



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**ESTUDO DO EFEITO DA ANGIOTENSINA 1-7 EM UM MODELO DE  
FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR BLEOMICINA**

Flávia Rago Glória Gonçalves

Belo Horizonte,  
Fevereiro/2017

Flávia Rago Glória Gonçalves

**ESTUDO DO EFEITO DA ANGIOTENSINA 1-7 EM UM MODELO DE  
FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR BLEOMICINA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira  
(Departamento de Bioquímica e Imunologia –

Belo Horizonte,  
Fevereiro/2017



043

Gonçalves, Flávia Rago Glória.

Estudo do efeito da angiotensina 1-7 em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina [manuscrito] / Flávia Rago Glória Gonçalves. – 2017. 79 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Bleomicina. 3. Fibrose Pulmonar. 4. Angiotensinas. I. Teixeira, Mauro Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615




**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FLAVIA RAGO GLORIA GONÇALVES.** Aos quatorze dias do mês de fevereiro de 2017 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Estudo do efeito da angiotensina 1-7 em um modelo de fibrose pulmonar induzida por Bleomicina", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Mauro Martins Teixeira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Lirlândia Pires de Souza (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Denise Carmona Cara Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Mauro Martins Teixeira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 14 de fevereiro de 2017.

  
 Dra. Lirlândia Pires de Souza (UFMG)

  
 Dra. Denise Carmona Cara Machado (UFMG)

  
 Dr. Mauro Martins Teixeira - Orientador (UFMG)

  
 Leda Quercia Vieira  
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

## RESUMO

Toxicidade pulmonar induzida por bleomicina é um efeito adverso comumente encontrado em pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico de algumas neoplasias, gerando um quadro de dispneia, hipoxemia e diminuição da capacidade funcional dos pulmões que pode levar o paciente ao óbito. Bleomicina é um agente antineoplásico usado para tratar diversos tipos de cânceres, como linfomas, câncer de pescoço, câncer de cabeça, de ovário e de testículo, para o qual possui 90% de cura. Entretanto, seu uso terapêutico se torna limitado pelo fato desse fármaco desencadear quebra nas fitas de DNA e consequente toxicidade celular nos pulmões dos pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico, o que ocasionará no desenvolvimento de fibrose pulmonar. Diante disso, faz-se necessário o estudo de estratégias que minimizem o efeito colateral do tratamento com esse fármaco.

Em nosso trabalho, estudamos o efeito do pré-tratamento com angiotensina 1-7 em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Angiotensina 1-7 é um heptapeptídeo do sistema Renina-Angiotensina com atividade anti-fibrótica e anti-inflamatória que vem sendo estudada em modelos de fibrose pulmonar. Em vista disso, nosso objetivo foi investigar os parâmetros inflamatórios e fibróticos na fibrose pulmonar induzida por bleomicina, sob o tratamento com angiotensina 1-7, via oral. A princípio, realizamos a padronização de uma dose de bleomicina a ser utilizada em nosso modelo, em camundongos machos C57Bl/6j. Feito isso, iniciamos o estudo do tratamento com angiotensina 1-7, também em camundongos machos C57Bl/6j, uma hora antes da indução da fibrose pulmonar, a qual foi induzida pela instilação com bleomicina. Os animais foram sacrificados 2, 7 e 14 dias após a instilação e o lavado broncoalveolar e retirada do tecido pulmonar foram realizados. Podemos observar que o tratamento prévio diminuiu a perda de peso e aumentou a sobrevivência dos animais tratados. O tratamento também interferiu significativamente no recrutamento celular diminuindo os níveis de mononucleares e neutrófilos nas vias aéreas dos camundongos tratados assim como os níveis de neutrófilos no tecido pulmonar.

Em conjunto, nossos resultados indicam que o tratamento prévio com angiotensina 1-7, em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina melhora o processo inflamatório nas vias aéreas e no tecido pulmonar de camundongos tratados, aumentando assim, a sobrevivência desses animais.

**Palavras-chave:** Bleomicina, fibrose pulmonar, angiotensina 1-7, inflamação

## **ABSTRACT**

Bleomycin - induced lung toxicity is a collateral effect commonly developed by patients submitted to chemotherapy treatments, causing dyspnea, hypoxia and decreased lung capacity, leading patients to death. Bleomycin is an antineoplastic agent used to treat a huge range of lymphomas, head and neck cancer, ovarium and testicular cancer, which has 90% of cure. However, bleomycin therapeutic efficacy is limited because it can mediate both single-stranded and double-stranded DNA damage, and consequently lung fibrosis. That is why the study of strategies that minimize the effect of treatment with this drug is necessary.

We have studied the effect of the previous treatment with angiotensin 1-7 on bleomycin-induced lung fibrosis model. Angiotensin 1-7 is a heptapeptide of renin-angiotensin system, with anti-fibrotic and anti-inflammatory activity, and it has been studied in some models of lung fibrosis. Due to this, we aim to study the inflammatory and fibrotic parameters on Bleomycin-induced lung fibrosis of mice under the treatment with angiotensin 1-7, via gavage. First, we standardized a dose of bleomycin to be used in our model. After this, male mice C57Bl/6j were treated with angiotensin 1-7, one hour before the induction of lung fibrosis. The animals were euthanized 2, 7 and 14 days after bleomycin instillation. We observed that the pre-treatment with angiotensin -17 decreased the animals weight lost and increased the animal's life time. The treatment also decreased, significantly, the levels of mononuclear cells and neutrophils in the mice airways, as well as the levels of neutrophil in lung tissue.

Therefore, our results indicate that the pre-treatment with angiotensin 1-7, in this Bleomycin-induced lung fibrosis model, improves inflammatory process in the airways and lung tissue of mice treated, increasing their life time.

**Keywords:** Bleomycin, lung fibrosis, angiotensin 1-7, inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Imagem ilustrativa do corte transversal de um alvéolo. ....	16
<b>Figura 2.</b> Estrutura da molécula. de Bleomicina .....	18
<b>Figura 3.</b> Esquema da ação da bleomicina.....	19
<b>Figura 4.</b> Esquema fisiopatológico da BILI.....	25
<b>Figura 5.</b> Esquema simplificado do sistema renina angiotensina (RAS).....	27
<b>Figura 6.</b> Delineamento experimental representando o estudo de padronização da dose de Bleomicina em um modelo de fibrose pulmonar. ....	32
<b>Figura 7.</b> Delineamento experimental representando o estudo do efeito do tratamento prévio com Angiotensina em um modelo de fibrose pulmonar induzida por Bleomicina.....	33
<b>Figura 8.</b> Perda de peso do experimento de padronização da dose de bleomicina em um modelo de fibrose pulmonar. ....	40
<b>Figura 9.</b> Letalidade do experimento de padronização da dose de bleomicina em um modelo de fibrose pulmonar .....	41
<b>Figura 10.</b> Análise do recrutamento celular no lavado broncoalveolar após instilação com duas doses de bleomicina. ....	43
<b>Figura 11.</b> Análise do recrutamento celular para o tecido pulmonar após instilação com duas doses de bleomicina. ....	45
<b>Figura 12.</b> Análise da produção de IL-1 $\beta$ no tecido pulmonar após instilação com duas doses de bleomicina .....	46
<b>Figura 13.</b> Avaliação dos parâmetros histológicos em um modelo de fibrose induzida por bleomicina. ....	48-49
<b>Figura 14.</b> Efeito da instilação de duas doses de bleomicina na deposição de colágeno em um modelo de fibrose pulmonar.....	51-52
<b>Figura 15.</b> Perda de peso do experimento de pré-tratamento com angiotensina 1-7 em um modelo de fibrose pulmonar inzulida por bleomicina. ....	54

<b>Figura 16.</b> Letalidade do experimento de pré-tratamento com angiotensina 1-7 em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina.....	55
<b>Figura 17.</b> Efeito do tratamento com angiotensina 1-7 no recrutamento celular em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina.....	57
<b>Figura 18.</b> Análise da influência do tratamento com angiotensina 1-7 no recrutamento celular para o tecido pulmonar.. ..	59
<b>Figura 19.</b> Efeito do pré-tratamento com angiotensina 1-7 na produção de citocinas pulmonares em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina.....	61-62

## LISTA DE ABREVEAÇÕES

BLM – Bleomicina  
BLT – Bleomycin lung toxicity  
ROS – Espécies reativas de oxigênio  
RNS – Espécies reativas de nitrogênio  
Fe(II) – Ferro ferroso  
Fe(III) – Ferro férrico  
BLH – Hidrolase de Bleomicina  
EMT – Transição mesenquimal-epitelial  
EndEMT – Transição mesenquimal-endotelial  
TGF- $\beta$  - Fator de crescimento transformador  $\beta$   
TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose tumoral  $\alpha$   
IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 $\beta$   
LPS – Lipopolissacarídeo  
TLR – Receptor de célula T  
BILI – Dano Pulmonar Induzido por Bleomicina  
IL-18 – Interleucina 18  
IL-22 – Interleucina 22  
IL17a – Interleucina 17a  
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaqueta  
COL1 – Colágeno tipo 1  
COL1A1 – Gene de colágeno tipo 1, alfa 1  
COL1A2 – Gene de colágeno tipo 1, alfa 2  
CTGF – Proteína da matriz extra celular  
SARA – Síndrome da Angustia Respiratória Aguda  
D<sub>LCO</sub> - Difusão pulmonar  
FEV1 – Volume Expiratório Forçado em 1 segundo  
pO<sub>2</sub> - Pressão de oxigênio  
pCO<sub>2</sub> - Pressão de gás carbônico  
RAS – Sistema Renina-angiotensina  
Ang II – Angiotensina II  
ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

AT1R – Receptor de angiotensina II do tipo 1

ECA 2 – Enzima Conversora de Angiotensina do tipo 2

ANGIO 1-7 – Angiotensina 1-7

NFκB – Fator nuclear kappa B

UI – Unidade Internacional

NaCl 0,9% - Salina 0,9%

BAL – Lavado Broncoalveolar

NAG – N-acetilglicosaminidase

MPO – Mieloperoxidase

CICLO – Ciclodextrina

RPM – Rotação Por Minuto



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
1.1	Fibrose pulmonar	12
<b>1.2.</b>	<b>Bleomicina</b>	<b>14</b>
1.3	Estrutura e ação	15
1.3.1	<i>Desativação da bleomicina</i>	18
1.4	Fibrose pulmonar induzida por Bleomicina e mediadores celulares envolvidos	18
<b>1.1.</b>	<b>Angiotensina 1-7</b>	<b>24</b>
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>27</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>28</b>
<b>3.1.</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>28</b>
<b>3.2.</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>28</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>4.1.</b>	<b>Animais</b>	<b>29</b>
<b>4.2.</b>	<b>Indução da fibrose pulmonar pela bleomicina</b>	<b>29</b>
<b>4.3.</b>	<b>Delineamento experimental</b>	<b>29</b>
4.3.1.	<i>Padronização da dose de BLM</i>	29
4.3.2.	<i>Tratamento prévio com ANGIO</i>	30
<b>4.4.</b>	<b>Lavado bronco alveolar (BAL) e coleta dos pulmões</b>	<b>31</b>
<b>4.5.</b>	<b>Contagem total e diferencial dos leucócitos</b>	<b>32</b>
<b>4.6.</b>	<b>Processamento de pulmão para dosagem de citocinas e ensaio de mpo e nag</b>	<b>32</b>
<b>4.7.</b>	<b>Ensaio da atividade da mieloperoxidase (MPO)</b>	<b>33</b>
<b>4.8.</b>	<b>Ensaio da atividade da n-acetilglicosaminidase (NAG)</b>	<b>33</b>
<b>4.9.</b>	<b>Dosagem de quimiocinas e citocinas</b>	<b>34</b>
<b>4.10.</b>	<b>Dosagem de tgf-<math>\beta</math></b>	<b>34</b>
4.10.1.	<i>Preparação da Placa</i>	34
<b>4.11.</b>	<b>Análise histológica e score da fibrose</b>	<b>35</b>
<b>4.12.</b>	<b>Análises estatísticas</b>	<b>36</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
<b>5.1.</b>	<b>Padronização do modelo</b>	<b>37</b>
5.1.1.	<i>Animais instilados com a maior dose de bleomicina apresentaram maior perda de peso se comparado aos animais instilados com a dose menor</i>	37
5.1.2.	<i>Animais instilados com a maior dose de bleomicina apresentaram taxa de mortalidade maior que os animais instilados com a dose menor</i>	39
5.1.3.	<i>Caracterização do recrutamento celular para o espaço alveolar no modelo de fibrose induzida por bleomicina</i>	40
5.1.4.	<i>Caracterização do recrutamento celular para o tecido pulmonar no modelo de fibrose induzida por bleomicina</i>	42
5.1.5.	<i>Efeito das doses 1,5mg/kg e 3,0mg/kg de bleomicina na produção da citocina IL-1<math>\beta</math></i>	44

5.1.6.	<i>Avaliação dos parâmetros histológicos na fibrose pulmonar induzida por 1,5mg/kg e 3,0mg/kg de bleomicina.....</i>	45
5.1.7.	<i>Avaliação da deposição de colágeno em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina.....</i>	48
5.2.	<b>Pré-tratamento com angiotensina 1-7 .....</b>	51
5.2.1.	<i>Animais tratados com angiotensina 1-7, 1 hora antes da instilação com bleomicina, apresentaram menor perda de peso ao longo do experimento.....</i>	51
5.2.2.	<i>O pré-tratamento com angiotensina 1-7, em um modelo de fibrose induzida por bleomicina, manteve a sobrevivência dos animais tratados em 100%.....</i>	53
5.2.3.	<i>O pré-tratamento com angiotensina 1-7 diminuiu o recrutamento celular no lavado broncoalveolar de animais tratados.....</i>	54
5.2.4.	<i>Efeito do tratamento com angiotensina 1-7 no recrutamento de células para o tecido pulmonar de animais instilados com bleomicina.....</i>	56
5.2.5.	<i>Influência do pré-tratamento de angiotensina 1-7 na produção de citocinas e quimiocinas pulmonares .....</i>	58
5.3.	<b>Sumário dos resultados.....</b>	61
6.	<b>DISCUSSÃO .....</b>	62
7.	<b>CONCLUSÃO .....</b>	66
	<b>Referências.....</b>	67
	<b>Anexo.....</b>	79

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Fibrose pulmonar

O pulmão é um órgão que tem como função principal a troca gasosa. Estruturalmente ele pode ser dividido em duas partes: (I) vias aéreas centrais, sendo composta pela traqueia, brônquios e bronquíolos terminais (vias condutoras dos gases respiratórios) e (II) parênquima periférico, que abrange os bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolos (regiões de troca gasosa). 300 milhões de alvéolos podem ser encontrados em um indivíduo adulto, tendo cada um deles 0,25mm de diâmetro. Em humanos adultos, estima-se que a área da superfície alveolar pode chegar a 100 m<sup>2</sup> enquanto a área da superfície endotelial dos capilares um pouco menor (~10-20%) (Weibel *et al.*, 1984).

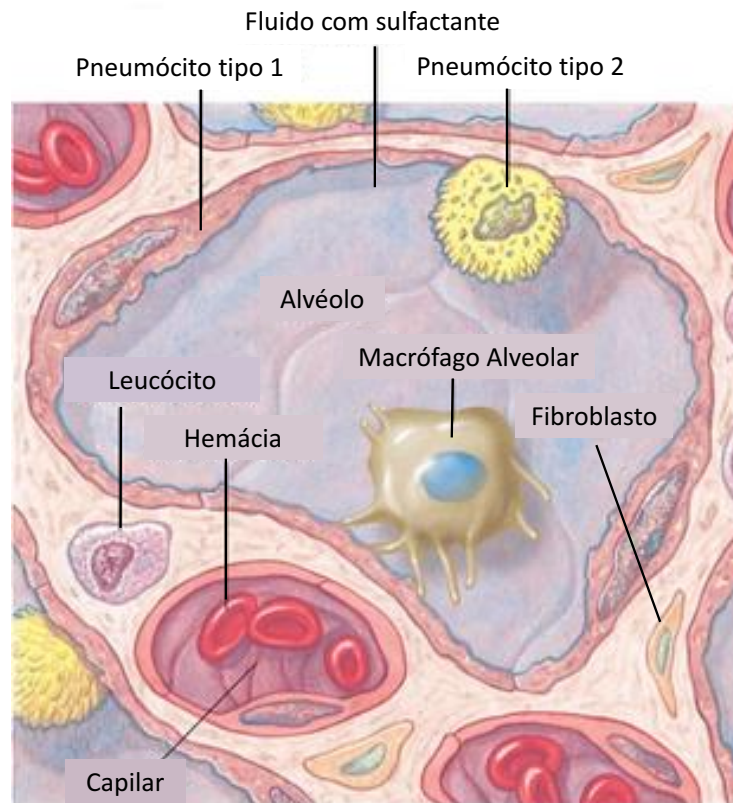
A superfície alveolar é recoberta por dois tipos celulares (figura 1). Os pneumócitos do tipo I são células epiteliais escamosas com a função de formar extensões citoplasmáticas, as quais penetram os poros de Kohn (orifícios na parede alveolar que conectam um alvéolo ao outro). Os pneumócitos do tipo II são células epiteliais em forma de cubo que sintetizam e secretam o surfactante pulmonar que cobre a superfície alveolar (KUHN, 1978). Pneumócitos do tipo II possuem a capacidade de dar origem a novas células do tipo II, além de se diferenciar em pneumócitos do tipo I para substituir aqueles que sofreram danos (ADAMSON; BOWDEN, 1974). O volume ocupado pelos pneumócitos do tipo I é de aproximadamente duas vezes maior que o ocupado pelos pneumócitos do tipo II, enquanto que a área alveolar abrangida pelas células do tipo I é cerca de 50 vezes maior do que a área abrangida pelas células do tipo II. Entretanto, ao avaliarmos, em porcentagem, o número de células dentro da parede alveolar, 8% são pneumócitos do tipo I, 16% são pneumócitos do tipo II, 30% são células endoteliais dos capilares, 36% são células intersticiais e 10% constituem os macrófagos alveolares (ADAMSON; BOWDEN, 1979).

A área alveolar de um adulto pode chegar a 100m<sup>2</sup> já que é nessa área que a troca gasosa ocorre. Assim, o pulmão é um órgão que pode ser exposto constantemente a uma variedade de antígenos do ambiente. Devido a isso, o trato respiratório possui uma efetiva proteção mecânica, tais como pelos nasais, cílios do epitélio respiratório, muco e surfactante, juntamente com um elaborado sistema imune. Uma ampla quantidade de linfócitos pode ser encontrada distribuída pelo tecido pulmonar (HOLT; SCHON-HEGRAD, 1987) e em compartimentos especializados como o tecido linfoide associado aos brônquios (BALT) e linfonodos que drenam o órgão

(Breel *et al.*, 1988). Além disso, células dendríticas, macrófagos intersticiais e alveolares são encontrados no trato respiratório e podem ser ativados, desencadeando processos inflamatórios crônicos com consequente desenvolvimento de fibrose (HOLT; SCHON-HEGRAD, 1987; SERTL *et al.*, 1986).

Fibrose pulmonar é uma condição clínica que produz perda da capacidade respiratória com episódios de dispneia, tosse seca e hipoxemia, podendo levar a morte (CALZAS RODRIGUEZ; CARMEN JUAREZ MORALES; CASERO, 2016). Ela é caracterizada pela ativação crônica da resposta inflamatória pulmonar, com constante liberação de mediadores pró-inflamatórios e pró-fibróticos que causará a ativação e diferenciação de fibroblastos intersticiais em miofibroblastos. Essa diferenciação terá como consequência a produção de componentes da matriz extracelular, dentre eles, a produção e deposição de colágeno no tecido, resultando na perda da complacência e função do órgão (LOMAS *et al.*, 2012).

A ativação do processo de fibrose pulmonar é observada em algumas doenças pulmonares inflamatórias crônicas. A inalação constante de cristais de alumínio, de silício e de titânio, tem como consequência a contínua indução de uma resposta inflamatória pulmonar que irá desencadear uma posterior fibrose (BOMHARD, 2017). Doenças inflamatórias induzidas por alergênicos, como a asma crônica, também pode induzir a fibrose pulmonar. Essa é caracterizada por uma ativação permanente da inflamação pelo reconhecimento desses alergênicos, o que irá provocar a ativação de células pró-inflamatória, resultando no desenvolvimento de fibrose (VARSANO; SEGEV; SHITRIT, 2017). Além disso, a fibrogênese pulmonar pode surgir como efeito adverso da administração de medicamentos. Esse quadro clínico pode ser observado em pacientes submetidos ao tratamento com bleomicina, a qual se tornou a droga mais usada no modelo de indução da fibrose pulmonar em animais de experimentação (DELLA LATTA *et al.*, 2015).



**Figura 1. Imagem ilustrativa do corte transversal de um alvéolo.** Espaço alveolar é composto por pneumócitos tipo 1 e 2; o espaço onde se encontram os fibroblastos é denominado interstício, sendo esse também o caminho de passagem e de acúmulo das células recrutadas dos capilares alveolares.

## 1.2. Bleomicina

Bleomicina (BLM) é um agente antitumoral usado para o tratamento de doenças neoplásicas como linfomas, carcinomas de células escamosas de pescoço e de cabeça, carcinoma testicular e câncer de ovário (EINHORN, 2001; LEVI *et al.*, [S.d.]). Apresenta um percentual de cura para o carcinoma de testículo que pode alcançar 90% quando em combinação com o medicamento Cisplatina (agente quimioterápico usado inicialmente na Universidade Indiana, em 1978 – Estados Unidos – onde descobriu-se seu potencial de cura). A BLM também apresenta baixa supressão mieloide e baixa imunossupressão em homens imunocompetentes, o que a torna uma opção terapêutica vantajosa (BOGGS; SARTIANO; DEMEZZA, 1974; LEHANE; HURD; LANE, 1975). Contudo, sua eficácia terapêutica é limitada pela relação dose-dependente entre esse fármaco e o desenvolvimento de fibrose pulmonar, a qual afeta mais de 46% do total de pacientes, com mortalidade de 3% (SLEIJFER, 2001).

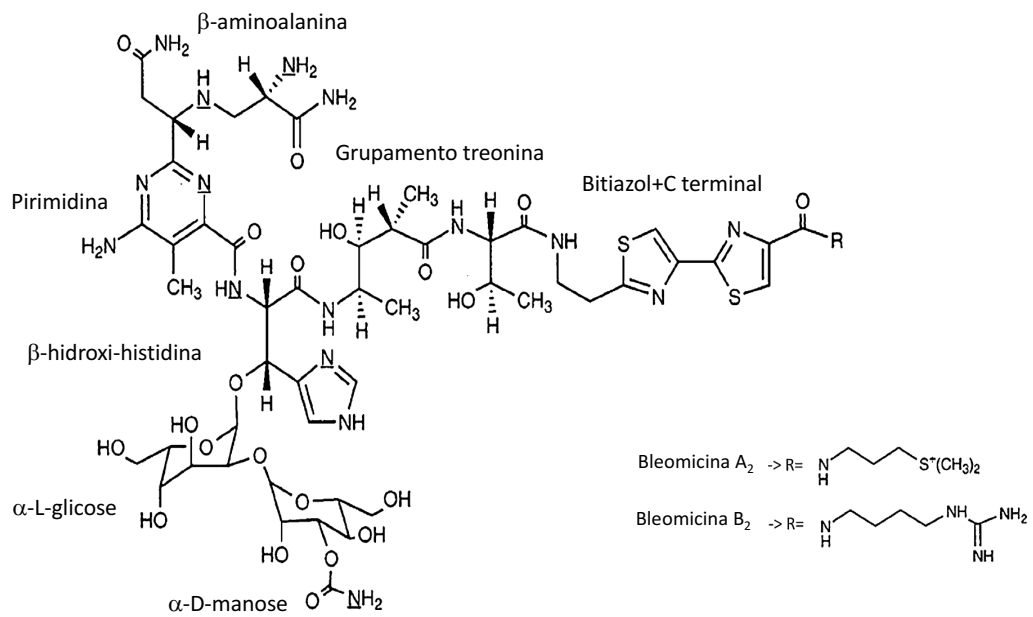
BLM é um antibiótico glicopeptídico solúvel em água de aproximadamente 1500Da e

faz parte de um grupo específico de glicopeptídeos derivados de produtos naturais isolados da bactéria *Streptomyces verticillus* (UMEZAWA, 1973). Entre os efeitos colaterais gerados pela administração desse fármaco, pode-se citar náusea, febre e ocasionais reações do tipo alérgicas (MIR; TOUNEKTI; ORLOWSKI, 1996), porém, o mais severo deles é a toxicidade pulmonar (Bleomycin lung toxicity – BLT) gerada pelo dano no DNA, ocasionando o desenvolvimento de fibrose e limitando seu uso como agente antineoplásico em humanos.

