

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Morfologia

Dissertação de Mestrado

ANÁLISE DOS EFEITOS INDIRETOS DA EXPOSIÇÃO  
PARENTERAL A ANTÍGENOS TOLERADOS NA FIBROSE PULMONAR

EVELIN NILDIANE DA SILVA EDLIN

**ANÁLISE DOS EFEITOS INDIRETOS DA EXPOSIÇÃO  
PARENTERAL A ANTÍGENOS TOLERADOS NA FIBROSE PULMONAR**

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Janeiro/2016

EVELIN NILDIANE DA SILVA EDLIN

**ANÁLISE DOS EFEITOS INDIRETOS DA EXPOSIÇÃO  
PARENTERAL A ANTÍGENOS TOLERADOS NA FIBROSE PULMONAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Cláudia Rocha Carvalho

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Janeiro/2016

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio e torcida, especialmente à minha avó e minha mãe por dedicarem suas vidas para minha educação e formação e por terem me ensinado a ser a pessoa que sou hoje;

Agradeço à todos os meus professores, desde o ensino médio até a pós-graduação, pelos ensinamentos, motivação, influência e apoio que me dedicaram;

Agradeço aos meus amigos de Teresina, os de universidade, os de colégio e os de infância, pela presença em todos os momentos da minha vida, nas vitórias e nas derrotas, nos risos e lágrimas, pelo apoio e amizade dedicados incondicionalmente;

Agradeço aos colegas da Biologia Celular pela recepção, companhia, aprendizado e momentos de alegria. Agradeço aos professores e profissionais administrativos e técnicos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Departamento de Morfologia, pela recepção, auxílio e tão agradável convivência;

Agradeço à minha querida orientadora, que abriu as portas do seu laboratório e me aceitou tão prontamente, sempre tão paciente e gentil, mesmo nos momentos difíceis;

Agradeço ao professor Nelson Vaz pela possibilidade de uma nova visão sobre a Imunologia e pelas contribuições neste trabalho;

Agradeço ao Dr. Geraldo Magela pelo imenso suporte que deu a este trabalho, pelos conselhos e dicas e por estar sempre presente nos meus momentos de dúvida;

Agradeço ao professor Remo, pelos ensinamentos iniciais da técnica de instilação de bleomicina intranasal;

Agradeço aos colegas de laboratório, Thiago, Kênia e Daniel pela convivência e por me ensinarem todas as técnicas com tanta atenção e dedicação. Pelos bons momentos e pelo apoio nos momentos ruins;

Agradeço as alunas de Iniciação Científica, Nathália e Isabela, que passaram pelo laboratório durante esses dois anos, por todo auxílio, alegria e amizade; especialmente à Gisele, que foi meu braço direito nos primeiros meses e continuou torcendo por mim durante todo esse tempo;

Agradeço às minhas amigas nordestinas que encontrei aqui, Heliana e Marliete, por serem minha família aqui e estarem presentes em todos os momentos, pelo apoio, carinho e auxílio em todos os aspectos.

## RESUMO

Tolerância oral refere-se à inibição de respostas imunes a antígenos previamente contactados por via oral. No entanto, em animais tolerantes há ativação dos linfócitos após a ingestão do antígeno e, quando há imunização com uma proteína previamente ingerida, ocorrem efeitos sistêmicos que inibem imunizações para proteínas não especificamente relacionadas injetadas concomitantemente. A inibição da resposta imune por proteínas toleradas foi denominada pelo nosso grupo de pesquisa de efeitos indiretos da tolerância oral. Os efeitos indiretos da tolerância, produzido pela injeção de uma proteína tolerada, inibe a inflamação desencadeada por carragenina, a inflamação e a formação de granulomas por ovos de *Schistosoma mansoni* e reduz a inflamação e a fibrose na cicatrização de feridas na pele. A fibrose pulmonar idiopática é uma doença caracterizada pela grande deposição de matriz extracelular no interstício pulmonar levando a uma perda da função pulmonar. Sulfato de bleomicina é uma droga antibiótica/antineoplásica e tem como principal efeito adverso a fibrose pulmonar. Modelos experimentais da fibrose pulmonar idiopática sugerem que há uma fase inflamatória seguida de uma fase fibrótica. Nosso objetivo foi verificar se os efeitos indiretos da tolerância oral inibem a inflamação e a fibrose pulmonar produzida por sulfato de bleomicina. Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos adultos separados em quatro grupos - controle (instilado com salina), bleomicina (instilado com bleomicina, imune bleomicina (imunizado com OVA e instilado com bleomicina) e tolerante bleomicina (tolerante a OVA, imunizado com OVA e instilado com bleomicina). A análise da inflamação foi realizada através da contagem total e diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar e avaliação qualitativa dos pulmões corados com H&E, 7 dias após a instilação de bleomicina. Aos 21 dias após a instilação de bleomicina foi feita a coleta de soro para análise dos anticorpos anti-Ova, de forma a avaliar o estabelecimento da tolerância oral. Durante 21 dias após a instilação de bleomicina foram analisadas a mortalidade e perda de peso dos animais. A análise histopatológica da fibrose pulmonar foi feita nos dias 7 e 21 após a instilação de bleomicina através da escala de Ashcroft modificada. Não houve diferença na média de peso dos animais ao final do experimento, porém os animais tolerantes recuperaram peso mais rápido que os demais tratados com bleomicina. Não houve diferença no grau de fibrose pulmonar entre os grupos instilados com bleomicina. Houve aumento na quantidade de leucócitos do lavado broncoalveolar no grupo que recebeu apenas bleomicina, enquanto nos grupos imune e tolerante que também receberam bleomicina não houve aumento. A avaliação histopatológica sugere uma inflamação mais severa e concentrada nos pulmões dos animais tratados apenas com bleomicina e uma alteração mais leve e mais difusa no grupo tolerante. Nossos resultados

demonstram que não houve relação entre a diminuição da inflamação observada no lavado broncoalveolar dos animais imunes e tolerantes que receberam bleomicina e a fibrose pulmonar, que não diminuiu de maneira igual nestes dois grupos e sugerem que a inflamação não seria requisito para formação da fibrose produzida por bleomicina.

**Palavras-chave:** fibrose pulmonar, tolerância oral, inflamação e fibrose, bleomicina

## ABSTRACT

Oral tolerance, in immunology, refers to the inhibition of immune responses to proteins previously contacted by oral route. However, there are activated lymphocytes in tolerant animals after antigen ingestion and, upon parenteral immunization with a previously ingested protein, immune responses to unrelated proteins concomitantly injected are also inhibited. We labeled this phenomenon as “indirect effects of oral tolerance”. Attempts to immunize with a tolerated protein are able to block the inflammation evoked by carageenan injection in the foot-pads; drastically reduces the size and cellularity of granulomas in the lungs of non-infected mice injected with *Schistoma mansoni* eggs; and is able to reduce the inflammation and the fibrosis during the healing of skin wounds. Idiopathic pulmonary fibrosis in humans is characterized by a large deposition of extracellular matrix in the interstitial lung tissue leading the loss of pulmonary function. Bleomycin sulfate is an antibiotic/anti-neoplastic drug that has pulmonary fibrosis as its main side effect. Experimental models of idiopathic pulmonary fibrosis suggest that an inflammatory phase precedes the fibrosis. Our experiments aim to verify whether the indirect effects of the exposure to a tolerated antigen (ovalbumin - OVA) was able to block the inflammation and the pulmonary fibrosis induced by bleomycin. Adult male C57BL/6 mice were divided into four groups, named: control (instilled with saline); bleomycin (instilled with bleomycin); immune (injected with OVA and instilled with bleomycin) and tolerant-bleomycin (previously made tolerant to Ova, injected with OVA and instilled with bleomycin). Total and differential counting of leukocytes in bronchoalveolar lavage fluid and histologic analyses of the lungs were done 7 and 21 days after the treatments. Serum was collected 21 days after the treatment for assay of anti-Ova antibodies, to confirm the induction of tolerance in the experimental group. Lung fibrosis was evaluated at 7 and 21 days using a modified Ashcroft scale. There was no difference in average weights of the animals at the end of the experiment, but the tolerant animals recovered weight faster than those in the bleomycin-treated control groups. There was no difference in the degree of pulmonary fibrosis among the groups. There was an increase in the number of leukocytes in the lavage fluid of animals treated with bleomycin, but not in the other groups (“immune” and “tolerant”). The histopathology suggested more severe and dense inflammation in the animals treated only with bleomycin than in the tolerant group. Thus, our result indicate that the exposure to the tolerated antigen (OVA) was able to reduce the inflammation, but not the fibrosis induced by bleomycin and, therefore, that inflammation is probably not a necessary step for the development of fibrosis.

**Key-words:** pulmonary fibrosis, oral tolerance, inflammation and fibrosis, bleomycin





## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Tolerância Oral  | 15 |
| <b>Figura 2:</b> Efeito indireto da tolerância oral   | 19 |
| <b>Figura 3:</b> Nível de anticorpos anti-OVA no soro   | 34 |
| <b>Figura 4:</b> Contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar de animais 7 dias após instilação de BLM i.n       | 35 |
| <b>Figura 5:</b> Contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar de animais 7 dias após instilação de BLM i.n       | 35 |
| <b>Figura 6:</b> Contagem diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar de animais 7 dias após instilação de BLM i.n | 36 |
| <b>Figura 7:</b> Contagem diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar de animais 7 dias após instilação de BLM i.n | 36 |
| <b>Figura 8:</b> A instilação i.n de sulfato de bleomicina produz alterações na estrutura pulmonar                        | 38 |
| <b>Figura 9:</b> Instilação i.n de sulfato de bleomicina causa fibrose pulmonar   | 39 |
| <b>Figura 10:</b> Porcentagem de sobrevivência dos animais após instilação i.n de sulfato de bleomicina (BLM)             | 40 |
| <b>Figura 11:</b> Média final do peso dos animais 21 dias após a instilação i.n de sulfato de bleomicina (BLM)            | 41 |
| <b>Figura 12:</b> Variação do peso corporal no período experimental de 21 dias após a instilação i.n de BLM               | 41 |

**Figura 13:** A instilação de sulfato de bleomicina alterou a estrutura pulmonar vista aos 21 dias 43

**Figura 14:** A instilação de sulfato de bleomicina produziu fibrose pulmonar vista aos 21 dias 44

## LISTA DE ABREVIATURAS

Al(OH)<sub>3</sub> :hidróxido de alumínio

BLM: sulfato de bleomicina

BSA (bovine serum albumin) : albumina sérica bovina

CETEA:Comitê de Ética em Experimentação Animal

CEUA:Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA (complete Freund adjuvant): adjuvante completo de Freund

DNP (dinitrophenyl): dinitrofenil

DTH (delayed-type hypersensitivity): hipersensibilidade do tipo tardia

EUA: Estados Unidos da América

ELISA (enzyme linked immunosorbent assay): ensaio imunoenzimático

EMT (epithelial mesenchymal transition): transição epitélio-mesenquimal

FPI: fibrose pulmonar idiopática

GALT (gut associated lymphoid tissue) :tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal

