekeeping* gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gadph*) e expresso como valores de *Fold change* (Livak and Schmittgen, 2001).

**Tabela 3.1: Primers utilizados para a reação de PCR.**

GENES	FORWARD	REVERSE
<i>Gadph</i>	TGAAGCAGGCATCTGAGGG	CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG
<i>Arginase 1</i>	GTTCCCAGATGTACCAGGATTC	CGATGTCTTTGGCAGATATGC
<i>iNos</i>	CGAAACGCTTCACTTCAA	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT
<i>Nfkb</i>	AGCCAGCTTCCGTGTTTGT	AGGGTTTCGGTTCAGTATCC
<i>Stat4</i>	AACGGGGAGACAAGGTTAC	GCATGGGGAGAAGGTCTGA

## 10. PCR array

As amostras de cDNA foram obtidas conforme descrito no tópico 8 desta seção. As amostras de cDNA foram misturadas ao RT<sup>2</sup> SYBR® *Green ROX qPCR Master Mix* (SA Qiagen) e a mistura foi aliqotada e distribuída nos poços da placa RT<sup>2</sup> *Fibrosis PCR array*, no formato de 96 poços (PAMM-120Z RT<sup>2</sup> Profile™ PCR Array Qiagen). Os genes da placa de PCRArray estão discriminados no Anexo IV.

## 11. Análises Estatísticas

Os ensaios de mecânica ventilatória, percentual de VOIs, ELISA, foram analisados usando two-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey, e resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão (SEM) dos resultados mais representativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.0. Os dados considerados significativos quando  $p < 0.05$ .

A curva de frequência de VOIs para cada um dos tempos foi calculada por regressão não linear. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.0.

As medidas de densidade pulmonar obtida nas análises das imagens do  $\mu$ CT e a quantificação de transcrito pulmonar foram analisadas usando one-way ANOVA seguido pelo pós teste LSD de Fisher e os resultados expressos como média  $\pm$  SEM dos dados representativos. Essas análises estatísticas também foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.0. Os dados considerados significativos quando  $p < 0.05$ .

A curva da massa corporal dos animais foi resultado da análise de regressão linear, também calculada utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.0.

### **III. Resultados e Discussão**

#### **1. Avaliação da indução de migração celular para o peritônio pelos peptídeos ToAP3 e ToAP4**

Para verificar se ToAP3 e ToAP4 seriam capazes de induzir alguma modificação na migração de populações celulares nos tecidos, esses peptídeos foram aplicados intraperitonealmente em camundongos Swiss e após 4h, 24h e 72h foi feita a contagem diferencial de células a partir do lavado peritoneal desses animais. Não foi possível observar diferenças estatísticas significativas entre os animais tratados com os peptídeos e os animais controle durante os tempos avaliados. Os peptídeos ToAP3 e ToAP4 são moléculas cujas estruturas primárias são muito parecidas e ambos tem atividade modulatória da RI (Veloso *et al.*, 2019). Uma das formas de modular a RI é pela indução da produção de

mediadores inflamatórios, quimiocinas e integrinas no tecido, o que levaria à migração de células e portanto à alteração das população celulares no local. No entanto, observou-se que o mecanismo de modulação da RI desses peptídeos não está diretamente relacionado com a indução da migração celular para o local onde foram inseridos (Tabela 3.2).

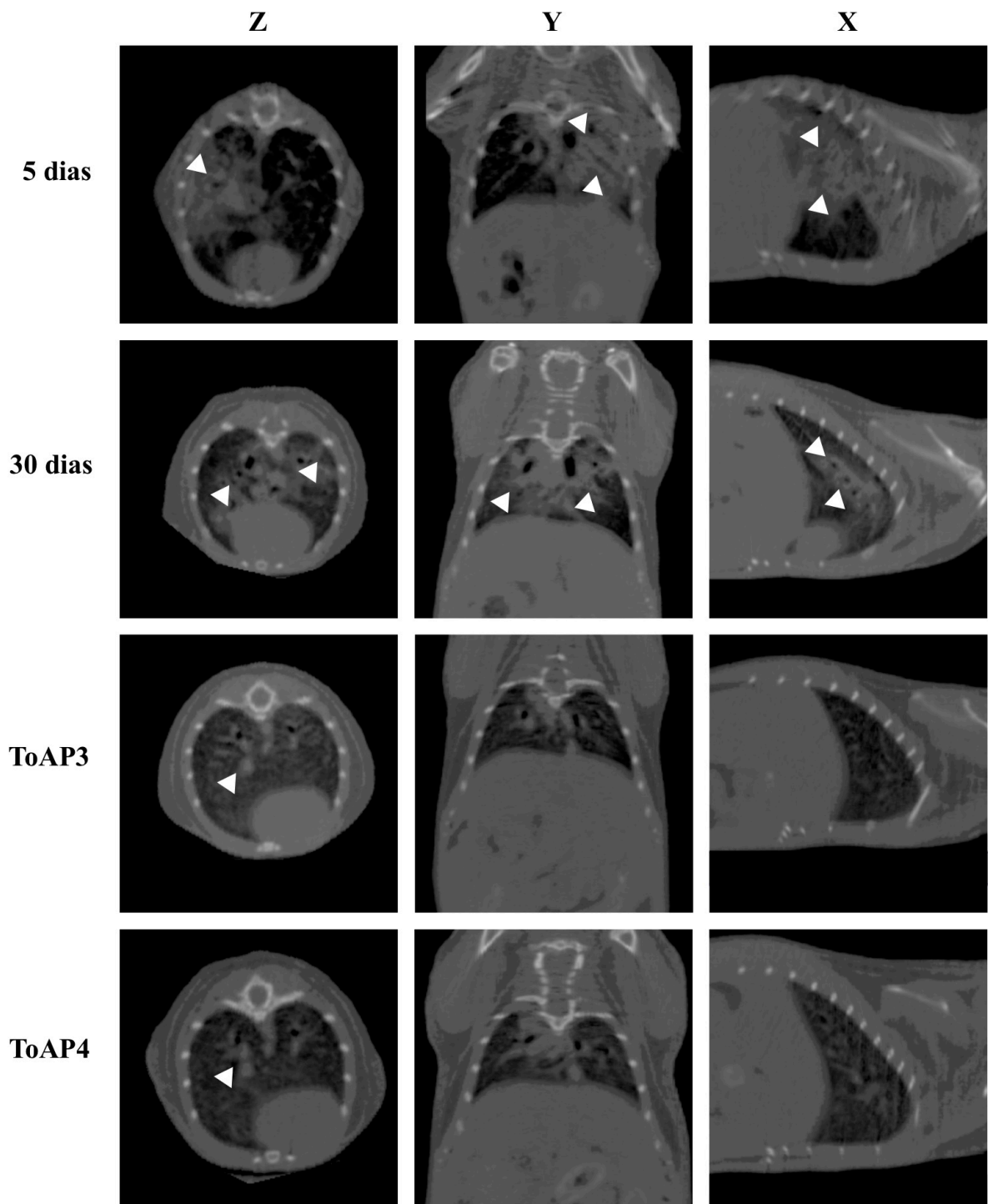
**Tabela 3.2: Migração celular no peritônio dos camundongos induzida por ToAP3 ou ToAP4**

Tipo Celular	4h				24 horas				72 horas			
	PBS	Tio	ToAP3	ToAP4	PBS	Tio	ToAP3	ToAP4	PBS	Tio	ToAP3	ToAP4
Neutrófilos	25	60*	13	15	11	0	0	0	11	21	13	9
Linfócitos	63	35	77	73	71	44	68	62	75	30	65	67
Monócitos	9	4	7	11	23	24	23	24	14	8	21	23
Macrófagos	0	1	0	0	1	3	1	1	0	40*	0	0

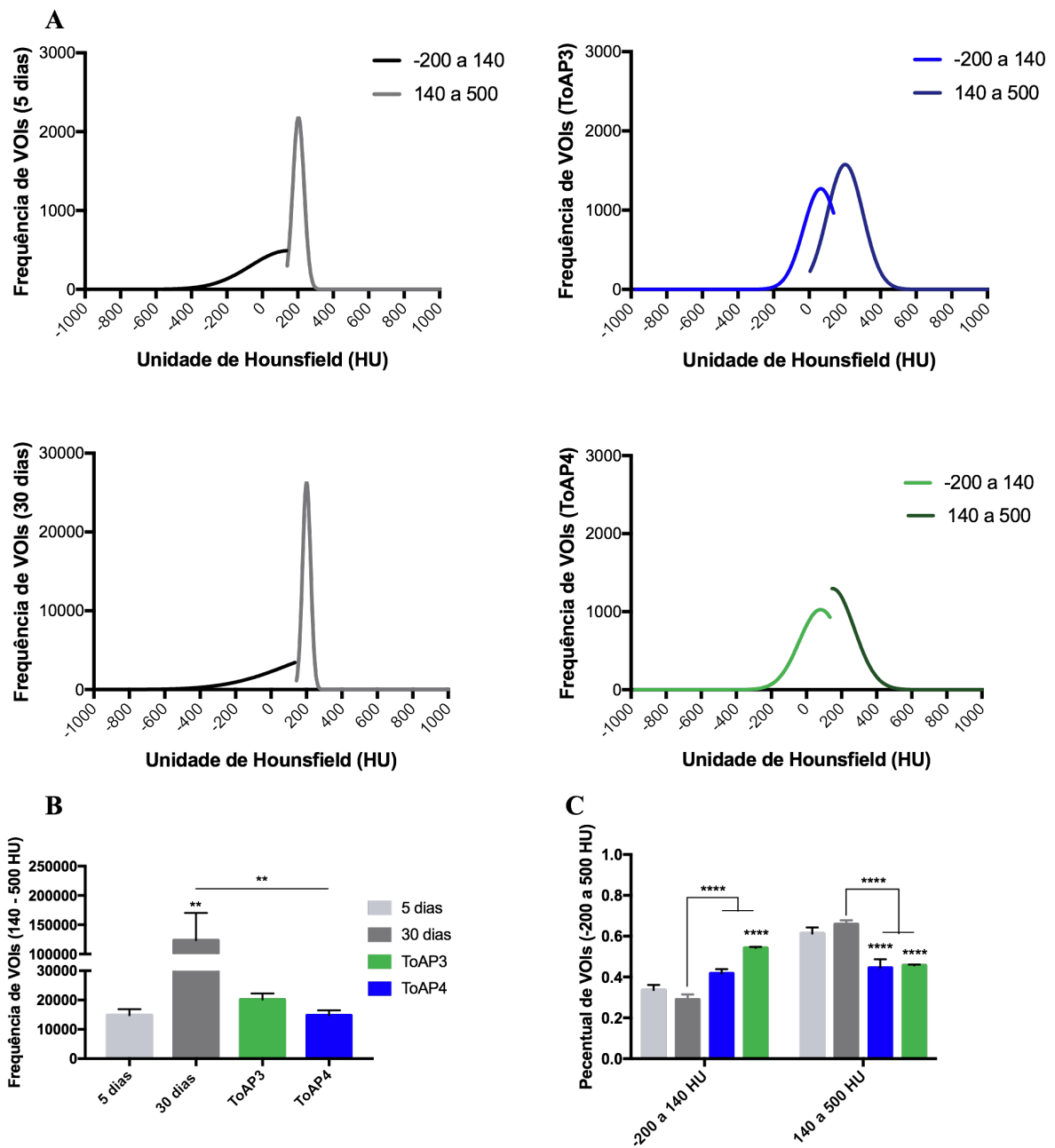
## **2. Análise morfológica dos pulmões dos camundongos instilados com bleomicina e tratados com ToAP3 e ToAP4**

Já tendo sido descritas propriedades imunomodulatórias de ToAP3 e de ToAP4, como a regulação da produção de TNF- $\alpha$  e NF $\kappa$ B, primeiro foi verificado se os peptídeos teriam capacidade de alterar a progressão da FPI (Veloso *et al.*, 2019). Para isso, no quinto dia após a instilação IT da BLM, iniciou-se o tratamento dos animais com os peptídeos. Durante o tratamento com duração de 30 dias, a progressão da lesão foi verificada por meio de imagens de  $\mu$ CT. A alteração da densidade do tecido foi avaliada por meio da sua relação direta com a escala de Hounsfield, que é baseada na atenuação de raios-X, conforme descrito no capítulo 2. Foi observado que as regiões de opacidade dos animais tratados com os peptídeos eram muito menores em contraste com o que foi observado para os animais no início do tratamento (5 dias após instilação de BLM) e para os animais não tratados com os peptídeos, cujos pulmões

se apresentavam com grandes zonas de opacificação (Figura 3.2). Estes resultados sugerem que houve um menor acúmulo de colágeno nos pulmões dos camundongos tratados com ToAP3 ou ToAP4. Essas observações foram confirmadas com o cálculo da frequência de VOIs encontrados nas imagens de  $\mu$ CT bem como percentual de VOIs de -100 a 140 HU, que foi de aproximadamente 45% para ambos os peptídeos, comparados com valores acima de 60% dos animais no 5º dia e 30º dia; e de 140 a 500 HU, com valores de aproximadamente 42% para ToAP3 e 54% para ToAP4 comparados com 34% e 29% no 5º e 30º dias, respectivamente. Isso indica que os peptídeos estão atuando na regulação da inflamação, de forma condizente com suas características descritas na literatura, e, por consequência, no desenvolvimento da fibrose. Dessa maneira, os mecanismos pelos quais os peptídeos estariam impedindo o aumento da cicatriz fibrótica dos pulmões dos animais após instilação da BLM está associados à regulação da inflamação, uma vez que o que é verificado um processo inflamatório após 5 dias da instilação que progride para um processo fibrótico (Figura 3.3).



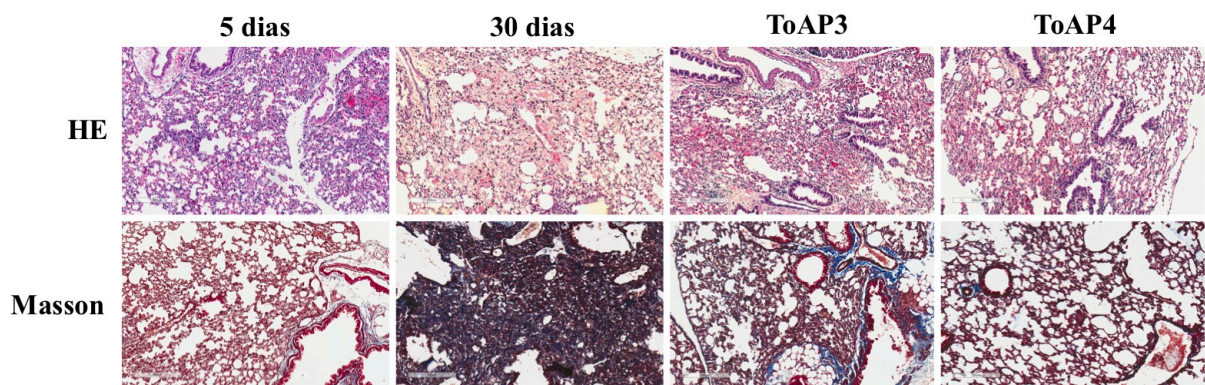
**Figura 3.2:** Imagem de  $\mu$ CT dos animais tratados que sofreram instilação com BLM e foram tratados com ToAP3 e ToAP4. Camundongos BALB/c foram submetidos à instilação IT com BLM ( $50 \mu\text{L}$ ,  $5 \text{ U/mL}$ ) e após 5 dias iniciou-se o tratamento intranasal com ToAP3 ou ToAP4 ( $20 \mu\text{l}$  a  $31,25 \mu\text{M}$ ). Os animais foram sedados e imagens adquiridas nos dias 5 e 30 após a instilação. As cabeças de setas brancas marcam as regiões de opacificação que sugerem o desenvolvimento de fibrose. Resultados são representativos de 2 experimentos independentes, cada um com 5 animais para cada grupo.



**Figura 3.3: Medidas da densidade pulmonar dos animais tratados com os peptídeos imunomodulatórios.**

Camundongos BALB/c foram submetidos ao tratamento IT com BLM (50  $\mu$ L, 5 U/mL) e após 5 dias iniciou-se o tratamento intranasal com ToAP3 ou ToAP4. Esses animais foram acompanhados para verificação do desenvolvimento fibrótico. (A) Foi medida a frequência de VOIs desses animais, (B) a diferença na sua frequência e (C) o percentual de VOIs na faixa de -200 a 500 HU. Resultados são representativos de 2 experimentos independentes. Frequência: One-way ANOVA, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , em comparação com o tempo de 5 dias. Percentual: Two-way ANOVA, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , em comparação com o tempo de 5 dias.

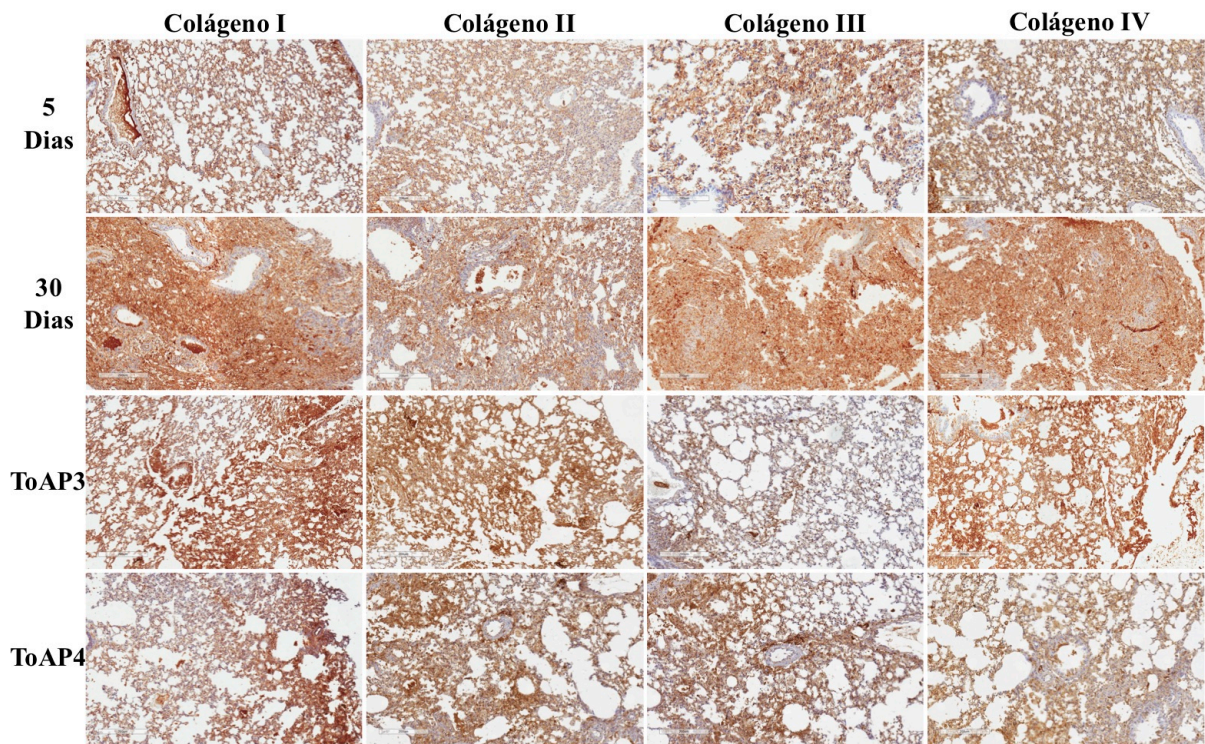
Para confirmar o que foi visualizado nos resultados do  $\mu$ CT, foram realizadas análises histopatológicas no tecido pulmonar desses animais ao final dos 30 dias de tratamento com os peptídeos. Não foram observadas alterações acentuadas na estrutura do tecido pulmonar entre o tempo de início (5 dias) e o final do tratamento (30 dias). O parênquima pulmonar desses animais apresentava-se com septos discretamente alargados, nos quais foi possível identificar vasos capilares dilatados e com a luz preenchida por hemácias. Verificou-se a presença de vias aérea de diferentes calibres, desde estruturas com parede constituída por fibromuscular e cartilagem e revestidas internamente por epitélio ciliado de padrão respiratório. Essas características demonstram que os peptídeos, quando analisamos as lâminas com coloração HE e tricrômio de Masson nesse modelo experimental, foram capazes de impedir a progressão da doença (Figura 3.4).



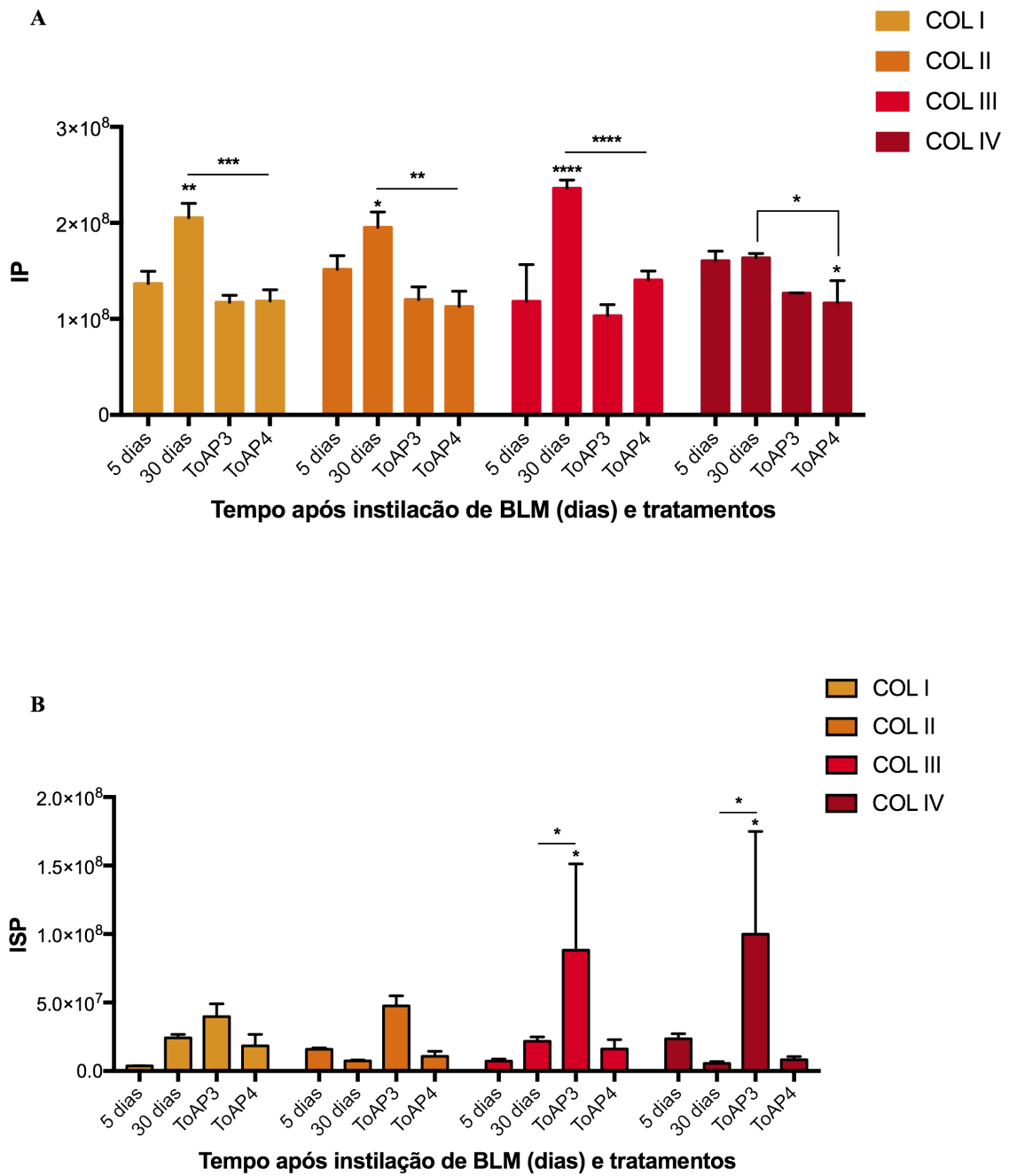
**Figura 3.4:** Avaliação histológica dos pulmões dos animais tratados com ToAP3 ou ToAP4 após serem instilados intratraquealmente com BLM. Camundongos BALB/c foram submetidos a instilação IT de BLM (50  $\mu$ L, 5 U/mL) e após 5 dias iniciou-se o tratamento intranasal com ToAP3 ou ToAP4. Esses animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> no 30º dia para a coleta de tecido pulmonar e análise histológica. HE e tricrômio de Masson, 1000 X. Barra preta equivalente a 200  $\mu$ m. Resultados são representativos de 2 experimentos independentes, cada um com 5 animais por ponto experimental.



Para verificar se há alguma alteração no tipo de colágeno depositado no tecido após o tratamento com ToAP3 ou ToAP4 após a instilação IT da BLM, realizamos a IHQ do tecido com marcações para colágeno I, colágeno II, colágeno III e colágeno IV. Não foi possível observar diferenças entre o início do tratamento (5º dia) e o momento em que esse se encerra (no 30º dia) de ambos os peptídeos na avaliação do colágeno I, do colágeno II e do colágeno III (Figura 3.5; Figura 3.6 A). Entretanto, embora não tenha sido possível observar diferenças na IP entre o 5º dia e o 30º dia após a instilação de BLM dos animais tratados com ToAP3 e ToAP4, há diferença significativa na ISP entre os animais tratados com ToAP3 e não tratados no 30º dia para o colágeno III, com ISP de  $8,82 \times 10^7$  e  $2,18 \times 10^7$ , respectivamente (Figura 3.6 B). Na avaliação do colágeno IV, há uma queda significativa entre os animais tratados com ToAP4 e os animais não tratados para IP, com uma média de  $1,64 \times 10^8$  para os camundongos não tratados e uma média de  $1,17 \times 10^8$  para os animais tratados com ToAP4. Além disso, na avaliação desse colágeno ISP também foi significativamente mais alta para ToAP3, sendo em média  $10^9$  para os animais tratados com este peptídeo e em média  $5,57 \times 10^6$  para os animais não tratados. Isso indica que o tratamento com ToAP3 pode ter sido menos eficiente que o tratamento de ToAP4 e, por essa razão, permitiu um maior acúmulo de colágeno III e de colágeno IV em algumas regiões onde foram encontrados com forte intensidade.