Quando administrado por via oral, sua biodisponibilidade é pequena. Em administração intravenosa, seu tempo de meia-vida é de aproximadamente 90 minutos. Esse tempo aumenta proporcionalmente à liberação de creatinina (ALBERTS *et al.*, 1978). Por isso, pacientes com disfunção renal, situação em que há maior liberação de creatinina sérica, são submetidos a uma maior e significativa exposição a esse fármaco (ALBERTS *et al.*, 1978). Já em pacientes com função renal normal, aproximadamente 65% da dose administrada é excretada na urina, na forma de Bleomicina ativa, dentro das primeiras 24 horas (DORR, 1992). BLM raramente atravessa a barreira hemato-encefálica, entretanto, ela atravessa a placenta (HALL *et al.*, 1982).

### 1.3 Estrutura e ação

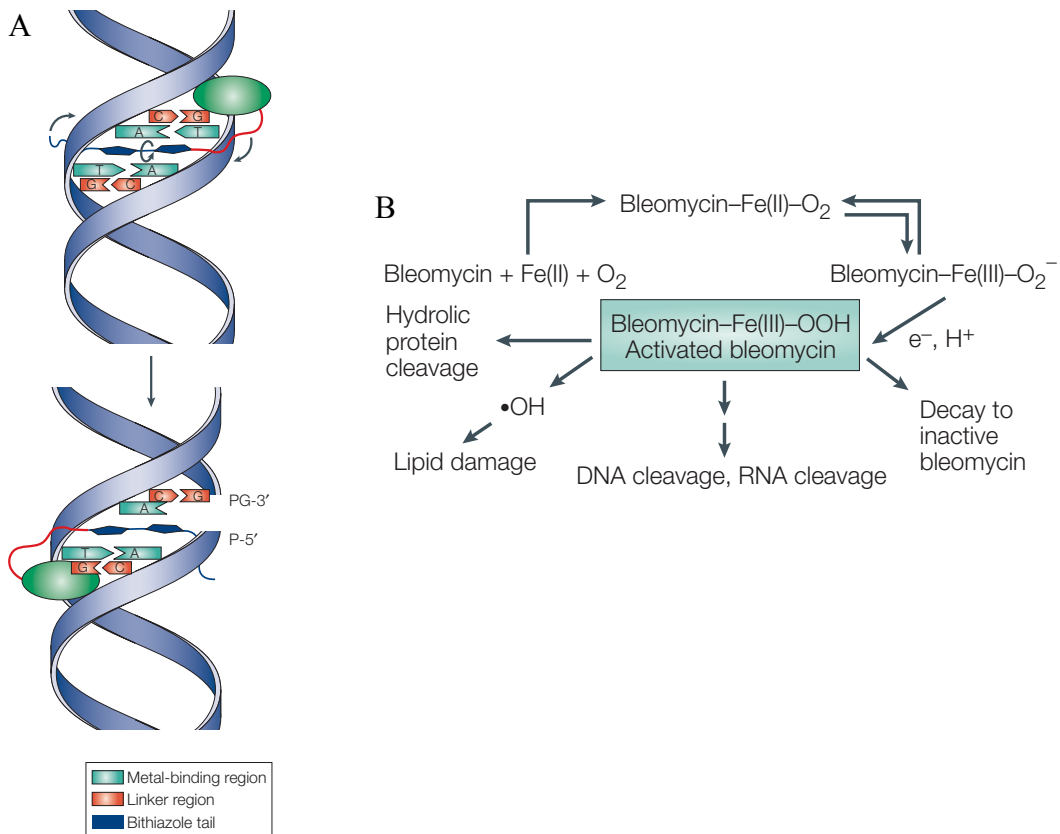
Todas as formas de bleomicina são glicopeptídeos com composições comuns – cinco aminoácidos, um grupamento amina, e dois açúcares: glicose e manose– diferenciando-se apenas na região amino terminal. São quatro as regiões da molécula de bleomicina: região 1, 2, 3 e 4 (figura 1). A região 1 consiste na região de ligação com um metal, o qual, na maioria das vezes, é o ferro. Esse irá permitir a ativação da BLM que, com isso, poderá exercer sua capacidade de dano. A região 2 é a responsável por ligar a região 1 e 3, ou seja, ela é a região de ligação. A região 3 é formada pela calda de bitiazol e o domínio C-terminal. Esse domínio diferencia as formas A2 e B2 da bleomicina, devido a presença do grupamento “R” o qual é distinto entre uma forma e outra. A região 3 é a região de afinidade pelo DNA, ou seja, responsável pela ligação entre o DNA e a bleomicina devido a carga positiva dos seus grupos. A região 4 é onde se encontra os açúcares: glicose e manose, conectados à região de ligação com o metal (região 1). Essa região participa da coordenação do íon metálico, do reconhecimento da superfície celular e do acúmulo seletivo da BLM em algumas células, tendo como consequência a concentração de produção de espécies reativas de oxigênio – O<sub>2</sub> - e nitrogênio (ROS e RNS, respectivamente) (BURGER; PEISACH; HORWITZ, 1981; CLAUSSEN; LONG, 1999; HAY, JOHN; SHAHZEIDI; LAURENT, 1991; MIR; TOUNEKTI; ORLOWSKI, 1996; UTE GALM *et al.*, 2005).



**Figura 2. Estrutura da molécula de Bleomicina.** Os grupos  $\beta$ -aminoalanina, Pirimidina e  $\beta$ -hidroxi-histidina representam a região de ligação com o metal (região 1). O grupo treonina forma a região de ligação (região 2) entre a região 1 e a 3. A região 3 é a calda de bitiazol e o domínio C-terminal responsável pela ligação e clivagem do DNA. Os açúcares compõem a região 4. Adaptado (DELLA LATTA *et al.*, 2015).

BLM tem a capacidade de exercer seu efeito citotóxico pela clivagem de DNA por um processo dependente de oxigênio e de um íon metálico, causando o surgimento da BILI (dano pulmonar induzido por bleomicina) (figura 2). Os íons metálicos que se ligam à molécula de BLM são o cobre, o manganês, o cobalto, o vanádio e o ferro. A ligação com o ferro é provavelmente a mais importante *in vivo*, mas o DNA também pode ser clivado pelo complexo formado com o manganês e com o vanádio, na presença de peróxido de hidrogênio, ou pelo complexo com o cobalto, se ativado por luz. O ferro ferroso – Fe(II) –, e o oxigênio funcionam como co-fatores na clivagem do DNA. BLM, se liga ao ferro ferroso – Fe(II) – na presença de oxigênio ( $\text{O}_2$ ). Essa ligação ocasionará a redução do Fe(II) em ferro férrico – Fe(III) – gerando a formação do complexo BLM-Fe(III)- $\text{O}_2^-$ . Na presença de um agente redutor, o  $\text{O}_2^-$  será reduzido em OOH formando o complexo BLM-Fe(III)-OOH. Esse complexo é denominado “Bleomicina ativa”, o qual irá se ligar simultaneamente ao DNA gerando sua quebra e liberação de radicais livres. O ataque nucleofílico, se na presença de  $\text{O}_2$ , resulta na geração de um sítio abásico ou na quebra da fita de DNA. Como consequência, os radicais livres liberados por esse processo causam quebras no DNA, provocando a morte celular, além de ativar o processo inflamatório. (CLAUSSEN; LONG, 1999; MIR; TOUNEKTI; ORLOWSKI, 1996; UTE

GALM *et al.*, 2005). Em seguida, o Fe(II) pode ser regenerado, o que possibilita a repetida formação da BLM ativa. Assume-se que cada molécula de BLM é capaz de gerar entre 8-10 quebras no DNA (HECHT, 2000; POVIRK; HAN; STEIGHNER, 1989).



**Figura 3. Esquema da ação da bleomicina.** (A) A ligação da molécula de BLM com as moléculas de O<sub>2</sub> e Fe(II). Essa ligação ocasionará na oxidação do Fe(II) em Fe(III) formando o complexo BLM-Fe(III)-O<sub>2</sub> que, na presença de um agente redutor ativar a BLM. A BLM ativada efetua diversas ações, sendo a clivagem do DNA uma delas. (B) O modelo de clivagem da fita dupla de DNA por apenas uma molécula de BLM. Isso requer a reativação da mesma durante ou depois da quebra da primeira fita de DNA. A explicação para a reorganização da BLM está relacionada à flexibilidade da calda de bitiazol. A rotação em torno da ligação entre os dois anéis de tiazol, na calda da BLM, faz com que o peróxido do fármaco ativado interaja com a segunda fita de DNA possibilitando sua dupla quebra. (CHEN, JINGYANG; STUBBE, 2005)

A interação da molécula ativa de BLM com o DNA se dá em razão da carga positiva da calda de bitiazol com a carga negativa da cadeia polinucleotídica do DNA. Isso permite que os componentes Fe(III)-O<sub>2</sub> do complexo ativado aproximem-se do DNA, induzindo um subsequente dano genético que inclui modificação de liberação de bases nitrogenadas sem deixar quebras. Entretanto, quebras na fita dupla ou simples do DNA ocorrem nas ligações C3'-C4' do resíduo de açúcar (UESUGI *et al.*, 1984). Isso ocorre em um número



limitado de sítios com quebra preferencial nas sequências G-C (MIRABELLI *et al.*, 1982). A manobra subsequente das reações intermediais depende da disponibilidade do oxigênio. Com ele, a formação da instável estrutura de 4-hidroperóxido ocorre, resultando na quebra do DNA (DELLA LATTA *et al.*, 2015).

### **1.3.1 Desativação da bleomicina**

BLM é predominantemente eliminada pela excreção renal: nas primeiras 24 horas depois da sua administração, aproximadamente 60% do medicamento que não foi modificado, ou seja, ativado, é excretado. Possui um tempo de meia vida entre 2-4 horas, exceto em paciente com função renal debilitada. Alguns experimentos conduziram à identificação da enzima Hidrolase de Bleomicina (BLH) em células de mamíferos (BRÖMME *et al.*, 1996; O'FARRELL *et al.*, 1999; UTE GALM *et al.*, 2005). BLH é uma aminopeptidase dependente de tiol que pertence a superfamília da papaína. É responsável pela desativação da BLM por meio da hidrólise da porção C-terminal da molécula de BLM. Essa enzima pode ser predominantemente encontrada no fígado, baço, medula óssea e intestino, mas em baixas quantidades no pulmão, o que explica sua toxicidade para este órgão e consequente desenvolvimento de BILI (MOURATIS; AIDINIS, 2011; RAFII *et al.*, 2013; WALTERS; KLEEGERGER, 2008).

## **1.4 Fibrose pulmonar induzida por Bleomicina e mediadores celulares envolvidos**

Bleomicina é capaz de realizar quebra nas fitas de DNA na presença de O<sub>2</sub>. Consequentemente, há produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de espécies reativas de nitrogênio (RNS) o que explica o efeito antineoplásico desse medicamento, pois, devido a isso, as células ativam seu mecanismo de morte. Uma única dose de BLM causa mudanças subcrônicas, enquanto que administrações recorrentes geram lesões duradouras, já que somente uma molécula do medicamento pode ser reutilizada e reativada. Em contraste às injeções intravenosas e intraperitoneais, as quais geram uma cicatrização pleural, a instilação (administração intranasal) de BLM gera acentuadas mudanças fibróticas nos bronquíolos respiratórios, inflamação alveolar e traqueal, ativação de macrófagos e fibroblastos, recrutamento celular para o espaço alveolar e intersticial e produção de interleucinas e quimiocinas (DELLA LATTA *et al.*, 2015).

Citocinas e radicais livres são os efetores principais do dano pulmonar induzido por BLM (BILI) e estão relacionados a baixos níveis da hidrolase de BLM (BLH) no pulmão, principalmente nos pneumócitos do tipo II (HAY, JOHN; SHAHZEIDI; LAURENT, 1991; WHITE; STOVER, 1984). Isso provoca vulnerabilidade as celular conduzindo-as ao efeito tóxico da BLM (ADAMSON; BOWDEN, 1979).

Sinais de dano pulmonar agudo (dano no epitélio alveolar, perda de surfactante e extravasamento de proteínas plasmática para o espaço alveolar) podem estar presente na fibrose pulmonar induzida por bleomicina, sendo inicialmente limitados às células do interstício pulmonar. A inflamação aguda tem um papel importante no desenvolvimento da BILI com um exsudato inflamatório que consiste, principalmente, em neutrófilos, macrófagos e linfócitos (HAY, J G *et al.*, 1987) (figura 4). BLM estimula os macrófagos teciduais a secretarem citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18 (HOSHINO *et al.*, 2009), IL-22 e IL17a (SONNENBERG; FOUSER; ARTIS, 2010) e as células endoteliais a secretarem IL-6 (SAITO *et al.*, 2008; SCHEULE *et al.*, 1992). As citocinas ativam os linfócitos que provocam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais facilitando o recrutamento de células inflamatórias através do endotélio; influxo no espaço intersticial e dano de células endoteliais por meio da via Fas-FasL (KUWANO *et al.*, 1999). Nesse contexto, necrose local dos pneumócitos do tipo I e indução de metaplasia em pneumócitos do tipo II também podem ser observadas juntamente com infiltrados inflamatórios (MOORE; HOGABOAM, 2008; MOURATIS; AIDINIS, 2011).

Fibroblastos são ativados precocemente no BILI pelo estímulo da fibronectina, a qual é produzida devido ao dano das células do endotélio ou devido ao estímulo gerado por citocinas, como TNF, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e TGF- $\beta$ 1 (SCHMIDT *et al.*, 2004). A diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos ocorre durante o processo de fibrose. As quatro fontes de miofibroblastos são: fibroblastos residentes do tecido, fibrócitos circulantes que são atraídos para as regiões de lesão pulmonar, células epiteliais do pulmão por meio da transição mesenquimal-epitelial (EMT) e células endoteliais pela transição mesenquimal-endotelial (EndEMT) quando essas células se convertem em um fenótipo fibroblastóide (“Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment”, 2000).

O recrutamento e a proliferação/diferenciação de células no pulmão podem ser induzidos por uma variedade de mediadores extracelulares ou pela combinação deles. Pode-se citar as citocinas TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador beta), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) (ALTINTAS *et al.*, 2016), IL-1 $\beta$  (interleucina 1 beta) e a quimiocina CCL5

(RUSSO *et al.*, 2009).

As citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são citocinas pró-inflamatórias que possuem atividades semelhantes e atuam em conjunto. O TNF- $\alpha$  tem como principal fonte de produção, células mononucleares ativadas (BORRIELLO *et al.*, 2017). Sua principal função é o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio inflamatório. Ele faz com que as células do endotélio vascular expressem moléculas de adesão, possibilitando a ligação das mesmas com células sanguíneas. Devido a isso o recrutamento leucocitário ocorre, inicialmente para os neutrófilos e subsequentemente para linfócitos e monócitos. O TNF- $\alpha$  atua em fagócitos mononucleares, estimulando a produção de IL-1 $\beta$  o que auxiliará no recrutamento celular. Pode agir no hipotálamo induzindo febre, sendo, portanto, chamado de pirógeno endógeno (derivado do hospedeiro). A febre é mediada pelo aumento da síntese de prostaglandinas por células hipotalâmicas. Quando em grandes quantidades, produz a inibição do movimento contrátil do miocárdio e de tônus da musculatura lisa, o que resulta na perda exacerbada da pressão sanguínea, ou choque. Essa citocina também causa trombose intravascular devido à perda das propriedades anticoagulantes normais do endotélio (AKDIS *et al.*, 2011).

TNF- $\alpha$  é uma citocina inflamatória importante, pois promove resposta inflamatória e subsequente fibrose durante resposta pulmonar induzida por BLM. Estudo anterior comprova que a depleção dessa citocina por meio de anticorpo, atenua a lesão pulmonar em modelos de BLM (PIGUET *et al.*, 1993). Níveis altos dessa citocina podem ser observados ao longo dos dias em que a fibrose pulmonar é induzida, tornando sua presença indispensável nesse processo (LEE *et al.*, 2012; RUSSO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2015).

Em semelhança ao TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  tem como função principal mediar a resposta inflamatória. Sua principal fonte celular assim como o TNF- $\alpha$  são fagócitos mononucleares ativados. A produção de IL-1 $\beta$  pelos fagócitos mononucleares é induzida por produtos bacterianos como LPS (lipopolissacarídeo), e por outras citocinas, como o TNF- $\alpha$ . Diferentemente do TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  possui outras fontes de produção além dos macrófagos. Ela pode ser produzida por neutrófilos, células epiteliais (ex. queratinócitos) e células endoteliais. IL-1 $\beta$  age nas células endoteliais para aumentar a expressão de moléculas de superfície que auxiliam na adesão de leucócitos, como ligantes para integrinas. Induz febre, síntese de proteínas plasmáticas de fase aguda por células hepáticas e produção de neutrófilos e plaquetas pela medula óssea (AKDIS *et al.*, 2011).

Em modelo de fibrose pulmonar induzida por BLM, IL-1 $\beta$  apresenta papel importante na indução de processos pró-inflamatórios e pró-fibróticos sendo observada em níveis

significativamente elevados nos quatorze primeiros dias da indução juntamente com níveis igualmente altos de TNF- $\alpha$ . A explicação para os efeitos biológicos semelhantes entre essas duas citocinas é que seus receptores ativam cascatas intracelulares com proteínas homólogas e ativam os mesmos fatores de transcrição. Entretanto, a IL-1 $\beta$ , mesmo em altos níveis sistêmicos, não causa alterações fisiopatológicas geradas pelo choque séptico (YARA *et al.*, 2001).

O papel de moléculas quimiotáticas na fibrose pulmonar é relevante. Quimiocinas são moléculas de estrutura homóloga que possuem como função biológica a movimentação dos leucócitos regulando sua migração do sangue para o tecido. A nomenclatura *quimiocina* é uma contração de “citocina quimiotática”. As quimiocinas podem ser produzidas por várias células devido, ou não, a um estímulo inflamatório. São lipéptídeos que possuem duas alças dissulfetos internas. Divididas em quatro famílias, as quimiocinas são separadas em relação ao número e à localização dos resíduos de cisteína N-terminais. As CC e CXC são as duas principais famílias de quimiocinas. A primeira possui dois resíduos de cisteína adjacentes e a segunda possui um aminoácido entre esses resíduos. Elas são produzidas por leucócitos e vários tipos de células teciduais como células endoteliais, epiteliais e fibroblastos. Sua liberação pode ser causada pelo contato com microrganismos - por meio da sinalização com TLR, e por citocinas inflamatórias, principalmente IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (BACHELERIE *et al.*, 2014; MURPHY *et al.*, 2000).

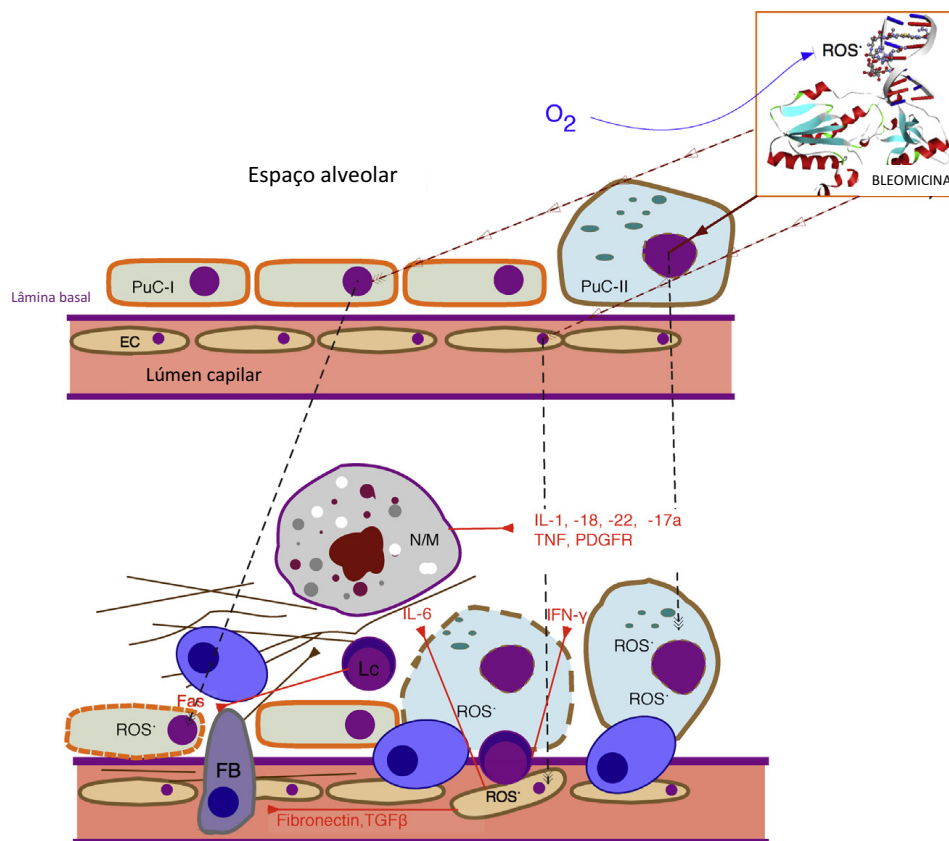
CCL5/RANTES é um agente quimioatraente para linfócitos e media o influxo dessas células para o pulmão. Os linfócitos apresentam um papel significativo no processo de fibrose pulmonar por meio do seu acúmulo. Nesse processo, a quimiocina é produzida por macrófagos residentes do pulmão que, ao serem ativados, recrutam os linfócitos para o tecido contribuindo assim para a progressão do infiltrado inflamatório (PETREK *et al.*, 1997). Esse agente quimiotático pode ser observado nos pulmões de animais tratados com BLM a partir do segundo dia após instilação permanecendo em quantidades elevadas até o vigésimo quinto dia (RUSSO *et al.*, 2009, 2011).

Estudos têm demonstrado que em animais com fibrose pulmonar, o TGF- $\beta$  está aumentado (AHLUWALIA; SHEA; TAGER, 2014; COVVEY; MANCL, 2014). É considerado um agente chave no processo de fibrose, já que estimula a produção de matriz extracelular, diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e inibição da autofagia em fibroblastos (COVVEY; MANCL, 2014; DATTA; SCOTTON; CHAMBERS, 2011; MAHER; ADAMALI, 2012). Esse subtipo pode ser encontrado em animais submetidos a indução de fibrose pulmonar por BLM, sendo encontrado no pulmão a partir do dia quatro até o dia vinte

e oito após instilação do fármaco (BURGY *et al.*, 2016; YOON *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2015).