IFN (interferon): interferon

Ig: imunoglobulina

i.n: intranasal

i.p: intraperitoneal

i.v: intravenoso

IL (interleukin): interleucina

KLH (keyhole limpet haemocyanin): hemocianina de caracol

Ova (ovalbumin): ovalbumina

PBS (phosphate-buffered saline): solução salina tamponada contendo fosfato

PIU: Pneumonia Intersticial Usual

ROS (Reactive oxygen species ): espécies de oxigênio reativo

TCAR: Tomografia Computadorizada de Alta Resolução

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1.INTRODUÇÃO</b>   | 15 |
| <b>1.1 TOLERÂNCIA ORAL</b>  | 15 |
| Definição e características                                       | 15 |
| Consequências imunológicas da exposição a proteínas por via oral. | 16 |
| Mecanismos da tolerância oral                                     | 17 |
| Efeito indireto da tolerância oral e suas consequências           | 18 |
| Relações entre a fibrose e a atividade imunológica                | 20 |
| <b>1.2 FIBROSE PULMONAR IDIOPÁTICA (FPI)</b>                      | 21 |
| Classificação e Epidemiologia                                     | 21 |
| Características Clínicas e Diagnóstico                            | 22 |
| Patogênese da fibrose pulmonar idiopática                         | 23 |
| Bleomicina e o modelo experimental de fibrose pulmonar            | 26 |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b>   |    |
| <b>3.OBJETIVOS</b>  | 29 |
| 3.1 Objetivo Geral  | 29 |
| 3.2 Objetivos Específicos   | 29 |
| <b>4. METODOLOGIA</b>   | 30 |
| Camundongos e grupos experimentais                                | 30 |
| Indução da fibrose pulmonar por bleomicina                        | 30 |

|   |    |
|---|----|
| Indução da tolerância oral e injeção da proteína tolerada                   | 31 |
| Análise da inflamação e fibrose pulmonar                                    | 31 |
| <i>Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para avaliação de anticorpos anti-OVA</i> | 32 |
| <i>Análise Histopatológica</i>  | 33 |
| <i>Análise Estatística</i>  | 33 |
| <b>5.RESULTADOS</b>   | 34 |
| Análise de anticorpos anti-OVA no soro                                      | 34 |
| Análise histopatológica 7 dias após a instilação de sulfato de bleomicina   | 37 |
| Análise da mortalidade e do peso corporal                                   | 40 |
| Análise histopatológica 21 dias após a instilação de sulfato de bleomicina  | 42 |
| <b>6.DISSCUSSÃO</b>   | 45 |
| <b>7.CONCLUSÃO</b>  | 50 |
| <b>REFERÊNCIAS</b>  | 51 |



# 1 INTRODUÇÃO

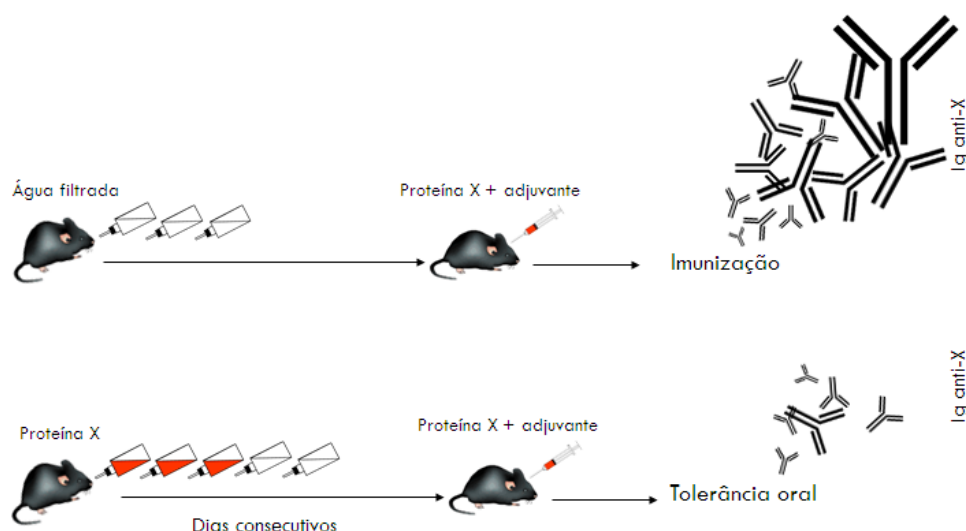
## 1.1 TOLERÂNCIA ORAL

### Definição e características

A tolerância imunológica, de uma maneira geral, era vista como um estado de não-reatividade imunológica específica, possivelmente por deleção clonal. Hoje, ao contrário, ela é vista como um estado imunológico no qual uma resposta imune potencialmente danosa é prevenida, suprimida ou alterada para um tipo de resposta imune não prejudicial (YANG et al. , 2015). Seguindo esta ideia, a tolerância oral vem sendo definida ao longo dos anos como um estado imunológico onde ocorre inibição de respostas imunes específicas para antígenos contatados pela via oral (HOSTMANN et al. , 2015; VERHAGEN et al. , 2015).

Assim, quando um animal é imunizado com um antígeno que foi previamente ingerido, as respostas imunes seriam modificadas, tanto na produção de anticorpos quanto na ativação/diferenciação de linfócitos T, tornando-as não prejudiciais ao organismo (WEINER et al., 2011), como ilustrado na figura 1.

**Figura 1:** Tolerância Oral



Animais que ingeriram uma proteína X por dias consecutivos e foram posteriormente imunizados com a proteína X +adjuvante apresentam um título de anticorpos anti-X reduzidos comparados àqueles que não ingeriram somente água e foram imunizados com a proteína X +adjuvante.



Buscando caracterizar a tolerância oral, um estudo realizado em 1993 comparou a produção de anticorpos anti-OVA em camundongos de diferentes linhagens e idades e submetidos a diferentes formas de tratamento oral com OVA antes da imunização com este antígeno (FARIA et al., 1993). Os resultados mostram que camundongos que ingeriram voluntariamente cerca de 20 mg de OVA/dia, durante 5 dias consecutivos, tiveram uma maior redução nos níveis de anticorpos quando comparados com os animais que foram expostos a 20 mg de OVA por gavagem, antes da imunização com OVA em adjuvante (FARIA et al., 1993).

Com relação à idade, animais com 8 semanas foram mais susceptíveis à indução da tolerância que aqueles com 24 ou 38 semanas de idade. Quanto à linhagem, houve também uma diferença sendo que a tolerância oral induzida por uma gavagem com OVA foi completamente abolida em camundongos A/J com 38 semanas e abolida de forma parcial em camundongos B6D2F1 com a mesma idade (FARIA et al., 1993).

Faria et al. (1993) mostraram então uma influência da idade e da linhagem dos camundongos e também da dose e forma de ingestão do antígeno, concluindo que a maneira mais eficaz de induzir tolerância oral é a administração contínua de um antígeno em pequenas doses em camundongos jovens.

O fenômeno da tolerância oral, uma vez estabelecido, pode ser mantido durante a vida do animal. Camundongos que foram oralmente expostos a OVA com 8 semanas de idade e, uma semana depois, imunizados com OVA em adjuvante, permaneceram tolerantes até as 70 semanas de idade, mostrando que a idade interfere na indução mas não na manutenção da tolerância oral uma vez estabelecida (FARIA et al. , 1998).

Faria et al. (1998) fizeram ainda uma análise comparativa do padrão de isotipos dos anticorpos entre animais tolerantes e imunes demonstrando que a supressão induzida pela tolerância é uma supressão homogênea, ou seja, o padrão isotípico dos anticorpos formados por animais tolerantes e imunes é similar.

### **Consequências imunológicas da exposição a proteínas por via oral**

A tolerância oral é uma das consequências mais comuns do contato com proteínas por via mucosa quando este contato ocorre de maneira contínua (Faria et al. , 1993). No entanto, a exposição oral às proteínas da dieta pode resultar também em imunização oral, ou seja, em altos títulos de anticorpos antígeno específicos,

especialmente quando as exposições orais ocorrem de maneira intermitente (VERDOLIN et al., 1993).

Verdolin et al. (2001) mostraram que quando há exposições orais a uma proteína seguidas de imunizações parenterais com esta proteína em adjuvante, a resposta imune específica para a proteína dada por via oral pode ser estabilizada em níveis baixos, médios ou altos de anticorpos. Assim, os autores demonstraram neste estudo que há uma terceira consequência do contato do antígeno com a mucosa: a estabilização dos níveis de anticorpo no soro.

### **Mecanismos da tolerância oral**

Estudos sobre os tipos de linfócitos, células apresentadoras de antígenos e órgãos linfóides associados às mucosas objetivam caracterizar estes componentes do sistema imune para entender a atividade imunológica desencadeada pela exposição à proteínas através das mucosas (CASTRO JÚNIOR et al. , 2012 ; MOWAT, 2003; WORBS et al. , 2006).

O tecido linfoide associado ao intestino (GALT) é formado por linfócitos dispersos no epitélio e na lâmina própria da mucosa e também por tecidos organizados como placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e folículos linfóides (MOWAT e AGACE, 2014). Os antígenos administrados por via oral podem ser apresentados aos linfócitos T de diferentes maneiras: através da captura do antígeno pelas células M na Placa de Peyer; por transferência do antígeno intestinal para os linfonodos mesentéricos através da drenagem linfática seguido pela apresentação local para as células T virgens; ou, por disseminação do antígeno para tecidos linfóides periféricos através do sangue (MOWAT, 2003).

Alguns autores sugerem que os mecanismos de tolerância oral podem estar relacionados com a dose do antígeno ingerida: altas doses induzindo tolerância através de anergia e/ou deleção clonal, e baixas doses do antígeno induzindo tolerância através da ativação de células T regulatórias (HUBER et al. , 2015 ; WEINER, 2011).

Castro Júnior et al. (2012) demonstraram que os camundongos tolerantes, tratados com altas doses de antígeno, possuem números elevados de células secretoras de imunoglobulina no baço e na medula óssea, além de apresentarem altos níveis de células T ativadas e de células T regulatórias. Estas últimas apareceram mais cedo nos animais tolerantes quando comparados aos animais imunes. Estes autores (CASTRO-

JÚNIOR et al. 2012) demonstraram então que o estabelecimento da tolerância oral se dá de forma ativa e sistêmica, com a mobilização de células T e B em compartimentos como medula óssea e baço.

A transferência adotiva de células do baço ou de linfonodos de camundongos tolerantes para camundongos não tolerantes é capaz de transferir o fenômeno de tolerância (RICHMAN et al. , 1978), isto é, os animais não tolerantes que recebem células do baço de animais tolerantes apresentam baixos títulos de anticorpos após serem imunizados com a proteína tolerada (HANSON et al. , 1977).

Além disso, a resposta imune mediada por células também foi avaliada através da reação de hipersensibilidade tardia (DTH) e foi observada uma redução do aumento na pata dos camundongos desafiados com OVA quando estes receberam transferência de células dos doadores tolerantes a OVA antes da imunização (CUNHA et al. , 2009). Esses experimentos também sugerem que a dinâmica do sistema imune do trato gastrointestinal torna o fenômeno de tolerância oral um fenômeno ativo e sistêmico.

Nelson Vaz e colaboradores sugerem que a atividade imunológica patológica seria decorrente da ativação de poucos clones de células agindo de maneira desconectada ao restante do sistema imune, o que resultaria na alta produção de anticorpos específicos e ativação oligoclonal de linfócitos T. Partindo desse princípio e pensando nas análises de tolerância oral resultando em baixos títulos de anticorpos porém com uma ativação sistêmica de linfócitos, presume-se que a alteração imunológica causada pelo fenômeno de tolerância oral é uma alteração saudável (VAZ e CARVALHO, 2015; VAZ et al. , 2003).