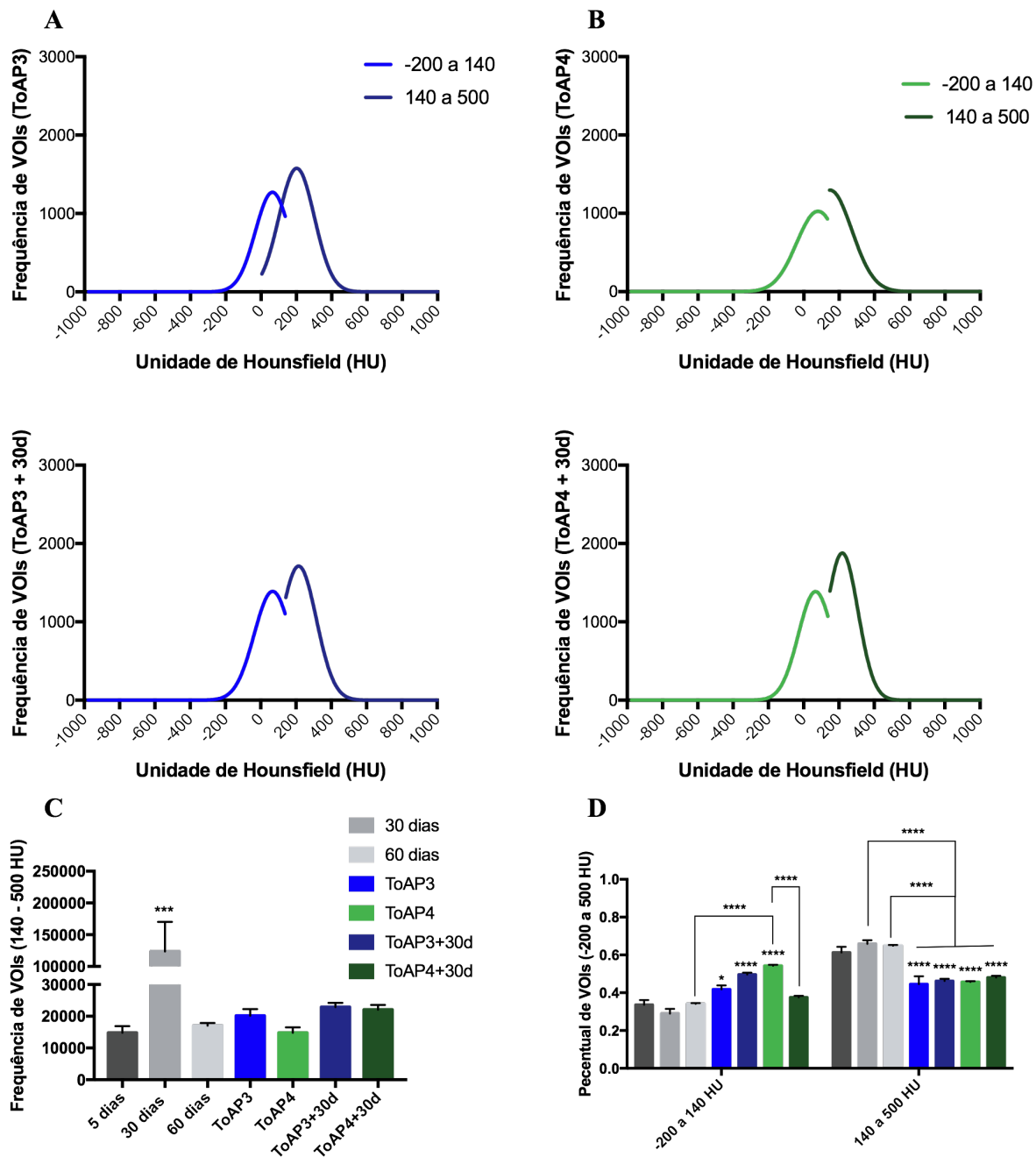


**Figura 3.5:** Análise imunohistoquímica dos pulmões dos animais tratados com ToAP3 ou ToAP4 após serem instilados intratraquealmente com BLM. Camundongos BALB/c foram submetidos a instilação IT de BLM BLM (50  $\mu$ L, 5 U/mL) e após 5 dias iniciou-se o tratamento intranasal com ToAP3 ou ToAP4. Esses animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> no 30º dia para a coleta de tecido pulmonar para análise colágeno I (A), colágeno II (B), colágeno III (C) e colágeno IV (D). Barra equivalente a 200  $\mu$ m.



**Figura 3.6: Quantificação de colágeno I, colágeno II, colágeno III e colágeno IV, tratados com ToAP3 ou ToAP4 após serem instilados intratraquealmente com BLM.** Camundongos BALB/c foram submetidos a instilação IT de BLM BLM (50  $\mu$ L, 5 U/mL) e após 5 dias iniciou-se o tratamento intranasal com ToAP3 ou ToAP4. Esses animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> no 30º dia para a coleta de tecido pulmonar e quantificação de colágeno I (A), colágeno II (B), colágeno III (C) e colágeno IV (D) para verificação da intensidade positiva (IP) e da intensidade fortemente positiva (ISP). Resultados são representativos de 2 experimentos independentes. Frequência: One-way ANOVA, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, em comparação com o tempo de 5 dias. Percentual: Two-way ANOVA, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, em comparação com o tempo de 5 dias.

Como os peptídeos tiveram a capacidade de retardar o processo fibrótico, objetivou-se saber se esse efeito seria apenas durante o tratamento e, se uma vez interrompido, a fibrose continuaria a se desenvolver. Para isso, animais que sofreram instilação com BLM e foram tratados com ToAP3 ou ToAP4 e quando tiveram seu tratamento finalizado, ao completar 30 dias, foram mantidos sob observação por mais 30 dias. Esses animais tiveram a morfologia do seu tecido pulmonar avaliada. Além disso, quando calculadas as frequências de VOIs entre 140 HU e 500 HU e o percentual de VOIs entre -200 HU e 500HU, foi observado que não houve diferenças entre a frequência de VOIs dos animais com 5 dias de instilação com BLM e os animais após 30 dias do término do tratamento com ToAP3 ou ToAP4. O percentual de VOIs entre 140 e 500 HU para os animais avaliados com 60 dias após a instilação com BLM e não tratados foi de 65%. Para e os camundongos que foram avaliados após 30 dias do final do tratamento com ToAP3 e ToAP4 o percentual de VOIs na mesma faixa de HU foi de 46% e 48%, respectivamente. Isso sugere que a densidade tecidual era menor nos pulmões desses animais que foram tratados com os peptídeos, e, portanto, haveria menor área de fibrose, mesmo 30 dias após o final do tratamento (Figura 3.7).



**Figura 3.7: Medidas da densidade pulmonar dos animais tratados com os peptídeos 30 dias após término do período de tratamento.** Camundongos BALB/c foram submetidos ao tratamento IT com BLM (50  $\mu$ L, 5 U/mL) e após 5 dias iniciou-se o tratamento intranasal com ToAP3 ou ToAP4. Após 30 dias da interrupção do tratamento esses animais foram avaliados por  $\mu$ CT. (A) Foi medida da frequência de VOIs desses animais, (B) as diferenças na sua frequência (C) e o percentual de VOIs na faixa de -200 a 500 HU. Resultados são representativos de 2 experimentos independentes. Frequência: One-way ANOVA, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , em comparação com o tempo de 5 dias. Percentual: Two-way ANOVA, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , em comparação com o tempo de 5 dias.

### **3. Avaliação da mecânica ventilatória dos animais tratados com ToAP3 ou ToAP4 após indução de fibrose com BLM.**

Um outro parâmetro avaliado foi a mecânica ventilatória de todos os animais, tratados ou não com os peptídeos ToAP3 e ToAP4. Os parâmetros avaliados foram Rrs, Crs, Ers, Rn, G, H.

No capítulo 2 já foram discutidas as alterações da mecânica ventilatória dos animais após estímulo com BLM, mostrando a piora de todos os parâmetros avaliados aos 30 dias após instilação. Ao avaliar Rrs desses animais, foi encontrado um aumento de cerca de 95% na resistência após 30 dias de instilação (Figura 2.8 A). Entretanto, ao completar 30 dias após instilação de BLM, mas com o tratamento com os peptídeos iniciando-se no 5º dia, houve redução significativa nesse parâmetro, com queda de cerca de 30% para ToAP3 e cerca de 35% para ToAP4, ficando próximo ao que foi encontrado no início do tratamento. Não foram observadas diferenças estatísticas entre o 5º dia e o 30º dia dos grupos que receberam s tratamentos com os peptídeos. Entretanto, os animais tratados com ToAP3 e ToAP4 ainda possuíam uma diferença estatística significativa quando comparados com os animais que não sofreram instilação, com Rrs cerca de 30% mais alto para ambos os peptídeos (Figura 3.8 A). Após 30 dias do final do tratamento, esses animais continuam a apresentar Rrs cerca de 35% mais baixa do os animais após 30 dias da instilação IT e sem tratamento (Figura 3.8 A). Esses resultados estão de acordo com os parâmetros morfológicos avaliados que mostram que não há evolução do processo fibrótico após o final do período do tratamento (Figuras 3.4, 3.5, 3.6). Além disso, foi possível observar uma diminuição significativa entre os animais tratados com ToAP3 no 30º dia e os animais tratados com esse mesmo peptídeo avaliados posteriormente à interrupção do tratamento (cerca de 23% mais baixo), indicando um processo de melhora contínua significativa (Figura 3.9 A).

Ao analisar Crs foi observada grande melhora da capacidade de extensão do sistema respiratório, chegando a cerca de 80% a mais para ToAP3 e cerca de 55% a mais para ToAP4 do que encontrado para os animais não tratados (Figura 3.8 B). Uma vez que Crs e Ers são parâmetros opostos, o mesmo padrão visto para Crs foi visto para Ers, com grande diminuição das medidas de elastância nos animais tratados com os peptídeos, embora que para ambos os parâmetros, da mesma maneira como para Rrs, ainda existisse diferenças significativas entre os animais que não sofreram instilação e os camundongos tratados com os peptídeos (Figura 3.8 B e C). Para ambos os parâmetros, após 30 dias da finalização do tratamento, os animais se mantiveram estatisticamente diferentes dos animais não tratados no 30º dia de após a instilação de BLM, com Ers cerca de 70% mais baixa para ToAP3 e cerca de 50% mais baixa para ToAP4. Entretanto, com o passar do tempo há uma piora em Crs para ambos os peptídeos quando comparados com o momento do final do tratamento, sendo cerca de 4% mais baixo no 30º dia após o término do tratamento (Figura 3.8 B). Curiosamente, essa piora é observada em Ers apenas para os animais tratados com ToAP4 (Figura 3.9 C). É possível que a piora observada entre os grupos ToAP3 e ToAP3 + 30 dias, mesmo se apresentado estatisticamente significativa, não tenha relevância biológica, uma vez que o mesmo não foi observado para Ers (Figura 3.9 B e C).

No modelo, assim como foi observado aumento em Rrs, foi também observado aumento significativo em Rn (Figura 2.8 A e D). Com o tratamento com os peptídeos, embora as medidas ainda fossem mais altas que no início do tratamento, houve um queda significativa na Rn, sendo essa queda de cerca de 45% para ToAP3 e de cerca de 60% para ToAP4 em comparação aos animais após 30 dias sem tratamento, apenas instilados com BLM (Figura 3.8 D). Essa diferença torna-se ainda maior com o passar do tempo, sendo aproximadamente 23%

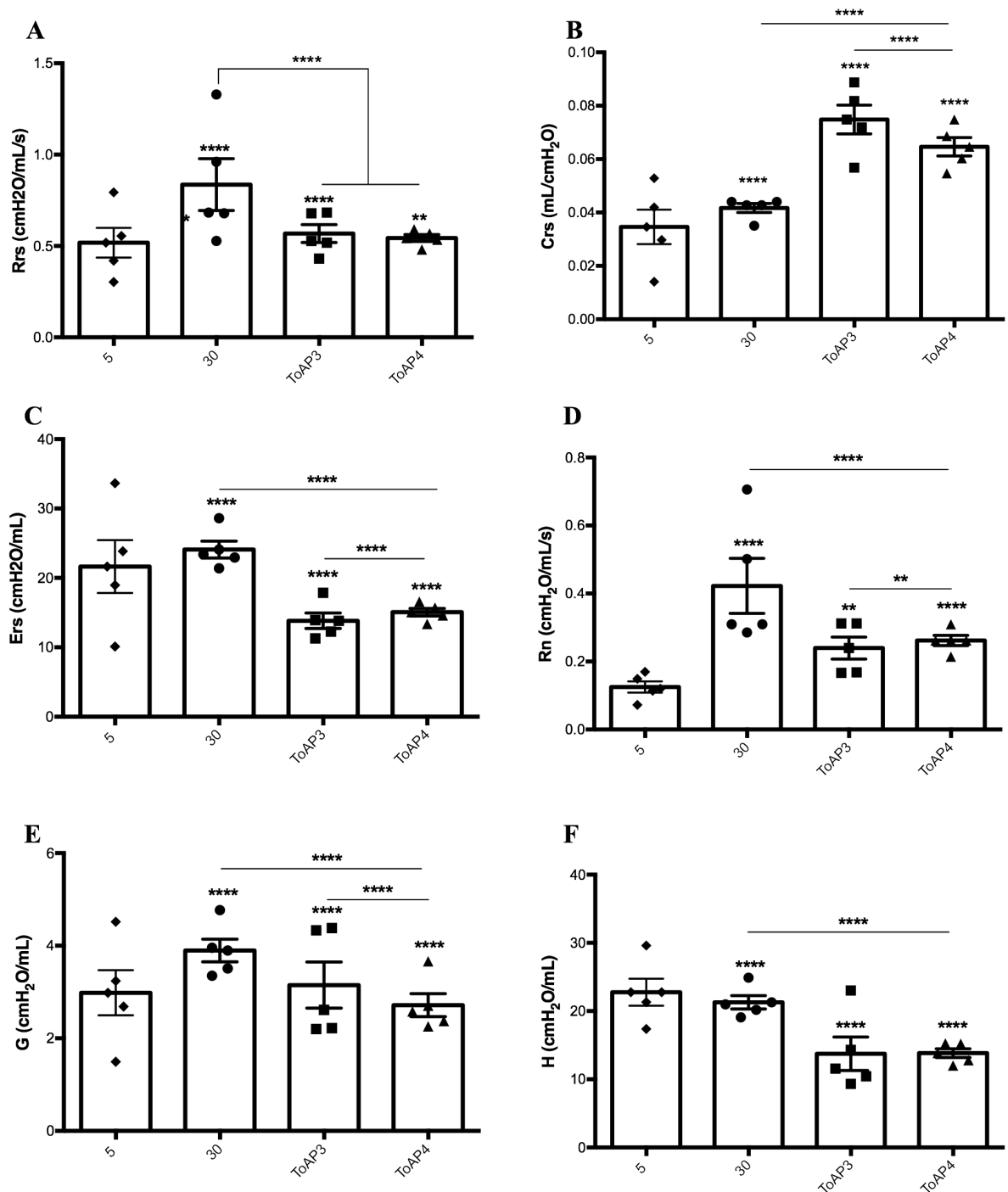
menor para ambos os peptídeos entre o final do tratamento e os animais avaliados posteriormente (Figura 3.9 D).

Com relação ao parâmetro G, que é relacionado com a energia de dissipação dos alvéolos e intimamente ligado com a resistência, cujo aumento reflete piora na capacidade respiratória, observou-se um aumento gradual de G até os 30 dias no grupo não tratado apenas instilado com BLM (Figura 2.8 E), entretanto após o tratamento com os peptídeos foi observada uma diferença significativa entre os grupos de 30 dias e peptídeos, com diminuição de cerca de 20% para ToAP3 e de cerca de 30% para ToAP4, sendo que ToAP4 apresentou-se aproximadamente 10% mais baixo do que para os animais no grupo com 5 dias de evolução (Figura 3.8 E). Os animais tratados com os peptídeos se mantiveram com G significativamente mais baixo do que os animais sem tratamento mesmo após 30 dias do final do tratamento, sendo que há uma queda contínua nos valores de G para os animais tratados com ToAP3 (cerca de 6%), em contraste com o que ocorreu com os grupos de animais tratados com ToAP4 (Figura 3.9 E).

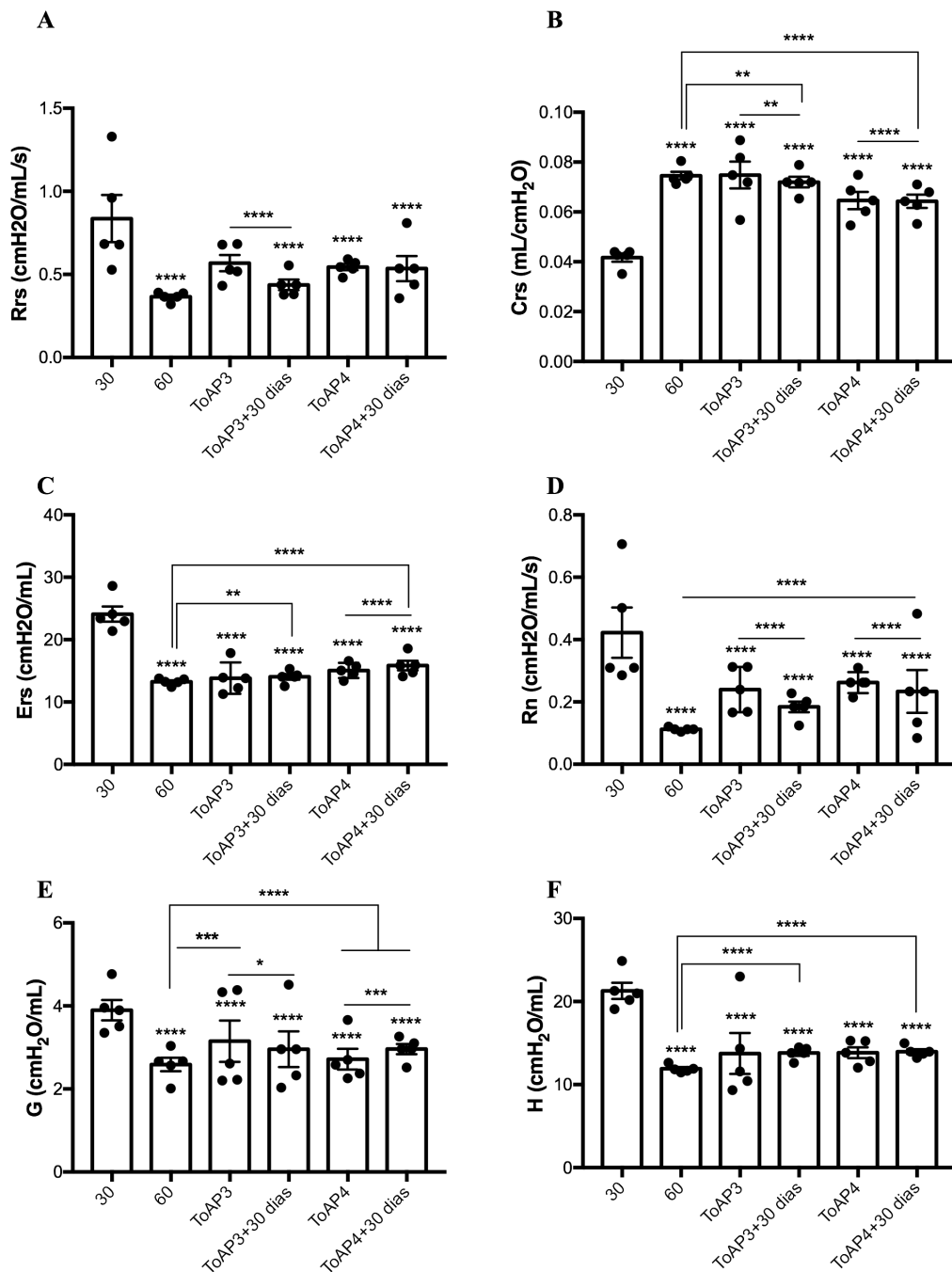
Ainda relacionado com alterações no parênquima pulmonar, H é um parâmetro que reflete a energia de conservação dos alvéolos. Dessa forma, quanto maior H, maior a energia necessária para expansão do tecido nos alvéolos, podendo esse fenômeno ser relacionado com inflamação e fibrose. Ambos os peptídeos têm capacidade anti-inflamatória, o que poderia explicar a melhora de todos os parâmetros observados, incluindo H. Na avaliação de H, é possível observar valores cerca de 35% menores do que os encontrados para os animais não tratados, apenas instilados com BLM (Figura 3.8 F). Esse padrão permanece nos animais avaliados 30 dias após a interrupção do tratamento com os peptídeos (Figura 3.9 F).



Como até o 30º dia é observado um processo inflamatório no pulmão dos animais, com gradual depósito de colágeno (Figura 2.2), foi suposto que o controle dessa inflamação não só resultaria em em uma diminuição do infiltrado celular, que dificulta a mecânica ventilatória dos pulmões, como controlaria o processo fibrótico com o estabelecimento de um processo inflamatório crônico. Os dados da mecânica ventilatória confirmam esta hipótese.



**Figura 3.8:** Avaliação da mecânica ventilatória dos animais tratados com ToAP3 ou ToAP4. Camundongos BALB/c sofreram instilação IT de BLM (50  $\mu$ L, 5 U/mL) e depois de 5 dias iniciou-se tratamento com ToAP3 ou ToAP4. Quando completados 30 dias da instilação, esses animais foram sedados e anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina (15 mL/kg e 0,1 mL/kg, respectivamente) e submetidos a traqueostomia para serem acoplados ao ventilador mecânico. Foram averiguados os parâmetros de (A) resistência do sistema respiratório - Rrs, (B) complacência do sistema respiratório- Crs, (C) elastância do sistema respiratório - Ers, (D) resistência Newtoniana - Rn, (E) amortecimento tecidual - G e (F) elastância tecidual - H. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , em comparação com o tempo de 5 dias.



**Figura 3.9: Avaliação da mecânica ventilatória após 30 dias do final do tratamento com ToAP3 ou ToAP4.**

Camundongos BALB/c sofreram instilação IT de BLM (50  $\mu$ L, 5 U/mL) e depois de 5 dias iniciou-se tratamento com ToAP3 ou ToAP4. Quando completados 30 dias após a instilação, esses animais foram mantido em observação por mais 30 dias, para então serem sedados e anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina (15 ml/kg e 0,1 mL/kg, respectivamente) e submetidos a traqueostomia para serem acoplados ao ventilador mecânico. Foram averiguados os parâmetros de (A) resistência do sistema respiratório - Rrs, (B) complacência do sistema respiratório- Crs, (C) elastância do sistema respiratório - Ers, (D) resistência Newtoniana - Rn, (E) amortecimento tecidual - G e (F) elastância tecidual - H. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , em comparação com o tempo de 30 dias.

#### 4. Quantificação de citocinas

As citocinas podem apresentar papéis anti-fibróticos e/ou pró-fibróticos. No modelo aqui estudado, quantificamos as citocinas tanto no BALF (Figura 3.10 A) como no interstício pulmonar (Figura 3.10 B) dos animais instilados com BLM.

Com o dano tecidual que inicia-se todo o processo, ocorre a liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que são reconhecidos por células do sistema imune. A partir desse reconhecimento, ativam-se vias de sinalização que culminam na expressão de citocinas. Uma delas é o TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos e muitas outros tipos celulares. Essas células são responsáveis pela sua produção no pulmão, após exposição a sílica, amianto e BLM. Nos camundongos BALB/c instilados intratraquealmente com BLM, observou-se o aumento da produção de TNF- $\alpha$  no BALF nos primeiros 15 dias (Figura 3.10 A), caindo a sua disponibilidade aos 30 dias e com um pequeno aumento aos 60 dias. Algumas diferenças foram observadas nos níveis dessa citocina no interstício, com níveis altos ao longo dos 60 dias (Figura 3.10 B). TNF- $\alpha$  está presente em pulmões de pacientes com FPI (Piguet *et al.*, 1993; Pan *et al.*, 1996 *appud* Agostini & Gurrieri, 2006). Além disso, camundongos modificados para terem a expressão de TNF- $\alpha$  aumentada no pulmão desenvolvem FP progressiva (Miyazaki *et al.*, 1995). A presença de dessa citocina não só contribui para o dano tecidual como, quando em concentrações não tóxicas, estimula o crescimento de fibroblastos e promove a diferenciação em miofibroblastos de células mesenquimais pulmonares, além do aumento dos níveis de mRNA dessa citocina nos pulmões, após o estímulo com BLM, estar associado ao processo fibrótico (Vilcek *et al.*, 1986; Duncan & Berman, 1989; Piguet *et al.*, 1990; Phan & Krunkel, 1992; Piguet *et al.*, 1993 Sullivan *et al.*, 2005; Kamitani *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2018). Esse processo ocorre por meio da ativação da via de sinalização de NF- $\kappa$ B que, em conjunto com TGF- $\beta$ , são capazes

de induzir as células alveolares do tipo II a alterarem a sua morfologia para um célula do tipo fibroblasto que expressa altos níveis de  $\alpha$ -SMA associada a fibrilas (Vilcek *et al.*, 1986; Piguet *et al.*, 1990; Willis *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2018).