Alguns estudos têm demonstrado que durante o processo de reparo, a expressão de TGF- $\beta$ 1 fica aumentada e estimula a transcrição de genes COL1A1 e COL1A2, os quais podem conduzir à um aumento anormal da deposição do colágeno tipo 1 (COL1) (AZAMBUJA *et al.*, 2005; WHITE; STOVER, 1984). Alguns dos efeitos pró-fibróticos de TGF- $\beta$ 1 e a ativação da expressão de COL1 podem ser mediados por CTGF, uma proteína da matriz extracelular que age como mediador central da remodelagem tecidual e fibrose e é altamente expressa na fibrose pulmonar induzida por BLM (DE LENA *et al.*, 1972; KEIJZER; KUENEN, 2007).

Exposição pulmonar contínua à BLM pode gerar um crescimento na síntese de colágeno e deposição de várias proteínas de matriz extracelular incluindo colágeno, elastina e proteoglicano (REISER *et al.*, 1986). Além disso, pode ativar também macrófagos teciduais que são estimulados a produzir ácido hialurônico, uma molécula tecidual de conexão que está presente em pulmões fibrosados (ADAMSON; BOWDEN, 1979). Linfócitos T também estão envolvidos no dano pulmonar mediado por inflamação. Eles são responsáveis pela secreção de citocinas durante sua fase inflamatória Th1 (como por exemplo o interferon- $\gamma$  - INF- $\gamma$  ) ou na fase Th2 (como por exemplo a IL-13) que modula a expressão de fatores de crescimento ativados pela família STAT de fatores de transcrição (BONNER, 2010).



**Figura 4. Esquema fisiopatológico da BILI.** Dano genético das células pulmonares estimulando a produção de citocinas. Recrutamento celular dos capilares alveolares e ativação dos fibroblastos, sendo esses os responsáveis pela produção de colágeno no tecido pulmonar. Símbolos e abreviações: PuCI, pneumócito do tipo I; PuCII, pneumócito do tipo II; grânulos verdes, surfactante; EC, célula endotelial; N/M, neutrófilo/macrófago; Lc, linfócito; FB, fibroblasto; linhas contínuas marrons, fibrina; linhas laranjas pontilhadas, células apoptóticas; linhas contínuas vermelhas; produção. Adaptado (FROUDARAKIS *et al.*, 2013).

Na clínica, A presença de BILI se torna suspeita devido a uma vasta quantidade de sinais e/ou sintomas, diagnóstico por imagem e testes de função pulmonar em pacientes tratados com BLM por via intravenosa (WHITE; STOVER, 1984). O sintoma que aparece de forma mais aguda é a dispneia, sendo que podem também estar presente: efusão (derrame) pleural ou mudanças no pneumotórax (AZAMBUJA *et al.*, 2005; KEIJZER; KUENEN, 2007; WHITE; STOVER, 1984). Quanto maior for o dano pulmonar na BILI, maior será a incidência dos sintomas e da perda de função pulmonar com falha respiratória podendo desenvolver a Síndrome de Angustia Respiratória Aguda (SARA), tendo como consequência ..... (AZAMBUJA *et al.*, 2005).

Nos estágios iniciais da doença, testes de função pulmonar se encontram alterados, sendo a capacidade de difusão pulmonar ( $D_{LCO}$ ) o indicador mais sensível de diagnóstico.

Apesar de que a diminuição do  $D_{LCO}$  não seja específica para pacientes com BILI, a diminuição de  $D_{LCO} > 40\%$  é comumente aceitável, como um sinal de alerta para a interrupção do tratamento com BLM. A diminuição do volume pulmonar, tal como a capacidade pulmonar total e a diminuição da capacidade vital com um volume expiratório forçado em 1 segundo (FEV1), define uma síndrome restritiva típica de pacientes com BILI e está associada com alcalose respiratória e diminuição da  $pO_2$  e  $pCO_2$  (pressão de oxigênio e de gás carbônico, respectivamente) (LUURSEMA *et al.*, 1983). Radiografia do tórax pode acusar consolidação bilateral combinada por infiltrados intersticial e alveolar, possibilitando também a constatação alterações pleurais (WHITE; STOVER, 1984). Tomografia de alta resolução do tórax é o teste ouro para constatar achados intersticiais e alveolares (ROSSI *et al.*, 2000).

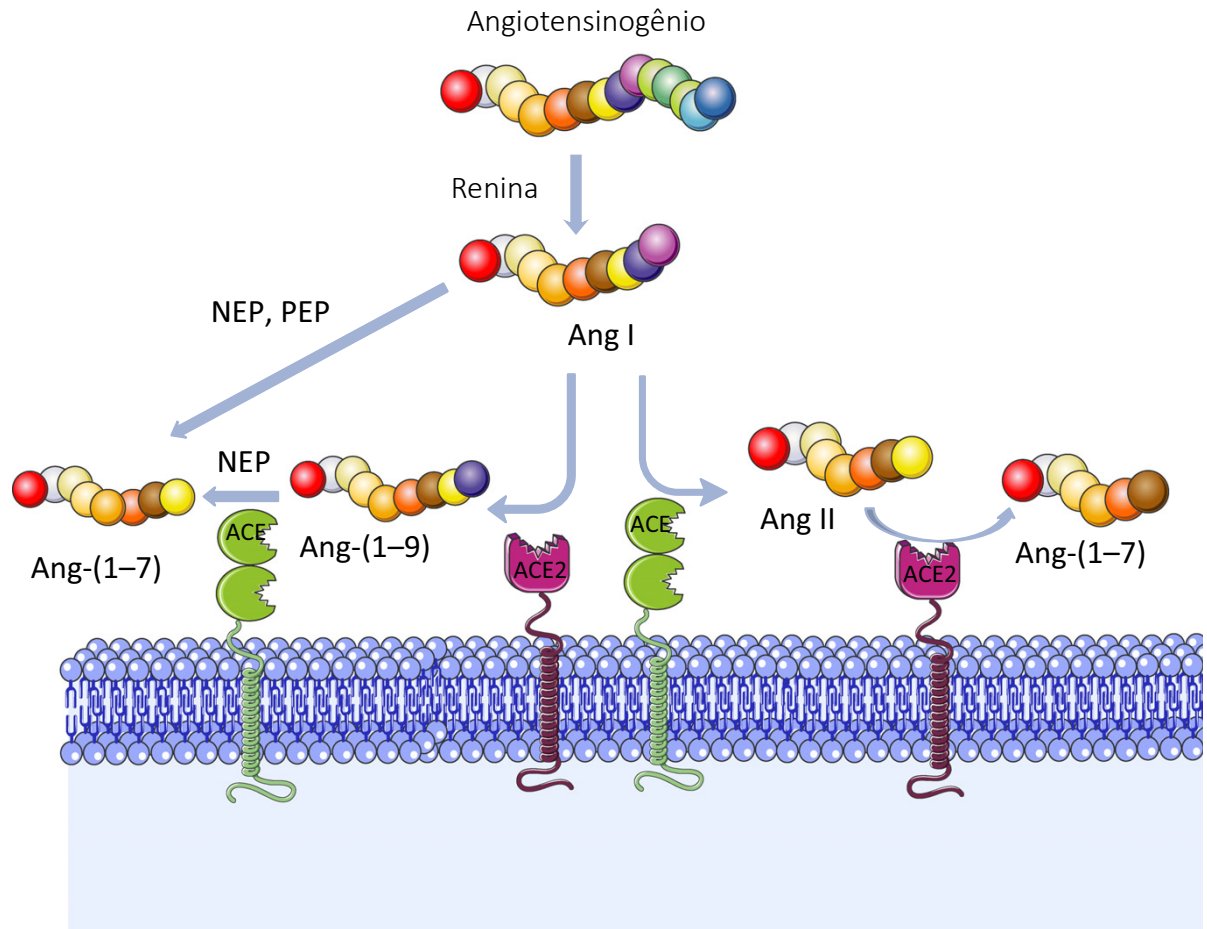
Até então, estratégias clínicas, que mimetizem o surgimento da fibrose pulmonar em pacientes submetidos a tratamento quimioterápicos, para aumentar a qualidade de vida desses indivíduos, tem sido motivo de estudo. Entretanto, o procedimento que melhor combate esse quadro clínico, ainda é o transplante de pulmão, o que torna relevante o estudo e desenvolvimento de terapias efetivas para o tratamento dessa condição clínica (LOMAS *et al.*, 2012).

### 1.1. Angiotensina 1-7

O sistema renina-angiotensina (RAS) (figura 5) é conhecido como um sistema hormonal envolvido no controle dos níveis de sal e água e no controle da pressão sanguínea. Evidências experimentais e clínicas indicam que a ativação do RAS pulmonar está diretamente ligada à fisiopatologia da fibrose pulmonar (ARTAUD-MACARI *et al.*, 2013; ASHCROFT; SIMPSON; TIMBRELL, 1988). Angiotensina II (AngII) é um peptídeo desse sistema, gerado pelo metabolismo da angiotensina I por meio da enzima conversora de angiotensina (ECA), que se liga ao receptor de AngII do tipo 1 (AT1R). É um importante mediador pró-fibrótico que induz proliferação de fibroblastos e sua diferenciação em miofibroblasto (CARNESECCHI *et al.*, 2011; KREUTZ *et al.*, 1996). Essa diferenciação causará a síntese de colágeno (ASHCROFT; SIMPSON; TIMBRELL, 1988; GOODWIN; JENKINS, 2009) por meio da produção de TGF- $\beta$ , um importante mediador da fibrogênese (CAI *et al.*, 2010). Além disso, AngII está envolvida na inflamação pulmonar por meio da geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de citocinas pró-inflamatórias (CHEN, JI *et al.*, 2013; COOK *et al.*, 2010).

Em contraste, ECA2, uma enzima homóloga à ECA, foi descoberta pela sua

capacidade de metabolizar AngII, dando origem ao heptapeptídeo denominado angiotensina 1-7 (ANGIO 1-7). Dessa forma, o eixo ECA2/ANGIO 1-7 consiste em novos componentes do RAS que contra regula o eixo ECA/AngII/AT1R (Possible contribution of nitric oxide...).



**Figura 5. Esquema simplificado do sistema renina angiotensina (RAS).** Abreviações: ACE, enzima conversora de angiotensina; ACE2, enzima conversora de angiotensina 2; Amp, aminopeptidase; Ang I, angiotensina I; Ang II, angiotensina II; Ang-(1-7), angiotensina 1-7; Ang-(1-9), angiotensina 1-9; NEP, endopeptidase neutra; PEP, Prolil endopeptidase. Adaptado de Silva D. *et. al.*, 2016. Adaptado. (PASSOS-SILVA; BRANDAN; SANTOS, 2015).

ANGIO 1-7 possui atividades anti-inflamatórias e antifibróticas que tem sido foco de alguns trabalhos. W. Lu *et al.*, estudaram o efeito do tratamento com angiotensina 1-7 em que ratos com dano renal causado por apnéia do sono obstrutiva. Os animais tratados apresentaram uma supressão na produção de espécies reativas de oxigênio, redução da inflamação renal e diminuição da fibrose renal. Efeitos benéficos do tratamento foram associados com a redução do estresse oxidativo celular, além de reduzir a inflamação e a fibrose (LU *et al.*, 2017). Em



outro estudo foi demonstrado o efeito anti-inflamatório de um agonista do receptor de angiotensina 1-7 em um modelo de arteriosclerose. Foi observado que o pré tratamento com o agonista do receptor de angiotensina 1-7 inibiu a inflamação perivascular por meio da redução da expressão de quimiocinas e citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1 and CXCL10, impedindo a ativação de monócitos/macrófagos e sua diferenciação para o fenótipo M1. Também foi observado a inibição da migração de monócito do tipo THP-1 no animais tratados (SKIBA *et al.*, 2016).

## **2. JUSTIFICATIVA**

A fibrose pulmonar é uma condição clínica multifatorial que acomete uma grande parte da população com doenças inflamatória crônicas. A fibrose limita a função respiratória e limita também o tratamento antineoplásico devido ao efeito pró-fibrótico de drogas ou medicamentos associados à essa terapia. Assim, é importante estudar alternativas terapêuticas para prevenir ou minimizar os danos de tecidos ou órgão afetados. Aqui, estudaremos o efeito de uma molécula com característica anti-inflamatórios já descrita em respostas inflamatórias agudas, em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. Objetivo geral**

Caracterizar o efeito da angiotensina 1-7 em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Padronizar doses ideais de Bleomicina para serem estudadas nesse modelo crônico de indução da fibrose pulmonar.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com Angiotensina 1-7.
- Avaliar os níveis de mediadores inflamatórios e pró-resolutivos no pulmão e no lavado broqueoalveolar, assim como as alterações celulares presentes nos animais tratados e não tratados com Angiotensina 1-7.
- Avaliar as alterações histopatológicas do pulmão dos animais estudados.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Neste estudo foram utilizados camundongos C57Bl/6j, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal De Minas Gerais (UFMG), com idade de 8 a 10 semanas, pesando entre 18-25g. Durante o período experimental, os animais ficaram mantidos em gaiolas, no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia, localizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG. Os animais tiveram livre acesso à água e ração; a temperatura foi mantida entre 22-25°C e o ciclo claro/escuro foi de 12 horas. Todos os procedimentos foram avaliados e realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais - UFMG (CEUA - UFMG), sob o protocolo 54 / 2016.

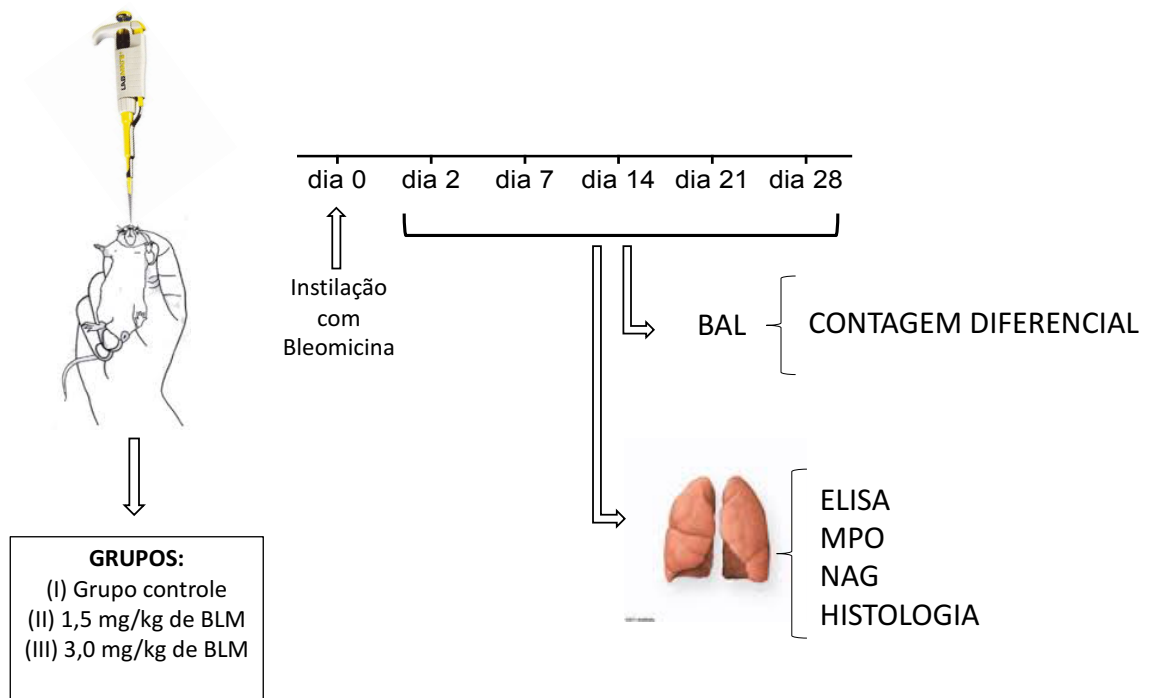
### **4.2. Indução da fibrose pulmonar pela bleomicina**

Os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal/subcutânea, com 60ul de uma solução de cetamina, xilazina e salina (NaCl 0,9%) (3ml, 1ml e 4ml, respectivamente). Em seguida, foram instilados com um volume de Bleomicina sulfato (Blenoxane; Bristol-Myers Squibb, New York, NY), diluída em salina 0,9%, com base no peso de cada animal. (RUSSO *et al.*, 2010)

### **4.3. Delineamento experimental**

#### **4.3.1. Padronização da dose de BLM**

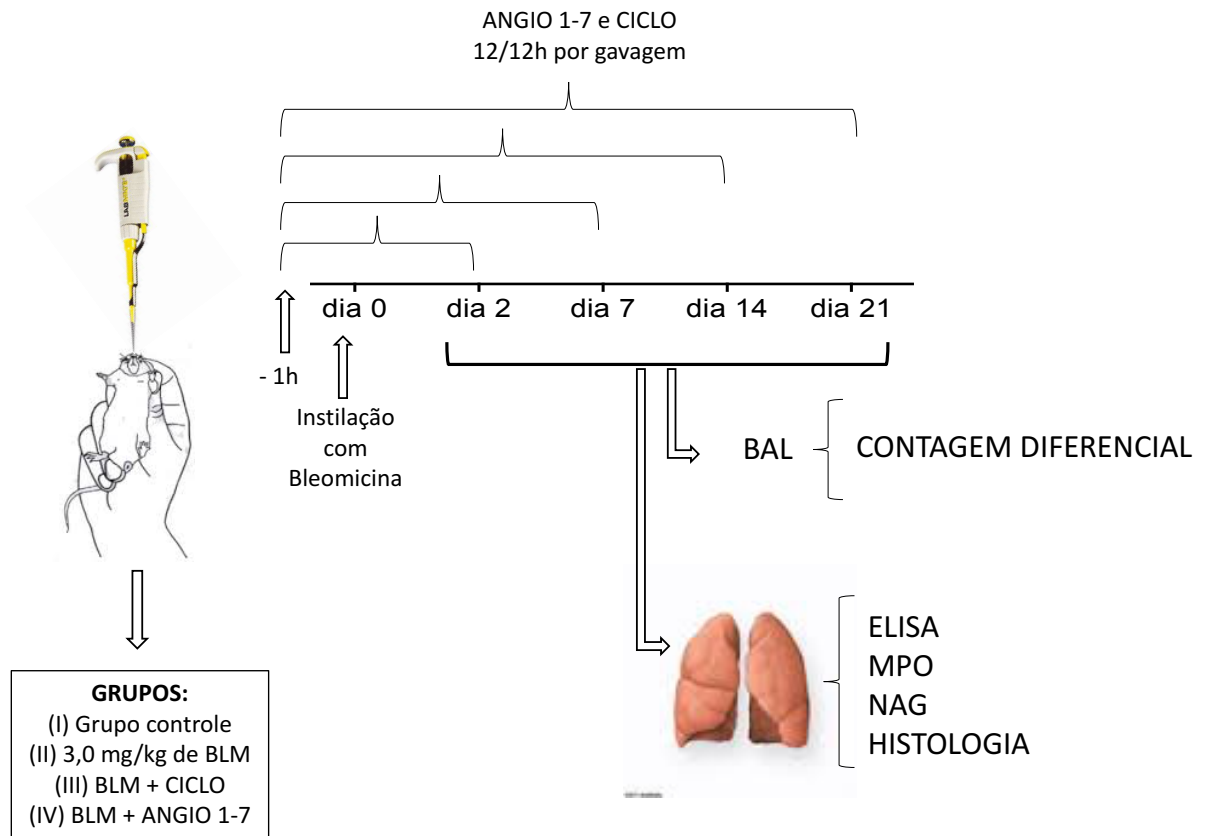
Os animais foram divididos em três grupos: (I) animais controles instilados apenas com salina 0,9% (NaCl 0,9%); (II) animais instilados com 1,5mg/kg de Bleomicina diluída em NaCl 0,9%; (III) animais instilados com 3,0mg/kg de Bleomicina diluída em NaCl 0,9%. A instilação foi realizada pelo manuseio de seringas Hamilton. Após 2, 7, 14, 21 e 28 dias, os animais foram eutanasiados, por meio de uma dose letal de cetamina e xilazina, quando foram realizados o lavado broncoalveolar para contagem diferencial de células inflamatórias e coleta dos pulmões para ELISA e análise histológica.



**Figura 6. Delineamento experimental representando o estudo de padronização da dose de Bleomicina em um modelo de fibrose pulmonar.** Abreviações: BLM = Bleomicina; BAL = lavado broncoalveolar; MPO = mieloperoxidase; NAG = N-acetilglicosaminidase.

#### 4.3.2. Tratamento prévio com *ANGIO*

Os animais foram divididos em quatro grupos: (I) animais controle instilados apenas com NaCl 0,9%; (II) animais instilados com 3,0mg/kg de BLM diluída em NaCl 0,9%; (III) animais veículo instilados com 3,0mg/kg de BLM diluída em NaCl 0,9%, tratados, por gavagem (via oral), com Ciclodextrina – CICLO - (HP $\beta$ CD 92mg/kg), a qual foi disponibilizada pelo laboratório do professor Robson Santos do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG, duas vezes ao dia (12 em 12 horas); (IV) animais instilados com 3,0mg/kg de BLM diluída em NaCl 0,9%, tratados, por gavagem, com angiotensina 1-7 (92 mg/kg de CICLO/60 mg/kg de ANGIO 1-7), também disponibilizada pelo laboratório, duas vezes ao dia (12 em 12 horas). A instilação foi realizada pelo manuseio de seringas Hamilton. O tratamento com ANGIO 1-7 e com CICLO iniciou uma hora antes da instilação com BLM e se estendeu por 2, 7, 14 e 21 dias, quando os animais foram eutanasiados, por meio de uma dose letal de cetamina e xilazina. Nos dias de sacrifício foram realizados o lavado broncoalveolar para contagem diferencial de células inflamatórias e coleta dos pulmões para ELISA e análise histológica.



**Figura 7. Delineamento experimental representando o estudo do efeito do tratamento prévio com Angiotensina em um modelo de fibrose pulmonar induzida por Bleomicina.** Abreviações: BLM = Bleomicina; ANGIO 1-7 = angiotensina 1-7; CICLO = ciclodextrina; BAL = lavado broncoalveolar; MPO = mieloperoxidase; NAG = N-acetilglicosaminidase.

#### 4.4. Lavado bronco alveolar (BAL) e coleta dos pulmões

Após a análise da mecânica pulmonar, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico, e novamente canulados com um cateter de polipropileno de 1,7mm. O BAL foi realizado pela administração de duas alíquotas de 1 mL de tampão salina-fosfato (137mmol/L NaCl; 2,7mmol/L KCl; 10mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>pH 7,2) à 4°C. Cada uma dessas alíquotas foi injetada e removida 3 vezes obtendo, ao final, aproximadamente 2 mL do lavado, como previamente descrito (Receptor CXCR2...).

Após a coleta do BAL, os pulmões foram perfundidos com a administração de 5 mL de tampão salina-fosfato (PBS) no ventrículo direito para que os vasos sanguíneos e capilares pulmonares fossem lavados. Após a perfusão, o pulmão esquerdo (lobo único) foi coletado para posterior análise histológica e o pulmão direito foi coletado e congelado para posterior processamento e análise de: Citocinas/quimiocinas, atividade da Mieloperoxidase (MPO), atividade da N-acetilglicosaminidase (NAG) e deposição de colágeno.

#### **4.5. Contagem total e diferencial dos leucócitos**

Logo após a realização do BAL, o líquido recuperado foi centrifugado por 8 minutos a 1.800 RPM e 4°C. O sobrenadante foi coletado e congelado para posteriores análises de citocinas enquanto o precipitado formado foi separado e re-suspendido em 100 µL de BSA 3%. Essa suspensão de células foi homogeneizada e, uma alíquota, foi diluída 10x em uma solução de lise para hemácias (Solução de Turk - IMBRALAB). Essa solução contendo as células foi colocada em câmara de Neubauer e, então, foi realizada a determinação do total de leucócitos presentes nas vias aéreas utilizando-se um microscópio óptico (Motic BA310) com aumento de 400X.