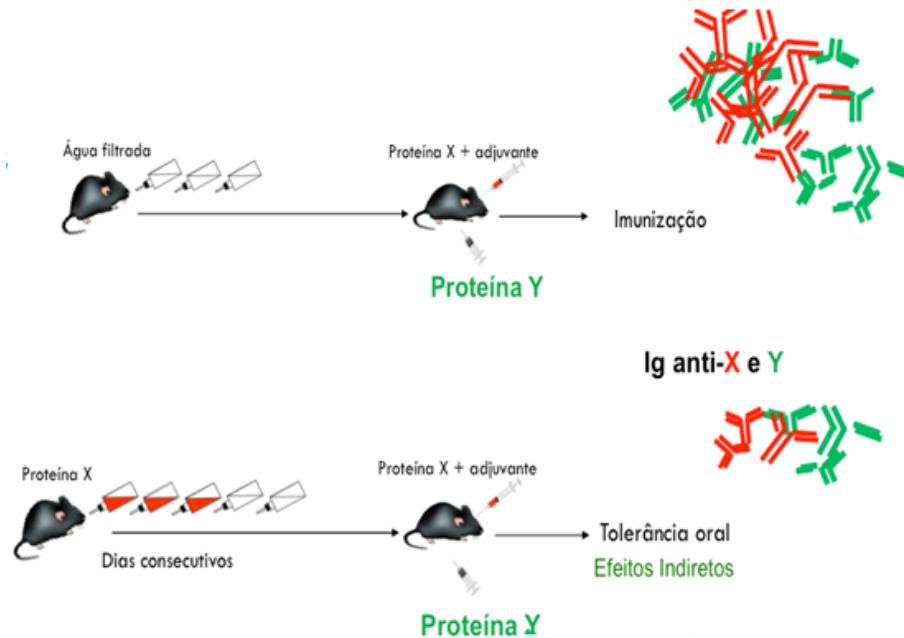
### **Efeito indireto da tolerância oral e suas consequências**

Em 1981 Vaz e colaboradores mostraram que as reações desencadeadas pela injeção de DNP-Ova em camundongos tolerantes orais a Ova eram capazes de inibir respostas imunes a uma proteína não relacionada (DNP-KLH, hemocianina) injetada simultaneamente (VAZ et al. , 1981). Posteriormente vários outros trabalhos mostraram que a injeção parenteral de antígenos tolerados pode inibir a resposta imune para diferentes proteínas não especificamente relacionadas (CARVALHO et al. , 1994 e 1997).

A figura 2 ilustra esse efeito. Quando um camundongo ingere uma proteína X por dias consecutivos e posteriormente é imunizado com a proteína X em adjuvante

concomitante com uma proteína Y não relacionada, há uma redução nos níveis de anticorpos tanto anti-X quanto anti-Y. Porém isso não é observado quando a ingestão é somente de água.

**Figura 2:** Efeito indireto da tolerância oral.



A parte de cima da figura mostra animais que ingeriram somente água e foram imunizados com com uma proteína X + uma proteína Y não relacionada + adjuvante, apresentando altos títulos de anticorpos tanto anti-X quanto anti-Y. A parte de baixo da figura mostra que animais que ingeriram a proteína X e foram posteriormente imunizados com a proteína X concomitante com a Y, desenvolveram títulos de anticorpos reduzidos para ambas proteínas quando comparados aos animais que ingeriram somente água.

Ainda nesse contexto foi demonstrado que mesmo quando as proteínas não relacionadas eram injetadas por diferentes vias (subcutânea e intraperitoneal), havia uma inibição da resposta à estas proteínas. Além disso, esse ‘efeito indireto da tolerância oral’ também foi observado quando a co-imunização era feita com uma proteína da dieta, como zeína, ou com um componente próprio, como o fibrinogênio (CARVALHO e VAZ, 1994; CARVALHO e VAZ, 1996).

Os efeitos desencadeados pela exposição parenteral a antígenos tolerados podem também inibir o estabelecimento de reações inflamatórias crônicas de origem imunológica (CARVALHO et al. , 2002) e a inflamação aguda desencadeada pela injeção de carragenina (RAMOS et al. , 2008).

Uma das diferenças entre animais tolerantes e não tolerantes que recebem uma imunização com a proteína tolerada, esta relacionada com a expressão de moléculas de adesão e migração celular (RODRIGUES et al. , 2006). Animais tolerantes a OVA, ao serem imunizados i.p. com OVA concomitante com a inoculação i.v. de ovos de *Schistosoma mansoni*, formam granulomas menores, expressam moléculas de adesão ICAM-1 em menor intensidade, ao redor de granulomas pulmonares e apresentam menor fibrose (AZEVEDO JUNIOR et al. , 2012).

Costa et al. (2011; 2015) mostraram que os efeitos indiretos da tolerância oral melhoram a cicatrização de feridas de pele, resultando em menor infiltração de células inflamatórias no leito da ferida e redução da formação do tecido de granulação. Além disso os efeitos indiretos da tolerância oral produziram alteração na deposição de colágeno no local da ferida onde a organização da matriz extracelular no local da cicatriz se mostrou semelhante à organização do colágeno na pele intacta.

### **Relações entre a fibrose e a atividade imunológica**

A fibrose é uma ocorrência comum a várias patologias e decorre da substituição do tecido original por matriz extracelular, com conseqüente perda da função do órgão afetado. A fibrose pulmonar está associada a diversas patologias e o tratamento normalmente é paleativo, uma vez que não existem medicamentos eficazes para prevenir ou para reverter a fibrose já estabelecida (KEKEVIAN, GERSHWIN e CHANG, 2014).

A fibrose excessiva pode ser resultado de alterações no perfil de ativação dos leucócitos e fibroblastos e alteração na síntese ou organização das proteínas de matriz extracelular (RAZZAQUE; TAGUCHI, 2003). Atualmente não há tratamento adequado para as fibroses e os estudos sobre os seus mecanismos de origem, assim como uma ênfase na sua prevenção se fazem necessários.

O transplante de pulmão, mesmo quando bem sucedido, pode produzir lesões crônicas que culminam com a deposição de colágeno e disfunção pulmonar. Em modelos de transplantes de pulmão em ratos, a indução prévia de tolerância ao colágeno tipo V retarda fibrose e disfunção do órgão ( BRAUN et al. , 2009). A administração de sulfato de bleomicina pode resultar em fibrose pulmonar e a tolerância induzida pela administração prévia de colágeno tipo V por via intravenosa reduz a inflamação (BRAUN et al. 2010). A administração de colágeno V também por via nasal, antes da

administração de sulfato de bleomicina, atenua a deposição de colágeno no tecido pulmonar (VITTAL et al. , 2013).

## 1.2 FIBROSE PULMONAR IDIOPÁTICA (FPI)

### Classificação e Epidemiologia

A Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI) é uma doença de origem desconhecida, acomete principalmente idosos e os pacientes apresentam tosse progressiva e dispneia. É caracterizada pela destruição do parênquima pulmonar e deposição de matriz extracelular nos espaços alveolares e intersticiais, e acredita-se que isso se inicie após uma injúria no pulmão seguida pelo reparo alterado do tecido pulmonar que leva a um estágio final de cicatrização fibrótica (BORENSZTAJN, CRESTANI e KOLB, 2013).

Tabagismo, exposição ambiental a poeiras de metais, pó de madeira, agricultura (poeira vegetal ou animal, exposição frequente a aves e pecuária) e agentes microbianos podem ser citados como fatores de risco. Os pacientes têm pouca sobrevida, variando de 2.5 a 3.5 anos após o diagnóstico (KEKEVIAN, GERSHWIN e CHANG, 2014; RAGHU et al. , 2011; BORENSZTAJN, CRESTANI e KOLB, 2013).

A Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT, 2012) classifica a FPI como doença pulmonar intersticial, que por ser de causa desconhecida é enquadrada como pneumonia intersticial idiopática. A patologia é resultante de lesão do parênquima pulmonar, tendo como consequência graus variáveis de inflamação e fibrose.

Um estudo realizado no Condado Olmsted, em Minnesota entre os anos de 1997 e 2005 demonstrou que em um total de 47 casos de FPI a incidência foi maior em homens que em mulheres e em pacientes com a idade de 70-79 anos. A média de sobrevivência foi de 3.5 a 4.4 anos; 72 % dos pacientes morreram no período do estudo sendo que 47% destes tiveram a FPI como causa primária da morte (PÉREZ et al. , 2010).

Em uma revisão sobre a epidemiologia e manejo de doenças pulmonares comuns em pessoas idosas, Akgün, Crothers e Pisani (2012), afirmam que quanto à fibrose pulmonar idiopática, a incidência e prevalência aumentam com a idade e que a incidência é de 10.7/100.000 homens ; 7.4/100.000 mulheres, com prevalência total de 42.7/100.000.

Dados do Centro Nacional para Estatísticas de Saúde foram compilados em um estudo entre os anos de 1989-2007 para comparar a presença de FPI em grupos étnicos/raciais descendentes dos EUA. O resultado demonstrou que negros (5,1%) parecem ser significativamente menos propensos que brancos (87,2%) para desenvolver a doença. Mas quando a doença está presente os negros morrem mais jovens (72.1 anos) que os brancos (77.9 anos). Este estudo também demonstrou resultados em consonância com outros trabalhos: homens (53%) foram mais afetados que mulheres (47%) e a média de idade foi  $77.4 \pm 9.9$  anos (SWIGRIS et al. , 2012).

### **Características Clínicas e Diagnóstico**

Indivíduos com FPI apresentam sintomas inespecíficos como dispnéia e tosse seca, além de apresentarem ruídos estertores crepitantes, agudos e de curta duração (estertores do tipo velcro) nas bases pulmonares e baqueteamento digital (hipertrofia das falanges distais) no exame físico. Em fases mais avançadas da doença podem haver sinais de hipertensão pulmonar (KAWANO-DOURADO, KAIRALLA e CARVALHO, 2013).

O diagnóstico da FPI é um diagnóstico feito por exclusão podendo ser realizado apenas através da TCAR (Tomografia Computadorizada de Alta Resolução) em alguns casos e, em outros casos, através de um diagnóstico integrado de achados tomográficos e histológicos. São excluídas outras causas como exposições ambientais como poeira vegetal ou animal e exposição frequente a aves e pecuária, toxicidade de drogas e doenças sistêmicas que provocam doença pulmonar intersticial e são associadas ao padrão PIU (Pneumonia Intersticial Usual) (KEKEVIAN, GERSHWIN e CHANG, 2014).

O padrão histológico de pneumonia intersticial usual é caracterizado por fibrose intercalada com áreas de parênquima normal, focos fibrobásticos, faveolamento e distribuição da fibrose nas partes inferiores dos lobos pulmonares, sendo acentuada na região pleural (SBPT, 2012).

A heterogeneidade temporal na FPI é caracterizada por zonas de deposição de colágeno acelulares (mais antigas) e focos fibroblásticos ativos, mais recentes. Estes encontram-se entre regiões fibróticas e menos afetadas que se manifestam na forma de proliferação de fibroblastos fusiformes frequentemente dispostos de forma paralela à

superfície alveolar (MORRISON, NOBLE 2010 ; WOLTERS, COLLARD e JONES, 2014)

O faveolamento, que consiste de espaços aéreos aumentados embutidos no tecido fibrótico, pode ser ausente na doença inicial e é o achado tomográfico de maior capacidade de prever o padrão histológico da pneumonia intersticial usual (KAWANO-DOURADO, KAIRALLA e CARVALHO, 2013; WUYTS et al. , 2014).

Alguns estudos foram realizados com o objetivo de tentar relacionar as características histopatológicas em biópsias de paciente com FPI e a sobrevida dos mesmos. Em 2003 Coletta et al. estudaram 51 pacientes diagnosticados com FPI e observaram que houve uma correlação significativa e inversa da sobrevida com o tempo de história, extensão dos focos fibroblásticos e com o espessamento miointimal da parede dos vasos. A extensão dos focos fibroblásticos influenciou a sobrevida de forma que quando estes eram mais esparsos, a sobrevida era significativamente maior.

Dado semelhante também foi encontrado em um estudo com 53 pacientes onde foi visto que houve uma forte correlação entre a extensão do foco fibroblástico aumentada e mortalidade e declínio da função pulmonar. Além disso, a extensão do infiltrado celular mononuclear intersticial também foi significativamente correlacionada com o declínio da função pulmonar (NICHOLSON et al. , 2002).

A extensão do tecido conjuntivo/granulação, envolvendo tecido de granulação nos espaços aéreos e mudanças fibróticas/reparativas, presentes no exame do tecido pulmonar foi preditiva de sobrevivência em um estudo com 87 pacientes, sendo que uma unidade aumentada no fator de tecido conjuntivo/de granulação foi associada com 1,74 vezes maior risco de morte ( KING et al. , 2001).