Em modelos experimentais, a utilização de anticorpos anti-TNF- $\alpha$  ou do seu receptor recombinante solúvel (rsTNFR- $\beta$ ) é eficiente para a prevenção do desencadeamento do processo fibrótico (Piguet *et al.*, 1990; Piguet *et al.*, 1990; Piguet & Vesin, 1994). Testes clínicos foram iniciados para investigar se inibidores da via de TNF- $\alpha$  poderiam ser benéficos no tratamento de FPI (Raghu *et al.*, 2008). Entretanto, o bloqueio da atividade de TNF- $\alpha$  já se mostrou danoso em indivíduos com artrite reumatoide que apresentam FP, além de ter efeitos pouco significativos no tratamento de FPI (Imaizumi *et al.*, 2006; Raghu *et al.*, 2008; Thavarajah *et al.*, 2009).

Outra citocina pró-inflamatória com possível importância para o contexto da FPI é a IL-1 $\beta$ . A análise no BALF mostrou um aumento de IL-1 $\beta$  ao longo de 30 dias, com uma brusca queda ao 60º dia (Figura 3.10 A). Porém, no interstício essa citocina se manteve alta durante os 60 dias do experimento (Figura 3.10 B). A interleucina 1 (IL-1) é encontrada nos pulmões de pacientes com FPI e, assim como TNF- $\alpha$ , pode induzir dano agudo no pulmão e contribuir para a progressão da FP (Pan *et al.*, 1996 *appud* Agostini & Gurrieri, 2006; Kolb *et al.*, 2001). Essa citocina é capaz de aumentar a produção de fibroblastos de forma dependente de PDGF, além de aumentar a produção de colágeno, glicosaminoglicana e a atividade da colagenase (Duncan & Berman, 1989; Raines *et al.*, 1989). Em alguns trabalhos, a produção de IL-1 por macrófagos alveolares nos modelos experimentais é detectada apenas nos primeiros dias após estímulo com BLM (Suwabe *et al.*, 1988; Phan & Kunkel, 1992). O seu papel é, aparentemente, mais relevante no início do processo que leva à FPI, pois essa citocina é pouco detectada em períodos mais tardios dos modelos experimentais (Suwabe *et al.*, 1988;

Phan & Kunkel, 1992). Dessa forma, IL-1 $\beta$  tem um papel controverso no desenvolvimento da fibrose. Enquanto esta citocina pode ser importante durante o início do processo fibrótico, a expressão de altos níveis dela em uma fase mais tardia poderia agir como indutora da apoptose de miofibroblastos (Phan *et al.*, 1992; Allen & Spiteri, 2002). O seu papel fibrótico tem relação não só com o aumento da inflamação podendo, assim, contribuir para o dano tecidual, mas também com a sua capacidade de induzir a produção de PDGF. Este, além de ser liberado em altos níveis por macrófagos alveolares retirados de pulmões com FPI, em um modelo de fibrose induzida por radiação aparece nas primeiras 72 horas (Martinet *et al.*, 1987; Raines *et al.*, 1988; Abdollahi *et al.*, 2005). Isso corroboraria com a importância de IL-1 no início do processo fibrótico, uma vez que a família de PDGF é um dos principais fatores de crescimento responsáveis por regular a proliferação de tecidos conectivos, cooperando com outros mediadores no estímulo da proliferação de fibroblastos (Martinet *et al.*, 1986 Raines *et al.*, 1989). Nos resultados mostrados neste trabalho foi possível observar a produção de IL-1 $\beta$  ao longo dos primeiros 30 dias após o tratamento com BLM, acompanhando o desenvolvimento fibrótico (Figura 3.11). Posteriormente, não foi possível observar diferenças estatísticas nos níveis dessa citocina, quando comparados ao 30º dia no interstício pulmonar, enquanto os níveis decaíram drasticamente no BALF. Esse padrão é consistente com a necessidade dessa citocina para o estabelecimento da fibrose e corrobora com a cronicidade da doença no modelo animal aqui proposto.

A IL-17 é uma terceira citocina pró-inflamatória que é reportada como importante para a manutenção da inflamação que leva ao processo fibrótico. Entretanto, não foi possível observar diferenças significativas na presença dessa citocina nos animais tratados em comparação com animais não tratados nem no BALF e nem no interstício pulmonar (Figura 3.10). Embora não tenha sido possível observar diferenças estatísticas entre os tempos

estudados, há uma tendência de aumento de IL-17 que pode ser biologicamente relevante, uma vez que essa citocina está relacionada tanto com a produção de outras citocinas que fazem parte da construção do perfil fibrótico, além de algumas MMPs (Collins *et al.*, 2016).

Diversos estudos evidenciam o papel importante dos linfócitos Th1 e Th2 durante a fase inflamatória e de manutenção da FP (Wynn *et al.*, 1995). Analisando as citocinas do padrão Th1/Th2, observamos que após o tratamento dos animais com BLM, os níveis de IL-10 no BALF e no interstício pulmonar aumentaram até o 15º dia, decaindo significativamente nos dias que seguiram (Figura 3.10). Citocinas regulatórias e citocinas com perfil Th2 tem um grande papel na cicatrização tecidual e na formação da fibrose. A IL-10 é uma citocina regulatória que tem o aumento da sua produção relacionado com aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias que acompanham o dano tecidual induzido pela BLM nos pulmões. Os dados presentes neste trabalho mostram um aumento da produção de IL-10 nos primeiros 15 dias após instilação de BLM, mas enquanto os níveis de IL-1 $\beta$  continuaram aumentando após 30 dias de tratamento, os níveis de IL-10 voltaram às concentrações similares às dos animais controle (Figura 3.11). Em um modelo utilizando camundongos deficientes para IL-10, a inflamação pulmonar após tratamento com BLM em relação aos animais selvagens diminuiu, entretanto não houve diferenças no grau de fibrose observado, sugerindo um importante papel da IL-10 na regulação da inflamação, mas não no controle da formação da fibrose (Kradin *et al.*, 2004). Em contra partida, num modelo onde há super expressão de IL-10, a longo prazo os animais apresentaram FP induzida pelo recrutamento de fibrócitos e ativação alternativa de macrófagos (Sun *et al.*, 2011). O aumento da IL-10, em conjunto com IL-4, tem papel na indução do perfil M2 de macrófagos, que, por sua vez, tem importante papel no processo de cicatrização e formação da cicatriz fibrótica após a lesão tecidual (Pechkovsky *et al.*, 2010). O aumento dos níveis de IL-10 que foi aqui observado

pode ter sido de fundamental importância para a alteração do perfil dos macrófagos de M1 para M2 e recrutamento de fibrócitos, uma vez que o início da deposição de colágeno nos camundongos BALB/c tratados com BLM foi observada após 15 dias de tratamento (Figura 2.2)

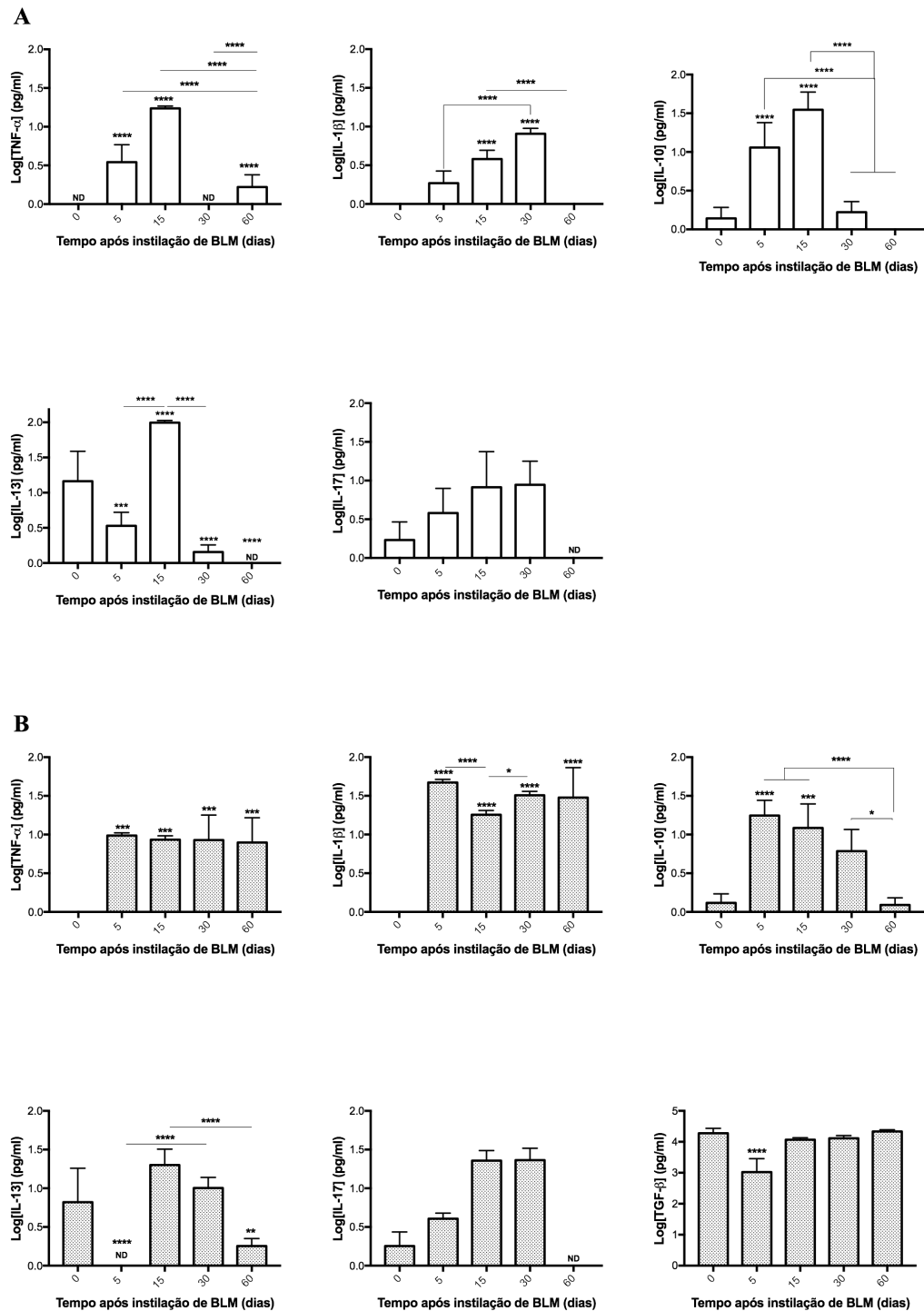
Outra citocina envolvida com a resposta Th2 é IL-13 que tem sido associada ao desenvolvimento de fibrose em uma variedade de doenças inflamatórias crônicas (Wynn, 2004). Portanto, essa é uma citocina considerada pró-fibrótica e tem a habilidade de ativar TGF- $\beta$ , cujo aumento está também relacionado ao aumento do mRNA de *Arginase* (Belperio *et al.*, 2004). Neste trabalho, foi possível observar no BALF o pico de produção de IL-13 após 15 dias do tratamento com BLM (Figura 3.10 A). Entretanto, no interstício apenas é possível observar a queda de IL-13 em relação ao controle no 5º e 60º dias (Figura 3.10 B). Apenas foi verificada a queda dos níveis aos 5 dias após a instilação de BLM, condizendo com o aumento de inflamação observado no tecido (Figura 3.10 B). Camundongos geneticamente modificados que especificamente super expressam IL-4 ou IL-13 no pulmão mostram que ambas citocinas atuam como mediadores pró-fibróticos por influenciar direta e indiretamente na ativação de miofibroblastos (Rankin *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1999). Da mesma forma, estudos conduzidos com inibidores de IL-4 e IL-13 ou camundongos deficientes para essas citocinas e seus receptores sugerem que a sinalização por IL-13 é o indutor dominante na fibrose dependente de Th2 em diversas doenças crônicas pulmonares (Chiaramonte *et al.*, 1999; Belperio *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2002; Huaux *et al.*, 2003; Kolodsick *et al.*, 2004). Na FPI IL-13 é detectado no lavado brônquico de pacientes e seus fibroblastos são hiper-responsivos à essa citocina, além de ter a sua expressão e a de seu receptor correlacionadas com a severidade da doença (Murray *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009). Nesse contexto, seu



papel aparentemente é mais importante que o da IL-4 pois ela pode induzir seletivamente a produção de TGF- $\beta$  (Belperio *et al.*, 2002; Belperio *et al.*, 2004).

Por último, TGF- $\beta$  é uma citocina fundamental para o processo de cicatrização e para o processo fibrótico. Embora TGF- $\beta$  seja um potente estimulador para a produção de colágeno, não foi possível ver qualquer alteração significativa nos seus níveis quando comparamos com os camundongos não tratados quando a FP iniciava seu estabelecimento no tecido (Figura 3.10 B). A citocina TGF- $\beta$  tem um papel central no desenvolvimento fibrótico. Ela é secretada em sua forma inativa no tecido, associada a uma proteína de latência chamada proteína ligante de TGF- $\beta$  latente (LTBP). Possivelmente não foi possível observar diferenças nos níveis dessa citocina nas dosagens do interstício pois ali é dosada a proteína latente, não sendo possível quantificar a proteína ativa que é quem exerce a atividade no tecido. Para a quebra da latência de TGF- $\beta$ , é necessário que a integrina  $\alpha\beta6$  reconhece a isoforma 1 da LTBP (LTBP-1), a qual possui alta afinidade, sendo essa ativação de TGF- $\beta$  específica para os complexos que possuem LTBP-1 (Annes *et al.*, 2004). Dessa maneira, uma vez que o complexo TGF- $\beta$ /LTBP-1 é reconhecido pela integrina  $\alpha\beta6$ , as duas subunidades se desprendem uma da outra e a forma ativa de TGF- $\beta$  é liberada. Como já mencionado, a ativação de TGF- $\beta$  pela integrina  $\alpha\beta6$  presente CEAs tem um papel central no desenvolvimento da FP, aparecendo aumentada tanto em doentes com padrão PIU nos pulmões como em pulmões de modelos murinos induzidos por BLM (Sakai & Tager, 2013).

Falar mais na importância do TGF- na fibrose



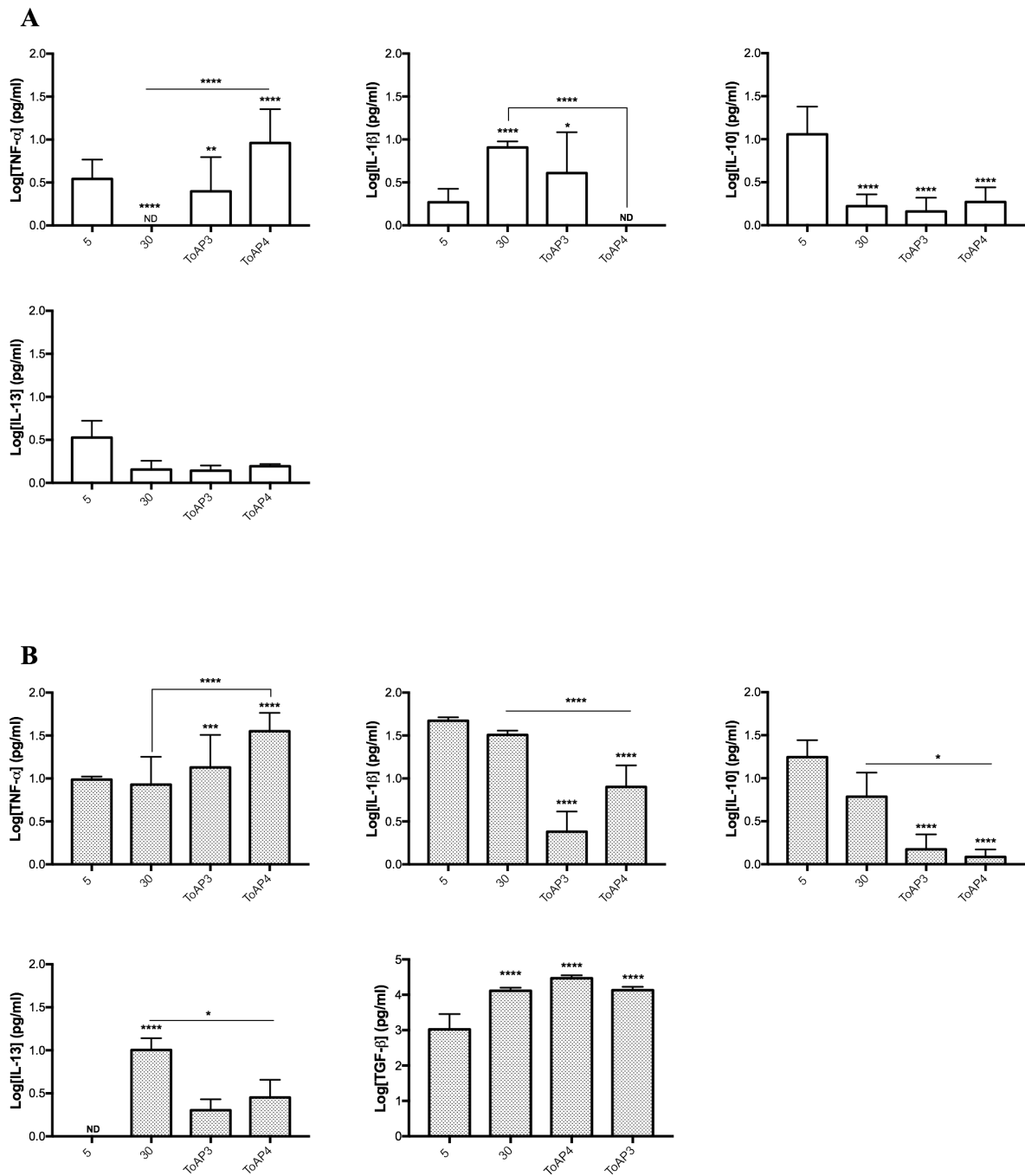
**Figura 3.10: Concentração de citocinas encontrada nos pulmões de animais tratados com BLM.** Camundongos BALB/c foram submetidos a instilação IT de BLM (50  $\mu$ L, 5 U/mL) e após 5, 15, 30 e 60 dias, esses animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> para a coleta de BALF e tecido pulmonar para quantificação de citocinas. (A) As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-13 foram quantificadas no BALF e (B) as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  foram quantificadas no interstício pulmonar. Resultados são representativos de 2 experimentos independentes, cada um utilizando 5 animais por grupo experimental. Os dados do ELISA foram analisados utilizando *two-way* ANOVA. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , em comparação com o tempo de 0 dias.

Ao tratar os animais com os peptídeos ToAP3 e ToAP4, foram observadas alterações nos padrões de citocinas em relação aos observados nos animais tratados apenas com BLM. No BALF foi possível observar que não houve a mesma queda de TNF- $\alpha$  nos animais tratados com ambos os peptídeos, embora os animais tratados com ToAP3 ainda apresentassem níveis mais baixos dessa citocina ao início do tratamento (Figuras 3.10 A). Os animais tratados com ToAP4 não apresentaram diferenças entre os níveis dessa citocina em relação aos animais no início do tratamento. Após o final do tratamento, TNF- $\alpha$  cai drasticamente (Figura 3.11 A). No interstício, esse padrão diferiu do BALF, sem evidenciar essa queda após 30 dias e com os níveis da TNF- $\alpha$  apresentando-se significativamente mais altos nos animais ao final do tratamento do que no período de seu início (Figura 3.10 B). Os níveis de TNF- $\alpha$  aumentam no interstício pulmonar 30 dias após o final do tratamento (Figura 3.11).

Esses padrões diferentes entre o BALF e o interstício são observados para a citocina IL-1 $\beta$  nos animais tratados com ToAP3 ou ToAP4. Como já dito, IL-1 $\beta$  aumentou no BALF ao longo dos 30 primeiros dias e apenas os animais tratados com ToAP4 mostraram queda significativa dos níveis dessa citocina (Figura 3.10 A). Essa queda foi significativa tanto em comparação com o início da tratamento como em comparação ao 30º dia após a instilando de BLM. Ao finalizar o tratamento, os níveis dessa citocina caem no BALF para ambos os grupos tratados com peptídeos (Figura 3.11 A). Já no interstício, houve diferenças entre os peptídeos, o início do tratamento, e o 30º dia dos animais instilados com BLM. ToAP3 e ToAP4 aparentam ter sido capazes de controlar a secreção de IL-1 $\beta$ , porém esse controle não se manteve após um mês da última dose de cada um dos peptídeos (Figuras 3.10 B e 3.11 B).

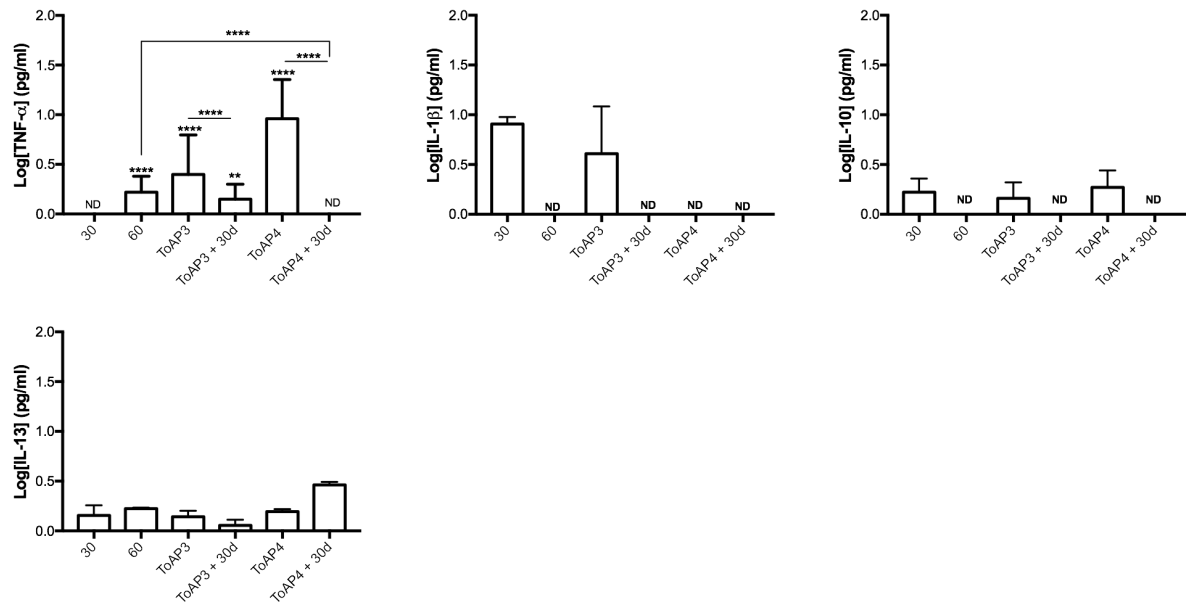
Ao avaliar IL-10 foi observada grande diminuição nos níveis dessa citocina tanto no BALF como no interstício pulmonar dos animais tratados com ToAP3 ou ToAP4, mesmo 30 dias após a última dose dos peptídeos (Figuras 3.10 e 3.11). No entanto, ao avaliar a IL-13, diferenças significativas nos níveis dessa citocina foram observadas somente no interstício dos pulmões, onde os animais tratados tiveram níveis de citocinas significativamente mais baixos dos que os animais após 30 dias da instilação de BLM (Figura 3.10). Essa diferença permanece após 30 dias do fim do tratamento nos camundongos tratados com ToAP4, enquanto ela desaparece nos animais tratados com ToAP3 (Figura 3.11 B).

O TGF- $\beta$ , teve seus níveis diminuídos nos animais tratados com ToAP3, mas não nos animais tratados com ToAP4. Essa diferença pode estar relacionada com diferenças nos mecanismos de ação de cada um desses peptídeos para exercer seu efeito antifibrótico por meio da sua regulação da RI.

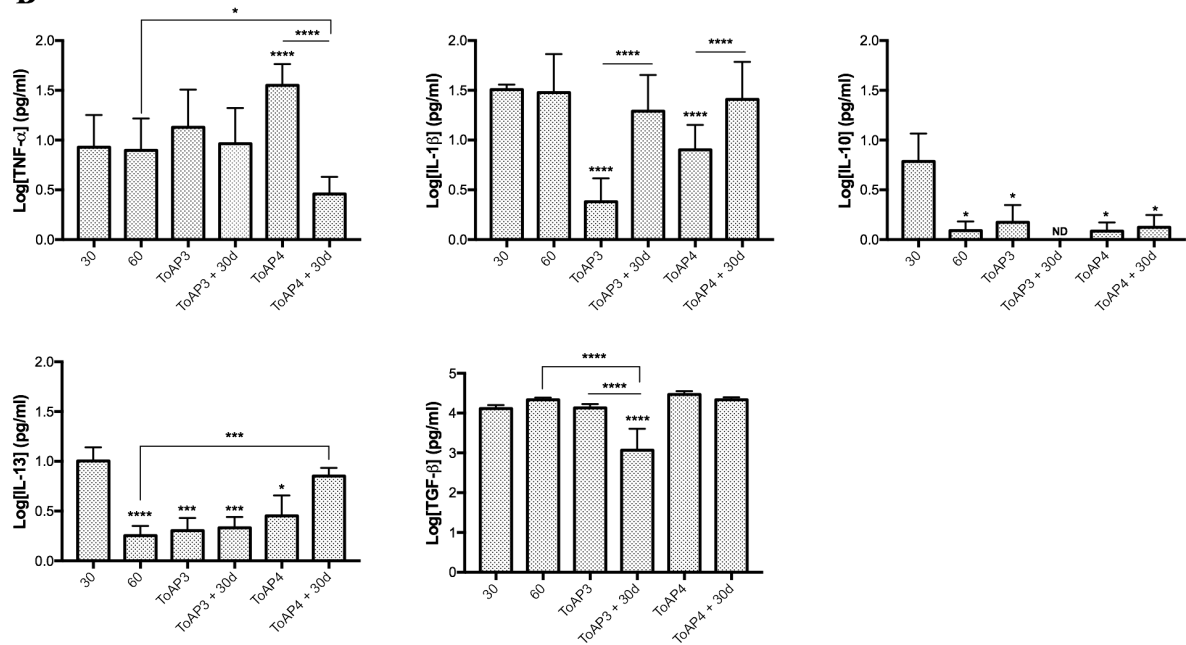


**Figura 3.11: Concentração de citocinas encontrada nos pulmões de animais com ToAP3 ou ToAP4.** Após instalação, IT de BLM (50  $\mu$ L, 5 U/mL) iniciou-se após 5d o tratamento intranasal dos camundongos com ToAP3 ou ToAP4. (A) As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-13 foram quantificadas no BALF dos animais e (B) as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  foram quantificadas no interstício pulmonar destes mesmo animais. Resultados são representativos de 2 experimentos independentes, cada um utilizando 5 animais por grupo experimental. Os dados do ELISA foram analisados utilizando *two-way* ANOVA. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , em comparação com o tempo de 5 dias.