A partir dessa contagem, um volume contendo aproximadamente  $5 \times 10^4$  células foi diluído em 100 µL de BSA 3% para a confecção de lâminas em citocentrífuga (Cytospin 3, Shandon) – centrifugação por 5 minutos a 450 rpm em temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com um Kit de panótico rápido seguindo o protocolo do fabricante (Renylab). A determinação diferencial da população de células foi realizada em microscópio óptico de campo claro com aumento de 1.000X em óleo de imersão. Foram contadas 300 células por lâmina, em campos aleatórios, e as células foram diferenciadas entre mononucleares, neutrófilos e eosinófilos. Os caracteres utilizados para a diferenciação das células foram: morfologia nuclear e citoplasmática e coloração nuclear e citoplasmática.

#### **4.6. Processamento de pulmão para dosagem de citocinas e ensaio de mpo e nag**

Após a coleta, 50 mg do pulmão direito foi separado para ser processado para análise de citocinas e as respectivas atividades enzimáticas. A amostra foi homogeneizada em 500 mL de solução de extração de citocinas (NaCl 0,4M, NaPO<sub>4</sub> 10 mM, PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, tween 20 0,05%, BSA 0,5%, 20 KI aprotinina) e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em um novo microtubo e congelado para posterior análise.

O precipitado formado foi novamente homogeneizado em 0,95 mL de solução tampão 1 (NaCl 0,1 M; Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,02 M e Na<sub>2</sub>EDTA 0,015 M; pH 4,7) e novamente centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Para lisar eventuais hemácias, o precipitado foi submetido à lise hipotônica (0,75 mL de NaCl 0,2% seguido da adição de 0,75 mL de NaCl 1,6% +Glicose

5%.

A partir desse ponto, o processamento das amostras para MPO se diferenciam do processamento para o NAG e, por isto, as amostras foram divididas em 2 tubos diferentes. Após a divisão, todos os tubos foram novamente centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Nos tubos para o ensaio de MPO, foi adicionado 0,5 mL de tampão 2 (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05M, HETAB 0,5%; pH 5,4) e as amostras foram homogeneizadas e submetidas à lise térmica. Para isso, as amostras foram congeladas e descongeladas por 3 vezes em nitrogênio líquido. Nos tubos para o ensaio de NAG, foi adicionado 0,5 mL de solução salina 0,9%/Triton X-100 0,1%. As amostras foram homogeneizadas e congeladas.

#### **4.7. Ensaio da atividade da mieloperoxidase (MPO)**

Após a lise térmica por criofratura através de 3 ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido, 25 µL das amostras diluídas 5 vezes em tampão 2 e foram adicionadas em placa de 96 poços. Em seguida, foi adicionado 25 µL do reagente 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) na concentração de 1,6 mM e a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos.

Ao final desse período, foi adicionado 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,002% em tampão 2) e a placa foi novamente incubada por 5 minutos a 37°C. Após a incubação, a reação foi parada pela adição de 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a leitura da absorbância foi determinada por espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices) com um filtro para o comprimento de onda de 450 nm.

#### **4.8. Ensaio da atividade da n-acetilglicosaminidase (NAG)**

Após centrifugação a 4°C por 15 minutos a 10.000 rpm, as amostras foram diluídas 5x em tampão citrato/fosfato (100mL Ácido cítrico 0,1M, 155mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M; pH = 4,5). 100 µL das amostras, já diluídas, foram adicionadas a placas de 96 poços, em duplicata. 100 µL do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida, diluído em tampão citrato/fosfato, foi adicionado aos poços e incubado a 37°C por 5 minutos. A reação foi parada por meio da adição de 100 µL de tampão glicina (Glicina 0,8M, NaCl 0,8M, NaOH 0,8M; pH = 10,6), e a leitura da absorbância foi determinada por espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices) com um filtro para o comprimento de onda de 405 nm.



#### **4.9. Dosagem de quimiocinas e citocinas**

Os níveis de citocinas e quimiocinas foram quantificados por ELISA. Microplacas de 96 poços (Nunc Maxi Sorb) foram cobertas com anticorpo de captura, na diluição recomendada pelo fabricante, em tampão carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15mM,  $\text{NaHCO}_3$  35 mM,  $\text{NaCl}$  3.1 mM; pH 9,5) e incubados overnight.

Após a incubação, a placa foi lavada com PBS suplementado com 0,05% de Tween20, então, foi feito o bloqueio das reações inespecíficas, utilizando soluções de bloqueio recomendadas pelo fabricante (PBS-BSA 1%), por 1 hora. Posteriormente ao bloqueio, 100  $\mu\text{L}$  das amostras ou de solução contendo concentrações seriadas das amostras avaliadas foram pipetados em duplicata e incubados por mais 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi lavada para retirar o excesso das amostras, e foram adicionados os respectivos anticorpos de detecção, nas concentrações recomendadas, por mais 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente com PBS/Tween20 0,05% e incubadas com solução de estreptavidina, por 30 minutos. As placas foram novamente lavadas com PBS/Tween20 0,05% e incubadas com solução reveladora (OPD) da atividade da peroxidase, por mais 30 minutos. A reação foi, então, bloqueada com a adição de 50  $\mu\text{L}$  de solução de bloqueio  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N e a leitura da absorbância determinada logo em seguida em 492 nm em espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices). As concentrações das amostras foram expressas em pg/mL de sobrenadante a partir da análise da curva padrão através do software SOFTmax PRO 6.3 (Molecular Devices Corp.).

#### **4.10. Dosagem de $\text{tgf-}\beta$**

##### **4.10.1. Preparação da Placa**

O Anticorpo de Captura foi diluído em PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2-7.4, 0.2  $\mu\text{m}$  filtrado) para a concentração ideal. Imediatamente uma placa de 96 poços foi revestida com 50 $\mu\text{l}$ /poço com o anticorpo de captura diluído. A placa foi vedada e incubada *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, o material de cada poço foi aspirado e lavado com 300  $\mu\text{l}$  de Tampão de Lavagem (0.05% Tween® 20 em PBS, pH 7.2-7.4) no colocar o nome do aparelho. Repetiu-se esse processo duas

vezes, totalizando três lavagens. Após a última lavagem, a placa foi invertida em toalhas de papel limpas e todo líquido permanente foi removido. Em sequência, a placa foi revestida com 300 µl de Tampão de Bloqueio (5% Tween 20 em PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtrado) e incubada em temperatura ambiente por, no mínimo, 1 hora. O processo de aspiração/lavagem foi repetido como anteriormente.

#### **4.10.2. Ensaio**

Concluída a última lavagem, 100 µl das amostras e dos padrões (especificar padrões) diluídos em Reagente Diluente (1.4 mL do Reagente Diluente concentrado 1- R&D Systems, Catalog # DY997 - em 98.6 mL de 0.05% Tween 20 em PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtrado) foram adicionados aos poços. A placa foi vedada e incubada por 2 horas em temperatura ambiente. A aspiração/lavagem foi repetida como anteriormente. Em seguida, 50 µl do Anticorpo de Detecção diluído em Reagente Diluente foi adicionado em cada poço da placa que foi incubada por mais 2 horas em temperatura ambiente. A placa passou novamente pelo processo de aspiração/lavagem. Foram adicionados 100 µl da solução de Estreptavidina (especificar) por poço. A placa foi vedada, protegida da luz, e incubada por 20 minutos. O processo de aspiração/lavagem foi repetido. Foi adicionado 100 µL da Solução de Parada (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em cada poço. A leitura da absorbância foi determinada por espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices) com um filtro para o comprimento de onda de 450 nm.

#### **4.11. Análise histológica e score da fibrose**

Amostras de pulmão foram fixadas em formol neutro e tamponado a 10% e processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções histológicas de 4µm foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (H&E), para análise do score histopatológico e coradas com Tricômio de Gomori, para as análises de fibrose pulmonar.

O score histopatológico foi realizado como descrito por Hovart *et al.*, 2007, simultaneamente por dois patologistas experientes e de forma cega. O escore de 25 pontos levou em consideração a inflamação das vias aéreas, inflamação perivascular e inflamação parenquimatosa.

Para a análise do score de fibrose pulmonar, as lâminas coradas com tricômio de gomori foram analisadas segundo descrito por Hubner *et al.*, 2008 pelos mesmos patologistas. O escore

de 8 pontos levou em consideração a deposição de colágeno nos alvéolos pulmonares, vasos e bronquíolos. Também, para a análise de fibrose pulmonar, secções histológicas coradas pelo tricômio de gomori foram avaliados em 10 campos/secção histológica em objetiva de 20x por meio de imagens capturadas pelo microscópio Olympus BX-40 com câmera digital acoplada.

#### **4.12. Análises estatísticas**

A análise estatística dos dados, bem como a elaboração dos gráficos, foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc). Testes estatísticos de normalidade como D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e KS foram utilizados para determinar se houve ou não normalidade nos resultados de cada grupo. Com o teste de normalidade positivo, aplicamos o teste de 2way ANOVA, o qual foi expresso como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). Quando os resultados não passaram no teste de normalidade, foi então utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, o qual foi expresso como mediana. Foram considerados significativamente diferentes resultados com valor de  $p$  foi menor do que 0,05.

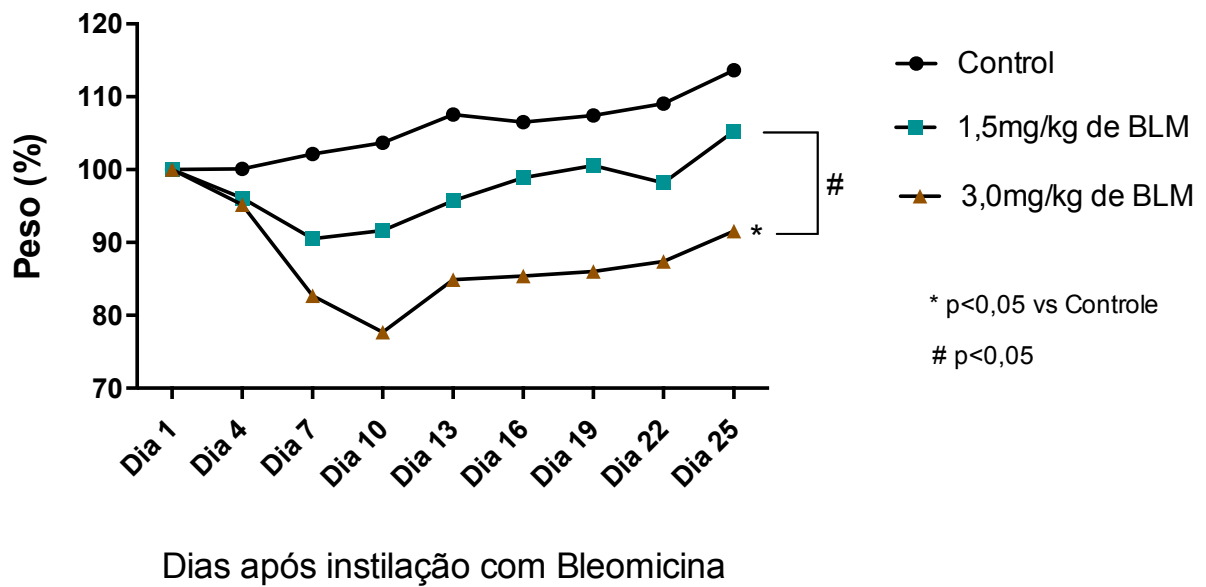
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Padronização do modelo

#### 5.1.1. *Animais instilados com a maior dose de bleomicina apresentaram maior perda de peso se comparado aos animais instilados com a dose menor*

Um modelo animal ideal, deve ser capaz de simular, o mais parecido possível, a doença humana, ser altamente consistente e reproduzível e fácil de executar. Até o momento, a administração de BLM é o mais importante método para induzir fibrose pulmonar em modelos animais.

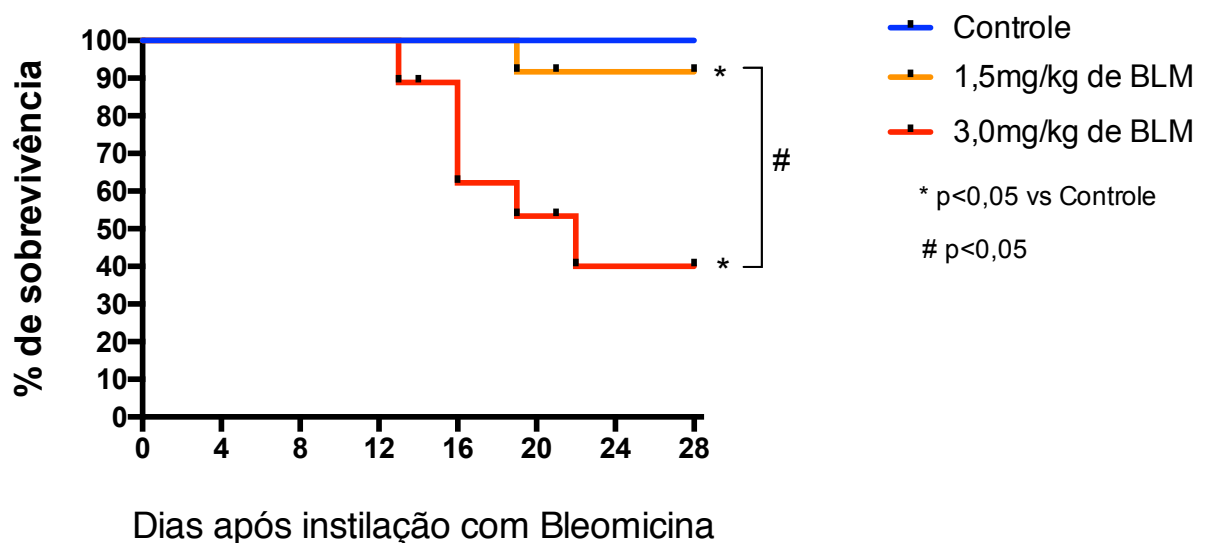
Com o objetivo de padronizar uma dose ideal de BLM, visando estudar medidas terapêuticas efetivas em um modelo de fibrose pulmonar, animais foram instilados (administração intranasal) com duas doses do fármaco (1,5mg/kg e 3,0mg/kg). Foi verificada a diferença da perda de peso dos animais em estudo. Eles foram submetidos a checagem de peso a cada três dias após a instilação. Para cada dia de checagem, a média do peso dos animais de cada grupo foi realizada e demonstrada em porcentagem. Os animais instilados com a menor dose de BLM apresentaram perda de peso nos primeiros 7 dias. Ganharam peso até o dia 19, quando tiveram uma nova e pequena perda de peso, porém, em alguns dias o recuperaram. Os animais instilados com a dose maior, apresentaram uma significativa perda de peso até o dia 10, quando o recuperaram e o mantiveram estável até o final do experimento. Os animais controle tiveram um ganho de, aproximadamente, 10% do seu peso inicial ao longo do experimento. Pôde-se observar que, ao final do experimento, os animais instilados com a menor dose tiveram uma menor perda de peso se comparados com os animais instilados com a maior dose.



**Figura 8. Perda de peso do experimento de padronização da dose de bleomicina em um modelo de fibrose pulmonar.** A perda de peso demonstrou-se influenciável de maneira dose-dependente. Animais instilados com a maior dose de Bleomicina apresentaram maior perda de peso se comparado aos animais instilados com a dose menos. Símbolos: círculo preenchido, grupo controle; quadrado, animais instilados com a dose de 1,5mg/kg de BLM; triângulo, animais instilados com a dose de 3,0 mg/kg de BLM. Gráfico representativo de um experimento, onde n = 4 – 6. One way ANOVA, seguido do teste de área (área under curve).

**5.1.2. Animais instilados com a maior dose de bleomicina apresentaram taxa de mortalidade maior que os animais instilados com a dose menor**

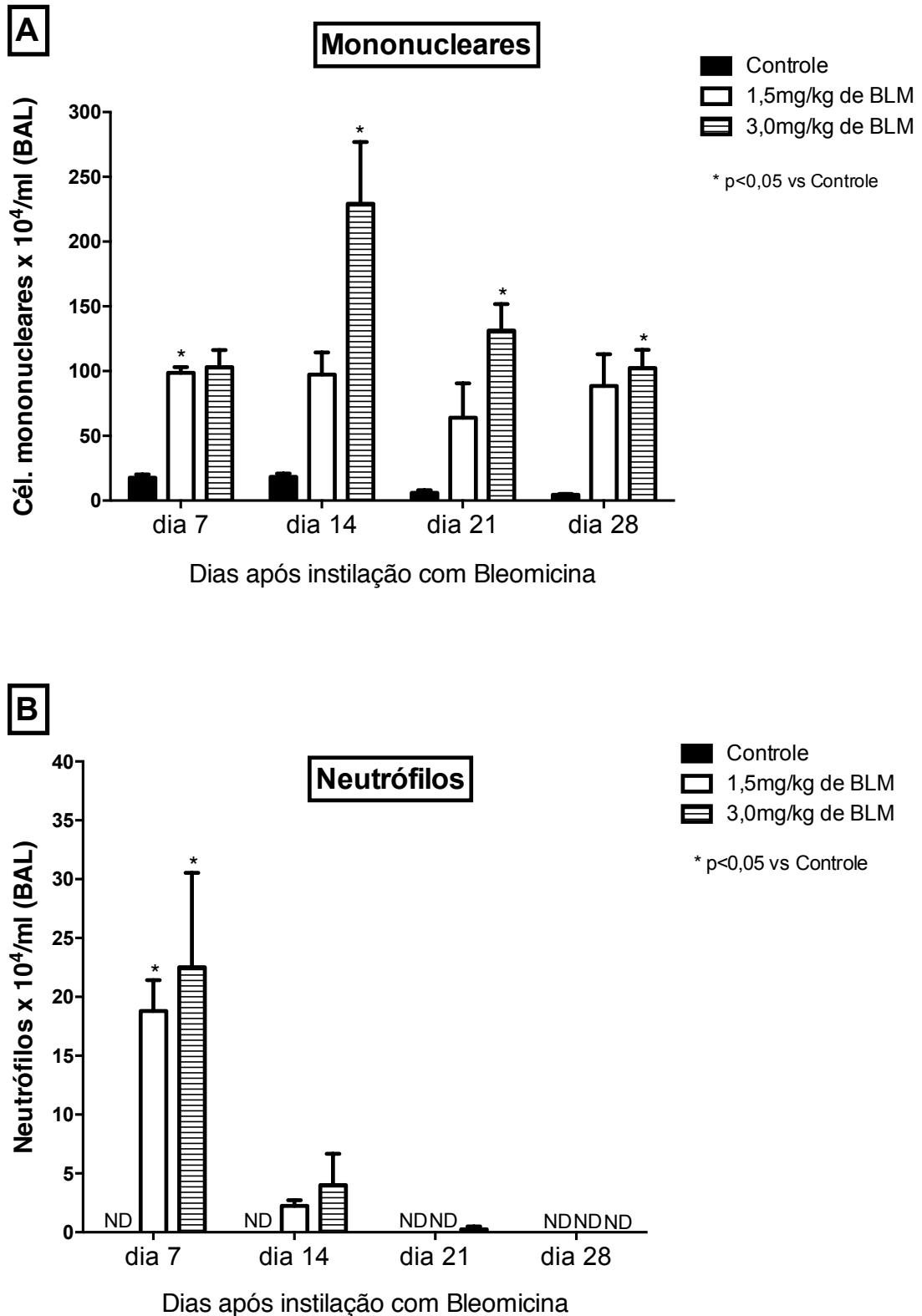
No experimento de padronização, checamos a influência das duas doses de BLM na sobrevida dos animais que foi demonstrada por uma curva de sobrevivência. Camundongos instilados com a maior dose apresentaram debilidade acentuada e começaram a morrer no dia 13. Fato que se repetiu nos dias 16 e 22. Ao final do experimento, apenas 40% dos animais sobreviveram. Em contrapartida, apenas 10% dos animais instilados com a menor dose, morreram no dia 19. Os animais do grupo controle não apresentaram diminuição da sobrevivência. Portanto, animais instilados com a dose menor apresentaram maior sobrevida que os animais instilados com a dose maior. Sendo assim, a dose de BLM influencia diretamente na sobrevida dos animais, sendo elas diretamente proporcionais.



**Figura 9. Letalidade do experimento de padronização da dose de bleomicina em um modelo de fibrose pulmonar.** Animais instilados com a maior dose de BLM apresentaram, ao final do experimento de fibrose pulmonar induzida por BLM, uma taxa de mortalidade maior que os animais instilados com a dose menor. Símbolos: linha azul, grupo controle; linha laranja, grupo instilado com 1,5mg/kg de BLM; linha vermelha, grupo instilado com 3,0mg/kg de BLM. Gráficos representativos de um experimento, onde  $n = 4 - 6$ . One way ANOVA, seguido do teste de área (área under curve).

### ***5.1.3. Caracterização do recrutamento celular para o espaço alveolar no modelo de fibrose induzida por bleomicina***

Após observarmos que houve diferença na perda de peso e na taxa de mortalidade entre os animais instilados com as duas doses de BLM, avaliamos o efeito desse fármaco no recrutamento celular para as vias aéreas por meio da realização do lavado broncoalveolar. Salina (grupo controle) e doses de 1,5mg/kg e 3,0mg/kg foram administradas via intranasal (instilação) no dia 0. Após a instilação, os dias de sacrifício escolhidos para análise foram o 7º, 14º, 21º e 28º. O lavado broncoalveolar foi realizado e as células foram identificadas e contadas. No grupo instilado com a dose menor, foi observado que houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de células mononucleares (figura 7 A) no dia 7. Nos dias seguintes, dia 14, 21 e 28, a dose maior de BLM induziu um significativo recrutamento dessas células para o espaço alveolar ( $p < 0,05$ ), sendo que seu pico ocorreu no dia 14. Em relação ao recrutamento neutrofílico (figura 7 B) para o espaço alveolar, pôde-se observar que as duas doses testadas induziram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) desse tipo celular no dia 7. Nos dias posteriores, o número de neutrófilos diminuiu até alcançar níveis basais (nível celular semelhante ao do grupo controle), como mostra a contagem do dia 21 e do dia 28 para todos os grupos. Níveis de neutrófilos no grupo controle, não foram detectadas (ND) em nenhum dos dias de sacrifício. Outro tipo celular incluído nas contagens foi os eosinófilos, os quais não foram detectados.