### **Patogênese da fibrose pulmonar idiopática**

Embora seja uma doença de origem desconhecida há hipóteses de como a FPI se inicia. Uma das hipóteses é que a inflamação crônica não resolvida desempenha um papel essencial na patogênese da doença, causando perda de pneumócitos I e proliferação de pneumócitos tipo II, com posterior acúmulo de proteínas da matriz secretadas por fibroblastos e miofibroblastos. Porém tratamentos envolvendo esteróides e imunossupressores foram limitados ou não surtiram muito efeito (SELMAN e PARDO, 2006; KORFEI et al. ,2008).



A outra hipótese é que a doença seja resultado de múltiplos ciclos de dano a células epiteliais alveolares, as quais liberam mediadores inflamatórios além de citocinas e fatores de crescimento que controlam proliferação, migração e diferenciação de fibroblastos bem como produção de matriz extracelular. Fatores como desequilíbrio das espécies de oxigênio reativo (ROS) e também entre as metaloproteinases e seus inibidores contribuem para o processo da doença (RAZZAQUE e TAGUCHI, 2003; SELMAN e PARDO, 2006).

O espaço alveolar do pulmão, onde ocorrem as trocas gasosas entre o lúmen dos alvéolos e os vasos capilares, é composto por uma camada fina de células epiteliais, formada principalmente por células epiteliais alveolares (também chamadas de pneumócitos) de dois tipos: I e II.

As células epiteliais alveolares do tipo I tem formato delgado com núcleo achatado e são mais numerosas, tendo como principal função formar uma barreira de espessura mínima de forma a possibilitar a troca de gases (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

As células do tipo II estão localizadas entre células alveolares tipo I e tem formato arredondado com citoplasma apresentando corpos multilamelares que contêm fosfolipídeos, glicosaminoglicanos e proteínas; essas células produzem surfactante pulmonar que é responsável pela redução da tensão superficial dos alvéolos evitando que estes entrem em colapso durante a expiração (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A avaliação da apoptose de células alveolares tipo II têm sido grande foco de estudo na patogênese dessa doença. Em casos de FPI familiar foram encontradas mutações em genes de proteínas surfactantes A e C, essas mutações resultam em proteínas mal formadas que parecem causar estresse do retículo endoplasmático e consequente apoptose das células (GUNTHER et al. , 2012).

A hipótese sobre a apoptose, como causa da FPI, é sustentada por estudos de Barbas-Filho et al. (2001) que encontraram evidências de apoptose em células localizadas nas áreas de pouco envolvimento fibrótico em biópsias pulmonares de paciente com FPI, sugerindo que a apoptose seria um processo primário que precede o preenchimento do espaço acelular por tecido fibroso na ausência de uma reação inflamatória.

Na forma esporádica da FPI, Korfei et al. (2008) observaram uma regulação positiva de fatores relacionados a via de apoptose intrínseca nas células epiteliais alveolares tipo II que recobriam as áreas de fibrose densa e foco fibroblástico em

amostras de pulmão de pacientes com FPI. Akram et al. (2014) demonstraram um significativo nível de expressão da proteína p53 (pró-apoptótica) em células epiteliais alveolares II localizadas em áreas fibróticas.

Sisson et al. (2010) mostraram que lesões dirigidas à essas células são capazes de causar fibrose pulmonar, reforçando a afirmação de vários autores de que o dano à célula epitelial alveolar tipo II pode desempenhar um papel central na patogênese da doença.

Autores como Thannickal e Horowitz (2006) e Fattman (2008) discutem um “paradoxo apoptótico” nessa doença, onde existe uma susceptibilidade de apoptose nas células epiteliais alveolares e resistência à apoptose em miofibroblastos e fibroblastos. Isso tem sido associado à formação das lesões fibróticas; a resistência à apoptose apresentada por fibroblastos e miofibroblastos pode levar a excessiva deposição de componentes da matriz extracelular, o que é uma das características principais da fibrose.

Várias fontes dessas células tem sido apresentadas incluindo proliferação de fibroblastos residentes, geração de fibroblastos a partir de células epiteliais através de transição epitélio-mesenquimal (EMT) e diferenciação de fibrócitos circulantes ou células progenitoras mesenquimais (LEKKERKERKER et al. , 2012).

Com relação à contribuição dos pneumócitos para a origem de fibroblastos, foi demonstrado que sob estímulos apropriados os pneumócitos tipo II passam por EMT *in vitro*, e com o monitoramento por marcação dessas células *in vivo* também se observou ocorrência de EMT (TANJORE et al. , 2009). Além disso, os autores deste estudo mostraram que há migração de células progenitoras da medula óssea para os locais de fibrose, concluindo assim que em um modelo experimental de fibrose pulmonar utilizando bleomicina, cerca de metade dos fibroblastos se originam de EMT e da medula óssea (TANJORE et al. , 2009).

Em biópsias de pulmão também foram encontradas evidências de EMT, onde células epiteliais apresentavam também características mesenquimais. (KIM et al, 2006).

## **Bleomicina e o modelo experimental de fibrose pulmonar**

Bleomicinas (BLM) são um grupo de glicopeptídeos antibióticos/antineoplásicos que provocam quebra da cadeia de DNA e apoptose, tanto durante a mitose das células quanto em células que não estão se dividindo (RANG et al. , 2007).

Um estudo sobre os eventos de sinalização apoptótica provocados por BLM foi realizado com cultura de células endoteliais pulmonares (um dos tipos celulares afetados na fibrose pulmonar) e os autores encontraram que a BLM induz apoptose dentro de 4 horas e mostraram que essa apoptose é iniciada pela via extrínseca através da ativação inicial de caspase 8 seguida das caspases 3 e 6 ( MUNGUNSUKH et al. , 2010).

A droga costuma ser usada para o tratamento de carcinomas de células escamosas, tumores germinativos e linfomas, porém o seu efeito tóxico mais grave é a fibrose pulmonar que acomete cerca de 10% dos pacientes tratados sendo relatada como evento fatal em 1% dos casos ( RUBIN et al. , 2000; RANG et al. , 2007 ).

A toxicidade pulmonar provocada pela BLM é devido aos baixos níveis da enzima hidrolase que cliva a bleomicina no pulmão. Na fase avançada dessa toxicidade os achados histológicos pulmonares possuem aspecto fibrótico que se assemelham à fibrose pulmonar idiopática (SEBTI et al. , 1989; RUBIN et al. , 2000).

Dessa forma, o modelo experimental utilizando bleomicina para induzir fibrose pulmonar é o mais comumente utilizado no estudo *in vivo* da doença. O modelo é caracterizado pela alta reprodutibilidade e capacidade de mimetizar as características histológicas da FPI. Latta et al. (2015) afirmam que a injúria pulmonar induzida por BLM ocorre em duas fases: a primeira possui um componente inflamatório como característica principal, seguido por evento fibrótico entre a terceira e quarta semana após administração da droga.

Estudos sobre a progressão da fibrose pulmonar idiopática tem sido realizados em modelos experimentais com administração da droga por diferentes vias, podendo ser intranasal (Manoury et al. , 2005) intratraqueal , (Izbicki et al. , 2002) ou orofaríngea (EGGER et al. , 2013).

Izbicki et al. (2002) estudaram o efeito da administração de bleomicina nos dias 3, 6, 14 e 21 após a administração da droga, utilizando camundongos C57BL/6. Eles observaram que nos dias 3 e 6 houve aumento na porcentagem de neutrófilos seguido

por um aumento sustentado de linfócitos. No dia 21 houve fibrose intra alveolar, fibrose focal densa frequentemente subpleural e hiperplasia subepitelial nos ductos alveolares.

Posteriormente Chaudhary, Schnapp; Park (2006) realizou experimento em ratos Wistar com bleomicina administrada intratraquealmente para avaliar a progressão da doença e chegaram aos mesmos resultados do estudo supracitado. Os autores descreveram que primeiros dias do experimento (3 e 6) houve influxo celular e aumento do nível de citocinas inflamatórias até o dia 9 e nos últimos dias estudados (dias 14 e 21) houve uma proeminente expressão do colágeno. A deposição de colágeno aumentou a partir do dia 9 com um máximo no dia 21. Os autores hipotetizaram então com esses resultados que neste modelo há uma troca entre a fase inflamatória e fibrótica por volta do dia 9.

Através de um estudo integrativo entre farmacologia e bioinformática Peng et al. (2013) mostraram que ocorrem mudanças moleculares correspondentes nos pulmões de camundongos tratados com BLM e paciente com FPI, principalmente nos genes associados com mitose e sinalização na matriz extracelular. Esses dados dão ainda mais suporte para a premissa de que este modelo pode recapitular a maioria das respostas pró-fibróticas complexas que ocorrem nas doenças em humanos, principalmente na doença ativa.

## 2 JUSTIFICATIVA

Em mamíferos adultos a cicatrização normalmente resulta em substituição do parênquima por matriz extracelular e ainda em remodelamento da matriz extracelular em diferentes órgãos. No pulmão a fibrose pode estar associada a diferentes patologias de etiologias conhecidas ou desconhecidas sendo, neste último caso, conhecida como fibrose pulmonar idiopática. O uso de sulfato de bleomicina para tratamento de câncer pode levar a fibrose pulmonar uma vez que este órgão não metaboliza adequadamente o medicamento. Na progressão da doença normalmente observa-se uma inflamação que precede a fibrose. A deposição de matriz extracelular em substituição aos tecidos pulmonares importantes para as trocas gasosas pode ocorrer de forma gradual levando a uma perda progressiva da função pulmonar. Trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram que a injeção parenteral de proteínas toleradas inibem a resposta imune para proteínas não especificamente relacionadas e inibem também a inflamação desencadeada pela injeção de carragenina no coxim plantar de camundongos ou a formação de granulomas pulmonares produzidos pela injeção endovenosa de ovos de *Schistosoma mansoni*. Neste trabalho estudamos os efeitos da injeção de proteínas toleradas sobre a inflamação e fibrose pulmonar induzida pela inalação de sulfato de bleomicina.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar se a injeção intraperitoneal (i.p) de uma proteína previamente administrada por via oral altera a inflamação e fibrose pulmonar induzida por sulfato de bleomicina em camundongos C57BL/6.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Em camundongos tolerantes orais à ovalbumina (Ova) injetados i.p com Ova em adjuvante  $Al(OH)_3$  no dia da injeção intranasal (i.n) de sulfato de bleomicina e grupos controles:

- 1 - Comparar a taxa de mortalidade e massa corporal do dia 0 ao dia 21 após a instilação de sulfato de bleomicina;
- 2 - Analisar histologicamente o pulmão avaliando o infiltrado inflamatório e a fibrose nos dias 7 e 21 após a instilação de sulfato de bleomicina;
- 3 - Quantificar e qualificar os leucócitos obtidos do lavado bronquialveolar no dia 7 após a instilação de sulfato de bleomicina.

## 4 METODOLOGIA

### Camundongos e grupos experimentais

Os camundongos C57BL/6 machos foram obtidos do Centro de Bioterismo da UFMG e utilizados quando atingiram a idade de 8 semanas,. Durante o período de experimentação, os animais permaneceram no Biotério de Animais Experimentais do Departamento de Morfologia (Câmara Climatizada), de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG. O projeto foi aprovado sob o número de protocolo 250/2014 da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG).

Os animais foram separados em quatro grupos:

**-Grupo Salina:** recebeu instilação de salina intranasal.

**-Grupo Bleomicina (BLM):** recebeu instilação de bleomicina intranasal.

**-Grupo Imune BLM:** recebeu uma imunização via intraperitoneal (i.p.) com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> seguido da instilação de bleomicina intranasal.

**-Grupo Tolerante BLM:** recebeu uma solução de clara de ovo por via oral, durante 3 dias consecutivos, 7 dias antes da imunização com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> e instilação de bleomicina intranasal.