A



B



**Figura 3.12: Concentração de citocinas encontrada nos pulmões de animais tratados com ToAP3 ou ToAP4 após 30 dias do final do tratamento.** Camundongos BALB/c foram submetidos a instilação IT de BLM (50 $\mu$ l, 5 U/ml) e tratados ToAP3 ou ToAP4. Após 30 dias da instilação de BLM o tratamento foi interrompido e após 30 dias da interrupção o fragmentos dos pulmões desses animais foram recolhidos para a quantificação de citocinas por ELISA. (A) Após 30 dias da interrupção do tratamento as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-13 foram quantificadas no BALF dos animais e (B) no interstício pulmonar. Resultados são representativos de 2 experimentos independentes, cada um utilizando 5 animais por grupo experimental. Os dados do ELISA foram analisados utilizando *two-way* ANOVA. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , em comparação com o tempo de 30 dias..

## 5. Quantificação de transcritos *Arginase 1*, *Nfkb*, *STAT4* and *iNOS* no tecido pulmonar

Por ser uma doença com um período inicial inflamatório e uma troca de perfil para um perfil fibrótico, a FPI possui, em diferentes momentos, características de ambos os perfis de RI. Para compreender melhor o desenvolvimento dessa doença, correlacionando com as características encontradas no modelo murino que utiliza BALB/c tratados com BLM, o mRNA total do tecido pulmonar foi extraído dos camundongos para a quantificação dos níveis de transcrito de *Arginase 1*, *Nfkb* e *iNOS*, durante o desenvolvimento fibrótico e após tratamento com ToAP3 ou ToAP4.

Foram utilizados um marcador de perfil de Th1, a *iNOS*, e um marcador de perfil Th2, a *Arginase 1*, da RI. Foram utilizados ainda dois fatores de transcrição, o NF- $\kappa$ B e o *STAT4*, envolvidos no perfil pró-inflamatório e regulatório da RI. Os níveis de acúmulo de transcrito de *Nfkb* e *iNOS*, todos aumentaram significativamente depois de 30 dias do tratamento.(Figura 3.12 A). Como já mencionado, as respostas inflamatórias estão associadas com o início da patogênese da FPI, estando o NF $\kappa$ B envolvido na regulação de diversos genes associados a citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas (Inayama *et al.*, 2006; Wilson & Wynn, 2009). Neste trabalho, foi possível observar o aumento da produção de TNF- $\alpha$  15 dias após tratamento com BLM tanto no BALF como no interstício (Figura 3.10), em contraste com outros trabalhos da literatura (Phan *et al.*, 1992). Essa incompatibilidade dos resultados pode ter se dado devido ao uso de metodologias mais sensíveis para a quantificação de citocinas. Em adição, foram encontrados altos níveis de TNF- $\alpha$  no interstício pulmonar no 30º dia, um dado compatível com os observados utilizando a técnica de PCR, quando os níveis mais altos de transcrito de NF $\kappa$ B se apresentaram 30 dias após a instilação com BLM (Figura

3.12 A). O acúmulo de mRNA de iNOS comumente tem seu aumento acompanhado pelo aumento de NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$ , assim como os dados apresentados mostraram (Figura 3.12 A).

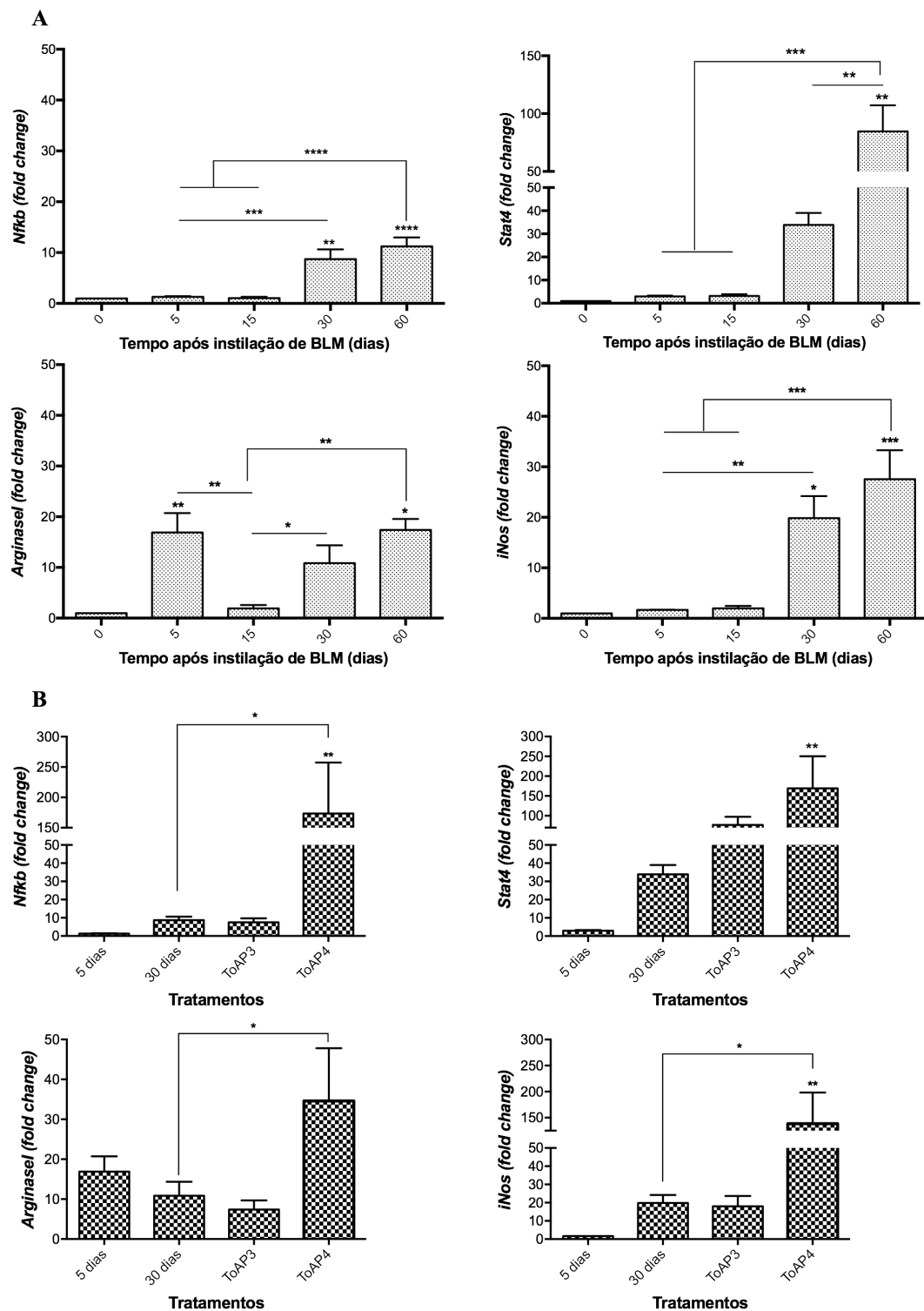
Diferentemente de *Nfkb* e *iNOS*, os níveis de transcrito de *Arginase 1* estavam mais altos depois de 5 dias do tratamento, com uma queda significativa passados mais 10 dias da instilação. No período em que há a queda no acúmulo de mRNA de Arginase 1 é quando começa-se a ver as alterações teciduais com produção de colágeno após a instilação de BLM nos animais (Figura 2.2). É possível que a baixa quantidade desse mRNA possa estar associada a alta tradução do mesmo, uma vez que a Arginase 1 está associada à produção de colágeno e proliferação celular.

O transdutor de sinal e ativador da transcrição 4 (STAT4) aparece em altos níveis após 60 dias da instilação de BLM. Ele está relacionado com a maturação e diferenciação de células Th1 e Th2 e, embora expresso em ambas as populações celulares, apenas é fosforilado após reconhecimento de IL-12 em células Th1, que, por sua vez, expressam altos níveis de IL-12R $\beta$  (Wurster *et al.*, 2000). Entretanto, a depender da estimulação antigênica, células Th1 podem expressar não só IFN- $\gamma$  como também IL-10 de maneira dependente de IL-12 e de STAT4 (Saraiva *et al.*, 2009). O reconhecimento de IFN- $\gamma$  ativa a via de sinalização que leva ao aumento de iNOS e NF $\kappa$ B. Além disso, pacientes com FPI estável tem altos níveis de expressão de STAT4 quando comparados com indivíduos nos quais a doença progride mais rapidamente, sugerindo que no modelo murino utilizado neste trabalho aos 60 dias os animais estejam apresentando uma fibrose estável (Molyneaux *et al.*, 2017).

Após tratamento com ToAP3 ou ToAP4, foram também verificados os níveis de acúmulo de transcritos desses mesmos genes avaliados nos animais instilados com BLM. Para todos os genes, apenas foi observada diferença significativa entre o 30º dia e os animais tratados com ToAP4 no acúmulo de transcritos de *Nfkb*, *iNOS* e *Arginase1*, além de ter sido



observada diferença significativa somente entre o início e o final desse tratamento para os genes de STAT4 e iNOS (Figura 3.12 B). Considerando a idéia de que o que os dados mostram é o acúmulo de mRNA e que houve momentos em que observamos aumento da produção de citocinas associado à queda do acúmulo de mRNA e que há aumento significativo ao quantificar todos esses genes nos animais tratados com ToAP4, é possível considerar a idéia de que esse peptídeo consiga fazer uma regulação pós transcricional desses genes.



**Figura 3.13:** Níveis do acúmulo de transcrito de *NFκb*, *Arginase 1* e *iNos* no tecido pulmonar de camundongos tratados com BLM e com ToAP3 ou ToAP4. Camundongos BALB/c sofreram instilação IT de BLM (50μl, 5 U/ml) depois de 5, 15 and 30 dias foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> para a coleta do interstício pulmonar para a extração de RNA total e quantificação relativa dos níveis de transcritos. Os níveis de transcrito de *NFκb*, *STAT4*, *Arginase 1*, *iNos* foram quantificados (A) nos animais tratados apenas com BLM e (B) nos animais tratados com BLM e os peptídeos, utilizando-se a técnica de RT-qPCR. \*p<0,05.

## 6. Verificação da alteração no acúmulo de transcrito de genes envolvidos no processo fibrótico por PCR array

No modelo descrito no capítulo 2, após instilação IT de BLM foi observado primeiramente um processo inflamatório contínuo que no 15º dia começa a se tornar um processo fibrótico que evolui até uma fibrose bem estabelecida. Com esses achados morfológicos quisemos aprofundar o conhecimento acerca do processo fibrótico de forma a entender seus mecanismos patogênicos e como o tratamento com ToAP3 e ToAP4 foi capaz de modificá-lo. Para isso, foi recolhido fragmentos de tecido pulmonar dos quais foi extraído RNA total para realização do ensaio de PCR array e comparação entre os animais que sofreram instilação com BLM e tratados com os peptídeos.

Como o processo fibrótico inicia-se 15 dias após a instilação de BLM, as primeiras comparações feitas foram entre animais saudáveis e animais após 15 e 30 dias de instilação. Após 15 dias de instilação foi observado aumento dos níveis de mRNA de integrina beta 6 (*Itgb6*) e diminuição dos níveis de mRNA do homólogo de MAD 4 (Drosófila) (*Smad4*) e do transdutor de sinal e ativador da transcrição 6 (*Stat6*).

A ativação de TGF- $\beta$  pela integrina  $\alpha v\beta 6$  tem um papel central no desenvolvimento da FP, aparecendo aumentada tanto em pulmões humanos com padrão PIU, bem como em pulmões de camundongos após desafio com BLM (Sakai & Tager, 2013). Essa integrina é produzida por células epiteliais e sua subunidade  $\beta 6$  é regulada pelo gene *itgb6*. Esse aumento é em parte devido ao aumento de TGF- $\beta$  ativo no tecido pulmonar, que induz a expressão de *itgb6*, criando um ciclo de amplificação de fatores centrais no desenvolvimento da FPI (Sakai & Tager, 2013).

O gene *Smad4* está intimamente ligado com a sinalização de TGF- $\beta$ , produção de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (Huang *et al.*, 2016; Morishita *et al.*, 2014). A proteína SMAD4 faz parte de diversas vias de sinalização, dentre elas a de ativação de TGFBR, que leva ao aumento de transcrição da integrina  $\alpha\beta 6$ . Uma das isoformas de TGF- $\beta$  é a TGF- $\beta 1$ . Essa isoforma é reconhecida por um receptor que possui duas subunidades, TGF $\beta$ R1 e TGF $\beta$ R2. Uma vez reconhecido, o TGF- $\beta 1$  ativa a via de sinalização canônica de SMAD, com a ligação de SMAD3 e SMAD4 ao promotor de *Itgb6*, promovendo sua transcrição. Esse reconhecimento e ativação da via de SMAD que contribui para o aumento da integrina  $\alpha\beta 6$  na membrana das CEAs e, por consequência, no aumento da ativação de TGF- $\beta$  latente do tecido.

Assim como especulado para o TGF- $\beta$ , como a técnica de PCR é utilizada para a verificação do acúmulo de transcritos, a diminuição dos níveis de mRNA de SMAD4 pode não estar relacionada com a sua regulação negativa, mas sim com sua alta tradução, uma vez que participa de vias de sinalização envolvidas no processo fibrótico como, além dessa mencionada, a via que leva a produção de  $\alpha$ -SMA que é bastante ativa nos miofibroblastos (Huang *et al.*, 2016; Morishita *et al.*, 2014). Entretanto, assim como encontramos menores níveis de acúmulo de transcrito neste trabalho, pacientes com FPI associada a carcinogênese aparentam ter baixa expressão de *Smad4* no tecido pulmonar em comparação com células da traquéia ou de tecido pulmonar normal (Takenaka *et al.*, 2009). Dessa forma, o menor acúmulo de transcrito desse gene pode estar associado a duas situações opostas: menor transcrição ou mesmo com alta transcrição associada a maior taxa de tradução, gerando baixos níveis de acúmulo de mRNA.

Da mesma forma que os baixos níveis de transcrito de *Smad4* podem estar relacionados com alta tradução do gene, *Stat6*, que contribui para uma grande variedade de

funções induzidas por IL-4 e IL13 (via IL-4R $\alpha$ ), resultando na resposta local do pulmões como hiperresponsividade das vias aéreas, hiperplasia das células de goblet e remodelamento tecidual (Zhu *et al.*, 2001; Wynn, 2003; Walford & Doherty, 2013; Richards, 2017). A queda que foi verificada nos níveis de STAT6 acontece em simultâneo com o pico de produção de IL-13 (Figura 3.10), indicando que o alto recrutamento da proteína pode ter levado a um aumento da tradução e, por consequência, à queda observada no acúmulo de transcrito de *Stat6*.

Após 30 dias da instilação IT de BLM, os animais apresentaram regulação positiva de fas ligante (superfamília de TNF, membro 6) (*Fasl*) e *Itgb6*, juntamente com metaloperoxidase de matriz 13 (Mmp13) e regulação negativa de endogлина (*Eng*).

FasL é um marcador apoptótico quando ancorado na membrana celular. Ele induz apoptose em células epiteliais e macrófagos após estímulo inflamatório, com a liberação concomitante de IL-1 $\beta$  e diversas quimiocinas, tendo um papel fundamental em modelos de FPI (Dosreis *et al.*, 2004). Entretanto, a BLM, em um primeiro momento, parece levar as CEAs à apoptose por estresse oxidativo, dependente de ROS, envolvendo a ativação da caspase 8 e somente em um segundo momento que a apoptose associada a FasL passa a ter maior importância, sendo independente de um processo inflamatório agudo (Wallach-Dayana *et al.*, 2006). Esses dados corroboram com o achado deste trabalho, quando só é observada altos níveis de mRNA de *Fasl* após 30 dias da instilação com BLM. Além disso, a expressão aumentada de *Fasl* no tecido de pacientes com FPI mostra que esse gene está sendo positivamente expresso em tecidos onde a fibrose já está estabelecida, ainda corroborando com os achados neste trabalho (Dosreis *et al.*, 2004).

A endogлина (ou CD105) é uma glicoproteína transmembrana presente em células epiteliais e macrófagos e no endotélio. Ela, além de ser um componente do receptor multi

cadeias de TGF- $\beta$  e ter sua expressão regulada positivamente pelo mesmo, é capaz de regular a expressão de uma série de componentes de matrix extra celular como fibronectina e colágeno. Essa proteína pode ser encontrada no tecido como S-endoglina e L-endoglina. Esta é a forma mais abundante nos pulmões e possui ação pró angiogênica. Associada ao endotélio, onde é altamente expressa, ela também tem papel na permeabilidade vascular que favorece o infiltrado inflamatório (De Paepe *et al.*, 2008). Essa proteína está ligada ao remodelamento tecidual regulando diversos componentes da MEC, incluindo colágeno e participando da angiogênese que é observada no desenvolvimento da fibrose (De Paepe *et al.*, 2008; Ackermann *et al.*, 2017).

**Tabela 3.3: Quantificação do acúmulo transcrito de genes relacionados à fibrose pulmonar, verificado por PCR array, em relação as animais no dia 0.**

Genes pró-fibróticos					
Símbolo	Descrição	Bleomicina 15 dias		Bleomicina 30 dias	
		Fold Change	P value	Fold Change	P value
<i>Eng</i>	Endoglina	0.47	0.349698	<b>0.37</b>	<b>0.038711</b>
<i>Fasl</i>	Fas ligante (superfamília de TNF, membro 6)	0.65	0.352122	<b>6.68</b>	<b>0.039064</b>
<i>Itgb6</i>	Integrina beta 6	<b>3.06</b>	<b>0.014495</b>	<b>2.44</b>	<b>0.019880</b>
<i>Smad4</i>	Homólogo de MAD 4 (Drosófila)	<b>0.48</b>	<b>0.005721</b>	0.62	0.027655
<i>Stat6</i>	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 6	<b>0.30</b>	<b>0.033396</b>	0.54	0.078273
Genes anti-fibróticos					
Símbolo	Descrição	Bleomicina 15 dias		Bleomicina 30 dias	
		Fold Change	P value	Fold Change	P value
<i>Mmp13</i>	Metaloperoxidase de matriz 13	6.21	0.149880	<b>3.09</b>	<b>0.029585</b>

Na comparação entre o 15º dia após a instilação IT e o 30º dia foi possível observar apenas alterações nos níveis de mRNA FasL, estando mais alto 30 dias após a

instilação, e para o mRNA de Beta-2 microglobulina (*B2m*). Este, mesmo sendo considerado um gene house keeping, é relativo a produto de mesmo nome (b2M) que é uma proteína de membrana de baixo peso molecular associada a proteínas do Complexo de Histocompatibilidade de classe I (MHCI). Ela é encontrada em baixas concentrações no plasma e seu aumento está relacionado a doenças associadas com o aumento da renovação celular como inflamações crônicas.

**Tabela 3.4: Quantificação do acúmulo transcrito de genes relacionados à fibrose pulmonar, verificado por PCR array, em relação as animais tratados com bleomicina há 15 dias.**

		Genes pró-fibróticos	
Símbolo	Descrição	Bleomicina 30 dias	
		Fold Change	P value
<i>Fasl</i>	Fas ligante (superfamília de TNF, membro 6)	10.23	0.026191
		Genes house keeping	
Símbolo	Descrição	Bleomicina 30 dias	
		Fold Change	P value
<i>B2m</i>	Beta-2 microglobulina	2.21	0.031351

Nos animais tratados com ToAP3 e ToAP4 o acúmulo de transcrito desses grupos foi comparado com o que foi encontrado 30 dias após instilação IT de BLM. Em contraste ao que foi achado no grupo tratado ToAP4, foram encontradas diversas alterações nos níveis de transcrito nos animais tratados com ToAP3. Além das alteração de FasL, com regulação positiva, e *Itgb6*, com regulação negativa, nos animais tratados com este peptídeo, foi observada a regulação positiva da quimicina (motivo c-c) ligante 11 (*Ccl11*), a citocina IL-1 alfa (*Il1a*) e a citocina IL-1 beta (*Il1b*). *Ccl11* é uma quimiocina responsável pela quimiotaxia de eosinófilos.

Além desses genes regulados positivamente nos animais tratados com ToAP3, estão regulados negativamente os genes pró-fibróticos proto-oncogene Viral de Timoma 1 (*Akt1*), integrina alfa V (*Itgav*), interina beta 6 (*Itgb6*), metaloperoxidase de matriz 14 (*Mmp14*), metaloperoxidase de matriz 2 (*Mmp2*), Fator de crescimento derivado de plaquetas, alfa (*Pdgfa*), inibidor de peptidase serina (ou cisteína), clado E, membro 1 (*Serpine1*), inibidor de peptidase serina (ou cisteína), clado H, membro 1 (*Serpinh1*), fator de crescimento transformador, beta 1 (*Tgfb1*), fator de crescimento transformador, beta 2 (*Tgfb2*), fator de crescimento transformador, beta 3 (*Tgfb3*), receptor do fator de crescimento transformador, beta 1 (*Tgfbr1*), receptor do fator de crescimento transformador, beta 2 (*Tgfbr2*).

Akt é uma proteína quinase com papel na sobrevivência celular mediando crescimento, metabolismo e produção ROS (Datta *et al.*, 1999). Ela é capaz de fosforilar diversas proteínas e, dessa forma, regular a apoptose (Larson-Casey *et al.*, 2014; Larson-Casey *et al.*, 2016). A expressão de Akt é regulada positivamente em tecidos fibróticos, incluindo pulmões tanto de animais após estímulo fibrótico da BLM como de pacientes com FPI (Larson-Casey *et al.*, 2014). A mitofagia é regulada em parte por Akt1 e esse processo contribui para a resistência a apoptose observada em macrófagos alveolares na FPI, além de ser necessário para a expressão de *Tgfb1* nos macrófagos (Larson-Casey *et al.*, 2014; Larson-Casey *et al.*, 2016).

O gene *Itgav* codifica uma das subunidades da integrina  $\alpha\beta6$  que se une com a subunidade  $\beta6$ , regulada por *itgb6* para formar o dímero dessa integrina. Como já citado, na FPI o aumento dessa interina é em parte devido ao aumento de TGF- $\beta$ , sendo fundamental para a ativação do mesmo.

Metaloproteinases (MMPs) de matriz são necessárias para a degradação de componentes da MEC para a remodelamento tecidual durante os processos de cicatrização ou



fibróticos. MMP-14, codificada pelo gene *Mmp14*, é uma MMP ligada a membrana celular, que exerce o seu papel proteolítico no colágeno I, no colágeno II, no colágeno III, e na fibronectina assim que chega à membrana (Cushing *et al.*, 2015; Hohensinner *et al.*, 2017). Além do seu papel proteolítico, ela é a principal ativadora da MMP-2, codificada pelo gene *Mmp2*, uma MMP solúvel com a papel de quebrar proteínas da MEC como o colágeno I e o colágeno IV (Cushing *et al.*, 2015; Hohensinner *et al.*, 2017).

Macrófagos alveolares de pacientes com FPI liberam espontaneamente altos níveis de PDGF (Martinet *et al.*, 1987). Este é um fator de crescimento com importante papel angiogênese, proliferação de células mesenquimais e quimiotaxia dessa células (Raines *et al.*, 1989). O PDGF, que é um dos principais fatores de crescimento na FPI, é um dímero que pode ser formado por duas subunidades A, codificada pelo gene *Pdgfa*, duas subunidades B ou ainda uma subunidade A e uma subunidade B, e o aumento da sua expressão está relacionado com o aumento de IL-1 $\beta$  (Allen & Spiteri, 2002; Wilson & Wynn, 2009; Wynn, 2011; Richards, 2017).

SERPINE1, também chamada de PAI-1, é codificada pelo gene *Serpine1* e tem papel inibidor de Akt (Larson-Casey *et al.*, 2014). Dessa forma, esse inibidor de peptidase tem papel na proliferação celular, cicatrização e senescência celular (Larson-Casey *et al.*, 2014; Simone, & Higgins, 2015; Jiang *et al.*, 2017).