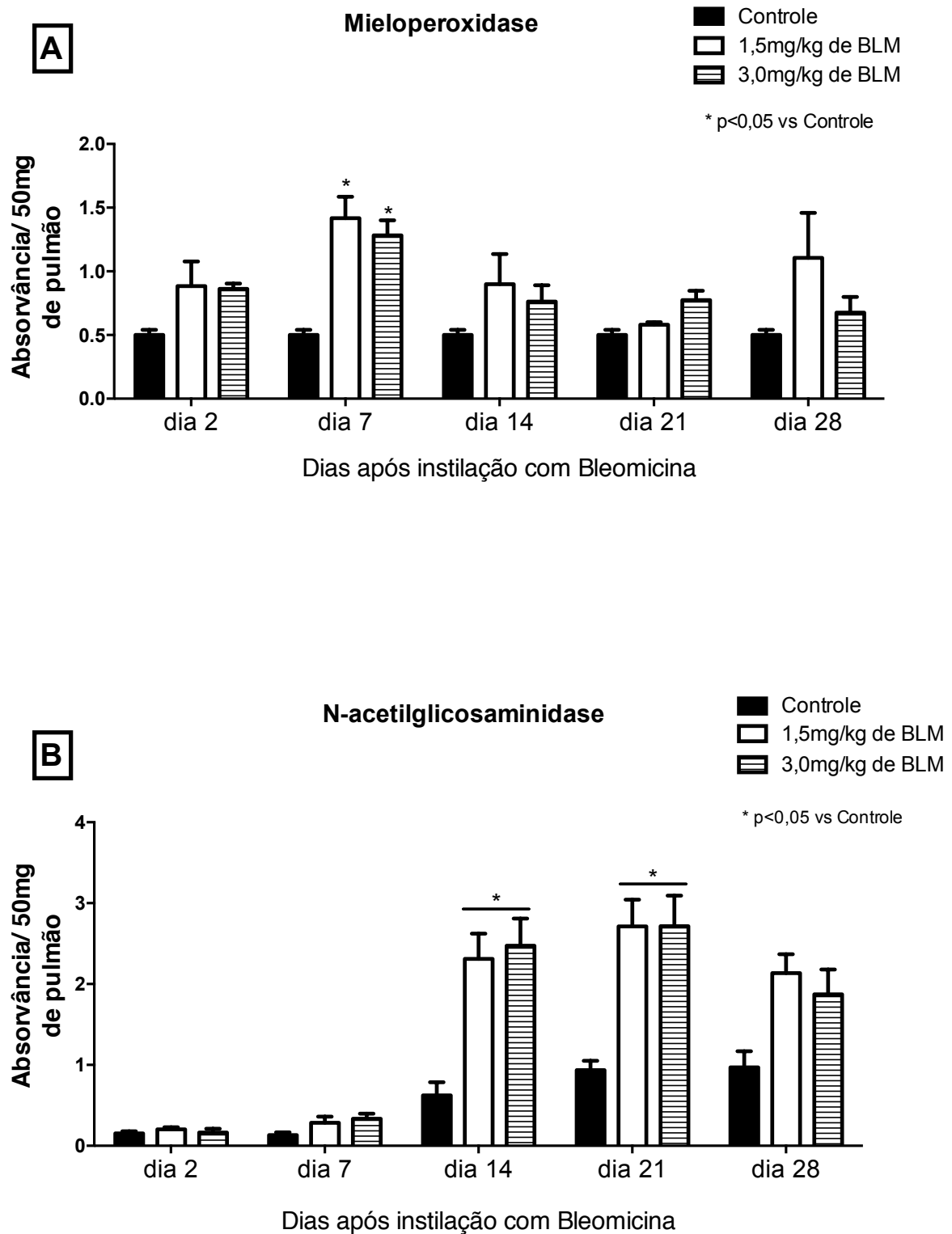


**Figura 10. Análise do recrutamento celular no lavado broncoalveolar após instilação com duas doses de bleomicina.** Contagem diferencial de (A) células mononucleares e (B) neutrófilos, 7, 14, 21 e 28 dias após a instilação com BLM. Valores expressos como média  $\pm$  EPM/mediana. 2way ANOVA (Teste de múltiplas comparações Bonferroni)/ Kruskal-Wallis seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde n= 4 – 6; ND= não detectado.



#### ***5.1.4. Caracterização do recrutamento celular para o tecido pulmonar no modelo de fibrose induzida por bleomicina***

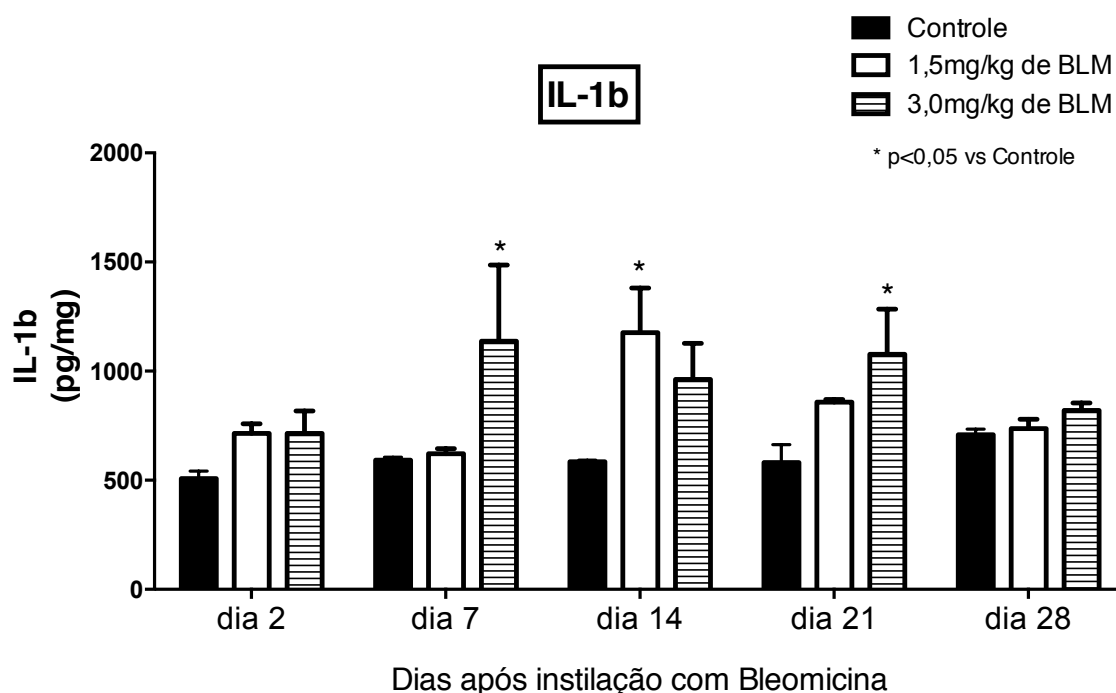
Avaliamos também, o efeito das duas doses de BLM no recrutamento celular para o tecido pulmonar por meio dos ensaios de mieloperoxidase (parâmetro indireto para se dosar neutrófilo no tecido) e de N-acetilglicosaminidase (parâmetro indireto para se dosar macrófagos no tecido). Tais parâmetros foram avaliados nos dias 2, 7, 14, 21 e 28 após a instilação com as duas doses de BLM para determinarmos o comportamento celular tecidual agudo e tardio. Pôde-se observar que ambas as doses não apresentaram efeito no recrutamento de neutrófilos nos dias 2, 14, 21 e 28 (figura 8 A). Entretanto, as duas doses, no dia 7, causaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no número de neutrófilos no tecido pulmonar. Quando avaliamos o recrutamento de macrófagos (figura 8 B), pôde-se observar que nos dias 2 e 7, essas células se encontravam em níveis basais no tecido pulmonar. Entretanto, nos dias 14 e 21 o recrutamento desse tipo celular aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) para as duas doses de BLM estudadas. E no dia 28, os níveis de macrófagos no pulmão diminuíram para ambas as doses avaliadas.



**Figura 11. Análise do recrutamento celular para o tecido pulmonar após instilação com duas doses de bleomicina.** Dosagem indireta de (A) neutrófilos no tecido pulmonar por meio da quantificação da enzima mieloperoxidase e de (B) macrófagos por meio da quantificação da enzima N-acetilglicosaminidase. Valores expressos como média  $\pm$  EPM/mediana. 2way ANOVA (Teste de múltiplas comparações Bonferroni)/ Kruskal-Wallis seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde  $n = 4 - 6$ .

### 5.1.5. Efeito das doses 1,5mg/kg e 3,0mg/kg de bleomicina na produção da citocina IL-1 $\beta$

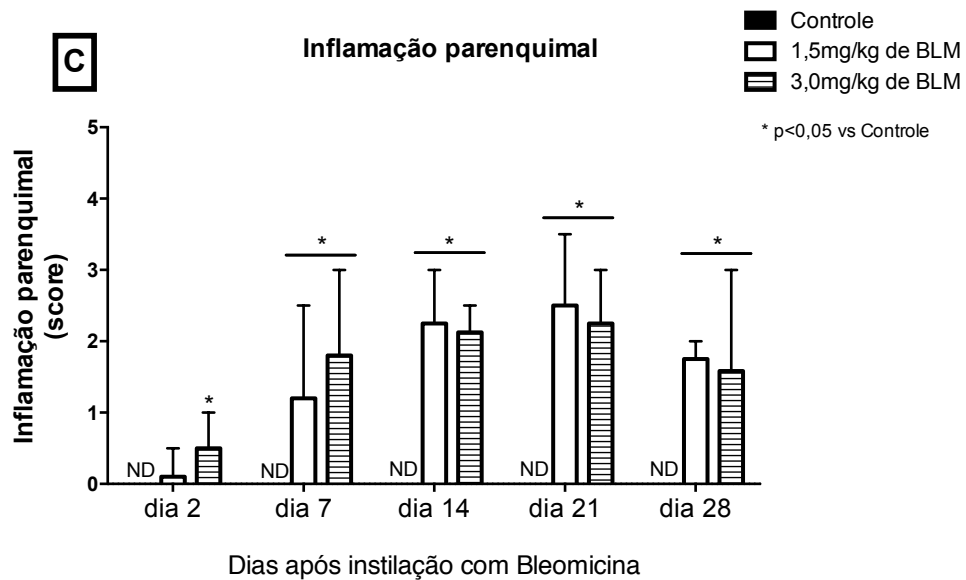
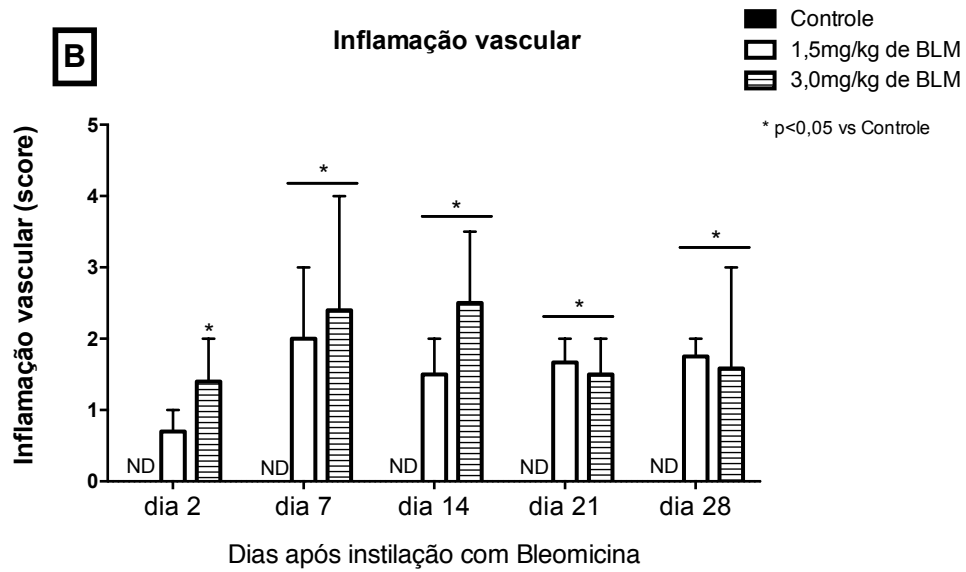
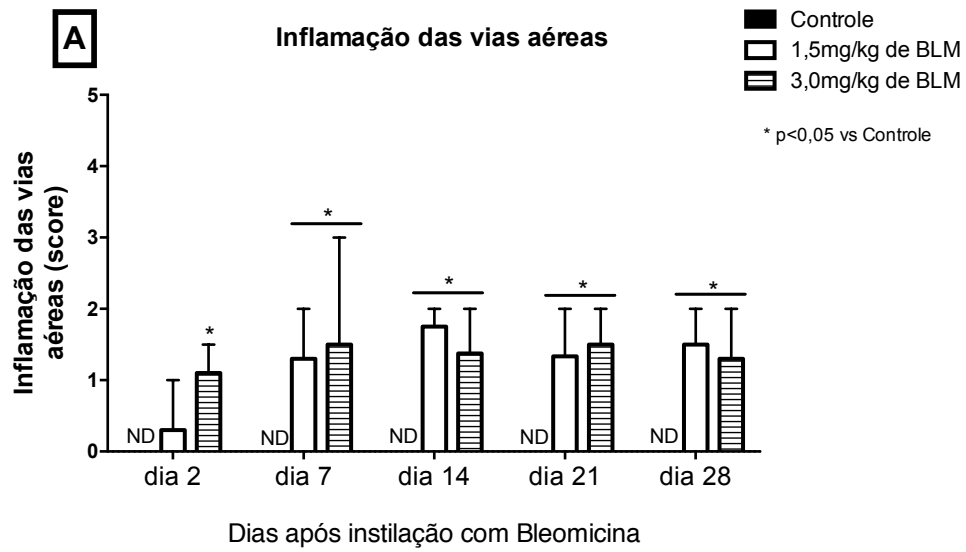
Para entendermos o efeito das duas doses de BLM na produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar, optamos por checar os níveis de IL-1 $\beta$  no pulmão dos animais dos grupos instilados com as duas doses de BLM e no grupo controle, instilado com salina. Pôde-se observar que 2 dias após a instilação, não houve um aumento na produção dessa citocina nos grupos instilados com ambas as doses de BLM. No dia 7, a instilação com a maior dose de induziu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dessa citocina no tecido pulmonar. Da mesma maneira, a maior dose aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis de IL-1 $\beta$  no dia 21 após a instilação. Já a dose menor, gerou um aumento ( $p < 0,05$ ) dessa citocina no pulmão somente no dia 14. No dia 28, ambas as doses apresentaram níveis basais de IL-1 $\beta$  no tecido pulmonar.

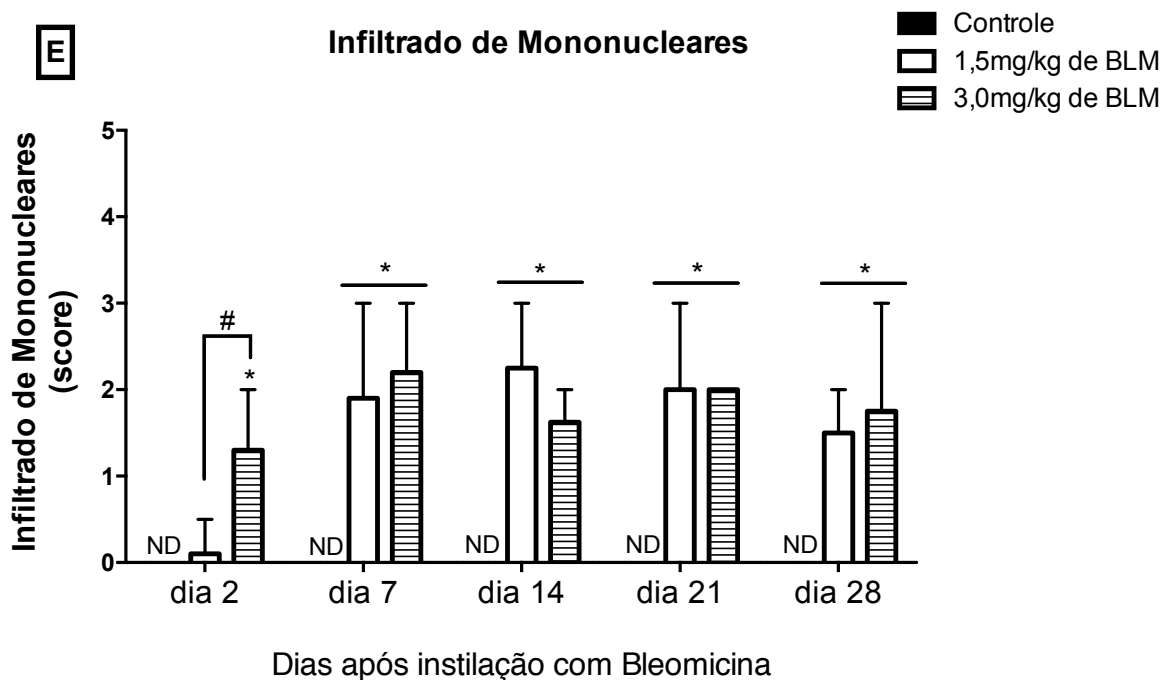
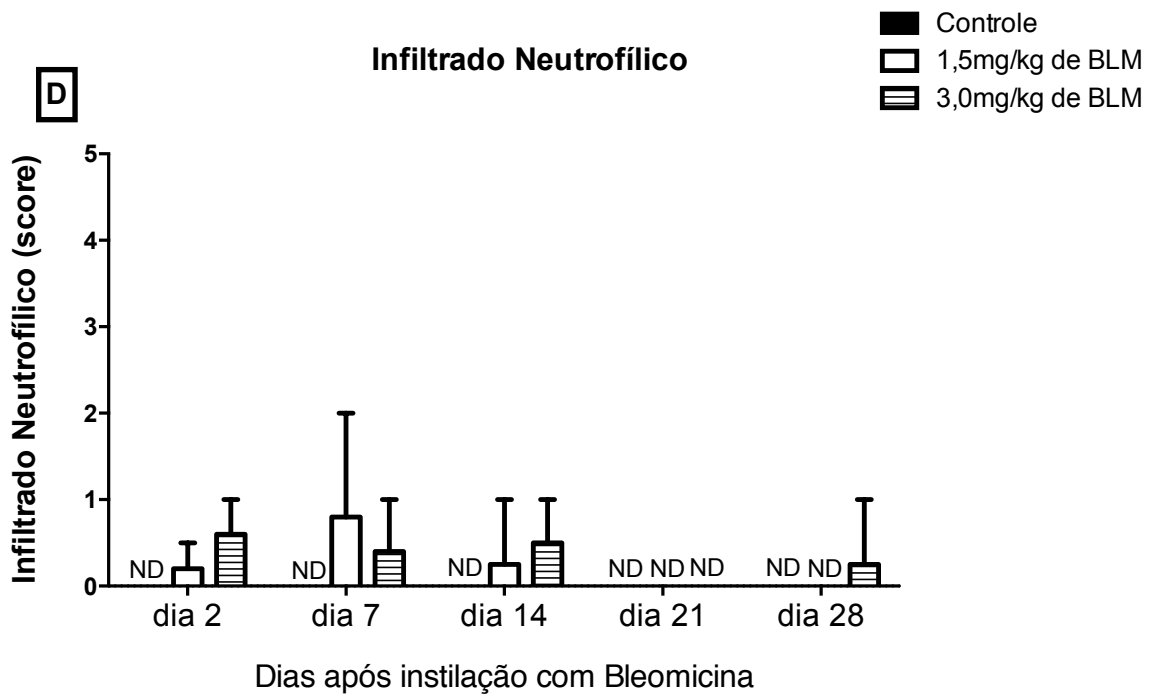


**Figura 12. Análise da produção de IL-1 $\beta$  no tecido pulmonar após instilação com duas doses de bleomicina.** Valores expressos como média  $\pm$  EPM/mediana. 2way ANOVA (Teste de múltiplas comparações Bonferroni)/Kruskal-Wallis seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde  $n = 4 - 6$ .

### ***5.1.6. Avaliação dos parâmetros histológicos na fibrose pulmonar induzida por 1,5mg/kg e 3,0mg/kg de bleomicina***

Quando avaliamos os parâmetros histológicos, observamos que a inflamação das vias aéreas (espaço alveolar e bronquíolos) (figura 10 A) está aumentada nos animais que receberam as duas doses de BLM em todos os dias de sacrifício, exceto no dia 2, onde esse parâmetro está aumentado apenas para a dose maior ( $p < 0,05$ ). Assim também foi observado na inflamação vascular (figura 10 B) e na inflamação parenquimal (parede alveolar e interstício) (figura 10 C). Ao avaliarmos o infiltrado celular, pôde-se observar que as células predominantemente recrutadas foram os mononucleares. Não houve aumento no infiltrado neutrofílico (figura 10 D) em nenhum dos dias avaliados para nenhuma das duas doses. Entretanto, houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de mononucleares (figura 10 E) em todos os dias de sacrifício para ambas as doses de Bleomicina.

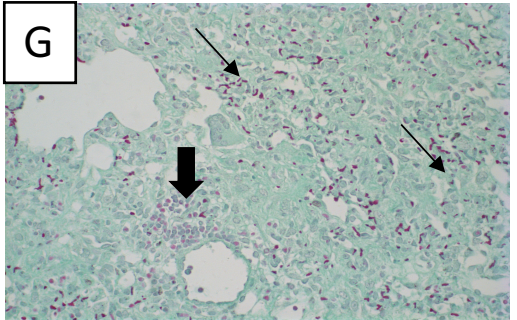
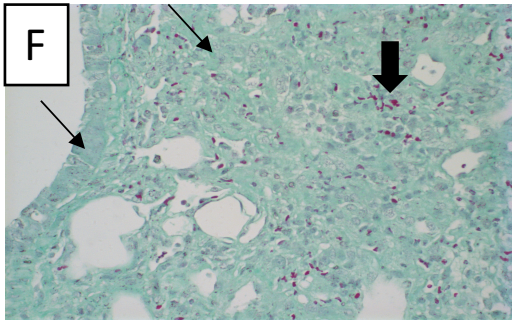
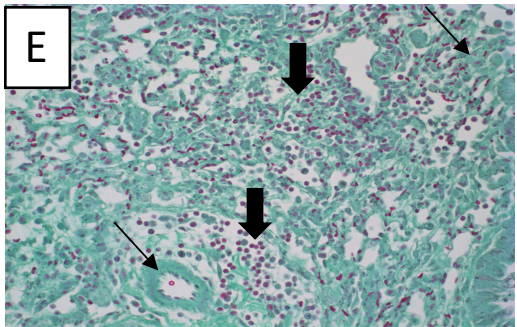
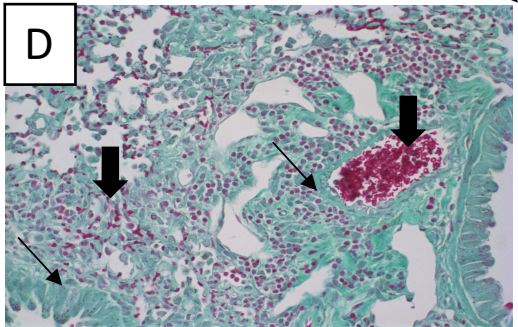
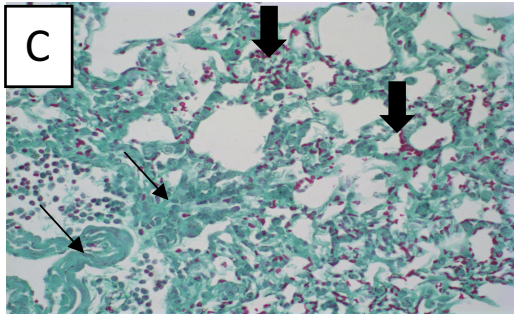
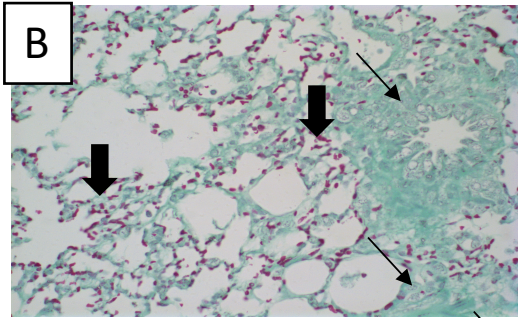
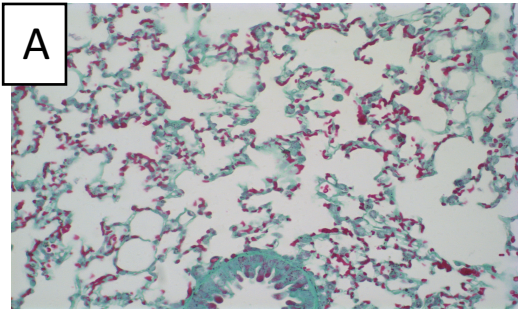