Os tratamentos realizados em cada grupo estão sumarizados no quadro abaixo.

| Grupo                | Tratamento oral        | Imunização intraperitoneal | Injeção intranasal de BLM |
|----------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <b>Salina</b>        | Não                    | Não                        | Não                       |
| <b>BLM</b>           | Não                    | Não                        | Sim                       |
| <b>Imune BLM</b>     | Não                    | OVA+Al(OH) <sub>3</sub>    | Sim                       |
| <b>Tolerante BLM</b> | OVA 5 mg/ml por 3 dias | OVA+Al(OH) <sub>3</sub>    | Sim                       |
| <b>DIAS</b>          | -10 a -7               | 0                          | 0                         |

### Indução de fibrose pulmonar por bleomicina

Sulfato de bleomicina (BLM), na dose de 3,75 mg/Kg Kg (Cinelao- Sulfato de Bleomicina, Meizler Biopharma S/A), foi instilada por via nasal em animais anestesiados pela injeção i.p. de 0,10 ml de uma solução de cloridrato de Ketamina (97

mg/Kg) (Dopalen injetável-Vetbrands) e xilazina (16,5 mg/Kg) (Dopaser solução injetável). Um grupo controle recebeu apenas salina intranasal.

### **Indução da tolerância oral e injeção da proteína tolerada**

Para indução da tolerância oral, o grupo tolerante-BLM recebeu, em vez de água, uma solução de clara de ovo 1:5 em água, durante três dias consecutivos. Após um intervalo de 7 dias, os animais receberam uma injeção i.p. de 10 µg de ovalbumina cristalizada (OVA, grau V, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e 1,6 mg de Al(OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2 ml de salina. Logo após a injeção i.p. da proteína tolerada, os animais receberam a instilação de BLM. O grupo controle imune não recebeu o tratamento oral com clara de ovo.

### **Análise da inflamação e fibrose pulmonar**

No dia 7, os animais foram sacrificados com alta dose de anestesia (0,40 ml da solução anestésica descrita acima) para realização do lavado broncoalveolar e coleta dos pulmões. Para coleta do lavado broncoalveolar, foi feita uma incisão na traquéia com tesoura cirúrgica e então inserção de uma cânula (Solidor-22G/25mm) para inoculação de 1 mL de PBS estéril. A inoculação do PBS e a retirada do líquido do lavado foi realizada três vezes e as amostras foram armazenadas no gelo até a contagem das células presentes no lavado. Após a realização do lavado broncoalveolar, os pulmões foram coletados e fixados em Formalina de Carson 10% (pH 7,2-7,4) por 48h sendo posteriormente conservados em álcool 70% até o processamento histológico.

Para contagem de leucócitos, o lavado broncoalveolar foi centrifugado a 1.200 rpm/ 4°C por 15 minutos, posteriormente foi desprezado o sobrenadante e o pellet de células foi ressuspendido em 100 µl de BSA 3%. Os leucócitos foram contados na câmara de Neubauer (Hemocytometer Bright-Line) e expresso em número de células x 10<sup>4</sup>/mL.

Uma amostra de 80 µl de BSA 3% mais 20 µl do lavado foi centrifugada em uma centrífuga citológica (FANEM<sup>®</sup> SP-BRASIL, Mod. 248, 500 rpm por 5 minutos) e as lâminas foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin) para contagem diferencial de leucócitos. As lâminas foram analisadas ao microscópio de luz (OLYMPUS BX40F-3) e foram contadas 200 células para cada animal, que de acordo com a morfologia



foram identificadas como macrófagos, neutrófilos, linfócitos ou eosinófilos. A porcentagem de cada uma destas células foi obtida em cada amostra e, de acordo com a contagem global de leucócitos feita na Câmara de Neubauer, o número total das células de cada animal foi expresso como número de células por mL.

Para análise histopatológica, os pulmões foram submetidos ao processamento histológico de rotina com banhos de álcool e xilol em concentrações crescentes e incluídos em parafina a 60° C. Cortes de 5µm foram obtidos dos pulmões de cada animal com o micrótomo (MICROM M335E -5µm) e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) ou Tricromático de Gomori.

No experimento realizado com 21 dias após a instilação de BLM, os animais foram monitorados e pesados diariamente para avaliação de sobrevivência e perda de peso. Aos 21 dias os animais foram anestesiados com 0,10 mL de solução anestésica e foi coletado o sangue através do plexo braquial esquerdo para a separação do soro. Em seguida os pulmões foram coletados e fixados em Formalina de Carson 10% (pH 7,2-7,4) por 48h sendo posteriormente conservados em álcool 70% até o processamento histológico.

#### *Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para avaliação de anticorpos anti-OVA*

O soro dos animais foi obtido através da centrifugação do sangue (1.800 rpm por 15 minutos), diluído 1:10 em PBS-caseína e então foi realizado ELISA (Ensaio Imunoenzimático) anti-OVA para detecção de anticorpos anti-OVA e assim comprovação do estado de tolerância dos animais do grupo tolerante BLM.

Para tanto foi utilizada uma placa de 96 poços (Nunc-Immuno™ Brand Products) que foi sensibilizada no primeiro dia com 100 µl de uma solução de 200 µg de OVA em 10 mL de Tampão Carbonato pH 9,6 (Coating Buffer) e incubada em câmara fria a 4°C por no mínimo de 18 horas. No segundo dia as placas foram lavadas duas vezes com salina -Tween (salina fisiológica NaCl 0,15 M contendo 0,05% de Tween 20) e posteriormente foi realizado bloqueio com 200 µl de PBS-caseína / poço.

Foram realizadas diluições seriadas do soro (1:50 a 1:3.200) e a placa foi incubada a 37°C durante 1 hora sendo posteriormente lavada com salina-Tween (6 x) e adicionado 100 µl /poço de uma solução do conjugado de anticorpo ligado à peroxidase ( Goat Anti-mouse IgG- HRP marca) 1:500. Depois disso a placa foi incubada a 37°C durante 1 hora, lavada novamente com salina-Tween (6 x) e revelada através da adição

de 100 µl /poço de uma solução de 4 mg de OPD (ortofenilenodiamina ) em 10 mL de tampão citrato (pH 5,0) e 2 µl de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30% incubada ao abrigo da luz por 15 minutos. A reação foi parada com 20 µl de ácido sulfúrico 2N por poço.

A leitura foi realizada através de um leitor de ELISA (Multiskan FC Thermo Scientific) e os resultados expressos em média de absorbância.

#### *Análise histopatológica*

A análise qualitativa das alterações morfológicas foi realizada nas lâminas coradas com H&E, levando em consideração arquitetura pulmonar preservada, áreas de inflamação e acúmulo de células perivasculares e peribronquiolares. Todas as lâminas foram revisadas pelo médico patologista Dr. Geraldo Magela Azevedo Júnior.

A análise de fibrose pulmonar foi realizada nas lâminas coradas com Tricromático de Gomori sob microscópio de luz com objetiva de 20X e o índice fibrótico de cada amostra de pulmão foi designado segundo a Escala de Ashcroft modificada, onde a cada campo do tecido pulmonar analisado é designado um grau de fibrose. A escala varia de 0 (pulmão normal) a 8 (obliteração do campo pela fibrose) e o índice fibrótico do pulmão é feito pela soma dos graus de cada campo dividido pelo número de campos (HUBNER et al. , 2008).

Para obtenção das imagens, as lâminas coradas com H&E ou Tricromático de Gomori, foram submetidas a um processamento digital através do Scanner de lâminas 3D HISTECH (CAPI –Centro de Aquisição e Processamento de Imagens/UFMG). Posteriormente foram feitas fotomicrografias das lâminas com o programa Panoramic Viewer (3D HISTECH, versão 1.15.4- 2014).

#### *Análise Estatística*

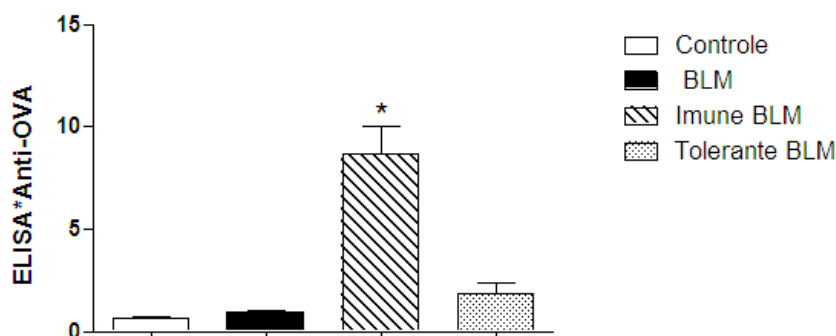
Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. Os dados foram analisados por análise de variância (One Way ANOVA) seguido do teste Newman-Keuls considerando o nível de significância de  $p < 0,05$  e a sobrevivência foi analisada através do teste Log-rank (Mantel-Cox). Todos os dados obtidos foram analisados através do programa GraphPad Prism 5.

## 5 RESULTADOS

### Análise de anticorpos anti-OVA no soro

O soro dos animais coletado 21 dias após a injeção i.p. de OVA e instilação de sulfato de bleomicina foi submetido ao teste ELISA anti-OVA para avaliação do estado de tolerância oral. Como visto na figura 3, os grupos que não receberam imunização com OVA (controle e BLM) apresentam níveis basais de anticorpos anti-OVA. O grupo imune BLM, onde os animais foram imunizados com OVA+Al(OH)<sub>3</sub>, apresentou uma alta taxa de anticorpos anti-OVA. O grupo que recebeu um tratamento com OVA por via oral durante 3 dias consecutivos antes de ser imunizado com OVA+Al(OH)<sub>3</sub>, (grupo tolerante BLM), apresentou uma significativa redução do título de anticorpos anti-OVA quando comparado ao grupo imune, comprovando assim o estado de tolerância oral.

**Figura 3:** Nível de anticorpos anti-Ova no soro.

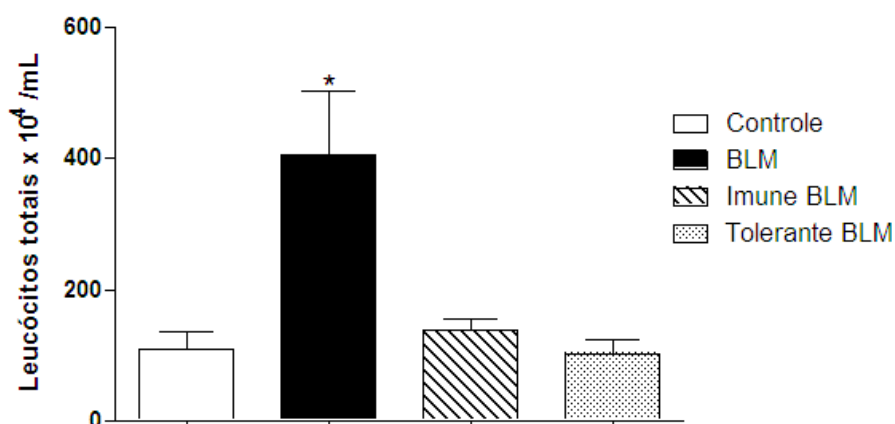


O gráfico demonstra diferença significativa no título de anticorpos do grupo imune quando comparado aos demais grupos. A média de absorbância de cada grupo foi obtida pela soma das médias da absorbância de diluições decrescentes seriadas e os resultados expressos como média ± SEM. O (\*) indica que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo imune BLM e os demais grupos (n=6).