SERPINH1, também conhecida como HSP47, é uma glicoproteína de 47 kDa que funciona como uma chaperona molecular específica para colágeno, localizado no retículo endoplasmático, codificada pelo gene *Serpinh1* (Cushing *et al.*, 2015; Kamikawaji *et al.*, 2016). Ela é uma proteína super expressa em doenças fibróticas e contribui significativamente para a biossíntese de colágeno (Kamikawaji *et al.*, 2016).

Além de todos esses genes pró fibróticos, o tratamento com o ToAP3 foi capaz de regular negativamente o homólogo de MAD 6 (Drosófila) (*Smad6*) e o inibidor tecidual de metaloproteinases 2 (*Timp2*), ambos genes anti fibróticos. SMAD6 é uma proteína inibitória encontrada no citoplasma celular que impede a fosforilação de outras proteínas da mesma família ligadas à receptores, além de competir com SMAD1 e com SMAD3 pela ligação com SMAD4. Dessa maneira, SMAD6 impede a ligação de SMAD3, que está ligado ao receptor de TGF- $\beta$ , após reconhecimentos dessa citocina e sua posterior translocação para o núcleo, impedindo, assim, a biossíntese de colágeno e outros elementos da MEC presentes em grandes quantidades nas regiões fibróticas (Zhao *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2013).

TIMP2 é codificada pr *Timp2* e é um potente inibidor de MMPs. Como as demais proteínas de sua família, executa seu papel inibitório pela sua ligação ao sítio catalítico de MMPs específicas, que no seu caso são MMP2 e MMP14 (Zucker *et al.*, 1998; Morgunova *et al.*, 2002)

Em contraste com o tratamento com o ToAP3, o tratamento com o ToAP4, apesar de ter sido bastante eficiente no controle do desenvolvimento da fibrose no modelo experimental utilizado neste trabalho, regulou negativamente apenas 2 genes pró-fibroticos. Estes foram o *Ccr2*, *Serpine1* e *Smad4*, sendo que esses dois últimos já foram citados anteriormente. CCR2 é um receptor encontrado nas membranas de monócitos e linfócitos T e linfócitos B ativados.

Tabela 3.5: Quantificação do acúmulo transcrito de genes relacionados à fibrose pulmonar, verificado por PCR array, em relação as animais instilados com bleomicina há 30 dias.

Genes pró-fibróticos					
Símbolo	Descrição	Tratamento ToAP3		Tratamento ToAP4	
		Fold Change	P Value	Fold Change	P Value
Akt1	Proto-oncogene Viral de Timoma 1	0.34	0.043212	0.83	0.570278
Ccl11	Quimicina (motivo c-c) ligante 11	3.18	0.021522	4.41	0.323722
Ccr2	Receptor de Quimicina (motivo c-c) 2	1.18	0.593361	0.14	0.043364
Fasl	Fas ligante (superfamília de TNF, membro 6)	4.30	0.006065	0.20	0.060712
Il1a	Interleucina 1 alfa	6.53	0.000911	3.19	0.239425
Il1b	Interleucina 1 beta	2.27	0.046645	0.62	0.750740
Itgav	Integrina alfa V	0.46	0.045766	1.79	0.375390
Itgb6	Integrina beta 6	0.21	0.005560	0.83	0.678812
Mmp14	Metaloperoxidase de matriz 14	0.18	0.015702	0.46	0.278868
Mmp2	Metaloperoxidase de matriz 2	0.39	0.043679	1.86	0.365113
Pdgfa	Fator de crescimento derivado de plaquetas, alfa	0.25	0.020553	1.18	0.536549
Serpine1	Inibidor de peptidase serina (ou cisteína), clado E, membro 1	0.40	0.026483	0.24	0.000152
Serpinh1	Inibidor de peptidase serina (ou cisteína), clado H, membro 1	0.21	0.025890	1.59	0.358584
Smad4	Homólogo de MAD 4 (Drosófila)	0.92	0.778855	0.50	0.035041
Tgfb1	Fator de crescimento transformador, beta 1	0.28	0.029165	2.23	0.338805
Tgfb2	Fator de crescimento transformador, beta 2	0.47	0.019035	1.74	0.355887
Tgfb3	Fator de crescimento transformador, beta 3	0.37	0.011840	0.71	0.155044
Tgfr1	Receptor do fator de crescimento transformador, beta 1	0.44	0.035557	0.71	0.142083
Tgfr2	Receptor do fator de crescimento transformador, beta 2	0.45	0.000265	1.34	0.038078
Genes anti-fibróticos					
Símbolo	Descrição	Tratamento Bleomicina 15 dias		Tratamento Bleomicina 30 dias	
		Fold Change	P value	Fold Change	P value
Il1b	Interleucina 1 beta	2.27	0.046645	0.62	0.750740
Smad6	Homólogo de MAD 6 (Drosófila)	0.22	0.025221	1.20	0.562480
Timp2	Inibidor tecidual de metaloproteinasas 2	0.45	0.003830	2.19	0.310287

Muitos aspectos da FPI já foram estudados. Dentre eles, a importância de algumas quimiocinas como CCL2, CCL6, CCL9 (em roedores), CCL17, CCL18; CXCL2; CXCL11 e seus receptores já foram reportados como relacionados ao desenvolvimento fibrótico, tanto associadas a estímulo da fibrogênese como na sua regulação (Antoniades *et al.*, 1992; Keane *et al.*, 1999; Belperio *et al.*, 2002; Belperio *et al.*, 2004; Burdick *et al.*, 2005; Prasse *et al.*, 2006). Todas essas quimiocinas estão associadas a quimioatratividade de leucócitos e fibroblastos para os pulmão de pacientes com FPI ou de animais desafiados com BLM. As células nas quais essas quimiocinas atuam são responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios que geram e perpetuam o contexto fibrótico.

Mesmo com a produção de citocinas quimioatrativas para célula do SI e os mediadores que elas produzem, as tentativas de tratamentos imunossupressores e imunomodulatórios como corticosteróides, azatioprina, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), receptor solúvel de TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ R), anticorpo anti-CCL2, anticorpo anti-CD20, todos foram pouco eficientes no tratamento da FPI e alguns chegaram a piorar os sintomas da doença (Sköld *et al.*, 2017; Borie *et al.*, 2016). Devido a diversas tentativas frustradas de intervenção na RI para tratamento da FPI, acreditou-se que o início e progressão dessa doença não teria relação com a RI. Portanto, os fármacos atualmente utilizados são anti-fibróticos que tem por função retardar o desenvolvimento da FPI: Nintedanib e Pirfenidona (Borie *et al.*, 2016; Aiello *et al.*, 2017; Sköld *et al.*, 2017).

A utilização do Nintedanib e da Pirfenidona tem grandes limitações. Essas drogas são capazes apenas de retardar o progresso da doença, além de apresentar pouca eficácia para pacientes em estágios mais avançados (Borie *et al.*, 2016; Sköld, *et al.*, 2017). Além disso, são medicamentos de alto custo que causam efeitos colaterais que, por muitas vezes, levam à interrupção do seu uso (Sköld, *et al.*, 2017). Dessa maneira, ainda são necessários estudos que

visem o desenvolvimento de novas alternativas farmacológicas para o controle e mais eficiente da FPI. Hoje a única possibilidade de cura para essa doença é o transplante pulmonar que, além do risco do processo cirúrgico e da baixa sobrevida dos pacientes nos primeiros dois anos após o transplante, não é recomendado para a maioria dos pacientes com FPI devido a faixa etária da maioria deles e as comorbidades associadas à doença (Jatene *et al.*, 2009; Camargo *et al.*, 2015).

Mesmo que um dos antifibróticos disponíveis no mercado tenha como um dos prováveis mecanismos de ação a regulação da RI, a reflexão a respeito da importância do SI para a patogênese da FPI é recente. Atualmente sabe-se que, embora a RI possa não ser o principal responsável pelos fatores desencadeadores da FPI, ela é responsável pelo seu perfil crônico (Desai *et al.*, 2018). Dessa maneira, a regulação do RI pode ser uma alternativa para o tratamento da FPI. A necessidade de terapias mais eficientes, mais seguras e com menos efeitos colaterais para tratamento de doenças inflamatórias ou cuja responsabilidade de sua manutenção é o SI leva à procura de alternativas terapêuticas com novos agentes imunomodulatórios como os PAMs (Méndez-Sampério, 2013).

Como já mencionado, eles estão presentes em todos os organismos pluricelulares com importante papel na imunidade inata, sendo capazes tanto de interagir diretamente com agentes patogênicos como com o SI de forma a alterar a RI. Da mesma maneira, PAMs derivados de peçonha de escorpião já foram descritos como sendo reconhecidos por receptores de membrana de macrófagos e, dessa maneira, estimulando a secreção de mediadores inflamatórios (Zoccal *et al.*, 2014).

PAMs conseguem interagir com as células de diferentes maneiras. Eles podem interagir com receptores celulares, com as membranas, sendo capaz de despolarizá-las e assim alterando uma série de atividades metabólicas ou ainda atuando em canais iônicos que fazem

parte dos mecanismo celulares que permitem a transcrição e a tradução dos genes (Organ *et al.*, 2017). Um exemplo de peptídeo com essa capacidade de interação é a catalecidina LL-37. Ela é um peptídeo composto por 37 resíduos de aminoácidos que é produzido em diversas células do SI como neutrófilos, macrófagos, células *natural killers*, além de também ser produzida constitutivamente em diversos órgãos (Scocchi *et al.*, 1992; Zanetti *et al.*, 1995; Zanetti, 2004; Kahlenberg & Kaplan, 2013). Além das propriedade microbicidas da LL-37, ela já foi associada tanto com propriedades antiinflamatórias, exercendo ação antagonista nas respostas dependentes de  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-4 e IL-12, quanto com propriedades proinflamatórias, sendo capaz de regular negativamente IL-10, regular positivamente IL-12p40, aumentar a resposta inflamatória causada pela sinalização de IL-1 $\beta$  e induzir o perfil M1 de macrófagos (Kahlenberg & Kaplan, 2013). Outra forma de LL-37 regular a RI é por meio da indução da migração de células tanto atuando como elemento quimiotático para neutrófilos e queratinócitos, como participante da indução de produção de citocinas e fatores de crescimento como  $\text{TGF-}\beta$  para a migração de células epiteliais (Kahlenberg & Kaplan, 2013).

Entretanto, existem diversas limitações ao uso LL-37. As catalecidinas são caracterizadas por possuírem um domínio catalina de 98 a 114 resíduos de aminoácidos (aa.) na sua forma inativa que são clivadas por enzimas ativas no meio extracelular as clivam e a porção c-terminal do peptídeo é liberada do seu domínio catalina, transformando-o na sua forma ativa (Scocchi. *et al.*, 1992; Zanetti *et al.*, 1995). Como diferentes enzimas são capazes de atuar na molécula clivando-as em pontos diversos, as sequências de catalecidinas podem ser originadas com uma grande variedade de estruturas no tecido, dificultando a compreensão de qual estrutura formada após a clivagem seria ativa e sua forma de ação (Zanetti, M. 2004). Além disso, embora a LL-37 não seja tóxica nas concentrações encontradas naturalmente nos

tecidos, doses mais altas deste peptídeo que são necessárias para sua utilização como fármaco podem ser prejudiciais para o tecido, uma vez que estudos já mostraram que essa catalecidina pode ter atividade citotóxica dose-dependente e que tem atividade hemolítica, limitando seu uso terapêutico (Ciornei *et al.*, 2005; Fukumoto *et al.*, 2005; Vandamme *et al.*, 2012; Kahlenberg & Kaplan, 2013).

Os PAMs utilizados neste trabalho, ToAP3 e ToAP4, foram caracterizados capazes de regular a secreção de citocinas pró-inflamatórias por meio de interação com TLR4, de interferir na expressão de MHC de classe I em DCs e possuem baixa atividade citotóxica e hemolítica, características que os tornam bons candidatos para utilização terapêutica para doenças cuja a progressão de manutenção estão relacionadas com a RI, como a FPI (Guilhelmelli *et al.*, 2016; Veloso *et al.*, 2019). Como já exposto, esta trata-se de uma doença grave, de evolução inexorável, incapacitante e que, até o presente, tem opções terapêuticas limitadas. As alterações observadas em seu curso impõem significativa deterioração da qualidade de vida dos seus portadores, determinando o comprometimento de outros sistemas do organismo, como o cardiovascular e o sistema nervoso central, em decorrência da baixa perfusão/oxigenação, levando à sucessivas hospitalizações de alto custo.

Para a avaliação do potencial de ToAP3 e ToAP4 como tratamento da FPI, animais BALB/c sofreram instilação IT de BLM e tiveram o curso do desenvolvimento da fibrose acompanhado para melhor caracterização do modelo e escolha do período no qual o tratamento com os peptídeos seria iniciado. Com a caracterização da FPI experimental feita, os animais tiveram seu tratamento iniciado aos 5 dias após a instilação de BLM para a avaliação da atividade do peptídeos no processo fibrótico.

Uma das formas de modulação da RI é a indução da migração de novas populações celulares produtoras de mediadores inflamatórios para o tecido. Para verificar se

ToAP3 e ToAP4 teriam essa capacidade, ambos os peptídeos foram injetados no peritônio de camundongos e depois de 4h, 24h e 72h foi feito o lavado peritoneal e contagem de células. Não houve diferença nas contagens de células dos animais que receberam os peptídeos e os animais que receberam apenas o veículo. Esses resultados sugerem que indução de migração celular não é um dos mecanismos pelos quais ToAP3 e ToAP4 são capazes de regular a RI (Tabela 3.2).

No entanto, no contexto da FPI experimental ambos os peptídeos foram capazes de inibir a migração de células para os pulmões. Após o tratamento com os peptídeos, as regiões de opacidade foram reduzidas, encontrando-se ainda menores do que no início do tratamento e com baixa densidade e frequência de HU (Figura 3.3 e 3.4). Esses dados foram corroborados com as observações feitas nos histopatológicos em IHQ, onde foi possível observar poucas alterações entre os animais no início e ao final do tratamento com os peptídeos. Em conjunto, esses resultados indicam que ambos os peptídeos foram eficientes na no controle do avanço da doença, limitando a migração celular para o tecido.

A limitação da migração celular ocorreu, provavelmente, pela regulação do processo inflamatório nos pulmões, evidenciada pela regulação das citocinas no BALF e no interstício pulmonar. No BALF, algumas citocinas apresentaram seu padrão de forma diferente do interstício (Figura 3.11). Isso pode ter ocorrido tanto pela sua interação com a MEC como, mais provavelmente, pela diferença na técnica utilizada para a coleta. No interstício, os níveis de TNF- $\alpha$  foram significativamente mais altos nos animais ao final do tratamento com ambos os peptídeos do que no seu início. A alta produção de TNF- $\alpha$  no período do começo do tratamento é condizente com o processo inflamatório observado nos dados da morfologia e a contínua produção dessa citocina é importante para o estímulo do crescimento dos fibroblastos e sua alteração morfológica em miofibroblastos, que também



associado ao aumento dos níveis de NF- $\kappa$ B (Vilcek *et al.*, 1986; Piguet *et al.*, 1990; Willis *et al.*, 2005; Kamitani *et al.*, 2011; Sullivan *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2018). Uma produção muito alta de TNF- $\alpha$ , acompanhada de altos níveis de transcrito de NF- $\kappa$ B poderia, em conjunto com outros fatores, estar impedindo a alteração do perfil inflamatório para um perfil fibrótico e, assim, impedindo o desenvolvimento da doença. Curiosamente, os altos níveis de TNF- $\alpha$  no interstício pulmonar ao final do tratamento com ambos os peptídeos não foi acompanhado por altos níveis de IL-1 $\beta$  ou IL-10, ambas também associadas ao NF- $\kappa$ B.

Não foi possível observar diferenças entre níveis de IL-13 no BALF dos animais tratados apenas com BLM e os animais tratados com ToAP3 e ToAP4 (Figura 3.11 A). Diferenças significativas nos níveis dessa citocina foram observadas somente no interstício dos pulmões, onde os animais tratados com os peptídeos tem níveis de citocinas significativamente mais baixos dos que os animais após 30 dias da instilação de BLM, com esses níveis reduzidos se mantendo após a interrupção do tratamento com os peptídeos (Figuras 3.11 B e 3.12 B). Como IL-13 tem grande importância para o desenvolvimento fibrótico na FPI, a queda dos níveis dessa citocina é condizente com a interrupção do processo causada pelo tratamento com ToAP3 e ToAP4.

Em relação ao TGF- $\beta$ , essa é uma citocina expressa constitutivamente nos pulmões e tem importante papel na patogênese da FPI. Após 5 dias da instilação com BLM, TGF- $\beta$  tem seus níveis reduzidos, provavelmente devido ao processo inflamatório iniciado nos pulmões após esse estímulo (Figura 3.10 B). O níveis dessa citocina voltam a subir, mantendo-se próximo aos normais, mesmo passados 60 dias da instilação (Figuras 3.10 B e 3.12 B). Durante esse mesmo período, foi verificado crescente acúmulo de colágeno e remodelamento tecidual, o que é condizente com a presença de TGF- $\beta$  em conjunto com TNF- $\alpha$  e as demais citocinas que já tiveram a sua importância aqui discutidas (Figuras 2.2 e

2.3) (Belperio *et al.*, 2002; Willis *et al.*, 2005; Agostini *et al.*, 2006; Prasse *et al.*, 2006; Wilson & Wynn, 2009; Kamitani *et al.*, 2011; Sullivan *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2018). Diferentemente dos animais tratados com ToAP4, os animais tratados com ToAP3 tiveram uma queda na produção de TGF- $\beta$  após terem o tratamento descontinuado, coincidindo com mesmo momento que IL- $\beta$  volta a subir.

Para tentar compreender melhor a patogênese da FPI e os mecanismos pelos quais o ToAP3 e ToAP4 atuam na limitação do processo fibrótico, foram realizados ensaios de PCR array. Esses ensaios auxiliaram na elucidação de varias questões a respeito da FPI experimental no modelo de BALB/c. Utilizando essa técnica foi possível mostrar a importância da ativação de TGF- $\beta$  para o estímulo da produção de fibronectina e colágeno, evidenciada pelo aumento da expressão da subunidade  $\beta 6$  da integrina  $\alpha\beta 6$  e endogлина, e o baixo acúmulo de mRNA de SMAD4, também observada em pulmões de pacientes com FPI, e de STAT6 que pode estar relacionado com a alta tradução desses mRNA para que ocorra o aumento da produção de TGF- $\beta$  e a alteração no metabolismo das células teciduais pulmonares que favorecem o remodelamento tecidual, além do aumento de mRNA de MMP-13 e FasL, que estão associados com o processo inflamatório que ocorre para a manutenção de fibrose e severidade da doença (Zhu *et al.*, 2001; Wynn, 2003; Dosreis *et al.*, 2004; De Paepe *et al.*, 2008; Takenaka *et al.*, 2009; Dancer *et al.*, 2011; Walford & Doherty, 2013; ; Richards, 2017).

A análise do PCRarray dos pulmões dos animais tratados com ToAP3 ou ToAP4 contribuiu com a idéia de que, embora os peptídeos tenham suas estruturas primárias semelhantes, eles atuam de forma diferente para o controle do processo fibrótico. Ambos os peptídeos foram descritos como capazes de interferir na produção de mediadores inflamatórios por interação com receptores de membrana (Veloso *et al.*, 2019). Esses dados

corroboram com os achados neste trabalho, que mostram a capacidade de ambos os peptídeos de regular as citocinas produzidas no contexto fibrótico. Entretanto as diferenças observadas nos resultados dos ensaios de PCRarray são gritantes, com ToAP4 mostrando pouca capacidade de alteração nos acúmulos de mRNA nos pulmões dos animais quando comparado com os animais nos quais a fibrose foi induzida, porém não foram tratados com qualquer dos peptídeos. As poucas alterações observadas nesses ensaios somadas aos demais dados aqui apresentados sugerem que para a maioria dos genes a regulação exercida por esse peptídeo pode ser pós transcricional.

Ao contrário de ToAP4, ToAP3 parece ser capaz de regular uma série de fatores associados à FPI experimental em nível transcricional. O tratamento desse peptídeo foi capaz de alterar o acúmulo de Akt1, que é uma proteína altamente expressa em pulmões de pacientes com FPI e que está relacionada com a sobrevivência celular mediando crescimento, metabolismo e produção de ROS e com a regulação da produção de TNF- $\alpha$  (Datta *et al.*, 1999; Nahid *et al.*, 2011; Larson-Casey *et al.*, 2014; Larson-Casey *et al.*, 2016). Além disso, ToAP3 parece ter regulado negativamente a expressão de uma série de fatores pró fibróticos (Tabela 3.4).

**CAPÍTULO 4: CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS**

Neste trabalho, objetivou-se compreender melhor os fatores que leva à fibrogênese na FPI, como um enfoque na RI, que, por motivos pouco elucidados, mantém o processo ativo. Neste contexto, abordou-se a o modelo da FP induzida pela BLM utilizando camundongos BALB/c, com uma visão diferente do que a literatura tem demonstrado. Foram observadas diversas alteração morfológicas e funcionais nos pulmões destes animais após instilando IT de BLM. O perfil de citocinas e os níveis de transcritos apresentados em conjunto com os dados de morfologia e função são condizentes com o desenvolvimento fibrótico. Em suma, esses resultados indicam que essa linhagem pode ser utilizada no modelo experimental crônico da FPI.

Os dados gerados ao longo deste trabalho não só tornou possível correlacionar a formação da FP com eventos da RI que contribuem para o processo, como também foi possível identificar os genes cujos produtos participam dos mecanismos de modulação do dano pulmonar, decorrente do progressivo depósito de matriz de colágeno, que acarreta a perda funcional progressiva do tecido pulmonar. A partir desses achados, e baseados nos dados já publicados que mostram a capacidade imuno modulatória da RI dos peptídeos ToAP3 e ToAP4 (Veloso *et al.*, 2019), testamos o possível papel destes peptídeos na redução e/ou inibição do estabelecimento da FP. Por mecanismos diferentes, o tratamento com ToAP3 e o tratamento com ToAP4 foram capazes de controlar a FP experimental, induzida por BLM, de forma eficiente e duradoura, com preservação do tecido dos animais pela regulação do processo inflamatório decorrente da instilação de BLM. Dessa maneira, ToAP3 e ToAP4 podem ser considerados com possíveis alternativas terapêuticas para o tratamento da FPI.

Entretanto, novas análises para compreender os mecanismos pelos quais esses peptídeos interagem com o SI de forma a regular o desenvolvimento fibrótico ainda são necessários. Como exemplo, análises de proteômica para a compreensão dos mecanismos

regulatórios de ToAP4 são de interesse para a elucidação da atividade desse peptídeo. Além disso, uma limitação da utilização de peptídeos para tratamento de inúmeras doenças é a sua biodisponibilidade, sendo importante o desenvolvimento de maneiras de manter esses peptídeos disponíveis para a atuação no tecido por mais tempo, como acontece com fármacos nanoencapsulados. Suprir essas limitações leva à possibilidade de utilizar ToAP3 e o ToAP4 em ensaios clínicos para tratamento da FPI.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] A.K. Abbas, A.H.H. Lichtman, S. Pillai, *IMUNOLOGIA CELULAR E MOLECULAR*, 9<sup>a</sup>, Elsevier, São Paulo, 2019.
- [2] M. Ackermann, Y.O. Kim, W.L. Wagner, D. Schuppan, C.D. Valenzuela, S.J. Mentzer, S. Kreuz, D. Stiller, L. Wollin, M.A. Konerding, EFFECTS OF NINTEDANIB ON THE MICROVASCULAR ARCHITECTURE IN A LUNG FIBROSIS MODEL, *Angiogenesis*. 20 (2017) 359–372. doi:10.1007/s10456-017-9543-z.
- [3] I.Y. Adamson, D.H. Bowden, THE PATHOGENESIS OF BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS IN MICE., *Am. J. Pathol.* 77 (1974) 185–97. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1910906&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [4] C. Agostini, C. Gurrieri, CHEMOKINE/CYTOKINE COCKTAIL IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Proc Am Thorac Soc.* 3 (2006) 357–363. doi:10.1513/pats.200601-010TK.
- [5] N. Ahluwalia, B.S. Shea, A.M. Tager, NEW THERAPEUTIC TARGETS IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS. AIMING TO REIN IN RUNAWAY WOUND-HEALING RESPONSES, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190 (2014) 867–878. doi:10.1164/rccm.201403-0509PP.
- [6] M. Aiello, G. Bertorelli, M. Bocchino, A. Chetta, A. Fiore-Donati, A. Fois, S. Marinari, T. Oggionni, B. Polla, E. Rosi, A. Stanziola, F. Varone, A. Sanduzzi, THE EARLIER, THE BETTER: IMPACT OF EARLY DIAGNOSIS ON CLINICAL OUTCOME IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 44 (2017) 7–15. doi:10.1016/j.pupt.2017.02.005.