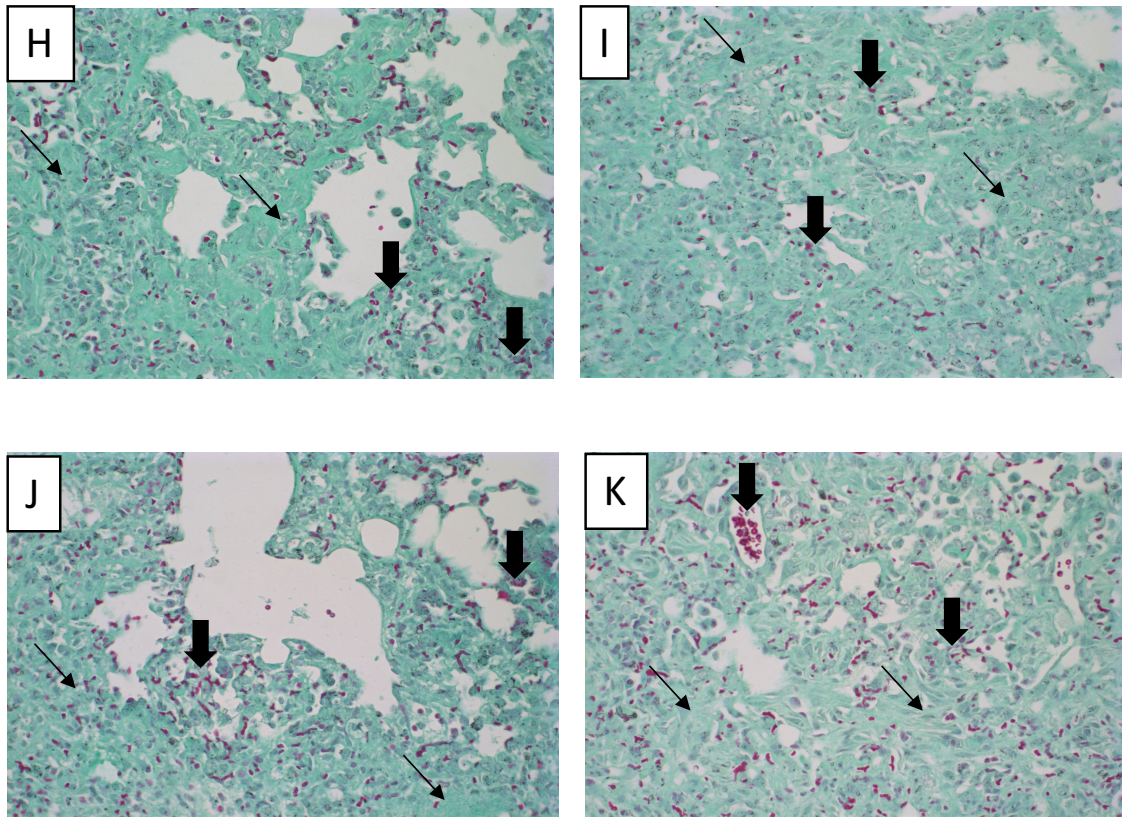
**Figura 13. Avaliação dos parâmetros histológicos em um modelo de fibrose induzida por bleomicina.** Resposta inflamatória presente nas (A) vias aéreas, nos (B) capilares alveolares e no (C) parênquima pulmonar para as duas doses de Bleomicina em todos os dias de sacrifício, exceto o dia 2, com ausência de (E) neutrófilos e predomínio de (D) mononucleares. Valores expressos como média  $\pm$  EPM/mediana. 2way ANOVA (Teste de múltiplas comparações Bonferroni)/ Kruskal-Wallis seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde  $n = 4 - 6$ ; ND= não detectado.  $*=p < 0,05$  vs controle;  $\#=p < 0,05$ .

### ***5.1.7. Avaliação da deposição de colágeno em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina***

Para entendermos a diferença da deposição de colágeno entre as duas doses de BLM, avaliamos a presença de colágeno em cortes histológicos dos pulmões de animais instilados com 1,5mg/kg e 3,0mg/kg de BLM em um aumento de 200X, corados com tricrômico de Gomori. Ao avaliarmos os pulmões do grupo controle (figura 11 A) pôde-se observar que nenhuma alteração morfológica tecidual foi encontrada. Os espaços alveolares, paredes dos alvéolos permaneceram intactos. Quando observamos os tecidos no segundo dia após instilação com as duas doses de BLM (figuras B e C), já começamos a notar uma leve deposição de colágeno ao redor dos bronquíolos alveolares nos animais instilados com a dose menor (figura B). Animais que foram instilados com a dose maior, apresentaram um aumento no recrutamento celular assim como na deposição de colágeno (figura C). No dia 7, podemos observar um aumento na deposição de colágeno acompanhado do aumento da inflamação vascular, parenquimal e das vias aéreas para a dose de 1,5mg/kg (figuras D) e para a dose 3,0mg/kg (figura E), assim como indicou o score histológico de inflamação. A deposição de colágeno aumentou ainda mais no dia 14 tanto para a dose menor (figuras F) quanto para a dose maior (figura G). As aéreas verdes, as quais representam o desenvolvimento de fibrose, ocuparam a maior parte do tecido, diminuindo, consideravelmente, os espaços alveolares para as duas doses. A presença de pneumonite, com predomínio de mononucleares, assim como a hiperemia, permaneceram altas, porém a deposição de colágeno foi tão intensa que, com a coloração, se tornou difícil de visualizar as células recrutadas. Assim também ocorreu nos dias 21 para a dose menor e maior (figuras H e I, respectivamente) e 28, também para a dose menor e maior (figuras J e K, respectivamente) após instilação com BLM. Sendo assim, após análise da deposição de colágeno e análises histológicas da inflamação pulmonar, podemos observar que não houve diferença na resposta gerada pela dose de 1,5mg/kg e 3,0mg/kg de BLM.







**Figura 14. Efeito da instilação de duas doses de bleomicina na deposição de colágeno em um modelo de fibrose pulmonar.** Cortes histológicos do (A) grupo controle, Bleomicina (B) 1,5mg/kg e (C) 3,0mg/kg no dia 2, Bleomicina (D) 1,5mg/kg e (E) 3,0mg/kg no dia 7, Bleomicina (F) 1,5mg/kg e (G) 3,0mg/kg no dia 14, Bleomicina (H) 1,5mg/kg e (I) 3,0mg/kg no dia 21 e Bleomicina (J) 1,5mg/kg e (K) 3,0mg/kg no dia 28. As setas finas indicam a presença de colágeno e as setas largas indicam inflamação. Aumento de 200X. Coloração tricrômico de Gomori.

## **5.2. Pré-tratamento com angiotensina 1-7**

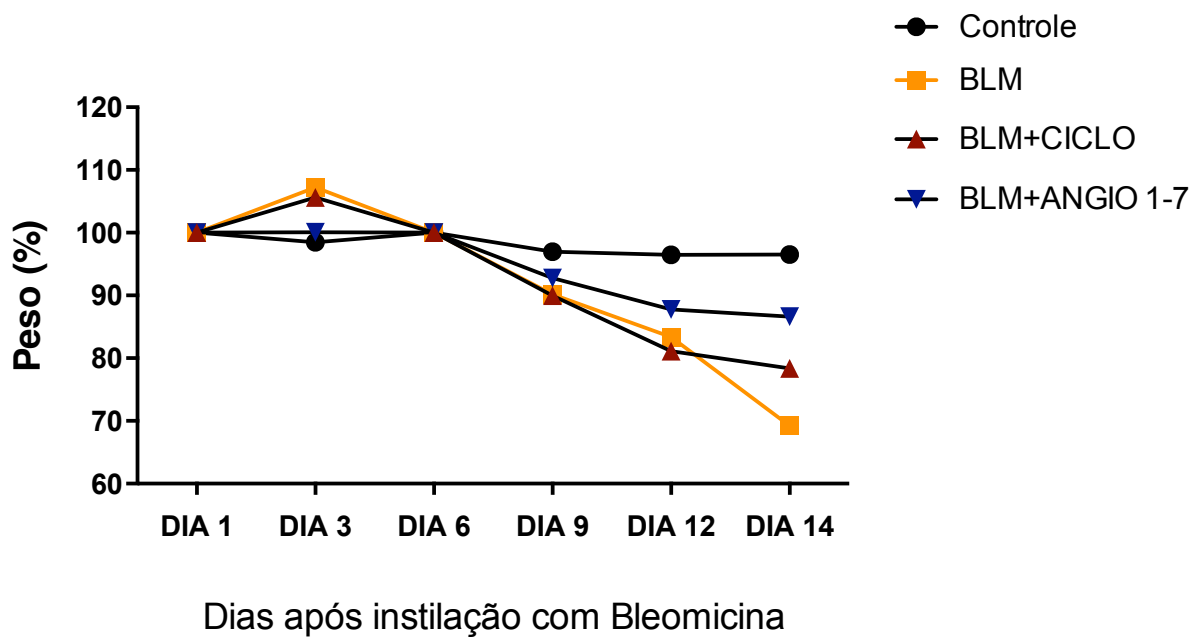
### ***5.2.1. Animais tratados com angiotensina 1-7, 1 hora antes da instilação com bleomicina, apresentaram menor perda de peso ao longo do experimento***

O tratamento com angiotensina 1-7 na fibrose pulmonar induzida por bleomicina tem sido estudado e apresentado êxito na prevenção do desenvolvimento de fibrose pulmonar. Entretanto, nenhum trabalho demonstrou o efeito dessa molécula na fibrose pulmonar sendo ela administrada via oral. Diante disso, optamos por estudar o efeito do tratamento da fibrose pulmonar induzida por BLM, com angiotensina 1-7, a qual foi administrada por gavagem (via oral).

Após checarmos a diferença nos parâmetros celulares e moleculares gerados pelas duas doses de BLM estudadas no experimento anterior, concluímos que a melhor dose a ser utilizada foi a dose de 3,0mg/kg de BLM. Essa dose foi a que obteve melhor influência nos parâmetros analisados, apesar de ter provocado maior perda de peso e maior taxa de mortalidade que a dose de 1,5mg/kg.

Com isso, animais foram divididos em quatro grupos: (i) grupo controle; (ii) grupo instilado com a dose de 3,0mg/kg de BLM – BLM; (iii) grupo instilado com a dose de 3,0 mg/kg de BLM e tratados de 12 em 12 horas com ciclodextrina – BLM+CICLO (grupo veículo); (iv) grupo instilado com 3,0mg/kg de BLM e tratados de 12 em 12 horas com Angiotensina 1-7 (fármaco composto por ciclodextrina e Angiotensina 1-7) – BLM+ANGIO (grupo tratado). O tratamento com ANGIO e com CICLO foi iniciado 1 hora antes da instilação com BLM e os animais foram sacrificados nos dias 2, 7 e 14. Devido a alta taxa de mortalidade do grupo BLM+CICLO, optamos por excluir o quarto dia de sacrifício (dia 21). Sendo assim, no dia 14, os animais sobreviventes foram todos sacrificados.

Pôde-se observar que o grupo BLM e BLM+CICLO tiveram perda de peso semelhante ao longo do experimento. Porém, ao final, o grupo BLM apresentou cerca de 30% de perda de peso e o grupo BLM+CICLO apresentou, aproximadamente, 25% de perda de peso. O grupo que recebeu o tratamento com angiotensina 1-7, teve uma perda de peso de, aproximadamente, 15% do seu peso inicial, sendo que o grupo controle manteve seu peso ao longo do experimento. Portanto, o tratamento com angiotensina 1-7, aparentemente, reduziu a perda de peso dos animais tratados.

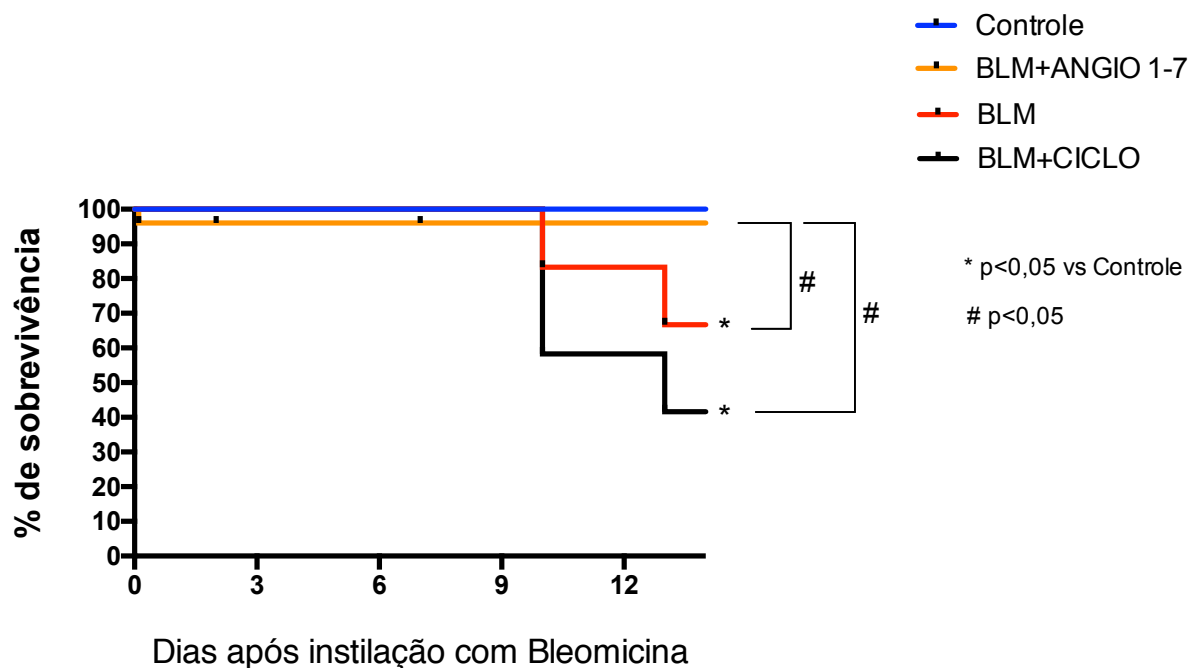


**Figura 15. Perda de peso do experimento de pré-tratamento com angiotensina 1-7 em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina.** O tratamento com Angiotensina 1-7, em um modelo de fibrose induzida por Bleomicina, reduziu a perda de peso dos animais tratados. Símbolos: círculo preto, grupo controle; quadrado laranja, animais instilados com 3,0mg/kg de Bleomicina; triângulo vermelho, grupo veículo - instilado com Bleomicina e tratado com Ciclodextrina; triângulo azul, grupo tratado - instilado com Bleomicina e tratado com ANGIO 1-7. Gráfico representativo de um experimento, onde n= 3 – 12. One way ANOVA, seguido do teste de área (área under curve).

**5.2.2. O pré-tratamento com angiotensina 1-7, em um modelo de fibrose induzida por bleomicina, manteve a sobrevida dos animais tratados em 100%**

Juntamente com a checagem da perda de peso, a sobrevida dos animais também foi checada para entendermos a influência do tratamento com Angiotensina 1-7 sob a taxa de mortalidade, em comparação aos grupos que não receberam tratamento. Ao final do experimento, o grupo veículo (BLEO+CICLO) apresentou, aproximadamente, 40% de sobrevida, sendo que as mortes iniciaram no dia 10. O grupo BLM apresentou, aproximadamente, 65% de sobrevida, sendo que as mortes iniciaram também no dia 10. Já o grupo tratado com ANGIO 1-7, tiveram uma sobrevida de 100%, igual ao grupo controle.

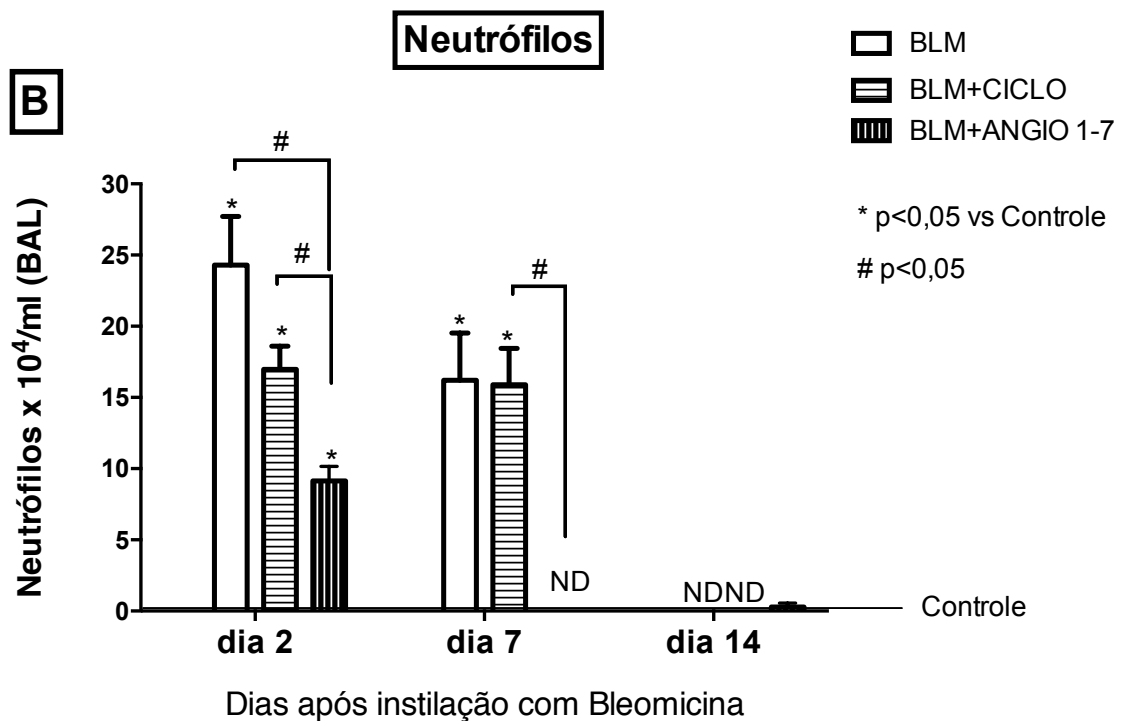
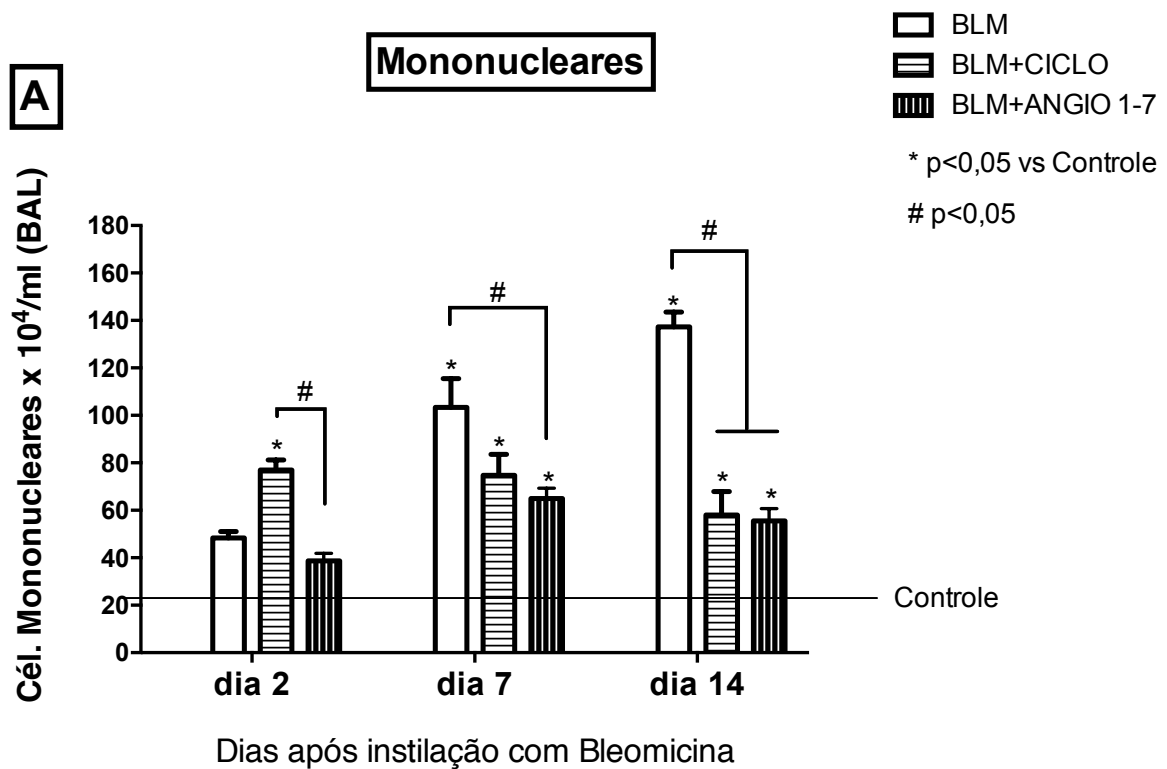
Assim, o tratamento com ANGIO 1-7 diminuiu a taxa de mortalidade dos animais tratados a um nível semelhante aos animais que não estavam com fibrose pulmonar (grupo controle).



**Figura 16. Letalidade do experimento de pré-tratamento com angiotensina 1-7 em um modelo de fibrose pulmonar inzulida por bleomicina.** Animais tratados com Angiotensina 1-7 apresentaram uma taxa de sobrevida semelhante ao grupo controle, ao final do experimento de fibrose pulmonar induzida por BLM. Símbolos: linha azul, grupo controle; linha laranja, grupo tratado - instilado com Bleomicina e tratado com ANGIO 1-7 (não aparente no gráfico); linha vermelha, grupo instilado 3,0mg/kg de BLM; linha preta, grupo veículo - instilado com Bleomicina e tratado com Ciclodextrina. Gráfico representativo de um experimento, onde  $n = 3 - 12$ . One way ANOVA, seguido do teste de área (area under curve).

### ***5.2.3. O pré-tratamento com angiotensina 1-7 diminuiu o recrutamento celular no lavado brocoalveolar de animais tratados***

Após observar que o tratamento com ANGIO 1-7 influencia significativamente na sobrevivência e na perda de peso dos animais tratados, avaliamos o recrutamento de células mononucleares e de neutrófilos para o espaço alveolar por meio da realização do lavado brocoalveolar (BAL). Ao contarmos as células mononucleares, pôde-se observar que no dia 2, houve um aumento significativo dessas células no grupo veículo se comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Entretanto, o tratamento com ANGIO 1-7 não causou esse aumento. No dia 7, todos os grupos instilados com BLM apresentaram aumento desse tipo celular no BAL ( $p < 0,05$ ), sendo que o grupo BLM estimulou um maior recrutamento mononuclear do que os grupos veículo e tratado ( $p < 0,05$ ). O mesmo ocorreu no dia 14; os animais do grupo BLM tiveram maiores níveis desse tipo celular do que os grupos veículo e tratado ( $p < 0,05$ ), sendo que, em relação ao controle, todos os grupos apresentaram aumento de células mononucleares nas vias aéreas. Ao observarmos os níveis de neutrófilos nas vias aéreas dos animais estudados, conseguimos perceber a influência do tratamento com ANGIO 1-7 também no recrutamento neutrofilico. No dia 2, os três grupos apresentaram aumento de neutrófilos quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), porém, esse aumento foi menor nos animais do grupo tratado em relação ao grupo BLM e veículo ( $p < 0,05$ ). No dia 7, os grupos BLM e veículo tiveram um aumento desse tipo celular ( $p < 0,05$ ), o que não ocorreu no grupo tratado (ND – não detectado). E no dia 14, todos os grupos mantiveram o número de neutrófilos a níveis basais. Outro tipo celular incluído nas contagens foi os eosinófilos, os quais não foram detectados.