### Contagem de células inflamatórias no lavado broquio-alveolar

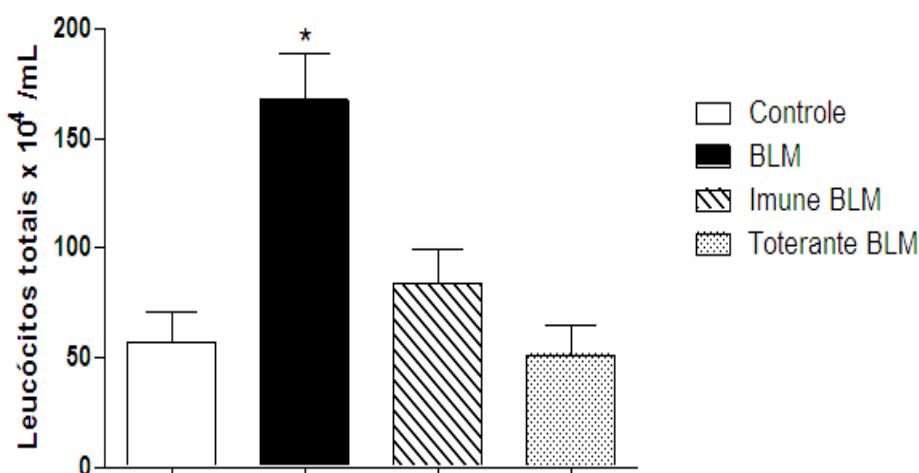
Nos animais do grupo controle bleomicina, que receberam sulfato de bleomicina sem nenhum outro tratamento, houve um aumento significativo de leucócitos quando comparado aos demais grupos. A injeção i.p. de OVA em Al(OH)<sub>3</sub>, antes da instilação de sulfato de bleomicina inibiu o aumento de leucócitos no lavado bronquio-alveolar, tanto em animais imunes quanto tolerantes a OVA (Figura 4). Este experimento foi repetido e as diferenças entre os grupos se mantiveram (Figura 5).

**Figura 4:** Contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar de animais 7 dias após instilação de BLM i.n



As barras representam média±SEM. O (\*) indica que houve diferença significativa (p menor que 0,05) em relação aos demais grupos (controle, imune BLM e tolerante BLM). (n=6-8). Fonte: GraphPad Prism 5.

**Figura 5:** Contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar de animais 7 dias após instilação de BLM i.n

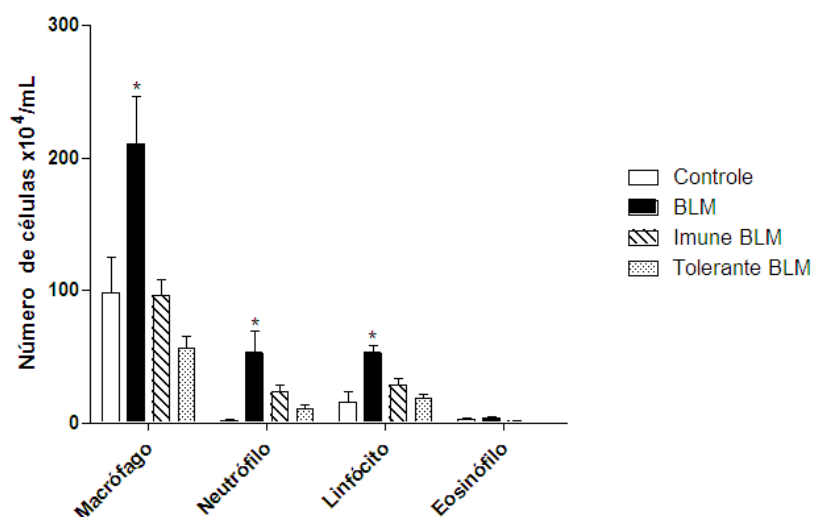


As barras representam média±SEM. O (\*) indica que houve diferença significativa (p menor que 0,05) em relação aos demais grupos (controle, imune BLM e tolerante BLM). (n=4-5). Fonte: GraphPad Prism 5.

A contagem diferencial dos leucócitos levou em consideração quatro tipos celulares: macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos. A instilação de sulfato de bleomicina produziu aumento do número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos, mas não de eosinófilos, no lavado bronquio-alveolar. Não houve aumento estatisticamente significativo no número destas células nos animais dos grupos que receberam uma

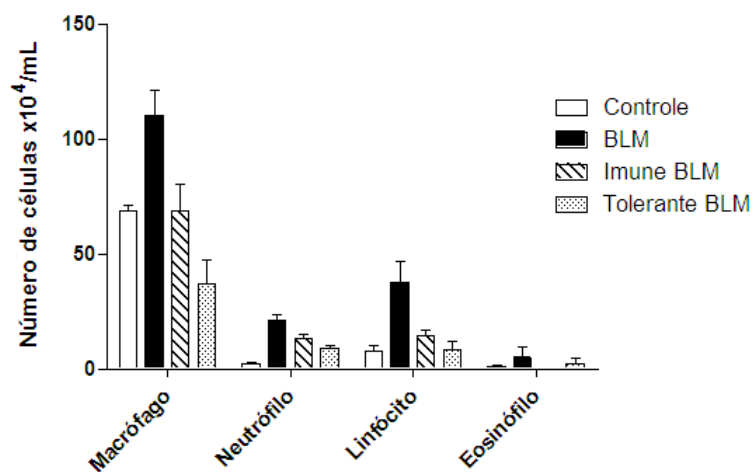
injeção i.p. de OVA em  $Al(OH)_3$ , antes da instilação de sulfato de bleomicina (Figura 6). Este experimento foi repetido e as diferenças entre os grupos se mantiveram (Figura 7).

**Figura 6:** Contagem diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar de animais 7 dias após instilação de BLM i.n.



As barras representam média $\pm$ SEM. O gráfico expressa o número absoluto de cada tipo celular em 1 mL. O (\*) indica que houve diferença significativa ( $p$  menor que 0,05) em relação aos demais grupos (controle, imune BLM e tolerante BLM). (n= 6-8).

**Figura 7:** Contagem diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar de animais 7 dias após instilação de BLM i.n.



As barras representam média $\pm$ SEM. O gráfico expressa o número absoluto de cada tipo celular em 1 mL. O (\*) indica que houve diferença significativa ( $p$  menor que 0,05) em relação aos demais grupos (controle, imune BLM e tolerante BLM). (n=4-5).

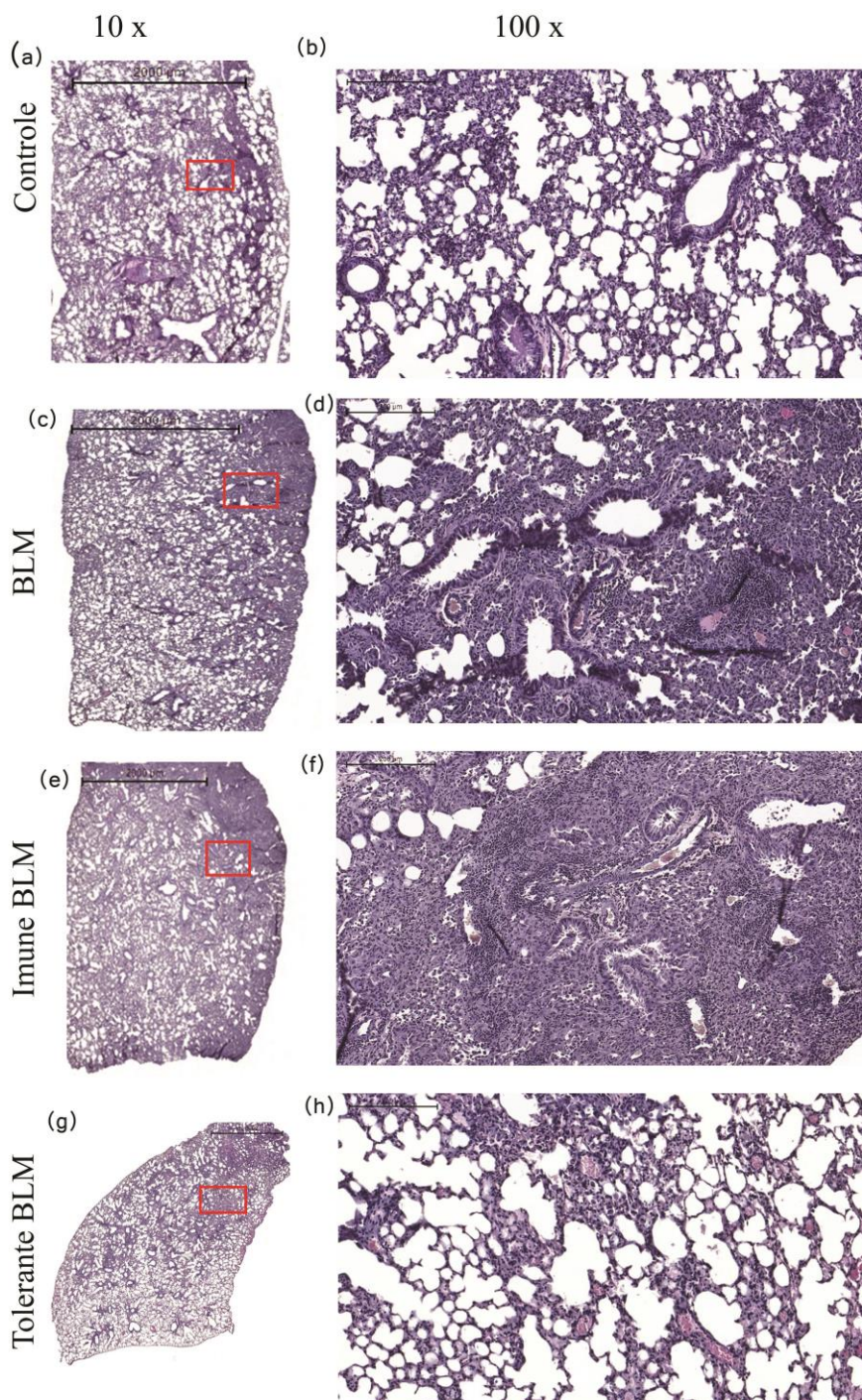
### **Análise histopatológica 7 dias após a instilação de sulfato de bleomicina**

Sete dias após o tratamento com sulfato de bleomicina todos os grupos apresentaram uma redução dos espaços aéreos com acúmulo de células no interstício pulmonar (Figura 8c, e, g). No entanto, os grupos BLM e imune BLM apresentaram distorção da arquitetura pulmonar principalmente subpleural (Figura 8c, e) enquanto o grupo tolerante BLM apresentou uma distorção mais difusa com a presença de algumas áreas de arquitetura pulmonar preservada (Figura 8g).

No aumento de 100x foi possível observar um leve espessamento alveolar nos pulmões do grupo controle (Figura 8b). Os grupos BLM e imune BLM (Figura 8d, f respectivamente) demonstraram uma inflamação predominantemente mononuclear e alguns neutrófilos, em áreas perivasculares e peribronquiolares. No grupo tolerante (Figura 8h), o acúmulo de células visto nessas áreas foi mais leve.