- [7] J.T. Allen, M.A. Spiteri, GROWTH FACTORS IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS: RELATIVE ROLES., *Respir. Res.* 3 (2002) 13. doi:10.1186/rr162.
- [8] J.P. Annes, Y. Chen, J.S. Munger, D.B. Rifkin, INTEGRIN AVB6-MEDIATED ACTIVATION OF LATENT TGF- $\beta$ 1 REQUIRES THE LATENT TGF- $\beta$ 1 BINDING PROTEIN-1, *J. Cell Biol.* 165 (2004) 723–734. doi:10.1083/jcb.200312172.
- [9] H.N. Antoniades, J. Neville-Golden, T. Galanopoulos, R.L. Kradin, A.J. Valente, D.T. Graves, EXPRESSION OF MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN 1 MRNA IN HUMAN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 (1992) 5371–5375. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1608944](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1608944).
- [10] C. Auvynet, Y. Rosenstein, MULTIFUNCTIONAL HOST DEFENSE PEPTIDES: ANTIMICROBIAL PEPTIDES, THE SMALL YET BIG PLAYERS IN INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY., *FEBS J.* 276 (2009) 6497–508. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07360.x.
- [11] A. Azuma, PIRFENIDONE: ANTIFIBROTIC AGENT FOR IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS., *Expert Rev. Respir. Med.* 4 (2010) 301–10. doi:10.1586/ers.10.32.
- [12] K.B. Baumgartner, J.M. Samet, C.A. Stidley, T. V. Colby, J.A. Waldron, CIGARETTE SMOKING: A RISK FACTOR FOR IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155 (1997) 242–248. doi:10.1164/ajrccm.155.1.9001319.
- [13] A.D. Befus, C. Mowat, M. Gilchrist, J. Hu, S. Solomon, A. Bateman, NEUTROPHIL DEFENSINS INDUCE HISTAMINE SECRETION FROM MAST CELLS: MECHANISMS OF ACTION., *J. Immunol.* 163 (1999) 947–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395691>.



- [14] J. a Belperio, M. Dy, M.D. Burdick, Y.Y. Xue, K. Li, J. a Elias, M.P. Keane, INTERACTION OF IL-13 AND C10 IN THE PATHOGENESIS OF BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27 (2002) 419–27. doi:10.1165/rcmb.2002-0009OC.
- [15] J. Belperio, Maria, L. Murray, M.D. Burdick, Y.Y. Xue, R.M. Strieter, M.P. Keane, THE ROLE OF THE TH2 CC CHEMOKINE LIGAND CCL17 IN PULMONARY FIBROSIS., *J. Immunol.* 173 (2004) 4692–8. doi:10.4049/jimmunol.173.7.4692.
- [16] A. Betensley, R. Sharif, D. Karamichos, A SYSTEMATIC REVIEW OF THE ROLE OF DYSFUNCTIONAL WOUND HEALING IN THE PATHOGENESIS AND TREATMENT OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *J. Clin. Med.* 6 (2016) 2. doi:10.3390/jcm6010002.
- [17] R. Borie, A. Justet, G. Beltramo, E.D. Manali, P. Prad??re, P. Spagnolo, B. Crestani, PHARMACOLOGICAL MANAGEMENT OF IPF, *Respirology.* 21 (2016) 615–625. doi:10.1111/resp.12778.
- [18] G. Borzone, R. Moreno, R. Urrea, M. Meneses, M. Oyarzún, C. Lisboa, BLEOMYCIN-INDUCED CHRONIC LUNG DAMAGE DOES NOT RESEMBLE HUMAN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Am J Respir Crit Care Med.* 163 (2001) 1648–1653.
- [19] B.D. Bringardner, C.P. Baran, T.D. Eubank, B. Marsh, THE ROLE OF INFLAMMATION IN THE PATHOGENESIS OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Antioxid Redox Signal.* 10 (2008) 287–301. doi:10.1089/ars.2007.1897.The.
- [20] E. Brummer, E. Castaneda, a Restrepo, PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS: AN UPDATE., *Clin. Microbiol. Rev.* 6 (1993) 89–117. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=358272&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- [21] R. Bucala, L.A. Spiegel, J. Chesney, M. Hogan, A. Cerami, CIRCULATING FIBROCYTES DEFINE A NEW LEUKOCYTE SUBPOPULATION THAT MEDIATES TISSUE REPAIR, *Mol. Med.* 1 (1994) 71–81.
- [22] M.D. Burdick, L. a Murray, M.P. Keane, Y.Y. Xue, D. a Zisman, J. a Belperio, R.M. Strieter, CXCL11 ATTENUATES BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS VIA INHIBITION OF VASCULAR REMODELING., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171 (2005) 261–8. doi:10.1164/rccm.200409-1164OC.
- [23] P.C.L.B. de Camargo, R.H. de O.B. Teixeira, R.M. Carraro, S.V. Campos, J.E. Afonso Junior, A.N. Costa, L.M. Fernandes, L.G. Abdalla, M.N. Samano, P.M. Pêgo-Fernandes, TRANSPLANTE PULMONAR: ABORDAGEM GERAL SOBRE SEUS PRINCIPAIS ASPECTOS, *J. Bras. Pneumol. São Paulo.* 41 (2015) 547–553. doi:10.1590/s1806-37562015000000100.
- [24] H. Cheng, C. Jin, J. Wu, S. Zhu, Y.J. Liu, J. Chen, GUARDS AT THE GATE: PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL ROLES OF TISSUE-RESIDENT INNATE LYMPHOID CELLS IN THE LUNG, *Protein Cell.* 8 (2017) 878–895. doi:10.1007/s13238-017-0379-5.
- [25] M.G. Chiamonte, L.R. Schopf, T.Y. Neben, A.W. Cheever, D.D. Donaldson, A. Thomas, IL-13 IS A KEY REGULATORY CYTOKINE FOR TH2 CELL-MEDIATED PULMONARY GRANULOMA FORMATION AND IGE RESPONSES INDUCED BY SCHISTOSOMA MANSONI EGGS, *J. Immunol.* 162 (1999) 920–930.
- [26] K.Y. Choi, L.N.Y. Chow, N. Mookherjee, CATIONIC HOST DEFENCE PEPTIDES: MULTIFACETED ROLE IN IMMUNE MODULATION AND INFLAMMATION, *J. Innate Immun.* 4 (2012) 361–370. doi:10.1159/000336630.
- [27] C.D. Ciornei, T. Sigurdardo, A. Schmidtchen, M. Bodelsson, ANTIMICROBIAL AND CHEMOATTRACTANT ACTIVITY , LIPOPOLYSACCHARIDE NEUTRALIZATION ,

CYTOTOXICITY , AND INHIBITION BY SERUM OF ANALOGS OF HUMAN CATHELICIDIN LL-37, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 2845–2850. doi:10.1128/AAC.49.7.2845.

[28] H.R. Collard, IMPROVING SURVIVAL IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS: THE RACE HAS JUST BEGUN, *Chest.* 151 (2017) 527–528. doi:10.1016/j.chest.2017.01.007.

[29] V. Cottin, A. Schmidt, L. Catella, F. Porte, C. Fernandez-Montoya, K. Le Lay, S. Bénard, BURDEN OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS PROGRESSION: A 5-YEAR LONGITUDINAL FOLLOW-UP STUDY, *PLoS One.* 12 (2017) 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0166462.

[30] W. de M. Cruvinel, D. Mesquita Júnior, J.A.P. Araújo, T.T.T. Catelan, A.W.S. de Souza, N.P. da Silva, L.E.C. Andrade, SISTEMA IMUNITÁRIO – PARTE I FUNDAMENTOS DA IMUNIDADE INATA COM ÊNFASE NOS MECANISMOS MOLECULARES E CELULARES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA, *Rev Bras Reum.* 50 (2010) 434–61. doi:10.1590/S0482-50042010000400008.

[31] L. Cushing, P. Kuang, J. Lü, THE ROLE OF MIR-29 IN PULMONARY FIBROSIS, *Biochem. Cell Biol.* 93 (2015) 1–10.

[32] R.C. a Dancer, a M. Wood, D.R. Thickett, METALLOPROTEINASES IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS., *Eur. Respir. J.* 38 (2011) 1461–7. doi:10.1183/09031936.00024711.

[33] S.R. Datta, A. Brunet, M.E. Greenberg, CELLULAR SURVIVAL: A PLAY IN THREE AKTS, *Genes Dev.* 13 (1999) 2905–2927.

[34] M.E. De Paepe, C. Patel, A. Tsai, S. Gundavarapu, Q. Mao, ENDOGLIN (CD105) UP-REGULATION IN PULMONARY MICROVASCULATURE OF VENTILATED PRETERM

INFANTS, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178 (2008) 180–187. doi:10.1164/rccm.200608-1240OC.

[35] A.L. Degryse, H. Tanjore, X.C. Xu, V. V Polosukhin, B.R. Jones, F.B. McMahon, L. a Gleaves, T.S. Blackwell, W.E. Lawson, REPETITIVE INTRATRACHEAL BLEOMYCIN MODELS SEVERAL FEATURES OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 299 (2010) L442–L452. doi:10.1152/ajplung.00026.2010.

[36] A.L. Degryse, W.E. Lawson, PROGRESS TOWARD IMPROVING ANIMAL MODELS FOR IPF, *Am J Med Sci.* 341 (2011) 444–449. doi:10.1097/MAJ.0b013e31821aa000.PROGRESS.

[37] O. Desai, J. Winkler, M. Minasyan, E.L. Herzog, THE ROLE OF IMMUNE AND INFLAMMATORY CELLS IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Front. Med.* 5 (2018). doi:10.3389/fmed.2018.00043.

[38] G.A. Dosreis, V.M. Borges, W.A. Zin, THE CENTRAL ROLE OF FAS – LIGAND CELL SIGNALING IN INFLAMMATORY LUNG DISEASES, *J Cell Mol Med.* 8 (2004) 285–293.

[39] R.M. du Bois, A.U. Wells, CRYPTOGENIC FIBROSING ALVEOLITIS/IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Eur. Respir. J.* 18 (2001) 43–55.

[40] R. Duncan, B. Berman, DIFFERENTIAL REGULATION OF COLLAGEN, GLYCOSAMINOGLYCAN, FIBRONECTIN, AND COLLAGENASE ACTIVITY PRODUCTION IN CULTURED HUMAN ADULT DERMAL FIBROBLASTS BY INTERLEUKIN L-ALPHA AND BETA AND B AND TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA AND BETA, *J. Invest. Dermatol.* 92 (1989) 699–706.

[41] S. Ebener, S. Barnowski, C. Wotzkow, T.M. Marti, E. Lopez-Rodriguez, B. Crestani, F. Blank, R.A. Schmid, T. Geiser, M. Funke, TOLL-LIKE RECEPTOR 4 ACTIVATION ATTENUATES PROFIBROTIC RESPONSE IN CONTROL LUNG FIBROBLASTS BUT

NOT IN FIBROBLASTS FROM PATIENTS WITH IPF, *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 312 (2016) L42–L55. doi:10.1152/ajplung.00119.2016.

[42] T. Enomoto, J. Usuki, A. Azuma, T. Nakagawa, S. Kudoh, DIABETES MELLITUS MAY INCREASE RISK FOR IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Chest.* 123 (2003) 2007–2011. doi:10.1378/chest.123.6.2007.

[43] E.M.S. Fialho, M.C.G. Maciel, A.C.B. Silva, A.S. Reis, A.K.M. Assunção, T.S. Fortes, L. a Silva, R.N.M. Guerra, F.H. Kwasniewski, F.R.F. NASCIMENTO, IMMUNE CELLS RECRUITMENT AND ACTIVATION BY TITYUS SERRULATUS SCORPION VENOM., *Toxicon.* 58 (2011) 480–5. doi:10.1016/j.toxicon.2011.08.006.

[44] K. Fukumoto, Æ.I. Nagaoka, Æ.A. Yamataka, EFFECT OF ANTIBACTERIAL CATHELICIDIN PEPTIDE CAP18 / LL-37 ON SEPSIS IN NEONATAL RATS, *Reditr Surg Int.* 21 (2005) 20–24. doi:10.1007/s00383-004-1256-x.

[45] B.G. Fulton, C.J. Ryerson, MANAGING COMORBIDITIES IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Int. J. Gen. Med.* 8 (2015) 309–318. doi:10.2147/IJGM.S74880.

[46] T. Ganz, DEFENSINS: ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF INNATE IMMUNITY., *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 710–20. doi:10.1038/nri1180.

[47] J. Gauldie, M. Jordana, G. Cox, CYTOKINES 4: CYTOKINES AND PULMONARY FIBROSIS, *Thorax.* 48 (1993) 931–935.

[48] F. Grabarz, C.F. Aguiar, M. Correa-Costa, T.T. Braga, M.I. Hyane, V. Andrade-Oliveira, M.A. Landgraf, N.O.S. Câmara, PROTECTIVE ROLE OF NKT CELLS AND MACROPHAGE M2-DRIVEN PHENOTYPE IN BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS, *Inflammopharmacology.* 26 (2018) 491–504. doi:10.1007/s10787-017-0383-7.

[49] T.J. Gross, G.W. Hunninghake, IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS., *N. Engl. J. Med.* 345 (2001) 517–525. doi:10.1056/NEJMra003200.

- [50] F. Guilhelmelli, N. Vilela, K.S. Smidt, M.A. de Oliveira, A. da C. Moraes <sup>1</sup>/<sub>2</sub>lvares, M.C.L. Rigonatto, P.H. da Silva Costa, A.H. Tavares, S.M. de Freitas, A.M. Nicola, O.L. Franco, L. da S. Derengowski, E.F. Schwartz, M.R. Mortari, A.L. Bocca, P. Albuquerque, I. Silva-Pereira, ACTIVITY OF SCORPION VENOM-DERIVED ANTIFUNGAL PEPTIDES AGAINST PLANKTONIC CELLS OF CANDIDA SPP. AND CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS AND CANDIDA ALBICANS BIOFILMS, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1–14. doi:10.3389/fmicb.2016.01844.
- [51] G. Gurujeyalakshmi, M.A. Hollinger, S.N. Giri, A.J. Physiol, L. Cell, M. Physiol, A.J. Physiol, L. Cell, M. Physiol, J.P.E. Ther, PIRFENIDONE INHIBITS PDGF ISOFORMS IN BLEOMYCIN HAMSTER MODEL OF LUNG FIBROSIS AT THE TRANSLATIONAL LEVEL PIRFENIDONE INHIBITS PDGF ISOFORMS IN BLEOMYCIN HAMSTER MODEL OF LUNG FIBROSIS AT THE TRANSLATIONAL LEVEL, *Am. Physiol. Soc.* 276 (1999) L311–L318.
- [52] J. Guttmann, L. Eberhard, G. Wolff, W. Bertschmann, J. Zeravik, M. Adolph, MANEUVER-FREE DETERMINATION OF COMPLIANCE AND RESISTANCE IN VENTILATED ARDS PATIENTS, *Chest.* 102 (1992) 1235–1242. doi:10.1378/chest.102.4.1235.
- [53] R.E.W. Hancock, E.F. Haney, E.E. Gill, THE IMMUNOLOGY OF HOST DEFENCE PEPTIDES: BEYOND ANTIMICROBIAL ACTIVITY., *Nat. Rev. Immunol.* 16 (2016) 321–334. doi:10.1038/nri.2016.29.
- [54] Z. Hantos, B. Daroczy, B. Suki, S. Nagy, J.J. Fredberg, INPUT IMPEDANCE AND PERIPHERAL INHOMOGENEITY OF DOG LUNGS, *J. Appl. Physiol.* 72 (1992) 168–178. doi:10.1152/jappl.1992.72.1.168.
- [55] K. Haranaka, N. Satomi, A. Sakurai, DIFFERENCES IN TUMOR NECROSIS FACTOR PRODUCTIVE ABILITY AMONG RODENTS, *Br. J. Cancer.* 50 (1984) 471–478. <http://>

w w w . n c b i . n l m . n i h . g o v / e n t r e z / q u e r y . f c g i ?  
cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\_uids=3100847.

[56] S. Harari, A. Caminati, IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS: FROM CLINICAL TRIALS TO REAL-LIFE EXPERIENCES, *Eur. Respir. Rev.* 24 (2015) 420–427. doi: 10.1183/16000617.0042-2015.

[57] S. Harari, F. Madotto, A. Caminati, S. Conti, G. Cesana, EPIDEMIOLOGY OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS IN NORTHERN ITALY, *PLoS One*. 11 (2016) 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0147072.

[58] S. Harari, F. Madotto, S. Conti, G. Cesana, PREVALENCE OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS IN THE USA AND CANADA, *Eur Respir J.* 49 (2017) 1601504. doi:10.1183/00000000.00000000.

[59] N. Hashimoto, H. Jin, T. Liu, S.W. Chensue, S.H. Phan, BONE MARROW–DERIVED PROGENITOR CELLS IN PULMONARY FIBROSIS, *J. Clin. Invest.* 113 (2004) 243–252. doi:10.1172/JCI200418847.Introduction.

[60] J. Herrera, C. Forster, T. Pengo, A. Montero, J. Swift, M.A. Schwartz, C.A. Henke, P.B. Bitterman, REGISTRATION OF THE EXTRACELLULAR MATRIX COMPONENTS CONSTITUTING THE FIBROBLASTIC FOCUS IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *JCL Insight*. 4 (2019) 1–13.

[61] F. Hilberg, G.J. Roth, M. Krssak, S. Kautschitsch, W. Sommergruber, U. Tontsch-grunt, P. Garin-chesa, G. Bader, A. Zoephel, J. Quant, A. Heckel, W.J. Rettig, BIBF 1120: TRIPLE ANGIOKINASE INHIBITOR WITH SUSTAINED RECEPTOR BLOCKADE AND GOOD ANTITUMOR EFFICACY, *Cancer res.* 68: 12 (2008) 4774–4783. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6307.

[62] A.L. Hilchie, A.J. Sharon, E.F. Haney, D.W. Hoskin, M.B. Bally, O.L. Franco, J.A. Corcoran, R.E.W. Hancock, MASTOPARAN IS A MEMBRANOLYTIC ANTI-CANCER

PEPTIDE THAT WORKS SYNERGISTICALLY WITH GEMCITABINE IN A MOUSE MODEL OF MAMMARY CARCINOMA, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858 (2016) 3195–3204. doi:10.1016/j.bbamem.2016.09.021.

[63] T. Hirsch, M. Metzigg, A. Niederbichler, H.-U. Steinau, E. Eriksson, L. Steinstraesser, ROLE OF THE HOST DEFENSE PEPTIDES OF THE INNATE IMMUNE RESPONSE IN SEPSIS, *Shock*. 30 (2008) 117–126. doi:10.1097/SHK.0b013e318160de11.

[64] U. Hodgson, T. Laitinen, P. Tukiainen, NATIONWIDE PREVALENCE OF SPORADIC AND FAMILIAL IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS: EVIDENCE OF FOUNDER EFFECT AMONG MULTIPLEX FAMILIES IN FINLAND, *Thorax*. 57 (2002) 338–342. doi:10.1136/thorax.57.4.338.

[65] P.J. Hohensinner, J. Baumgartner, J.B. Kral-Pointner, P. Uhrin, B. Ebenbauer, B. Thaler, K. Doberer, S. Stojkovic, S. Demyanets, M.B. Fischer, K. Huber, G. Schabbauer, W.S. Speidl, J. Wojta, PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) EXPRESSION RENDERS ALTERNATIVELY ACTIVATED HUMAN MACROPHAGES PROTEOLYTICALLY QUIESCENT, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37 (2017) 1913–1922. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309383.

[66] S.T. Holgate, INNATE AND ADAPTIVE IMMUNE RESPONSES IN ASTHMA, *Nat. Med.* 18 (2012) 673–683. doi:10.1038/nm.2731.

[67] P.G. Holt, D.H. Strickland, M.E. Wikström, REGULATION OF IMMUNOLOGICAL HOMEOSTASIS IN THE RESPIRATORY TRACT, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 142-. doi:10.1038/nri2236.

[68] R.B. Hopkins, N. Burke, C. Fell, G. Dion, M. Kolb, EPIDEMIOLOGY AND SURVIVAL OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS FROM NATIONAL DATA IN CANADA, *Eur. Respir. J.* 48 (2016) 187–195. doi:10.1183/13993003.01504-2015.



- [69] J. Hou, T. Ma, H. Cao, Y. Chen, C. Wang, X. Chen, Z. Xiang, X. Han, NF-KB SIGNALING EXACERBATES BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS, *J. Cell. Physiol.* 233 (2018) 2409–2419. doi:10.1002/jcp.26112.
- [70] X. Huang, W. Zhou, S. Ding, DOWNREGULATED SMAD4 AFFECTS EXTRACELLULAR MATRIX REMODELING IN VENTILATOR-INDUCED LUNG INJURY, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 46 (2016) 451–456.
- [71] F. Huaux, T. Liu, B. McGarry, M. Ullenbruch, S.H. Phan, DUAL ROLES OF IL-4 IN LUNG INJURY AND FIBROSIS, *J. Immunol.* 170 (2003) 2083–2092. doi:10.4049/jimmunol.170.4.2083.
- [72] K. Imaizumi, M. Sugishita, M. Usui, T. Kawabe, N. Hashimoto, Y. Hasegawa, PULMONARY INFECTIOUS COMPLICATIONS ASSOCIATED WITH ANTI-TNF- $\alpha$  THERAPY (INFLIXIMAB) FOR RHEUMATOID ARTHRITIS, *Intern.Med.* 45 (2006) 685–688. doi:10.2169/internalmedicine.45.1623.
- [73] M. Inayama, Y. Nishioka, M. Azuma, S. Muto, Y. Aono, H. Makino, K. Tani, H. Uehara, K. Izumi, A. Itai, S. Sone, A NOVEL I $\kappa$ B KINASE- $\beta$  INHIBITOR AMELIORATES BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS IN MICE, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173 (2006) 1016–1022. doi:10.1164/rccm.200506-947OC.
- [74] A. Iwasaki, E.F. Foxman, R.D. Molony, N. Haven, N. Haven, N. Haven, EARLY LOCAL IMMUNE DEFENSES IN THE RESPIRATORY TRACT, *Nat Rev Immunol.* 17 (2017) 7–20. doi:10.1038/nri.2016.117.Early.
- [75] F.B. Jatene, P.M.P. Fernandes, I.L. De Medeiros, TRANSPLANTE PULMONAR - LUNG TRANSPLANTATION, *Rev Med.* 88 (2009) 111–122.
- [76] C. Jiang, G. Liu, T. Luckhardt, V. Antony, Y. Zhou, A.B. Carter, V.J. Thannickal, R.M. Liu, SERPINE 1 INDUCES ALVEOLAR TYPE II CELL SENESCENCE THROUGH

ACTIVATING P53-P21-RB PATHWAY IN FIBROTIC LUNG DISEASE, *Aging Cell*. 16 (2017) 1114–1124. doi:10.1111/accel.12643.

[77] H.E. Jo, I. Glaspole, C. Grainge, N. Goh, P.M.A. Hopkins, Y. Moodley, P.N. Reynolds, S. Chapman, E.H. Walters, C. Zappala, H. Allan, G.J. Keir, A. Hayen, W.A. Cooper, A.M. Mahar, S. Ellis, S. Macansh, T.J. Corte, BASELINE CHARACTERISTICS OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS: ANALYSIS FROM THE AUSTRALIAN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS REGISTRY., *Eur. Respir. J.* 49 (2017). doi: 10.1183/13993003.01592-2016.

[78] L.C. Junqueira, J. Carneiro, HISTOLOGIA BÁSICA, 11ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

[79] J.M. Kahlenberg, M.J. Kaplan, LITTLE PEPTIDE, BIG EFFECTS: THE ROLE OF LL-37 IN INFLAMMATION AND AUTOIMMUNE DISEASE, *J Immunol*. 191 (2013) 1–15. doi:10.4049/jimmunol.1302005.Little.

[80] K. Kamikawaji, N. Seki, M. Watanabe, H. Mataka, T. Kumamoto, K. Takagi, K. Mizuno, H. Inoue, REGULATION OF LOXL2 AND SERPINH1 BY ANTITUMOR MICRORNA-29A IN LUNG CANCER WITH IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *J. Hum. Genet.* (2016) 1–9. doi:10.1038/jhg.2016.99.

[81] S. Kamitani, Y. Yamauchi, S. Kawasaki, K. Takami, H. Takizawa, T. Nagase, T. Kohyama, SIMULTANEOUS STIMULATION WITH TGF-BETA1 AND TNF-ALPHA INDUCES EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION IN BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS, *Int Arch Allergy Immunol*. 155 (2011) 119–128. doi:10.1159/000318854.

[82] M.P. Keane, J. a Belperio, T. a Moore, B.B. Moore, D. a Arenberg, R.E. Smith, M.D. Burdick, S.L. Kunkel, R.M. Strieter, NEUTRALIZATION OF THE CXC CHEMOKINE, MACROPHAGE INFLAMMATORY PROTEIN-2, ATTENUATES BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS., *J. Immunol*. 162 (1999) 5511–5518.

- [83] L. Knüppel, A. Walch, H.P. B, O. Eickelberg, C.A. Staab-weijnitz, A NOVEL ANTIFIBROTIC MECHANISM OF NINTEDANIB AND PIRFENIDONE INHIBITION OF COLLAGEN FIBRIL ASSEMBLY, *AJRCMB*. 57 (2017) 77–90. doi:10.1165/rcmb.2016-0217OC.
- [84] M. Kolb, P.J. Margetts, T. Galt, P.J. Sime, Z. Xing, M. Schmidt, J. Gauldie, TRANSIENT TRANSGENE EXPRESSION OF DECORIN IN THE LUNG REDUCES THE FIBROTIC RESPONSE TO BLEOMYCIN, *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 163 (2001) 770–777. doi:10.1164/ajrccm.163.3.2006084.
- [85] J.E. Kolodsick, G.B. Toews, C. Jakubzick, T.A. Moore, A. Mckenzie, A. Carol, C.J. Chrisman, B.B. Moore, J.E. Kolodsick, G.B. Toews, C. Jakubzick, C. Hogaboam, T.A. Moore, A. Mckenzie, C.A. Wilke, C.J. Chrisman, B.B. Moore, PROTECTION FROM FLUORESCHEIN ISOTHIOCYANATE-INDUCED FIBROSIS IN IL-13-DEFICIENT, BUT NOT IL-4-DEFICIENT, MICE RESULTS FROM IMPAIRED COLLAGEN SYNTHESIS BY FIBROBLASTS, *J Immunol*. 172 (2004) 4068–4076. doi:10.4049/jimmunol.172.7.4068.
- [86] M. Kreuter, V. Cottin, THE YIN AND YANG OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Eur Respir J*. 49 (2017). doi:10.1183/13993003.02316-2016.
- [87] R.K. Kumar, C. Herbert, M. Yang, A.M.L. Koskinen, A.N.J. Mckenzie, P.S. Foster, ROLE OF INTERLEUKIN-13 IN EOSINOPHIL ACCUMULATION AND AIRWAY REMODELLING IN A MOUSE MODEL OF CHRONIC ASTHMA, *Clin Exp Allergy*. 32: (2002) 1104–1111.
- [88] M. Kuwana, Y. Okazaki, H. Kodama, K. Izumi, H. Yasuoka, Y. Ogawa, Y. Kawakami, Y. Ikeda, HUMAN CIRCULATING CD14+ MONOCYTES AS A SOURCE OF PROGENITORS THAT EXHIBIT MESENCHYMAL CELL DIFFERENTIATION, *J. Leukoc. Biol*. 74 (2003) 833–845. doi:10.1189/jlb.0403170.Journal.