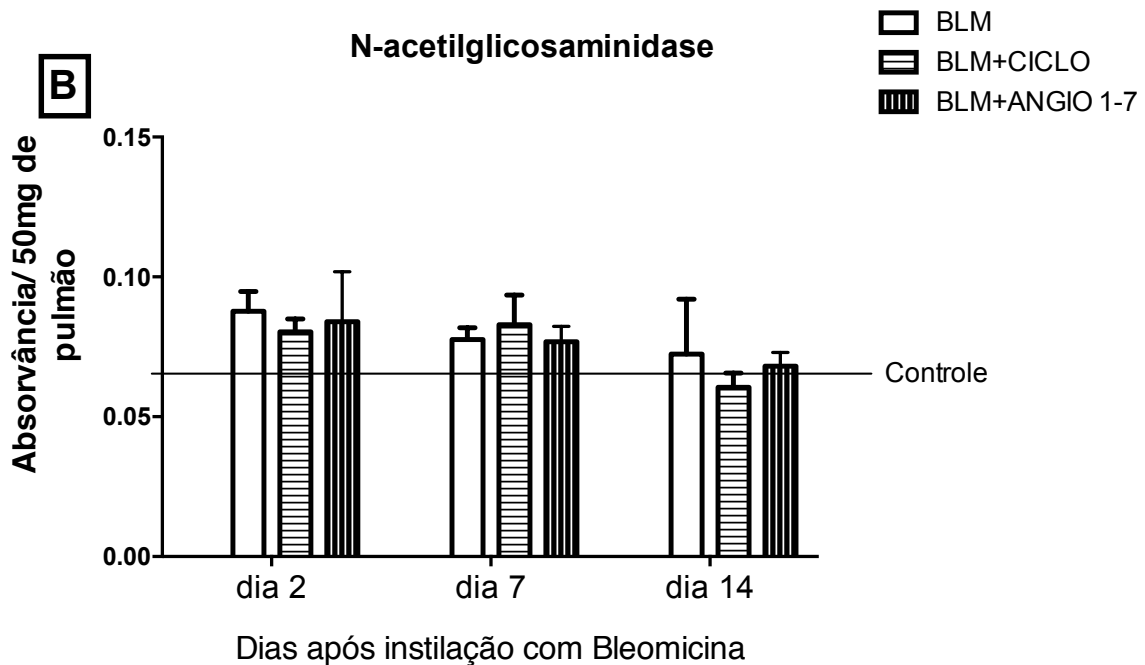
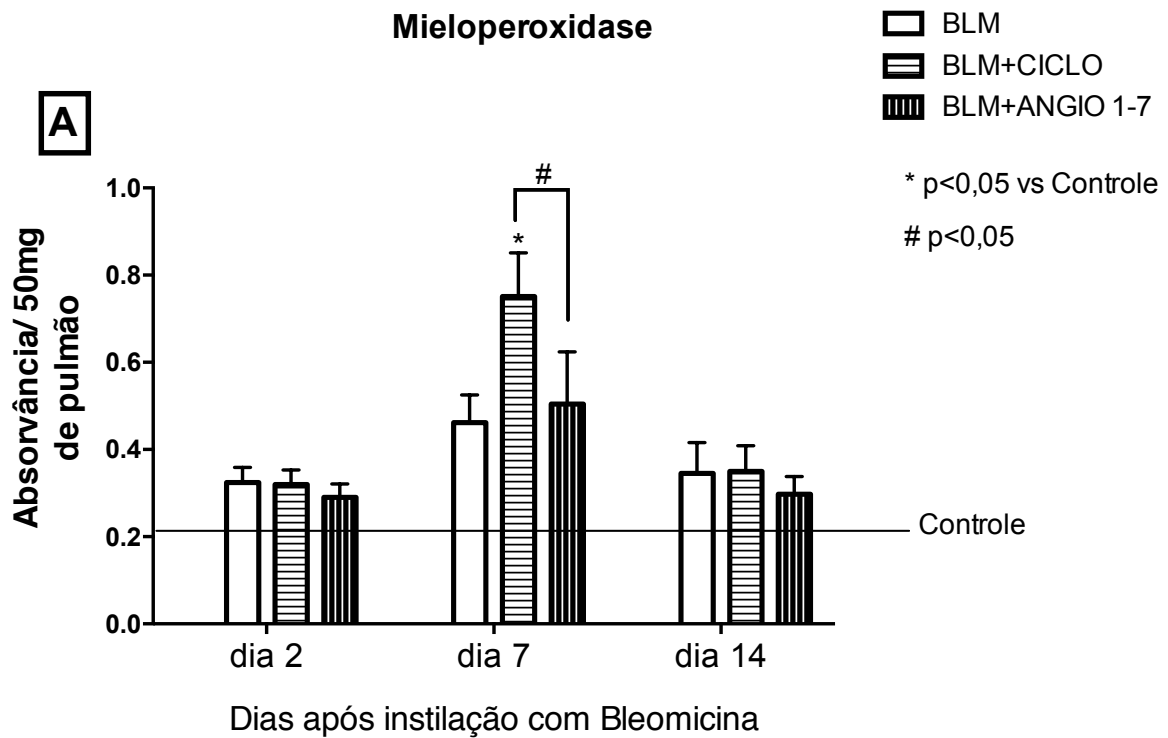


**Figura 17. Efeito do tratamento com angiotensina 1-7 no recrutamento celular em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina.** Contagem diferencial de (A) células mononucleares e (B) neutrófilos no BAL, 2, 7 e 14 dias após a instilação com BLM. Valores expressos como média  $\pm$  EPM/mediana. 2way ANOVA (Teste de múltiplas comparações Bonferroni)/ Kruskal-Wallis seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde n= 3 – 12; ND= não detectado.

#### ***5.2.4. Efeito do tratamento com angiotensina 1-7 no recrutamento de células para o tecido pulmonar de animais instilados com bleomicina***

Com o objetivo de analisar o recrutamento celular no tecido pulmonar, realizamos a dosagem da enzima Mieloperoxidase - MPO (parâmetro indireto para determinar a quantidade de neutrófilo tecidual) e a dosagem da enzima N-acetilglicosaminidase - NAG (parâmetro indireto para determinar a quantidade de macrófago tecidual). No dia 2, foi possível observar que nenhum grupo teve os níveis de MPO aumentados. No dia 7, os níveis dessa enzima aumentaram, porém, esse aumento só foi significativo no grupo veículo ( $p < 0,05$ ). Quando comparamos o grupo tratado com o grupo veículo no dia 7, pôde-se observar que o tratamento com ANGIO 1-7 impediu o aumento de MPO no tecido pulmonar que ocorreu no grupo veículo ( $p < 0,05$ ). No dia 14, os níveis de mieloperoxidase não sofreram alteração em nenhum dos três grupos.

Dosamos também os níveis de NAG pulmonar e percebemos que os níveis dessa enzima não foram alterados em nenhum dos grupos estudados e se manteve em níveis semelhantes ao longo do tempo.



**Figura 18. Análise da influência do tratamento com angiotensina 1-7 no recrutamento celular para o tecido pulmonar.** Dosagem indireta de (A) neutrófilos no tecido pulmonar por meio da quantificação da enzima mieloperoxidase e de (B) macrófagos por meio da quantificação da enzima N-acetilglicosaminidase. Valores expressos como média  $\pm$  EPM/mediana. 2way ANOVA (Teste de múltiplas comparações Bonferroni)/ Kruskal-Wallis seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde n= 3 – 12.



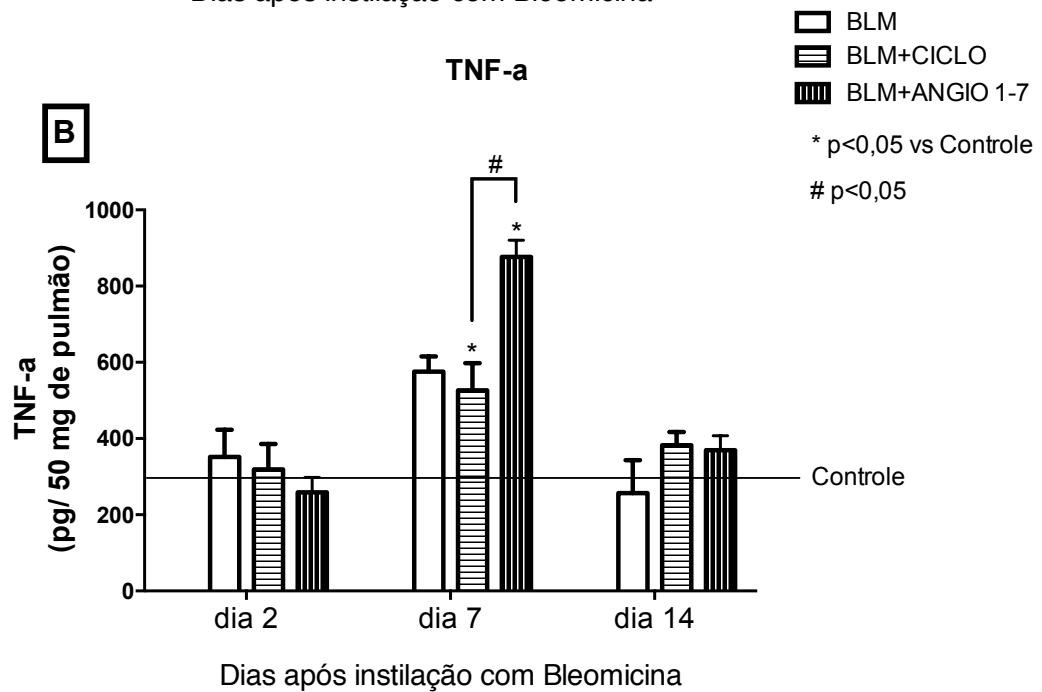
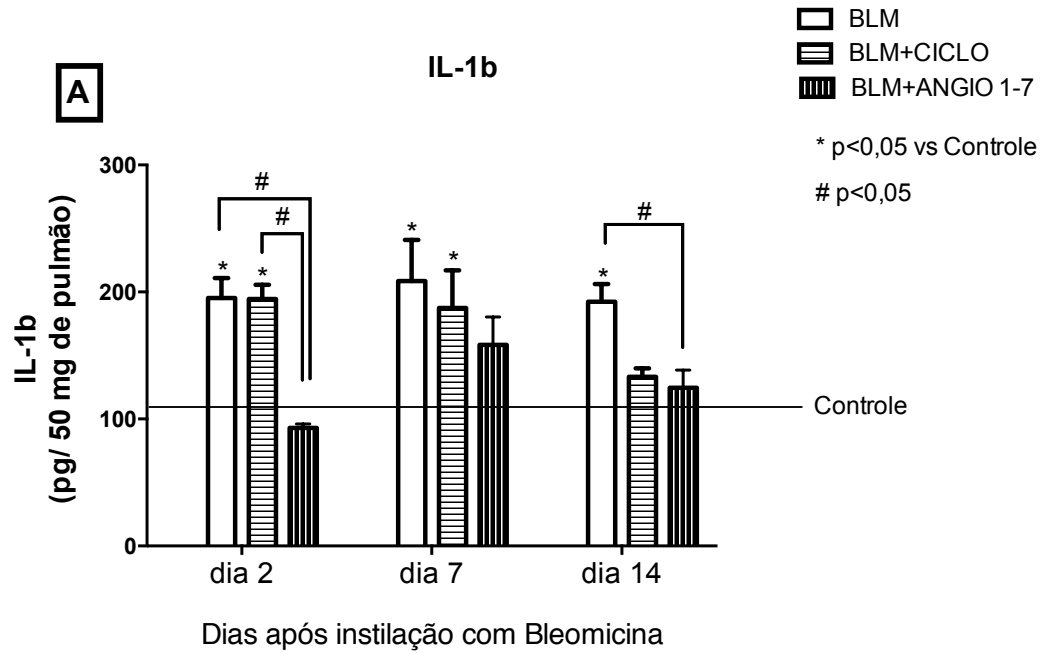
### ***5.2.5. Influência do pré-tratamento de angiotensina 1-7 na produção de citocinas e quimiocinas pulmonares***

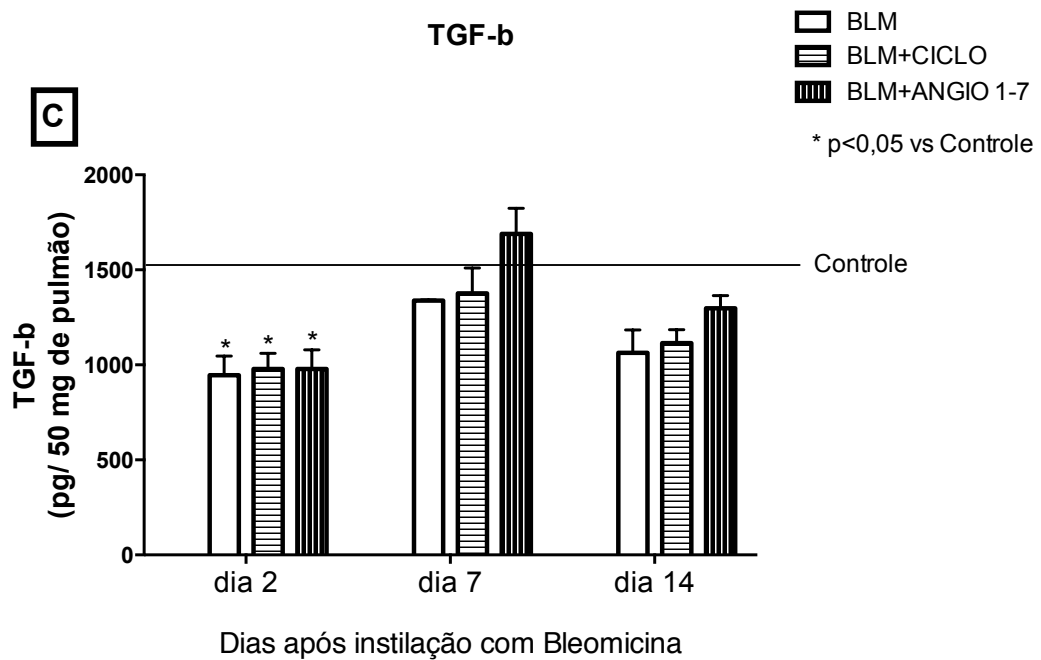
Após observarmos que o pré-tratamento com ANGIO 1-7 influencia no recrutamento celular tanto para o BAL, quanto para o tecido pulmonar, analisamos o efeito do tratamento na produção de citocina e quimiocinas no pulmão dos animais. Quando avaliamos a produção de IL-1 $\beta$  no tecido pulmonar, foi possível observar que no segundo dia após instilação com BLM, os grupos BLM e veículo apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos níveis dessa citocina no tecido pulmonar, o que não ocorreu nos animais que receberam o tratamento com ANGIO 1-7. Assim, houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na produção dessa citocina, no dia 2, pelo grupo tratado quando comparado com os grupos BLM e veículo. No dia 7 essa citocina ainda está elevada nos grupos BLM e veículo ( $p < 0,05$ ), mas não no grupo tratado. Já no dia 14, o grupo BLM manteve alto os níveis de IL-1 $\beta$ , diferentemente do grupo que recebeu o tratamento ( $p < 0,05$ ).

Outra citocina dosada foi o TNF- $\alpha$  que apresentou resultados intrigantes. Nos dias 2 e 14, nenhuma diferença foi encontrada nos níveis dessa citocina quando comparamos os grupos entre si. Entretanto, no dia 7, o grupo tratado e o grupo veículo apresentaram aumento de TNF- $\alpha$  pulmonar ( $p < 0,05$ ), porém, o aumento dos níveis dessa citocina pelo grupo tratado, foi maior que o do grupo veículo, o que não era esperado acontecer, já que nesse dia, o recrutamento celular, principalmente de neutrófilos, é menor.

Níveis de TGF- $\beta$  foram medidos, porém, inesperadamente, o grupo controle apresentou níveis muito elevados dessa citocina, sendo que estudos demonstram níveis de TGF- $\beta$  nos grupos controle entre 100 e 200 pg/ml.

Dosamos, também, a produção da quimiocina CCL5/RANTES, porém, os resultados obtidos precisam ser repetidos.





**Figura 19. Efeito do pré-tratamento com angiotensina 1-7 na produção de citocinas pulmonares em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina.** Níveis de (A) IL-1 $\beta$ , (B) TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  foram dosados nos tecidos pulmonares de animais do grupo controle, grupo veículo e grupo tratado nos dias 2, 7 e 14 após instilação com Bleomicina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM/mediana. 2way ANOVA (Teste de múltiplas comparações Bonferroni)/ Kruskal-Wallis seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde n= 3 – 12.

### 5.3. Sumário dos resultados

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, podemos sumarizar:

- Bleomicina diminui a taxa de sobrevivência de maneira dose-dependente, assim como aumenta a perda de peso;
- As doses de 1,5mg/kg e 3,0mg/kg de bleomicina aumentam o recrutamento celular para as vias aéreas pulmonares. Mononucleares aumentam a partir do dia 7, com seu pico no dia 14 (no caso da dose maior). Neutrófilos se encontram aumentados no dia 7 e em seguida decaem para níveis basais;
- A dose de 3,0mg/kg influencia de forma mais significativa no recrutamento de mononucleares;
- Neutrófilos são detectados no tecido pulmonar no dia 7 para as duas doses, e os mononucleares teciduais têm seus níveis aumentados nos dias 14 e 21 também para as duas doses;
- Níveis elevados de IL-1 $\beta$  pulmonar são encontrados nos dias 7 e 21 para a dose maior, e no dia 14 para a dose menor;
- O pré-tratamento com angiotensina 1-7 aumenta a taxa de sobrevivência de animais instilados com bleomicina, assim como diminui a perda de peso dos mesmos;
- O pré-tratamento com angiotensina 1-7 diminui o recrutamento celular para as vias aéreas pulmonares e para o tecido, assim como a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ .

## 6. DISCUSSÃO

Bleomicina é um componente chave de estratégias quimioterápicas para o tratamento de alguns tipos de linfoma, câncer de pescoço e cabeça, câncer de ovário e câncer testicular – a neoplasia com maior porcentagem de cura (DELLA LATTA *et al.*, 2015). Entretanto, o efeito adverso mais conhecido é a toxicidade pulmonar que pode ocorrer em mais de 46% dos pacientes, além de haver risco de morte (CALZAS RODRÍGUEZ; CARMEN JUAREZ MORALES; CASERO, 2016). Por essa razão, o uso clínico da BLM como um agente antineoplásico é limitado (WALTERS; KLEEGER, 2008).

Em modelos animais, a instilação com BLM gera o aumento da resposta inflamatória. Estudos demonstram a importância do papel de células inflamatórias na fibrose pulmonar induzida por BLM, onde o número de células totais no lavado broncoalveolar está aumentado (ALTINTAS *et al.*, 2016; VERMA *et al.*, 2013). O exsudato celular presente nesse processo é composto por neutrófilos e mononucleares. Os neutrófilos estão aumentados no início da doença, diminuindo no dia 14; os mononucleares começam a aumentar a partir do dia 7 permanecendo altos mesmo na fase tardia da fibrose pulmonar (IZBICKI *et al.*, 2002; RUSSO *et al.*, 2010). Em nosso modelo, obtivemos resultados semelhantes, em que há um aumento dos níveis de neutrófilos na fase inicial da doença com posterior queda, e dos níveis de mononucleares que permanecem elevados ao longo do estudo. Isso ocorre, provavelmente, porque os mononucleares possuem papel crítico na produção de moléculas pró-fibróticas (AKDIS *et al.*, 2011).

Estudos vêm demonstrando a importância do papel de mediadores inflamatório na fibrose pulmonar induzida por BLM. Dentre esses mediadores, pode-se citar as citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , assim como mediadores quimiotáticos como CCL5/RANTES e CXCL1. Nesse tipo de modelo de fibrose pulmonar, é possível observar o aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (HOSHINO *et al.*, 2009; TASHIRO *et al.*, 2015). Em nosso modelo, níveis elevados de IL-1 $\beta$  também podem ser observados, entretanto, não detectamos níveis elevados de TNF- $\alpha$ . Esse resultado corrobora com Damazo *et al.* em 2011. Eles demonstraram níveis baixos dessa citocina em animais instilados com BLM no dia 7, sendo seu aumento observado apenas no dia 21 (DAMAZO *et al.*, 2011). Um aumento nos níveis de moléculas quimiotáticas como CCL5/RANTES e CXCL1 também ocorre nos primeiros dias após instilação com BLM (RUSSO *et al.*, 2009), o que as torna importante no processo agudo de recrutamento celular para o tecido pulmonar. Nesse estudo, níveis de CCL5/RANTES foram

dosados, porém os resultados obtidos precisam ser repetidos e confirmados. Outra citocina essencial no processo de fibrose pulmonar induzida por BLM é o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ). Essa molécula tem um papel importante na ativação de fibroblastos no espaço intersticial pulmonar, ativando assim, o processo de produção de colágeno (BIERNACKA; DOBACZEWSKI; FRANGOGIANNIS, 2011). Níveis elevados dessa citocina estão presentes em modelos de fibrose pulmonar induzida por BLM a partir do dia 7 até o dia 28 após a indução da fibrose pulmonar (DAMAZO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2015). Em nosso estudo, intrigantemente, as dosagens de TGF- $\beta$  não ocorreram de maneira esperada, com seus níveis elevados no grupo controle e não nos grupos com fibrose induzida.

A consequência da ativação dos fibroblastos intersticiais é a deposição de colágeno no tecido pulmonar substituindo as áreas de alvéolos e bronquíolos. Quando comparados ao grupo controle, os animais que recebem a instilação com BLM apresentam considerável aumento das áreas de deposição de colágeno nos espaços intersticiais, ao redor dos bronquíolos e em regiões perivasculares, quando observados em cortes histológicos. Nesses cortes, também é possível observar o aparecimento do quadro de pneumonite devido ao aumento do recrutamento de células inflamatórias para os pulmões dos animais doentes, além de hiperemia (ALTINTAS *et al.*, 2016; TASHIRO *et al.*, 2015). Nossos resultados sustentam tais evidências a medida que a instilação com BLM induziu o aumento do processo inflamatório e de fibrogêneses pulmonar dos animais instilados com esse fármaco.

Em frente a ativação exacerbada da produção e deposição de colágeno nos pulmões dos animais instilados com BLM, causando aumento da perda de peso e diminuição da sobrevivência dos mesmos (ZHANG *et al.*, 2015), assim como ocorre nesse modelo, faz-se necessário o estudo de alternativas para minimizar o desenvolvimento de toxicidade pulmonar induzida por BLM. Nosso grupo demonstrou algumas estratégias para diminuir a atividade pró-fibrótica da BLM. Foi demonstrado que a enzima fosfatidilinositol-3 quinase possui um papel importante na inflamação e fibrose pulmonar. Animais KO para a enzima apresentaram uma diminuição da taxa de mortalidade e fibrose induzida por BLM. Esses animais também apresentaram diminuição no recrutamento leucocitário para o tecido pulmonar, o que confirmou a importância da enzima estudada no desenvolvimento da fibrose pulmonar (RUSSO *et al.*, 2010). Outra estratégia estudada, foi o uso de um antagonista para o receptor CXCR2, o qual é importante para o processo de angiogêneses e recrutamento neutrofílico. O bloqueio do receptor diminuiu o recrutamento de neutrófilos, além de ter diminuído parâmetros moleculares, como

deposição de colágeno e produção de citocinas. Esses resultados demonstraram que esse receptor possui um papel crítico na fibrose pulmonar induzida por BLM (RUSSO *et al.*, 2009).