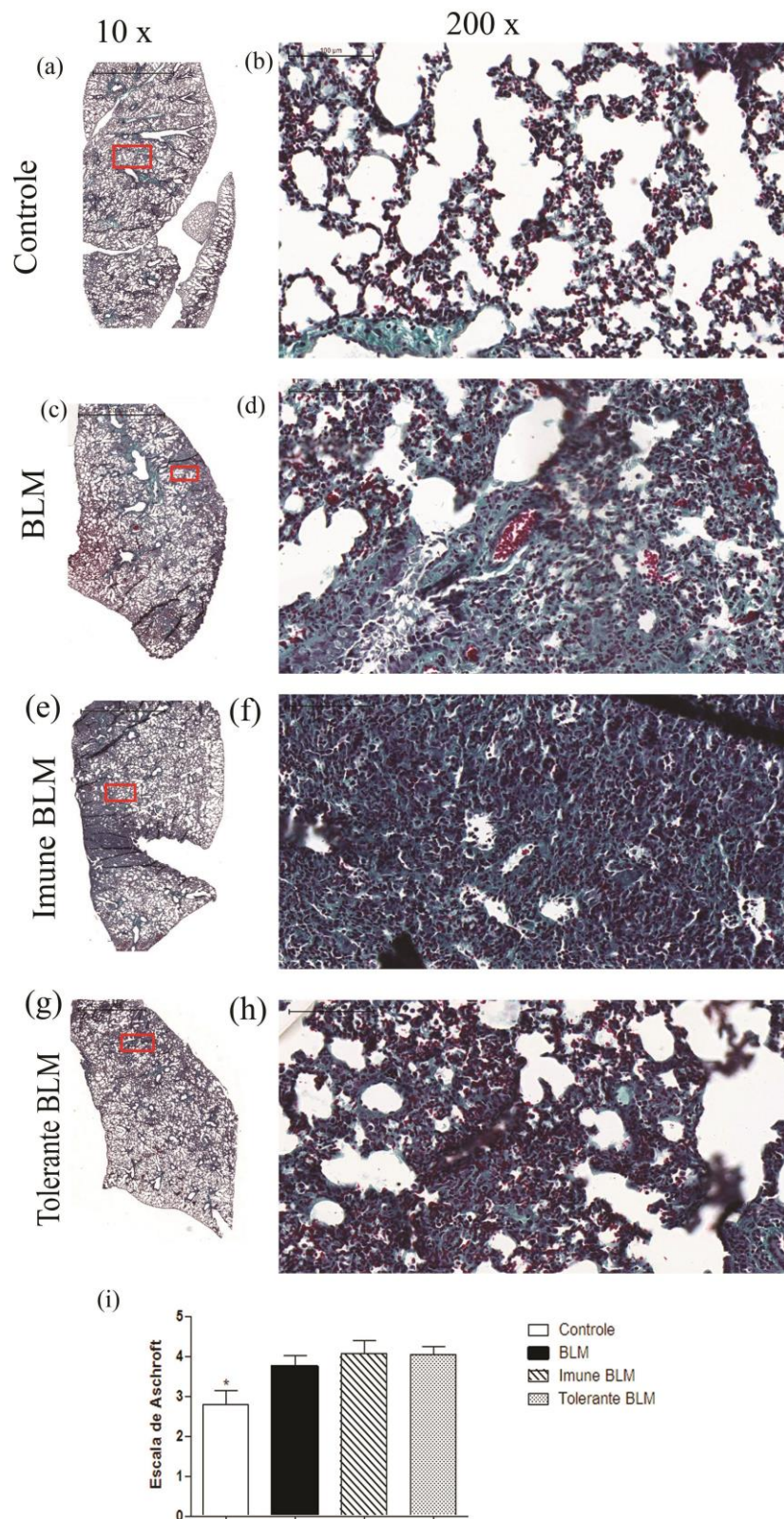
A análise da fibrose pulmonar foi feita em cortes corados com Tricromático de Gomori e a Escala de Ashcroft modificada foi utilizada para a sua quantificação (Hubner *et al.*, 2008). Na figura 9 pode-se observar uma fibrose leve nos pulmões dos camundongos controle que não receberam sulfato de bleomicina, enquanto os demais grupos tratados com esta droga apresentam áreas de fibrose classificadas como leves ou severas na extensão do pulmão. Aos sete dias após a instilação de BLM, não houve diferença estatisticamente significativa no índice fibrótico entre os grupos tratados com sulfato de bleomicina (Figura 9i).

**Figura 8:** A instilação i.n de sulfato de bleomicina produz alterações na estrutura pulmonar.



Fotomicrografias de lâminas de pulmão coradas com H&E mostrando alterações causadas pela instilação i.n de sulfato de bleomicina (BLM), 7 dias após instilação. Na figura estão ilustrados os pulmões dos grupos controle sem bleomicina (a, b), BLM (c, d), imune BLM (e, f) e tolerante BLM (g, h). (n=4-5). As imagens da direita são fotomicrografias em maior aumento da área destacada pelo retângulo vermelho na fotomicrografia da esquerda.

**Figura 9:** A instilação i.n de sulfato de bleomicina causa fibrose pulmonar.



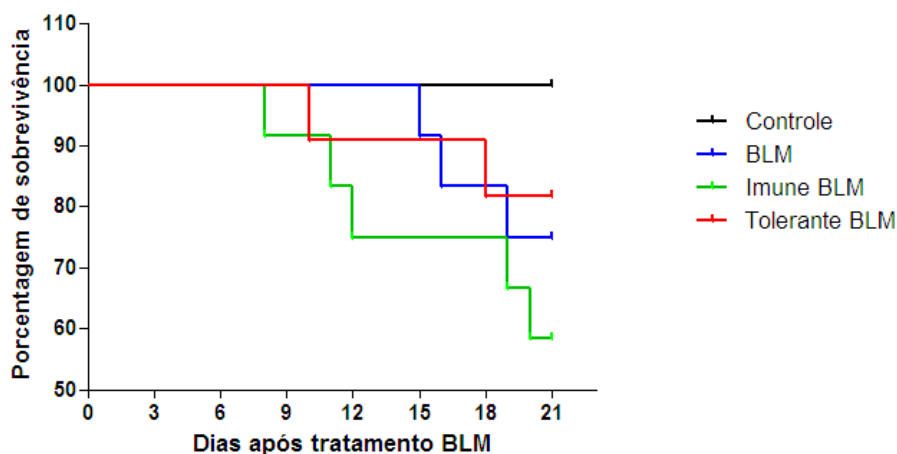
Fotomicrografias de lâminas de pulmão coradas com Tricromático de Gomori mostrando a fibrose (verde) no dia 7 após a instilação i.n de sulfato de bleomicina (BLM). Na figura estão ilustrados os pulmões dos grupos controle sem bleomicina (a, b), BLM (c, d), imune BLM (e, f) e tolerante BLM (g, h). Em (i) o gráfico mostra o índice fibrótico pela escala de Aschroft (2008). Em (b) há um exemplo de fibrose grau 3, em (d) e (h) grau 5 e em (f) grau 7 (n=4-5). As imagens da direita são fotomicrografias em maior aumento da área destacada pelo retângulo vermelho na fotomicrografia da esquerda.



## Análise da mortalidade e do peso corporal

Durante o período experimental de 21 dias os animais foram monitorados diariamente para avaliação de sobrevivência (figura 10) e perda de peso (Figura 11). Os animais não tolerantes a OVA que receberam injeção i.p. de OVA+Al(OH)<sub>3</sub> antes da instilação i.n. de sulfato de bleomicina entraram em óbito mais cedo do que os animais dos outros grupos. Neste grupo (imune BLM), a porcentagem de sobrevivência também foi relativamente menor quando comparados aos demais grupos, apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa.

**Figura 10:** Porcentagem de sobrevivência dos animais após instilação i.n de sulfato de bleomicina (BLM).

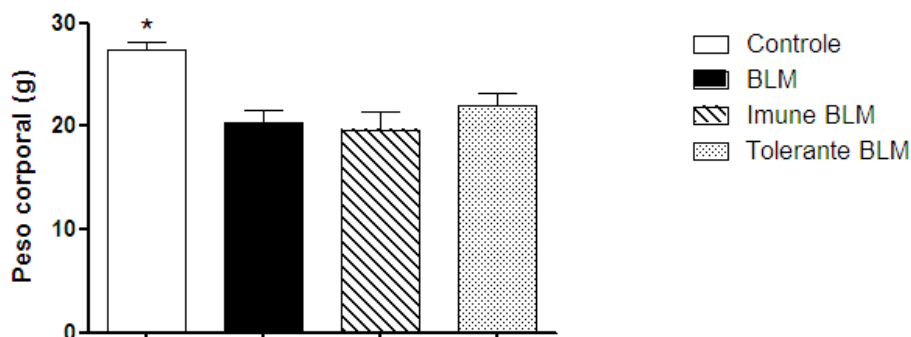


Os dados de sobrevivência foram analisados através do teste Log-rank (Mantel-Cox). (n= 6-12).

A avaliação do peso foi realizada através da média de peso final, aos 21 dias após a instilação de BLM (figura 11) e através da perda de peso analisada em intervalos de 3 dias (figura 12).

No gráfico da figura 11 pode-se observar que o grupo controle estava com peso significativamente maior ao final do experimento quando comparado aos demais grupos. Todos os animais que receberam instilação de BLM apresentaram, ao final do experimento, peso menor do que os que não receberam esta droga, e não houve diferença no peso dos animais dos grupos BLM, imune BLM e tolerante BLM.

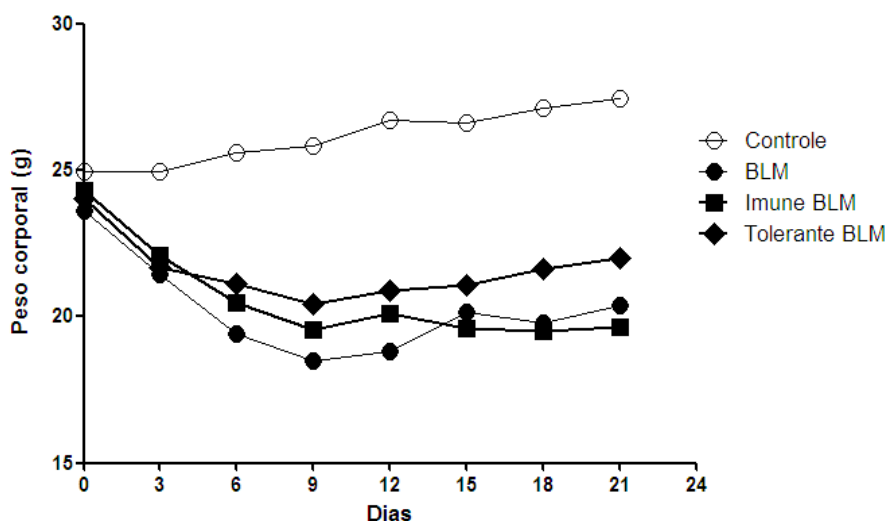
**Figura 11:** Média final do peso dos animais 21 dias após a instilação i.n de sulfato de bleomicina (BLM).



As barras representam média±SEM. O (\*) indica que houve diferença significativa entre o grupos controle e os demais que perderam peso. (n=6-10).

A variação do peso durante o período experimental, analisada em intervalos de três dias, demonstrou que por volta do dia 9 ocorreu o pico de perda de peso corporal de todos os grupos tratados com BLM. A partir do dia 9, o grupo tolerante recuperou o peso mais rápido que os demais grupos (figura 12).

**Figura 12:** Variação do peso corporal no período experimental de 21 dias após a instilação i.n de BLM.



O gráfico demonstra que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com BLM. (n=6-10).