- [89] Y. Lai, R.L. Gallo, AMPED UP IMMUNITY: HOW ANTIMICROBIAL PEPTIDES HAVE MULTIPLE ROLES IN IMMUNE DEFENSE., *Trends Immunol.* 30 (2009) 131–41. doi:10.1016/j.it.2008.12.003.
- [90] J.L. Larson-casey, J.S. Deshane, A.J. Ryan, V.J. Thannickal, A.B. Carter, MACROPHAGE AKT1 KINASE-MEDIATED MITOPHAGY MODULATES APOPTOSIS RESISTANCE AND PULMONARY FIBROSIS, *Immunity.* 44 (2016) 582–596. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.001.Macrophage.
- [91] J.L. Larson-Casey, S. Murthy, A.J. Ryan, A.B. Carter, MODULATION OF THE MEVALONATE PATHWAY BY AKT REGULATES MACROPHAGE SURVIVAL AND DEVELOPMENT OF PULMONARY FIBROSIS, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 36204–36219. doi:10.1074/jbc.M114.593285.
- [92] B. Ley, K.K. Brown, H.R. Collard, MOLECULAR BIOMARKERS IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 307 (2014) L681-91. doi:10.1152/ajplung.00014.2014.
- [93] B. Ley, H.R. Collard, EPIDEMIOLOGY OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Clin. Epidemiol.* 5 (2013) 483–492. doi:10.2147/CLEP.S54815.
- [94] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, ANALYSIS OF RELATIVE GENE EXPRESSION DATA USING REAL-TIME QUANTITATIVE PCR AND THE 2(-DELTA DELTA C(T)) Method., *Methods.* 25 (2001) 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [95] C.M. Lloyd, B.J. Marsland, LUNG HOMEOSTASIS: INFLUENCE OF AGE, MICROBES, AND THE IMMUNE SYSTEM, *Immunity.* 46 (2017) 549–561. doi:10.1016/j.immuni.2017.04.005.
- [96] N.J. Lomas, K.L. Watts, K.M. Akram, N.R. Forsyth, M.A. Spiteri, IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS: IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS PROVIDES FRESH

INSIGHTS INTO LUNG TISSUE REMODELING WITH IMPLICATIONS FOR NOVEL PROGNOSTIC MARKERS, *Int J Clin Exp Pathol.* 5 (2012) 58–71.

[97] A.J. Lopes, A.J. Noronha, T.T. Mafort, MECANISMOS DE DEFESA DO SISTEMA RESPIRATÓRIO, *Rev. Hosp. Univ. PedRo ERnesto, UeRJ.* 9 (2010) 10–16. doi:10.1016/j.coastaleng.2005.09.003.

[98] Y. Martinet, W.N. Rom, G.R. Grotendorst, G.R. Martin, R.G. Crystal, Exaggerated SPONTANEOUS RELEASE OF PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR BY ALVEOLAR MACROPHAGES FROM PATIENTS WITH IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *N. Engl. J. Med.* 317 (1987) 202–209.

[99] L. McMahon, K. Schwartz, O. Yilmaz, E. Brown, L.K. Ryan, G. Diamond, VITAMIN D-MEDIATED INDUCTION OF INNATE IMMUNITY IN GINGIVAL EPITHELIAL CELLS., *Infect. Immun.* 79 (2011) 2250–6. doi:10.1128/IAI.00099-11.

[100] E.B. Meltzer, W.T. Barry, I. V Yang, K.K. Brown, M.I. Schwarz, H. Patel, A. Ashley, P.W. Noble, D.A. Schwartz, M.P. Steele, FAMILIAL AND SPORADIC IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS: MAKING THE DIAGNOSIS FROM PERIPHERAL BLOOD., *BMC Genomics.* 15 (2014) 902. doi:10.1186/1471-2164-15-902.

[101] P. Méndez-Samperio, RECENT ADVANCES IN THE FIELD OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES IN INFLAMMATORY DISEASES., *Adv Biomed Res.* 2 (2013).

[102] E.N. Miyaji, E. Carvalho, M.L.S. Oliveira, I. Raw, P.L. Ho, TRENDS IN ADJUVANT DEVELOPMENT FOR VACCINES: DAMPS AND PAMPS AS POTENTIAL NEW ADJUVANTS, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 44 (2011) 500–513. doi:10.1590/S0100-879X2011007500064.

[103] Y. Miyazaki, K. Araki, C. Vesin, I. Garcia, Y. Kapanci, J.A. Whitsett, P. Piguet, P. Vassalli, EXPRESSION OF A TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$  TRANSGENE IN MURINE

LUNG CAUSES LYMPHOCYTIC AND FIBROSING ALVEOLITIS, *J. Clin. Invest.* 96 (1995) 250–259.

[104] N. Mookherjee, R.E.W. Hancock, CATIONIC HOST DEFENCE PEPTIDES: INNATE IMMUNE REGULATORY PEPTIDES AS A NOVEL APPROACH FOR TREATING INFECTIONS., *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (2007) 922–33. doi:10.1007/s00018-007-6475-6.

[105] J.J. Mooney, K. Raimundo, E. Chang, M.S. Broder, HOSPITAL COST AND LENGTH OF STAY IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *J. Med. Econ.* 20 (2017) 518–524. doi:10.1080/13696998.2017.1282864.

[106] E. Morgunova, A. Tuuttila, U. Bergmann, K. Tryggvason, STRUCTURAL INSIGHT INTO THE COMPLEX FORMATION OF LATENT MATRIX METALLOPROTEINASE 2 WITH TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE 2, *PNAS* 99 (2002) 7414–7419.

[107] Y. Morishita, H. Yoshizawa, M. Watanabe, K. Ishibashi, S. Muto, SIRTININ TARGETED TO SMAD4 PREVENT RENAL FIBROSIS IN VIVO, *Sci. Rep.* 4 (2014) 1–8. doi:10.1038/srep06424.

[108] W.E.G. Müller, B. Blumberg, I.M. Müller, EVOLUTION OF THE INNATE AND ADAPTATIVE IMMUNE SYSTEMS., *Transplantation.* 68 (1999) 1215–1227.

[109] A. Nahid, M. Satoh, E.K.L. Chan, MICRORNA IN TLR SIGNALING AND ENDOTOXIN TOLERANCE, *Cell. Mol. Immunol.* 8 (2011) 388–403. doi:10.1038/cmi.2011.26.

[110] G. Nakos, A. Adams, N. Andriopoulos, ANTIBODIES TO COLLAGEN IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC FIBROSIS, *Chest.* 103 (1993) 1051–1058. doi:10.1378/chest.103.4.1051.

[111] F. Niyonsaba, H. Ushio, N. Nakano, W. Ng, K. Sayama, K. Hashimoto, I. Nagaoka, K. Okumura, H. Ogawa, ANTIMICROBIAL PEPTIDES HUMAN BETA-DEFENSINS

STIMULATE EPIDERMAL KERATINOCYTE MIGRATION, PROLIFERATION AND PRODUCTION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND CHEMOKINES., *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 594–604. doi:10.1038/sj.jid.5700599.

[112] T. Nürnberger, F. Brunner, B. Kemmerling, L. Piater, INNATE IMMUNITY IN PLANTS AND ANIMALS: STRIKING SIMILARITIES AND OBVIOUS DIFFERENCES., *Immunol. Rev.* 198 (2004) 249–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199967>.

[113] H. Oku, T. Shimizu, T. Kawabata, M. Nagira, I. Hikita, A. Ueyama, S. Matsushima, M. Torii, A. Arimura, ANTIFIBROTIC ACTION OF PIRFENIDONE AND PREDNISOLONE: DIFFERENT EFFECTS ON PULMONARY CYTOKINES AND GROWTH FACTORS IN BLEOMYCIN-INDUCED MURINE PULMONARY FIBROSIS, *Eur. J. Pharmacol.* 590 (2008) 400–408. doi:10.1016/j.ejphar.2008.06.046.

[114] L. Organ, B. Bacci, E. Koumoundouros, G. Wayne, C.S. Samuel, C.J. Nowell, P. Bradding, M. Katy, G. Westall, J. Jaffar, K.J. SNIBSON, INHIBITION OF THE KCA3.1 CHANNEL ALLEVIATES ESTABLISHED PULMONARY FIBROSIS IN A LARGE ANIMAL MODEL, *Am. J. Respir. Cell Mollecular Biol.* (2017) 1–37. doi:<https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0092OC>.

[115] E. Ortiz, G.B. Gurrola, E.F. Schwartz, L.D. Possani, SCORPION VENOM COMPONENTS AS POTENTIAL CANDIDATES FOR DRUG DEVELOPMENT, *Toxicon.* 93 (2014) 125–135. doi:10.1016/j.toxicon.2014.11.233.

[116] D. V. Pechkovsky, A. Prasse, F. Kollert, K.M.Y. Engel, J. Dentler, W. Luttmann, K. Friedrich, J. Müller-Quernheim, G. Zissel, ALTERNATIVELY ACTIVATED ALVEOLAR MACROPHAGES IN PULMONARY FIBROSIS-MEDIATOR PRODUCTION AND INTRACELLULAR SIGNAL TRANSDUCTION, *Clin. Immunol.* 137 (2010) 89–101. doi:10.1016/j.clim.2010.06.017.

- [117] R. Peng, S. Sridhar, G. Tyagi, J.E. Phillips, R. Garrido, P. Harris, L. Burns, L. Renteria, J. Woods, L. Chen, J. Allard, P. Ravindran, H. Bitter, Z. Liang, C.M. Hogaboam, C. Kitson, D.C. Budd, J.S. Fine, C.M.T. Bauer, C.S. Stevenson, BLEOMYCIN INDUCES MOLECULAR CHANGES DIRECTLY RELEVANT TO IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS: A MODEL FOR “ACTIVE” DISEASE, *PLoS One*. 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0059348.
- [118] S. Phan, S. Kunkel, LUNG CYTOKINE PRODUCTION IN BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS, *Exp. Lung Res.* 43 (1992) 29–43. doi: 10.3109/01902149209020649.
- [119] P.F. Piguet, G.E. Grau, P. Vassalli, SUBCUTANEOUS PERFUSION OF TUMOR NECROSIS FACTOR INDUCES LOCAL PROLIFERATION OF FIBROBLASTS, CAPILLARIES, AND EPIDERMAL CELLS, OR MASSIVE TISSUE NECROSIS., *Am. J. Pathol.* 136 (1990) 103–10. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1877459&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [120] P.F. Piguet, C. Vesin, PULMONARY PLATELET TRAPPING INDUCED BY BLEOMYCIN: CORRELATION WITH FIBROSIS AND INVOLVEMENT OF THE BETA 2 INTEGRINS., *Int. J. Exp. Pathol.* 75 (1994) 321–328.
- [121] P.F. Piguet, C. Vesin, TREATMENT BY HUMAN RECOMBINANT SOLUBLE TNF RECEPTOR OF PULMONARY FIBROSIS INDUCED BY BLEOMYCIN OR SILICA IN MICE, *Eur. Respir. J.* 7 (1994) 515–518. doi:10.1183/09031936.94.07030515.
- [122] P.F. Piguet, C. Ribaux, V. Karpuz, G.E. Grau, SHORT COMMUNICATION EXPRESSION AND LOCALIZATION OF TUMOR NECROSIS, *Am. J. Pathol.* 143 (1993) 651–655.



- [123] P.F. Piguet, M.A. Collart, G.E. Grau, A.-P. Sappino, P. Vassalli, REQUIREMENT OF TUMOUR NECROSIS FACTOR FOR DEVELOPMENT OF SILICA-INDUCED PULMONARY FIBROSIS, *Nature*. 344 (1990) 245–247.
- [124] A.E. Postlethwaite, H. Shigemitsu, S. Kanangat, CELLULAR ORIGINS OF FIBROBLASTS: POSSIBLE IMPLICATIONS FOR ORGAN FIBROSIS IN SYSTEMIC SCLEROSIS, *Curr. Opin. Rheumatol.* 16 (2004) 733–738. doi:10.1097/01.bor.0000139310.77347.9c.
- [125] D.W. Powell, R.C. Mifflin, J.D. Valentich, S.E. Crowe, J.I. Saada, A.B. West, MYOFIBROBLASTS. I. PARACRINE CELLS IMPORTANT IN HEALTH AND DISEASE, *Am. J. Physiol. Physiol.* 277 (1999) C1–C19.
- [126] A. Prasse, D. V. Pechkovsky, G.B. Toews, W. Jungraithmayr, F. Kollert, T. Goldmann, E. Vollmer, J. Müller-Quernheim, G. Zissel, A VICIOUS CIRCLE OF ALVEOLAR MACROPHAGES AND FIBROBLASTS PERPETUATES PULMONARY FIBROSIS VIA CCL18, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173 (2006) 781–792. doi:10.1164/rccm.200509-1518OC.
- [127] G. Raghu, T.D. Freudenberger, S. Yang, J.R. Curtis, C. Spada, J. Hayes, J.K. Sillery, C.E. Pope, C.A. Pellegrini, HIGH PREVALENCE OF ABNORMAL ACID GASTRO-OESOPHAGEAL REFLUX IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Eur. Respir. J.* 27 (2006) 136–142. doi:10.1183/09031936.06.00037005.
- [128] G. Raghu, K.K. Brown, U. Costabel, V. Cottin, R.M. du Bois, J. a Lasky, M. Thomeer, J.P. Utz, R.K. Khandker, L. McDermott, S. Fatenejad, TREATMENT OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS WITH ETANERCEPT: AN EXPLORATORY, PLACEBO-CONTROLLED TRIAL., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178 (2008) 948–55. doi:10.1164/rccm.200709-1446OC.

- [129] G. Raghu, S.Y. Chen, Q. Hou, W.S. Yeh, H.R. Collard, INCIDENCE AND PREVALENCE OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS IN US ADULTS 18-64 YEARS OLD, *Eur. Respir. J.* 48 (2016) 179–186. doi:10.1183/13993003.01653-2015.
- [130] G. Raghu, S.Y. Chen, W.S. Yeh, B. Maroni, Q. Li, Y.C. Lee, H.R. Collard, IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS IN US MEDICARE BENEFICIARIES AGED 65 YEARS AND OLDER: INCIDENCE, PREVALENCE, AND SURVIVAL, 2001-11, *Lancet Respir. Med.* 2 (2014) 566–572. doi:10.1016/S2213-2600(14)70101-8.
- [131] G. Raghu, H.R. Collard, J.J. Egan, F.J. Martinez, J. Behr, K.K. Brown, T. V. Colby, J.F. Cordier, K.R. Flaherty, J.A. Lasky, D.A. Lynch, J.H. Ryu, J.J. Swigris, A.U. Wells, J. Ancochea, D. Bouros, C. Carvalho, U. Costabel, M. Ebina, D.M. Hansell, T. Johkoh, D.S. Kim, T.E. King, Y. Kondoh, J. Myers, N.L. Müller, A.G. Nicholson, L. Richeldi, M. Selman, R.F. Dudden, B.S. Griss, S.L. Protzko, H.J. Schünemann, AN OFFICIAL ATS/ERS/JRS/ALAT STATEMENT: IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS: EVIDENCE-BASED GUIDELINES FOR DIAGNOSIS AND MANAGEMENT, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183 (2011) 788–824. doi:10.1164/rccm.2009-040GL.
- [132] G. Raghu, L.D. Hudson, G.E. Striker, EXTRACELLULAR MATRIX IN NORMAL AND FIBROTIC HUMAN LUNGS, *Am Rev Respir Dis.* 131 (1985) 281–289.
- [133] G. Raghu, B. Rochweg, Y. Zhang, C.A.C. Garcia, A. Azuma, J. Behr, J.L. Brozek, H.R. Collard, W. Cunningham, S. Homma, T. Johkoh, F.J. Martinez, J. Myers, S.L. Protzko, L. Richeldi, D. Rind, M. Selman, A. Theodore, A.U. Wells, H. Hoogsteden, H.J. Schünemann, ATS, ERS, JRS, AN OFFICIAL ATS/ERS/JRS/ALAT CLINICAL PRACTICE GUIDELINE: TREATMENT OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS: AN UPDATE OF THE 2011 CLINICAL PRACTICE GUIDELINE, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 192 (2015) e3–e19. doi:10.1164/rccm.201506-1063ST.

- [134] E.W. Raines, S.K. Dower, R. Ross, INTERLEUKIN-1 MITOGENIC ACTIVITY FOR FIBROBLASTS AND SMOOTH MUSCLE CELLS IS DUE TO PDGF-AA., *Science* (80-. ). 243 (1989) 393–396. doi:10.1126/science.2783498.
- [135] J.A. Rankin, D.E. Picarellat, G.P. Gebat, U. Temann, B. Prasad, B. Dicosmot, A. Tarallo, B. Strippi, J. Whitsetfri, R.A. Flavell, PHENOTYPIC AND PHYSIOLOGIC CHARACTERIZATION OF TRANSGENIC MICE EXPRESSING INTERLEUKIN 4 IN THE LUNG: LYMPHOCYTIC AND EOSINOPHILIC INFLAMMATION WITHOUT AIRWAY HYPERREACTIVITY, *Immunology*. 93 (1996) 7821–7825.
- [136] C.D. Richards, INNATE IMMUNE CYTOKINES, FIBROBLAST PHENOTYPES, AND REGULATION OF EXTRACELLULAR MATRIX IN LUNG, *J. Interf. Cytokine Res.* 37 (2017) 52–61. doi:10.1089/jir.2016.0112.
- [137] G.J. Roth, R. Binder, F. Colbatzky, C. Dallinger, R. Schlenker-herceg, F. Hilberg, S. Wollin, R. Kaiser, NINTEDANIB: FROM DISCOVERY TO THE CLINIC, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 1053–1063. doi:10.1021/jm501562a.
- [138] F. Ruscitti, F. Ravanetti, G. Donofrio, Y. Ridwan, P. van Heijningen, J. Essers, G. Villetti, A. Cacchioli, W. Vos, F.F. Stellari, A MULTIMODAL IMAGING APPROACH BASED ON MICRO-CT AND FLUORESCENCE MOLECULAR TOMOGRAPHY FOR LONGITUDINAL ASSESSMENT OF BLEOMYCIN-INDUCED LUNG FIBROSIS IN MICE, *J. Vis. Exp.* 2018 (2018) 1–7. doi:10.3791/56443.
- [139] N. Sakai, A.M. Tager, FIBROSIS OF TWO: EPITHELIAL CELL-FIBROBLAST INTERACTIONS IN PULMONARY FIBROSIS, *Biochim. Biophys. Acta.* 1832 (2013) 911–921. doi:10.1016/j.bbadis.2013.03.001.
- [140] F. Sánchez, A. Orero, A. Soriano, C. Correcher, P. Conde, A. González, L. Hernández, L. Moliner, M.J. Rodríguez-Alvarez, L.F. Vidal, J.M. Benlloch, S.E. Chapman, W.M. Leevy,

ALBIRA: A SMALL ANIMAL PETSPECTCT IMAGING SYSTEM, *Med. Phys.* 40 (2013) 1–11. doi:10.1118/1.4800798.

[141] M. Saraiva, J.R. Christensen, M. Veldhoen, T.L. Murphy, K.M. Murphy, A.O. Garra, INTERLEUKIN-10 PRODUCTION BY TH1 CELLS REQUIRES INTERLEUKIN-12-INDUCED STAT4 TRANSCRIPTION FACTOR AND ERK MAP KINASE ACTIVATION BY HIGH ANTIGEN DOSE, *Immunity*. 31 (2009) 209–219. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.012.

[142] M. Scocchi, B. Skerlavaj, D. Romeo, R. Gennaro, PROTEOLYTIC CLEAVAGE BY NEUTROPHIL ELASTASE CONVERTS INACTIVE STORAGE PROFORMS TO ANTIBACTERIAL BACTENECINS., *Eur. J. Biochem.* 209 (1992) 589–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1425666>.

[143] C.J. Scotton, R.C. Chambers, BLEOMYCIN REVISITED: TOWARDS A MORE REPRESENTATIVE MODEL OF IPF?, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 299 (2010) L439–L441. doi:10.1152/ajplung.00258.2010.Editorial.

[144] A.S. Shen, C. Haslett, D.C. Feldsien, P.M. Henson, R.M. Cherniack, THE INTENSITY OF CHRONIC LUNG INFLAMMATION AND FIBROSIS AFTER BLEOMYCIN IS DIRECTLY RELATED TO THE SEVERITY OF ACUTE INJURY<sup>1-4</sup>, *Am Rev Respir Dis*. 2 (1988) 564–571.

[145] Z.J. Shen, R.K. Braun, J. Hu, Q. Xie, H. Chu, R.B. Love, L.A. Stodola, L.A. Rosenthal, R.J. Szakaly, R.L. Sorkness, J.S. Malter, PIN1 PROTEIN REGULATES SMAD PROTEIN SIGNALING AND PULMONARY FIBROSIS, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 23294–23305. doi:10.1074/jbc.M111.313684.

[146] T.M. Simone, C.E. Higgins, R. Czekay, B.K. Law, S.P. Higgins, J. Archambeault, S.M. Kutz, P.J. Higgins, S.E.T. A, SERPINE1: A MOLECULAR SWITCH IN THE PROLIFERATION-MIGRATION DICHOTOMY IN WOUND- “ ACTIVATED ”

KERATINOCYTES, *Advances in Wound Care*. 3 (2014) 281–290. doi:10.1089/wound.2013.0512.

[147] C.M. Sköld, E. Bendstrup, M. Myllärniemi, G. Gudmundsson, T. Sjøheim, O. Hilberg, A. Altraja, R. Kaarteenaho, G. Ferrara, TREATMENT OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS: A POSITION PAPER FROM A NORDIC EXPERT GROUP, *J. Intern. Med.* 281 (2017) 149–166. doi:10.1111/joim.12571.

[148] O.E. Sørensen, N. Borregaard, A.M. Cole, ANTIMICROBIAL PEPTIDES IN INNATE IMMUNE RESPONSES., *Contrib. Microbiol.* 15 (2008) 61–77. doi:10.1159/000136315.

[149] P. Spagnolo, T.M. Maher, L. Richeldi, IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS: RECENT ADVANCES ON PHARMACOLOGICAL THERAPY, *Pharmacol. Ther.* 152 (2015) 18–27. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.04.005.

[150] P. Spagnolo, PIRFENIDONE AND MORTALITY IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Lancet Respir. Med.* 5 (2016) 3–5. doi:10.1016/S2213-2600(16)30416-7.

[151] H. Steiner, D. Hultmark, Å. Engström, H. Bennich, H.G. Boman, SEQUENCE AND SPECIFICITY OF TWO ANTIBACTERIAL PROTEINS INVOLVED IN INSECT IMMUNITY, *Nature*. 292 (1981) 246–248.

[152] L. Steinstraesser, T. Hirsch, M. Schulte, M. Kueckelhaus, F. Jacobsen, E. a Mersch, I. Stricker, N. Afacan, H. Jenssen, R.E.W. Hancock, J. Kindrachuk, INNATE DEFENSE REGULATOR PEPTIDE 1018 IN WOUND HEALING AND WOUND INFECTION., *PLoS One*. 7 (2012) e39373. doi:10.1371/journal.pone.0039373.

[153] P.A. Stumbles, J.W. Upham, P.G. Holt, AIRWAY DENDRITIC CELLS: COORDINATORS OF IMMUNOLOGICAL HOMEOSTASIS AND IMMUNITY IN THE RESPIRATORY TRACT, *APMIS*. 111 (2003) 741–755.

- [154] D.E. Sullivan, M. Ferris, D. Pociask, A.R. Brody, TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA INDUCES TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA1 EXPRESSION IN LUNG FIBROBLASTS THROUGH THE EXTRACELLULAR SIGNAL – REGULATED KINASE PATHWAY, *Am J Res.* 32 (2005) 342–349. doi:10.1165/rcmb.2004-0288OC.
- [155] a Suwabe, K. Takahashi, S. Yasui, S. Arai, F. Sendo, BLEOMYCIN-STIMULATED HAMSTER ALVEOLAR MACROPHAGES RELEASE INTERLEUKIN-1, *Am. J. Pathol.* 132 (1988) 512–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2118282>.
- [156] A. Suzuki, Y. Kondoh, THE CLINICAL IMPACT OF MAJOR COMORBIDITIES ON IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Respir. Investig.* 55 (2017) 94–103. doi:10.1016/j.resinv.2016.11.004.
- [157] K. Takenaka, A. Gemma, A. Yoshimura, Y. Hosoya, M. Nara, Y. Hosomi, T. Okano, S. Kunugi, K. Koizumi, Y.U.H. Fukuda, K. Uematsu, K. Shimizu, S. Kudoh, REDUCED TRANSCRIPTION OF THE SMAD4 GENE DURING PULMONARY CARCINOGENESIS IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Mol. Med. Rep.* 2 (2009) 73–80. doi:10.3892/mmr.
- [158] J. Tashiro, G.A. Rubio, A.H. Limper, K. Williams, S.J. Elliot, I. Ninou, V. Aidinis, A. Tzouvelekis, M.K. Glassberg, EXPLORING ANIMAL MODELS THAT RESEMBLE IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Front. Med.* 4 (2017) 1–11. doi:10.3389/fmed.2017.00118.
- [159] A.L. Tatler, A.T. Goodwin, O. Gbolahan, G. Saini, H. Parfrey, P.J. Wolters, J. Gauldie, M. Kolb, G. Jenkins, AMPLIFICATION OF TGF B INDUCED ITGB6 GENE TRANSCRIPTION MAY PROMOTE PULMONARY FIBROSIS, *PLoS One.* 11 (2016) 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0158047.