Uma molécula que vem sendo estudada pela sua atividade anti-fibrótica é a angiotensina 1-7. Esta é um heptapeptídeo, do sistema Renina Angiotensina, que oferece uma via alternativa na regulação de componentes pulmonares, produzindo efeitos benéficos. Shenoy V. *et al.* demonstraram que quando partículas virais, contendo o gene da Angiotensina 1-7, são administradas por via intratraqueal em ratos, há uma considerável diminuição da deposição de colágeno nos pulmões de camundongos instilados com BLM (SHENOY *et al.*, 2010). Da mesma maneira, outros trabalhos demonstraram efeitos benéficos da ANGIO 1-7 na fibrose pulmonar induzida por BLM quando *pumps* subcutâneos são implantados também em ratos. Dessa forma, a fibrose pulmonar dos animais que receberam os *pumps* de ANGIO 1-7 foi atenuada se comparada com os animais que só receberam a instilação com BLM (MENG, Y *et al.*, 2015; MENG, YING *et al.*, 2014).

Nosso modelo foi o primeiro a demonstrar o efeito da ANGIO 1-7, na fibrose pulmonar induzida por BLM, administrada por via oral em camundongos. Pôde-se observar que o tratamento com ANGIO 1-7 causou um efeito benéfico no processo inflamatório gerado pela fibrose pulmonar. Houve diminuição do recrutamento celular, principalmente de neutrófilos, para as vias aéreas dos camundongos tratados. Resultados semelhantes aos nossos foram observados em um modelo de Síndrome de Distress Respiratório Agudo, apesar de esse ser um modelo de fibrose pulmonar muito mais branda do que a que ocorre na instilação por BLM e a via de tratamento ter sido diferente. Eles demonstraram que o tratamento com ANGIO 1-7 por via subcutânea gera uma diminuição no número de polimorfonuclear no lavado brocoalveolar de ratos que receberam o tratamento (ZAMBELLI *et al.*, 2015).

A diminuição do recrutamento celular para o pulmão dos animais tratados com ANGIO 1-7 pode ser explicada pela diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar, como foi observado no caso da citocina IL-1 $\beta$ . Um dado relevante encontrado no estudo feito por Meng Y. *et al.* é que os níveis de TNF- $\alpha$  no grupo tratado com ANGIO 1-7 se encontra menor do que no grupo instilado com BLM (MENG, YING *et al.*, 2014). Em nosso caso, o TNF- $\alpha$  no grupo tratado se encontrou mais elevado do que no grupo veículo. Por isso, faz-se necessário a repetição da dosagem dessa citocina, já que ANGIO 1-7 causa a diminuição do recrutamento celular e TNF- $\alpha$  é uma citocina que está relacionada diretamente nesse processo por meio da ativação do endotélio vascular (AKDIS *et al.*, 2011).

Outro resultado intrigante, observado no nosso estudo, foi que o grupo veículo, administrado com ciclodextrina, apresentou diferentes parâmetros celulares e moleculares, se comparado ao grupo apenas instilado com BLM. Era esperado que não houvesse diferença nos parâmetros desses dois grupos, já que a ciclodextrina é um carboidrato. Entretanto, foi possível observar que o grupo tratado com ciclodextrina apresentou menores níveis de IL-1 $\beta$ , 14 dias após instilação com BLM, assim como menores níveis de células mononucleares, nas vias aéreas dos camundongos, nos dias 7 e 14, se comparado ao grupo BLM. Zimmer S. *et al.* demonstraram em seu estudo que a ciclodextrina possui um papel importante na reprogramação de macrófagos em um modelo de arteriosclerose. Nesse estudo camundongos que apresentaram a doença receberam o tratamento com ciclodextrina. Esse tratamento causou uma reprogramação transcricional de macrófagos, os quais foram capazes de internalizar mais colesterol, melhorando assim, o quadro de arteriosclerose (GRISIN *et al.*, 2017). Em nosso modelo, a diferença entre o grupo instilado apenas com BLM e o grupo tratado apenas com ciclodextrina foi principalmente no recrutamento de mononucleares no lavado broncoalveolar, onde essas células se encontravam em níveis mais baixos para o grupo veículo. Torna-se, então, necessário investigar a influência da administração da ciclodextrina no recrutamento de macrófagos para o pulmão de animais com fibrose pulmonar induzida por BLM e sua relação com a diminuição do recrutamento desse tipo celular para o lavado broncoalveolar, como foi apresentado por esse estudo.



## **7. CONCLUSÃO**

Esse estudo sugere que a intervenção farmacológica, via oral, com angiotensina 1-7, em camundongos, interfere na resposta inflamatória da fibrose pulmonar induzida por bleomicina por meio da diminuição da perda de peso dos animais tratados, assim como o aumento da sobrevivência dos mesmos. Promove a diminuição do recrutamento celular tanto para o tecido, quanto para as vias aéreas pulmonares, assim como a diminuição da produção de mediadores pró-inflamatórios. Entretanto, nossos resultados precisam ser repetidos e confirmados.

## REFERENCIAS

ADAMSON, I Y; BOWDEN, D H. Bleomycin-induced injury and metaplasia of alveolar type 2 cells. Relationship of cellular responses to drug presence in the lung. *The American journal of pathology*, v. 96, n. 2, p. 531–44, ago. 1979. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/89815>>. Acesso em: 19 dez. 2016.

ADAMSON, I Y; BOWDEN, D H. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, v. 30, n. 1, p. 35–42, jan. 1974.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4812806>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

AHLUWALIA, Neil; SHEA, Barry S; TAGER, Andrew M. New therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. Aiming to rein in runaway wound-healing responses. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 190, n. 8, p. 867–78, 15 out. 2014.

Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.201403-0509PP>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

AKDIS, Mübecel *et al.* Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 127, n. 3, p. 701–721, 2011.

ALBERTS, D S *et al.* Bleomycin pharmacokinetics in man. I. Intravenous administration.

*Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 1, n. 3, p. 177–81, 1978. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/86392>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

ALTINTAS, Nejat *et al.* Protective Effect of Infliximab, a Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Inhibitor, on Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Rats. *Inflammation*, v. 39, n. 1, p. 65–78, 2016.

ARTAUD-MACARI, Elise *et al.* Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 nuclear translocation induces myofibroblastic dedifferentiation in idiopathic pulmonary fibrosis.

*Antioxidants & redox signaling*, v. 18, n. 1, p. 66–79, 1 jan. 2013. Disponível em:

<<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2011.4240>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

ASHCROFT, T; SIMPSON, J M; TIMBRELL, V. Simple method of estimating severity of

pulmonary fibrosis on a numerical scale. *Journal of clinical pathology*, v. 41, n. 4, p. 467–70, abr. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3366935>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

AZAMBUJA, E. *et al.* Bleomycin lung toxicity: Who are the patients with increased risk? *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, v. 18, n. 5, p. 363–366, 2005.

BACHELERIE, Françoise *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacological reviews*, v. 66, n. 1, p. 1–79, 2014.

BIERNACKA, Anna; DOBACZEWSKI, Marcin; FRANGOIANNIS, Nikolaos G. TGF- $\beta$  signaling in fibrosis. *Growth Factors*, v. 29, n. 5, p. 196–202, 11 out. 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08977194.2011.595714>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

BOGGS, Sallie S.; SARTIANO, George P.; DEMEZZA, Angelo. Minimal Bone Marrow Damage in Mice Given Bleomycin. *Cancer Research*, 1974.

BOMHARD, Ernst M. Particle-induced Pulmonary Alveolar Proteinosis and Subsequent Inflammation and Fibrosis. *Toxicologic Pathology*, p. 19262331668895, 31 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28136187>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

BONNER, James C. Mesenchymal cell survival in airway and interstitial pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, v. 3, n. 1, p. 15, 25 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20738867>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

BORRIELLO, Francesco *et al.* GM-CSF and IL-3 Modulate Human Monocyte TNF- $\alpha$  Production and Renewal in In Vitro Models of Trained Immunity. *Frontiers in Immunology*, v. 7, p. 680, 16 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28138327>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

BRÖMME, D *et al.* Human bleomycin hydrolase: molecular cloning, sequencing, functional

expression, and enzymatic characterization. *Biochemistry*, v. 35, n. 21, p. 6706–14, 28 maio 1996. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi960092y>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

BURGER, R M; PEISACH, J; HORWITZ, S B. Activated bleomycin. A transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA. *The Journal of biological chemistry*, v. 256, n. 22, p. 11636–44, 25 nov. 1981. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6170635>>. Acesso em: 14 dez. 2016.

BURGY, Olivier *et al.* Deglycosylated bleomycin has the antitumor activity of bleomycin without pulmonary toxicity. *Science Transl. Med.*, v. 8, n. 326, p. 326ra20-326ra20, 2016. Disponível em: <<http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.aad7785>>.

CAI, Guo-qiang *et al.* Downregulation of FAK-related non-kinase mediates the migratory phenotype of human fibrotic lung fibroblasts. *Experimental cell research*, v. 316, n. 9, p. 1600–9, 15 maio 2010. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482710000339>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

CALZAS RODRIGUEZ, Julia; CARMEN JUAREZ MORALES, María Del; CASERO, Miguel Angel Racionero. Death by bleomycin pulmonary toxicity in ovarian dysgerminoma with pathologic complete response to chemotherapy. A case report. *Respiratory Medicine Case Reports*, v. 18, p. 48–50, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.rmcr.2016.04.004>>.

CARNESECCHI, Stephanie *et al.* A key role for NOX4 in epithelial cell death during development of lung fibrosis. *Antioxidants & redox signaling*, v. 15, n. 3, p. 607–19, 1 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.2010.3829>>.

Acesso em: 31 jan. 2017.

CHEN, Ji *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 priming enhances the function of endothelial progenitor cells and their therapeutic efficacy. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, v. 61, n. 3, p. 681–9, 1 mar. 2013. Disponível em:

<<http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00202>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

CHEN, Jingyang; STUBBE, JoAnne. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, v. 5, n. 2, p. 102–112, 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1547>>.

CLAUSSEN, C A; LONG, E C. Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin. *Chemical reviews*, v. 99, n. 9, p. 2797–816, 8 set. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11749501>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

COOK, Katherine L *et al.* Angiotensin-(1-7) reduces fibrosis in orthotopic breast tumors. *Cancer research*, v. 70, n. 21, p. 8319–28, 1 nov. 2010. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-10-1136>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

COVVEY, Jordan R.; MANCL, Erin E. Recent Evidence for Pharmacological Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annals of Pharmacotherapy*, v. 48, n. 12, p. 1611–1619, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25202034>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

DAMAZO, Amílcar S *et al.* Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. *BMC immunology*, v. 12, n. 1, p. 59, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3212807&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DATTA, Arnab; SCOTTON, Chris J; CHAMBERS, Rachel C. Novel therapeutic approaches for pulmonary fibrosis. *British Journal of Pharmacology*, v. 163, n. 1, p. 141–172, maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21265830>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

DE LENA, M *et al.* Clinical, radiologic, and histopathologic studies on pulmonary toxicity induced by treatment with bleomycin (NSC-125066). *Cancer chemotherapy reports*, v. 56, n. 3, p. 343–56, jun. 1972. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19051494>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

DELLA LATTA, Veronica *et al.* Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From

biological mechanisms to counteractions. *Pharmacological Research*, v. 97, p. 122–130, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.04.012>>.

DORR, R T. Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical pharmacokinetics. *Seminars in oncology*, v. 19, n. 2 Suppl 5, p. 3–8, abr. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384141>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

EINHORN, Lawrence H. Curing metastatic testicular cancer. 2001.

FROUDARAKIS, Marios *et al.* Revisiting bleomycin from pathophysiology to safe clinical use. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 87, n. 1, p. 90–100, jul. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842812002491>>. Acesso em: 19 dez. 2016.

GOODWIN, Amanda; JENKINS, Gisli. Role of integrin-mediated TGF $\beta$  activation in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Biochemical Society Transactions*, v. 37, n. 4, p. 849–854, 1 ago. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19614606>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

GRISIN, Tiphany *et al.* Cyclodextrin-mediated self-associating chitosan micro-platelets act as a drug booster against *Candida glabrata* mucosal infection in immunocompetent mice. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017.

HALL, S W *et al.* Bleomycin clinical pharmacology by radioimmunoassay. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 9, n. 1, p. 22–5, 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6183016>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

HAY, J G *et al.* Development of acute lung injury after the combination of intravenous bleomycin and exposure to hyperoxia in rats. *Thorax*, v. 42, n. 5, p. 374–82, maio 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2443992>>. Acesso em: 19 dez. 2016.

HAY, John; SHAHZEIDI, Shahriar; LAURENT, Geoffrey. Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. *Archives of Toxicology*, v. 65, n. 2, p. 81–94, 1991.

HECHT, Sidney M. Bleomycin: New Perspectives on the Mechanism of Action <sup>1</sup>. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 1, p. 158–168, jan. 2000. Disponível em:

<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np990549f>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

HOLT, P G; SCHON-HEGRAD, M A. Localization of T cells, macrophages and dendritic cells in rat respiratory tract tissue: implications for immune function studies. *Immunology*, v. 62, n. 3, p. 349–56, nov. 1987. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3499375>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

HOSHINO, Tomoaki *et al.* Role of Proinflammatory Cytokines IL-18 and IL-1 $\beta$  in Bleomycin-Induced Lung Injury in Humans and Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 41, n. 6, p. 661–670, dez. 2009. Disponível em:

<<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2008-0182OC>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 161, n. 2, p. 646–664, fev. 2000. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10673212>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

IZBICKI, G. *et al.* Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 83, n. 3, p. 111–119, 2002.

KEIJZER, A.; KUENEN, B. Fatal Pulmonary Toxicity in Testis Cancer With Bleomycin-Containing Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, v. 25, n. 23, p. 3543–3544, 2 jul. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17687159>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

KREUTZ, R *et al.* Effect of losartan on right ventricular hypertrophy and cardiac angiotensin I-converting enzyme activity in pulmonary hypertensive rats. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)*, v. 18, n. 1, p. 101–11, jan. 1996. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8822237>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

KUHN, C. Ultrastructure and cellular function in the distal lung. *Monographs in pathology*, v. 19, p. 1–20, 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/218096>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

KUWANO, Kazuyoshi *et al.* Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the

development of pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 104, n. 1, p. 13–19, 1 jul. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10393694>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

LEE, Ye Ji *et al.* Apoptotic cell instillation after bleomycin attenuates lung injury through hepatocyte growth factor induction. *European Respiratory Journal*, v. 40, n. 2, p. 424–435, 2012.

LEHANE, Daniel E; HURD, Elizabeth; LANE, Montague. The Effects of Bleomycin on Immunocompetence in Man. *CANCER RESEARCH*, v. 35, p. 2724–2728, 1975.

LEVI, John A *et al.* The Importance of Bleomycin in Combination Chemotherapy for Good-Prognosis Germ Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*, v. 11, p. 1300–1305, [S.d.].

LOMAS, Nicola J *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: immunohistochemical analysis provides fresh insights into lung tissue remodelling with implications for novel prognostic markers. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 5, n. 1, p. 58–71, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22295148>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

LU, W. *et al.* Angiotensin-(1-7) relieved renal injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats by reducing inflammation, oxidative stress and fibrosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 50, n. 1, 2017. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2017000100604&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2017000100604&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 1 fev. 2017.

LUURSEMA, P B *et al.* Bleomycin-induced changes in the carbon monoxide transfer factor of the lungs and its components. *The American review of respiratory disease*, v. 128, n. 5, p. 880–3, nov. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6195947>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

MAHER, Toby; ADAMALI, Toby M. Current and novel drug therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 6, p. 261, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055696>>. Acesso em: 31 jan. 2017.



MENG, Y *et al.* The angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin (1-7)/Mas axis protects against lung fibroblast migration and lung fibrosis by inhibiting the NOX4-derived ROS-mediated RhoA/Rho kinase pathway. *Antioxid Redox Signal*, v. 22, n. 3, p. 241–258, 2015.

Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25089563>%5Cn<http://online.liebertpub.com/doi/pdfplus/10.1089/ars.2013.5818>>.

MENG, Ying *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas axis protects against lung fibrosis by inhibiting the MAPK/NF- $\kappa$ B pathway. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 50, n. 4, p. 723–736, 2014.

MIR, L. M.; TOUNEKTI, O.; ORLOWSKI, S. Bleomycin: Revival of an old drug. *General Pharmacology*, v. 27, n. 5, p. 745–748, 1996.

MIRABELLI, C K *et al.* Bleomycin and talisomycin sequence-specific strand scission of DNA: a mechanism of double-strand cleavage. *Cancer research*, v. 42, n. 7, p. 2779–85, jul. 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6177398>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

MOORE, Bethany B.; HOGABOAM, Cory M. Murine models of pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 294, n. 2, 2008.

MOURATIS, Marios A.; AIDINIS, Vassilis. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, v. 17, n. 5, p. 355–361, set. 2011. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00063198-201109000-00011>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

MURPHY, P M *et al.* International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological reviews*, v. 52, n. 1, p. 145–176, 2000.

O'FARRELL, P A *et al.* Crystal structure of human bleomycin hydrolase, a self-compartmentalizing cysteine protease. *Structure (London, England : 1993)*, v. 7, n. 6, p. 619–27, 15 jun. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10404591>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

PASSOS-SILVA, Danielle Gomes; BRANDAN, Enrique; SANTOS, Robson Augusto Souza. Angiotensins as therapeutic targets beyond heart disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 36, n. 5, p. 310–320, maio 2015. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614715000413>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

PETREK, M *et al.* The source and role of RANTES in interstitial lung disease. *European Respiratory Journal*, v. 10, n. 6, 1997.

PIGUET, P F *et al.* Expression and localization of tumor necrosis factor-alpha and its mRNA in idiopathic pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology*, v. 143, n. 3, p. 651–5, set. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8362967>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

POVIRK, Lawrence F.; HAN, Yi Hong; STEIGHNER, Robert J. Structure of bleomycin-induced DNA double-strand breaks: predominance of blunt ends and single-base 5' extensions. *Biochemistry*, v. 28, n. 14, p. 5808–5814, jul. 1989. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00440a016>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

RAFII, Rokhsara *et al.* A review of current and novel therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of thoracic disease*, v. 5, n. 1, p. 48–73, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23372951>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

REISER, K M *et al.* Changes in collagen cross-linking in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Journal of biochemical toxicology*, v. 1, n. 1, p. 83–91, mar. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2482891>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

ROSSI, Santiago E. *et al.* Pulmonary Drug Toxicity: Radiologic and Pathologic Manifestations. *RadioGraphics*, v. 20, n. 5, p. 1245–1259, set. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10992015>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

RUSSO, Remo C *et al.* Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *Journal of leukocyte biology*, v. 89, n. 2, p. 269–82, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21048214>>.

- RUSSO, Remo C. *et al.* Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 40, n. 4, p. 410–421, 2009.
- RUSSO, Remo C. *et al.* Therapeutic effects of evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 45, n. 1, p. 72–80, 2011.
- SAITO, Fumitake *et al.* Role of Interleukin-6 in Bleomycin-Induced Lung Inflammatory Changes in Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 38, n. 5, p. 566–571, maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096870>>. Acesso em: 31 jan. 2017.
- SCHEULE, R K *et al.* Bleomycin stimulation of cytokine secretion by the human alveolar macrophage. *The American journal of physiology*, v. 262, n. 4 Pt 1, p. L386-91, abr. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1373569>>. Acesso em: 31 jan. 2017.
- SCHMIDT, Reinhold *et al.* Changes in pulmonary surfactant function and composition in bleomycin-induced pneumonitis and fibrosis. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 195, n. 2, p. 218–31, 1 mar. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X03005416>>. Acesso em: 31 jan. 2017.
- SERTL, K *et al.* Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *The Journal of experimental medicine*, v. 163, n. 2, p. 436–51, 1 fev. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3511172>>. Acesso em: 31 jan. 2017.
- SHENOY, Vinayak *et al.* The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 182, n. 8, p. 1065–1072, 2010.
- SKIBA, DS *et al.* Antiatherosclerotic effect of Ang- (1-7) non-peptide mimetic (AVE 0991) is mediated by inhibition of perivascular and plaque inflammation in early atherosclerosis. *British Journal of Pharmacology*, 9 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27935022>>. Acesso em: 1 fev. 2017.
- SLEIJFER, Stefan. Bleomycin-Induced Pneumonitis. *Chest*, v. 120, n. 2, p. 617–624, 2001.
- SONNENBERG, Gregory F; FOUSSER, Lynette A; ARTIS, David. Functional biology of the IL-22-IL-22R pathway in regulating immunity and inflammation at barrier surfaces. *Advances in immunology*, v. 107, p. 1–29, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123813008000010>>. Acesso em: 31 jan.

2017.

TASHIRO, Jun *et al.* Therapeutic benefits of young, but not old, adipose-derived mesenchymal stem cells in a chronic mouse model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Translational Research*, v. 166, n. 6, p. 554–567, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2015.09.004>>.

UESUGI, S *et al.* Identification of oligonucleotide fragments produced in a strand scission reaction of the d(C-G-C-G-C-G) duplex by bleomycin. *Nucleic acids research*, v. 12, n. 3, p. 1581–92, 10 fev. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6199743>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

UMEZAWA, H. Studies on bleomycin: chemistry and the biological action. *Biomedicine / [publiee pour l'A.A.I.C.I.G.]*, v. 18, n. 6, p. 459–75, nov. 1973. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4131806>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

UTE GALM, † *et al.* Antitumor Antibiotics: Bleomycin, Enediynes, and Mitomycin. 2005. VARSANO, Shabtai; SEGEV, David; SHITRIT, David. Severe and non-severe asthma in the community: A large electronic database analysis. *Respiratory Medicine*, v. 123, p. 131–139, fev. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0954611116303572>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

VERMA, Ramesh *et al.* Evaluating the ameliorative potential of quercetin against the bleomycin-induced pulmonary fibrosis in wistar rats. *Pulmonary Medicine*, v. 2013, 2013. WALTERS, Dianne M.; KLEEBERGER, Steven R. Mouse Models of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Current Protocols in Pharmacology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008. v. Chapter 5. p. Unit 5.46. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22294226>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

WHITE, D A; STOVER, D E. Severe bleomycin-induced pneumonitis. Clinical features and response to corticosteroids. *Chest*, v. 86, n. 5, p. 723–8, nov. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6207992>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

YARA, S *et al.* FTS reduces bleomycin-induced cytokine and chemokine production and inhibits pulmonary fibrosis in mice. *Clinical and experimental immunology*, v. 124, n. 1, p.

77–85, abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359445>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

YOON, Young-So *et al.* Coordinated induction of cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 and hepatocyte growth factor by apoptotic cells prevents lung fibrosis. *Journal of leukocyte biology*, v. 94, n. 5, p. 1037–49, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23922381>>.

ZAMBELLI, Vanessa *et al.* Angiotensin-(1-7) improves oxygenation, while reducing cellular infiltrate and fibrosis in experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. *Intensive Care Medicine Experimental*, v. 3, n. 1, p. 8, 2015. Disponível em: <<http://www.icm-experimental.com/content/3/1/8>>.

ZHANG, X *et al.* Magnolol reduces bleomycin-induced rodent lung fibrosis. *Int J Clin Exp Med*, v. 8, n. 9, p. 15450–15457, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26629034>>.

## **ANEXO**

Resultados histológicos e de mecânica pulmonar do experimento de tratamento prévio com ANGIO 1-7 em um modelo de fibrose pulmonar induzida por Bleomicina, ainda se encontram em análises laboratoriais.