- [160] K. Thavarajah, P. Wu, E.J. Rhew, A.K. Yeldandi, D.W. Kamp, PULMONARY COMPLICATIONS OF TUMOR NECROSIS FACTOR- TARGETED THERAPY, *Respir. Med.* 103 (2009) 661–669. doi:10.1016/j.rmed.2009.01.002.PULMONARY.
- [161] G.J. Tortora, CORPO HUMANO: FUNDAMENTOS DE ANATOMIA E FISILOGIA., 4ª edição, Artmed, Porto Alegre, 2000.
- [162] D. Vandamme, B. Landuyt, W. Luyten, L. Schoofs, A COMPREHENSIVE SUMMARY OF LL-37 , THE FACTOTUM HUMAN CATELICIDIN PEPTIDE, *Cell. Immunol.* 280 (2012) 22–35. doi:10.1016/j.cellimm.2012.11.009.
- [163] P.H.D.H. Veloso, K.S. Simon, R.J.A. de Castro, L.C. Coelho, F.A.H. Erazo, A.C.B. de Souza, R.C. da Neves, V.F. Lozano, E.F. Schwartz, A.H. Tavares, M.R. Mortari, A.P. Junqueira-kipnis, I. Silva-pereira, A.L. Bocca, PEPTIDES TOAP3 AND TOAP4 DECREASE RELEASE OF INFLAMMATORY CYTOKINES THROUGH TLR-4 BLOCKING, *Biomed. Pharmacother.* 118 (2019). doi:10.1016/j.biopha.2019.109152.
- [164] B.Y.J.A.N. Vilcek, V.J. Palombella, D. Henriksen-destefano, C. Swenson, R. Feinman, M. Hirai, M. Tsujimoto, FIBROBLAST GROWTH ENHANCING ACTIVITY OF TO NECROSIS FACTOR AND ITS RELATIONSHIP OTHER GROWTH FACTORS, *J Exp Med.* 163 (1986) 632–643.
- [165] H.H. Walford, T.A. Doherty, STAT6 AND LUNG INFLAMMATION, *JAK-STAT.* 2 (2013) 1–11.
- [166] B.C. Willis, J.M. Liebler, K. Luby-Phelps, A.G. Nicholson, E.D. Crandall, R.M. du Bois, Z. Borok, INDUCTION OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS BY TRANSFORMING GROWTH FACTOR- $\beta$ 1, *Am. J. Pathol.* 166 (2005) 1321–1332. doi:10.1016/S0002-9440(10)62351-6.
- [167] M.S. Wilson, T. a Wynn, PULMONARY FIBROSIS: PATHOGENESIS, ETIOLOGY AND REGULATION., *Mucosal Immunol.* 2 (2009) 103–21. doi:10.1038/mi.2008.85.

- [168] L. Wollin, I. Maillet, V. Quesniaux, A. Holweg, B. Ryffel, ANTIFIBROTIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF THE TYROSINE KINASE INHIBITOR NINTEDANIB IN EXPERIMENTAL MODELS OF LUNG FIBROSIS S, *J Pharmacol Exp Ther.* 349 (2014) 209–220.
- [169] L. Wollin, E. Wex, A. Pautsch, G. Schnapp, K.E. Hostettler, S. Stowasser, M. Kolb, MODE OF ACTION OF NINTEDANIB IN THE TREATMENT OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, *Eur Respir J.* 45 (2015) 1434–1445. doi: 10.1183/09031936.00174914.
- [170] A.L. Wurster, T. Tanaka, M.J. Grusby, THE BIOLOGY OF STAT4 AND STAT6, *Oncogene.* 19 (2000) 2577–2584.
- [171] T.A. Wynn, INTEGRATING MECHANISMS OF PULMONARY FIBROSIS., *J. Exp. Med.* 208 (2011) 1339–1350. doi:10.1084/jem.20110551.
- [172] W. Yu, F. Guo, X. Song, EFFECTS AND MECHANISMS OF PIRFENIDONE, PREDNISONE AND ACETYLCYSTEINE ON PULMONARY FIBROSIS IN RAT IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS MODELS, *Pharm. Biol.* 55 (2017) 450–455. doi: 10.1080/13880209.2016.1247879.
- [173] M. Zanetti, CATHELICIDINS , MULTIFUNCTIONAL PEPTIDES OF THE INNATE IMMUNITY, *J. Leukoc. Biol.* 75 (2004) 39–48. doi:10.1189/jlb.0403147.Journal.
- [174] M. Zanetti, R. Gennaro, D. Romeo, CATHELICIDINS: A NOVEL PROTEIN FAMILY WITH A COMMON PROREGION AND A VARIABLE C-TERMINAL ANTIMICROBIAL DOMAIN, *FEBS Lett.* 374 (1995) 1–5.
- [175] K. Zhang, M.D. Rekhter, D. Gordon, S.H. Phan, MYOFIBROBLASTS AND THEIR ROLE IN LUNG COLLAGEN GENE EXPRESSION DURING PULMONARY FIBROSIS. A COMBINED IMMUNOHISTOCHEMICAL AND IN SITU HYBRIDIZATION STUDY.,



Am. J. Pathol. 145 (1994) 114–25. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1887314&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

[176] K. Zhang, S.H. Phan, CYTOKINES AND PULMONARY FIBROSIS, *Biol Signa.* 5 (1996) 232–239. doi:10.1159/000109195.

[177] J. Zhao, W. Shi, H. Chen, D. Warburton, SMAD7 AND SMAD6 DIFFERENTIALLY MODULATE TRANSFORMING GROWTH FACTOR B-INDUCED INHIBITION OF EMBRYONIC LUNG MORPHOGENESIS, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 23992–23997. doi:10.1074/jbc.M002433200.

[178] J. Zhu, L. Guo, C.J. Watson, J. Hu-li, W.E. Paul, STAT6 IS NECESSARY AND SUFFICIENT FOR IL-4'S ROLE IN TH2 DIFFERENTIATION AND CELL EXPANSION, (2019). doi:10.4049/jimmunol.166.12.7276.

[179] Z. Zhu, Y. Zhang, J.A. Elias, Z. Zhu, R.J. Homer, Z. Wang, Q. Chen, G.P. Geba, J. Wang, Y. Zhang, J.A. Elias, PULMONARY EXPRESSION OF INTERLEUKIN-13 CAUSES INFLAMMATION , MUCUS HYPERSECRETION, SUBEPITHELIAL FIBROSIS, PHYSIOLOGIC ABNORMALITIES, AND EOTAXIN PRODUCTION FIND THE LATEST VERSION: INFLAMMATION, MUCUS HYPERSECRETION, SUBEPITHELIAL FIBROSIS, *PHYSIO, J. Clin. Invest.* 103 (1999) 779–788.

[180] K.F. Zoccal, C.D.S. Bitencourt, F.W.G. Paula-Silva, C.A. Sorgi, K. De Castro Figueiredo Bordon, E.C. Arantes, L.H. Faccioli, TLR2, TLR4 AND CD14 RECOGNIZE VENOM-ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS FROM TITYUS SERRULATUS TO INDUCE MACROPHAGE-DERIVED INFLAMMATORY MEDIATORS, *PLoS One.* 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0088174.


[181] K.F. Zoccal, C.D.S. Bitencourt, A. Secatto, C.A. Sorgi, K.D.C.F. Bordon, S.V. Sampaio, E.C. Arantes, L.H. Faccioli, TITYUS SERRULATUS VENOM AND TOXINS TS1, TS2

AND TS6 INDUCE MACROPHAGE ACTIVATION AND PRODUCTION OF IMMUNE MEDIATORS., *Toxicon*. 57 (2011) 1101–8. doi:10.1016/j.toxicon.2011.04.017.

[182] K.F. Zoccal, C.D.S. Bitencourt, C.A. Sorgi, K.D.C.F. Bordon, S.V. Sampaio, E.C. Arantes, L.H. Faccioli, TS6 AND TS2 FROM TITYUS SERRULATUS VENOM INDUCE INFLAMMATION BY MECHANISMS DEPENDENT ON LIPID MEDIATORS AND CYTOKINE PRODUCTION., *Toxicon*. 61 (2013) 1–10. doi:10.1016/j.toxicon.2012.10.002.

[183] S. Zucker, M. Drews, C. Conner, H.D. Foda, Y.A. Declerck, K.E. Langley, W.F. Bahou, A.J.P. Docherty, J. Cao, TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE-2 ( TIMP-2 ) BINDS TO THE CATALYTIC DOMAIN OF THE CELL SURFACE RECEPTOR , MEMBRANE TYPE 1-MATRIX METALLOPROTEINASE 1 ( MT1-MMP )\*, *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 1216–1222.

## ANEXO I




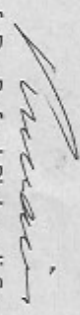
**Universidade de Brasília**  
 Instituto de Ciências Biológicas  
 Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 20 de agosto de 2014.


**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "**BASES MOLECULARES DA MODULAÇÃO DA FIBROSE PULMONAR E POSSÍVEIS APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS**", UnBDoc n.º 100166/2014, sob responsabilidade da Professora Anamélia L. Bocca foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.





Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior  
 Coordenador da CEUA



\* Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

## ANEXO II

```

<Algorithms><Algorithm Name="Positive Pixel Count 2004-08-11" Description="Counts
Positive Pixels into Three Intensity Bins" AlgorithmLicenseId="10016"
Incremental="0"><Parameter Title="View Width" Value="1000" Description="Width of
processing box" Type="0"><ParameterAttribute><Min>0</Min><Max>2500</
Max><Step>100</Step></ParameterAttribute></Parameter><Parameter Title="View Height"
Value="1000" Description="Height of processing box"
Type="0"><ParameterAttribute><Min>0</Min><Max>2500</Max><Step>100</Step></
ParameterAttribute></Parameter><Parameter Title="Overlap Size" Value="0"
Description="Size of the overlap region for each view. This should be atleast as big as the
average object size" Type="0"><ParameterAttribute><Min>0</Min><Max>300</
Max><Step>10</Step></ParameterAttribute></Parameter><Parameter Title="Image Zoom"
Value="1" Description="Zoom level to be used. Higher zoom results in faster algorithm run
but less accurate results." Type="1"><ParameterAttribute><Min>0</Min><Max>1</
Max><Step>0,1</Step></ParameterAttribute></Parameter><Parameter Title="Markup
Compression Type" Value="0" Description="This sets compression type for algorithm
markup image. Choose better compression if you need it for a special purpose."
Type="4"><ParameterAttribute><List><Item Value="0" Description="Same as processed
image"/><Item Value="1" Description="JPEG"/><Item Value="2" Description="JPEG2000"/
></List></ParameterAttribute></Parameter><Parameter Title="Compression Quality"
Value="30" Description="Higher quality takes longer and yields bigger files. Does not apply
to all compression types." Type="0"><ParameterAttribute><Min>0</Min><Max>95</
Max><Step>1</Step></ParameterAttribute></Parameter><Parameter Title="Classifier
Neighborhood" Value="0" Description="Size (microns) of neighborhood to pad boundary of

```

each view, as required by classifier." Type="1"><ParameterAttribute><Min>0</Min><Max>200</Max><Step>10</Step></ParameterAttribute></Parameter><Parameter Title="Classifier" Value="None" Description="Choose from the list of Classifiers available in Spectrum" Type="6"><ParameterAttribute/></Parameter><Parameter Title="Class List" Value="" Description="Pick the classes to retain for further processing" Type="5"><ParameterAttribute/></Parameter><Parameter Title="Hue Value" Value=" .1" Description=" 0 &lt;= Hue &lt;= 1 , B R O W N = 0 . 1 , B L U E = 0 . 6 6 " Type="1"><ParameterAttribute><Min>0</Min><Max>1</Max><Step>0,01</Step></ParameterAttribute></Parameter><Parameter Title="Hue Width" Value=" .33" Description="0&lt;=Hue Width&lt;=1, 0=&gt;Narrow, 1=&gt;Wide Band" Type="1"><ParameterAttribute><Min>0</Min><Max>1</Max><Step>0,01</Step></ParameterAttribute></Parameter><Parameter Title="Color Saturation Threshold" Value=" .04" Description="Pixels with  $((R+G+B) - 3*\min(R,G,B))/(R+G+B)$  less than this value will be ignored" Type="1"><ParameterAttribute><Min>0</Min><Max>1</Max><Step>0,01</Step></ParameterAttribute></Parameter><Parameter Title="Iwp(High)" Value=" 220" Description="Intensity Threshold (Upper Limit) of WEAK Positive Pixels" Type="0"><ParameterAttribute><Min>0</Min><Max>255</Max><Step>1</Step></ParameterAttribute></Parameter><Parameter Title="Iwp(Low) = Ip (High)" Value=" 175" Description="Intensity Threshold (Lower Limit) of WEAK Positive Pixels" Type="0"><ParameterAttribute><Min>0</Min><Max>255</Max><Step>1</Step></ParameterAttribute></Parameter><Parameter Title="Ip(Low) = Isp(High)" Value=" 100" Description="Intensity Threshold (Lower Limit) of MEDIUM Positive Pixels" Type="0"><ParameterAttribute><Min>0</Min><Max>255</Max><Step>1</Step></ParameterAttribute></Parameter><Parameter Title="Isp (Low)" Value=" 0"

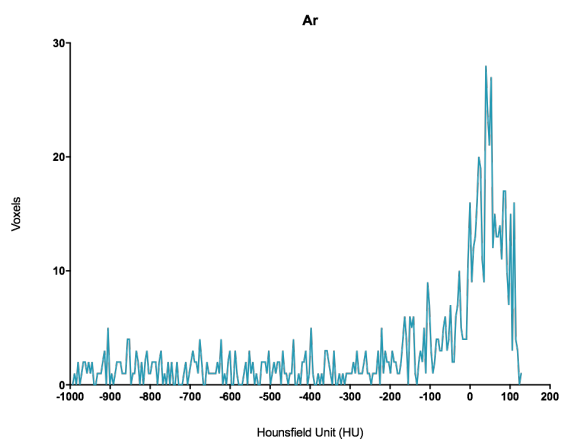
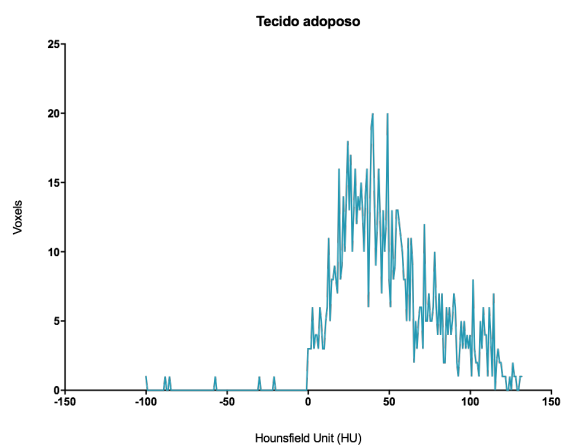
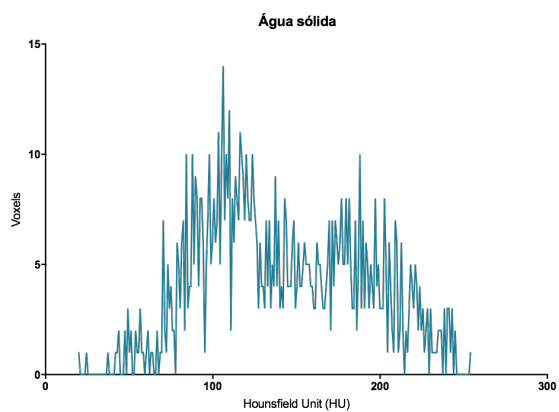
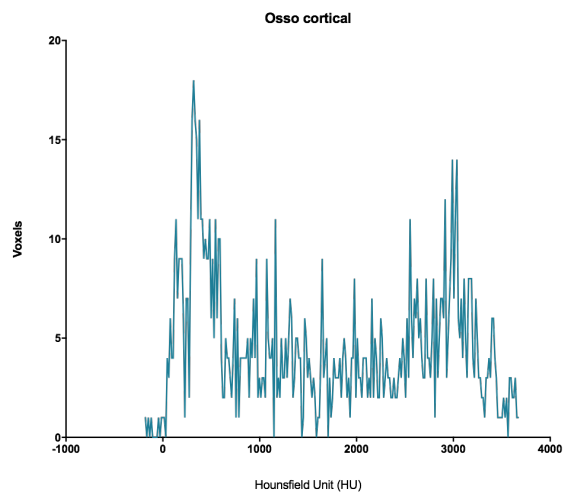
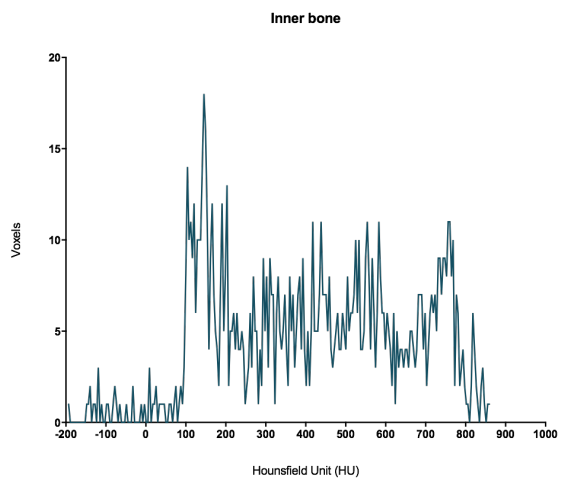
Description="Intensity Threshold (Lower Limit) of STRONG Positive Pixels"  
Type="0"><ParameterAttribute><Min>0</Min><Max>255</Max><Step>1</Step></  
ParameterAttribute></Parameter><Parameter Title="Inp(High)" Value="-1"  
Description="Intensity Threshold of Negative Pixels (-1 defaults to Iwp(High))"  
Type="0"><ParameterAttribute><Min></Min><Max>255</Max><Step>1</Step></  
ParameterAttribute></Parameter><MacroOutputCollection><MacroOutput><Title>Nwp =  
Number of Weak Positive</Title></MacroOutput><MacroOutput><Title>Np = Number of  
Positive</Title></MacroOutput><MacroOutput><Title>Nsp = Number of Strong Positive</  
Title></MacroOutput><MacroOutput><Title>Iwp = Total Intensity of Weak Positive</  
Title></MacroOutput><MacroOutput><Title>Ip = Total Intensity of Positive</Title></  
MacroOutput><MacroOutput><Title>Isp = Total Intensity of Strong Positive</Title></  
MacroOutput><MacroOutput><Title>Iavg =  $(Iwp+Ip+Isp)/(Nwp+Np+Nsp)$ </Title></  
MacroOutput><MacroOutput><Title>Nsr =  $Nsp/(Nwp+Np+Nsp)$ </Title></  
MacroOutput><MacroOutput><Title>Iwavg =  $(Iwp+Ip)/(Nwp+Np)$ </Title></  
MacroOutput><MacroOutput><Title>Nn = Number of Negative</Title></  
MacroOutput><MacroOutput><Title>In = Total Intensity of Negative</Title></  
MacroOutput><MacroOutput><Title>NTotal = Total Number (Positive+Negative)</Title></  
MacroOutput><MacroOutput><Title>Positivity =  $NPositive/NTotal$ </Title></  
MacroOutput></MacroOutputCollection></Algorithm></Algorithms>

## Algorithm Positive Pixel Count 2004-08-11

Version	8,100
Algorithm Inputs	
View Width	1000
View Hight	1000
Overlap Size	0
Image Zoom	1
Markup Compression Type	Same as processed image
Compression Quality	30
Classifier Neighborhood	0
Classifier	None
Class List	
Hue Value (Center)	0,1
Hue Width	0,33
Color saturation Threshold	0,04
Intensity Threshold WEAK (Upper Limit)	220
Intensity Threshold WEAK (Lower Limit)	175
Intensity Threshold MEDIUM (Upper Limit)	175
Intensity Threshold MEDIUM (Lower Limit)	100
Intensity Threshold STRONG (Upper Limit)	100
Intensity Threshold STRONG (Lower Limit)	0
Intensity Threshold Negative Pixels	-1

## ANEXO III

## Dados camundongo XRM-5 X-ray Phantom Mouse (Caliper)





## ANEXO IV

## Genes contidos na placa do PCR Array

Símbolo	Descrição
Acta2	Actina, alfa 2, músculo liso, aorta
Agt	Angiotensinogen (inibidor da peptidase serpina, clado A, membro 8)
Akt1	Proto-oncogene Viral de Timoma 1
Bcl2	Leucemia de células B/Linfoma 2
Bmp7	Proteína morfogénica óssea 7
Cav1	Caveolina 1/Proteína Caveolae
Ccl11	Quimicina (motivo c-c) ligante 11
Ccl12	Quimicina (motivo c-c) ligante 12
Ccl3	Quimicina (motivo c-c) ligante 3
Ccr2	Receptor de Quimicina (motivo c-c) 2
Cebpb	CCAAT/ Proteína de ligação do <i>enhancer</i> (C/EPB), beta
Col1a2	Colágeno, tipo 1, alfa 2
Col3a1	Colágeno, tipo 3, alfa 1
Ctgf	Fator de crescimento de tecido conectivo
Cxcr4	Receptor de quimiocina (motivo c-x-c) 4
Dcn	Decorina
Edn1	Endotelina 1
Egf	Fator de crescimento epidérmico
Eng	Endoglina
FasL	Fas ligante (superfamília de TNF, membro 6)
Grem1	Gremlin 1
Hgf	Fator de crescimento de hepatócito
Ifng	Interferon gama
Il10	Interleucina 10
Il13	Interleucina 13
Il13ra2	Receptor de interleucina 13, alfa 2
Il1a	Interleucina 1 alfa
Il1b	Interleucina 1 beta
Il4	Interleucina 4
Il5	Interleucina 5
Ilk	Quinase ligada a integrina
Inhbe	Inhibin beta E

Itga1	Integrina alfa 1
Itga2	Integrina alfa 2
Itga3	Integrina alfa 3
Itgav	Integrina alfa V
Itgb1	Integrina beta 1 (receptor de fibronectina beta)
Itgb3	Integrina beta 3
Itgb5	Integrina beta 5
Itgb6	Integrina beta 6
Itgb8	Integrina beta 8
Jun	Jun oncogene
Lox	Lisil oxidase
Ltbp1	Proteína de ligação do fator de transformação beta latente 1
Mmp13	Metaloperoxidase de matriz 13
Mmp14	Metaloperoxidase de matriz 14
Mmp1a	Metaloperoxidase de matriz 1 alfa
Mmp2	Metaloperoxidase de matriz 2
Mmp3	Metaloperoxidase de matriz 3
Mmp8	Metaloperoxidase de matriz 8
Mmp9	Metaloperoxidase de matriz 9
Myc	Oncogene de mielocitomastose
Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105
Pdgfa	Fator de crescimento derivado de plaquetas, alfa
Pdgfb	Fator de crescimento derivado de plaquetas, polipeptídeo B
Plat	Ativador de plasminogênio, tecido
Plau	Ativador de plasminogênio, uroquinase
Plg	Plasminogênio
Serpina1a	Inibidor de peptidase serina (ou cisteína), clado A, membro 1 alfa
Serpine1	Inibidor de peptidase serina (ou cisteína), clado E, membro 1
Serpinh1	Inibidor de peptidase serina (ou cisteína), clado H, membro 1
Smad2	Homólogo de MAD 2 (Drosófila)
Smad3	Homólogo de MAD 3 (Drosófila)
Smad4	Homólogo de MAD 4 (Drosófila)
Smad6	Homólogo de MAD 6 (Drosófila)
Smad7	Homólogo de MAD 7 (Drosófila)
Snai1	Homólogo de Snail 1 (Drosófila)
Sp1	Fator de transcrição trans-actin 1
Stat1	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1

Stat6	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 6
Tgfb1	Fator de crescimento transformador, beta 1
Tgfb2	Fator de crescimento transformador, beta 2
Tgfb3	Fator de crescimento transformador, beta 3
Tgfbr1	Receptor do fator de crescimento transformador, beta 1
Tgfbr2	Receptor do fator de crescimento transformador, beta 2
Tgif1	Fator homeobox induzido por TGFB 1
Thbs1	Trombospondina 1
Thbs2	Trombospondina 2
Timp1	Inibidor tecidual de metaloproteinases 1
Timp2	Inibidor tecidual de metaloproteinases 2
Timp3	Inibidor tecidual de metaloproteinases 3
Timp4	Inibidor tecidual de metaloproteinases 4
Tnf	Fator de necrose tumoral
Vegfa	Fator de crescimento de endotélio vascular A
Actb	Actina, beta
B2m	Beta-2 microglobulina
Gapdh	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Gusb	Glucoronidase, beta
Hsp90ab1	Proteína de choque térmico 90 alfa (citossólica), classe B, membro 1