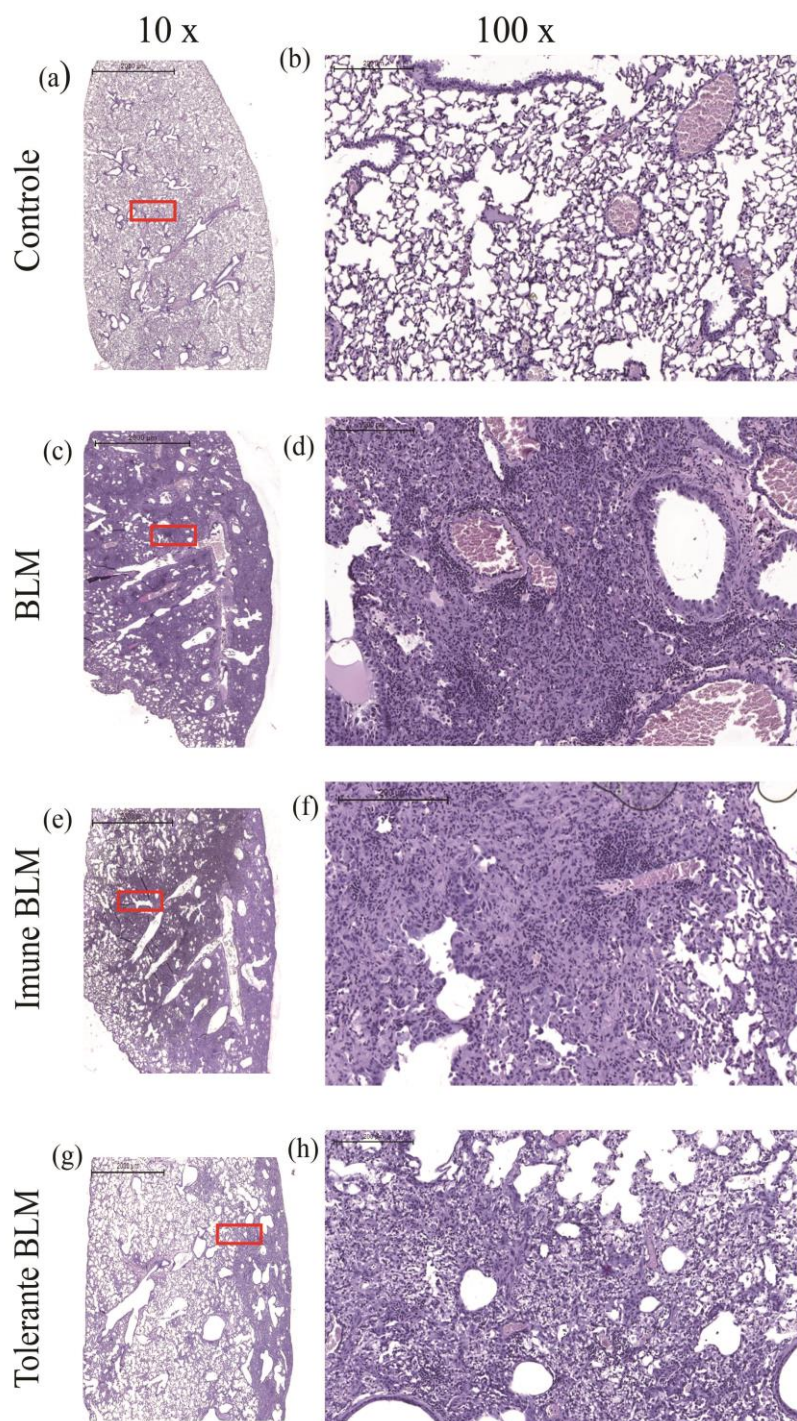
### **Análise histopatológica 21 dias após a instilação de sulfato de bleomicina**

Aos 21 dias, observou-se inflamação e fibrose mais severa em toda a extensão dos pulmões dos animais que receberam instilação i.n. de sulfato de bleomicina, porém no grupo tolerante BLM foi observado uma distribuição mais subpleural dessas alterações (Figura 13 c, e, g).

Aos 21 dias, os pulmões dos animais tratados com BLM apresentavam acúmulo de células, predominantemente mononucleares, perivascular e peribronquiolar. Esse acúmulo foi mais severo comparado com aquele observado com 7 dias e, além disso, foi possível observar muitos fibroblastos ao redor das áreas fibróticas (Figura 13 d, f). Em alguns animais do grupo tolerante BLM a área de fibrose apresentou-se com faveolamento (Figura 13h) que pode ser fibrose num estágio mais inicial.

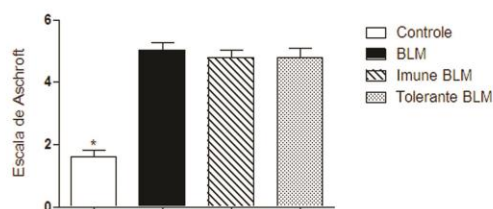
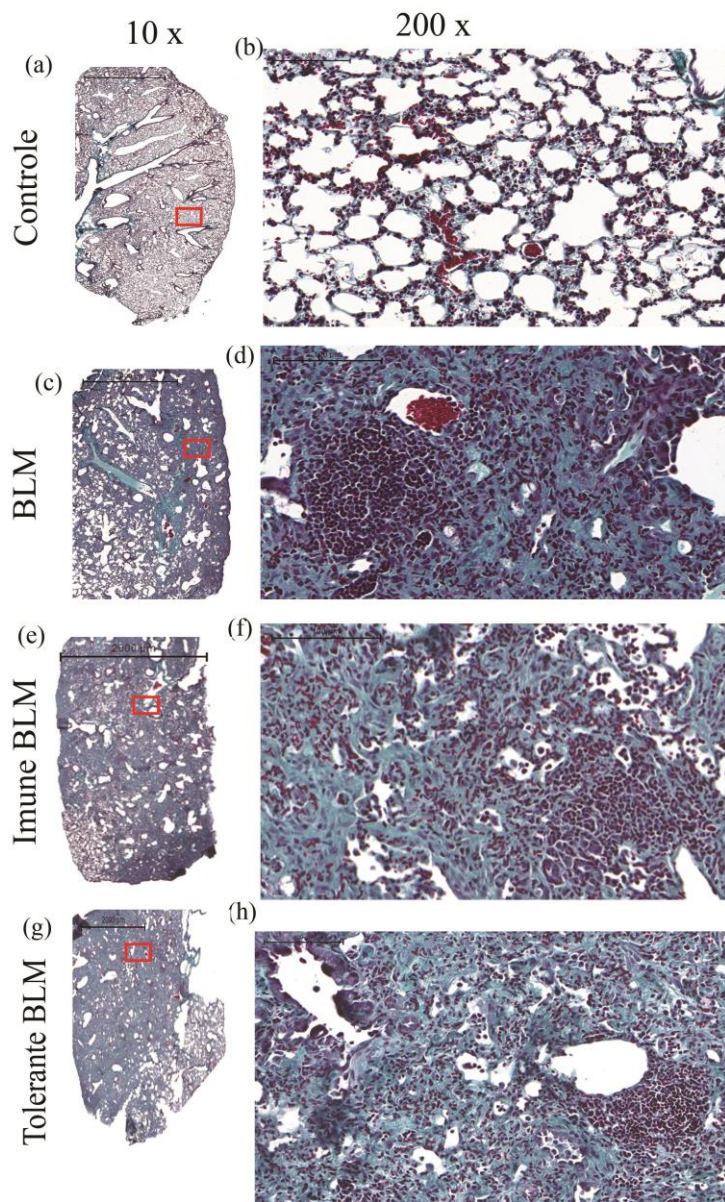
A análise das lâminas coradas com Tricromático de Gomori mostraram que não houve diferença na fibrose dos grupos tratados com BLM (figura 14). O gráfico da escala de Ashcroft (2008) desses animais mostra, assim como com 7 dias, que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com BLM (figura 14i).

**Figura 13:** A instilação de sulfato de bleomicina alterou a estrutura pulmonar vista aos 21 dias.



Fotomicrografias de lâminas de pulmão coradas com H&E mostrando alterações causadas pela instilação i.n de sulfato de bleomicina (BLM), 21 dias após instilação. Nas imagens são ilustrados os pulmões dos grupos controle que não recebeu bleomicina (a, b), grupo BLM (c, d), grupo imune BLM (e, f) e grupo tolerante BLM (g, h). (n=4-5). As imagens da direita são fotomicrografias em maior aumento da área destacada pelo retângulo vermelho na fotomicrografia da esquerda.

**Figura 14:** A instilação de sulfato de bleomicina produziu fibrose pulmonar vista aos 21 dias.



Fotomicrografias de lâminas de pulmão coradas com Tricromático de Gomori mostrando a fibrose (verde) 21 dias após instilação i.n de BLM. Nas imagens são ilustrados os pulmões dos grupos controle (a e b), BLM (c e d), imune BLM (e e f) e tolerante BLM (g e h). Em (i) está ilustrado o gráfico representativo da escala de Aschroft (2008), (b) há um exemplo de grau 3, em (d, f e h) grau 6. (n=4-5). As imagens da direita são fotomicrografias em maior aumento da área destacada pelo retângulo vermelho na fotomicrografia da esquerda.

## 6 DISCUSSÃO

Lesões em diferentes órgãos de mamíferos adultos são normalmente reparadas com substituição dos componentes do estroma e parênquima por matriz extracelular, resultando em fibrose e perda de função do órgão (RAZZAQUE; TAGUCHI, 2003).

Uma vez que a fibrose é um problema médico de grande importância e existem poucos recursos para o seu tratamento, os estudos em modelos experimentais tornam-se necessários para uma melhor compreensão das patologias e proposição de alternativas de prevenção e/ou tratamento.

A fibrose pulmonar pode ter diferentes causas, como exposições ambientais e a certos tipos de poeira, além de existir a fibrose pulmonar idiopática que não possui origem conhecida. Ademais, a fibrose pulmonar também pode estar relacionada ao tratamento de câncer com sulfato de bleomicina (KEKEVIAN, GERSHWIN e CHANG, 2014 ; RANG et al. , 2007). Alguns estudos em modelos experimentais de fibrose pulmonar com o uso de sulfato de bleomicina sugerem que a inflamação está relacionada com a sua patogênese (IZBICKI et al. , 2002; CHAUDHARY, SCHNAPP; PARK, 2006).

Em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa mostrou que a injeção parenteral de proteínas toleradas em adjuvantes inibe a inflamação e bloqueia a fibrose em diferentes modelos experimentais (RODRIGUES et al. , 2006 ; RAMOS et al. , 2008; RAMOS et al. , 2012).

O presente trabalho mostrou que a injeção parenteral de uma proteína tolerada em adjuvante inibe a inflamação mas não bloqueia a fibrose pulmonar induzida por sulfato de bleomicina.

Existem diferentes formas de indução de tolerância oral a ovalbumina e, neste trabalho, utilizamos a exposição contínua a uma solução de clara de ovo diluída em água, por três dias consecutivos. Esta é umas das formas mais efetivas de indução de tolerância a ovalbumina em camundongos (OLIVEIRA et al. , 2015). De fato, o tratamento oral com solução contendo ovalbumina resultou em tolerância oral, atestada pela comparação entre os níveis séricos de anticorpos anti-Ova nos grupos imunizados com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> e pré-tratados ou não com OVA.

A taxa de sobrevivência e perda de peso são parâmetros bastante utilizados no estudo de drogas e/ou tratamentos para fibrose pulmonar em modelos animais utilizando sulfato de bleomicina (MURAKAMI et al. , 2014; ARIZMENDI et al. , 2014 ; LIU et

al. , 2013). No nosso trabalho a média de perda de peso e a sobrevivência foram condizentes com os dados da literatura, ocorrendo redução de peso e da taxa de sobrevivência em todos os grupos tratados com sulfato de bleomicina. Porém no grupo tolerante, apesar de não demonstrar uma diferença estatisticamente significativa com relação aos demais grupos tratados com sulfato de bleomicina, foi possível observar que estes recuperaram peso mais precocemente.

Silva e colaboradores (2008), testaram se a injeção de uma proteína tolerada poderia bloquear uma reação do enxerto-versus-hospedeiro, que produz uma inflamação sistêmica desencadeada pela reação de linfócitos alogênicos transplantados para um hospedeiro que não pode rejeita-los.

A reação aguda do enxerto-versus-hospedeiro afeta vários órgãos e a avaliação de perda de peso e mortalidade também são critérios usados para avaliação do grau desta patologia. Os resultados quanto a esses parâmetros - mortalidade e peso – do trabalho com o modelo de reação do enxerto-versus-hospedeiro, a injeção de uma proteína tolerada em um grupo de animais, produziu um aumento na sobrevivência dos animais tolerantes, porém assim como no nosso modelo, não houve diferença estatisticamente significativa (SILVA, 2008).

A análise da inflamação pulmonar, no modelo experimental utilizado neste trabalho, é geralmente realizada através de contagem global e diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar e análise histológica do pulmão decorridos 7 dias da instilação de sulfato de bleomicina. Vários estudos publicados mostram que nos animais tratados com sulfato de bleomicina o número total de células inflamatórias (leucócitos) e, dentre estes, o número de macrófagos, neutrófilos, e linfócitos estão aumentados no lavado broncoalveolar, quando comparados aos animais controle (SAITO et al. , 2008; MURAKAMI et al. , 2014).

A contagem de células inflamatórias no nosso estudo demonstrou resultados similares aos da literatura, sendo que o número de células total foi significativamente maior nos animais do grupo BLM, que recebeu apenas sulfato de bleomicina, quando comparado aos demais grupos. No entanto, animais dos grupos imune BLM e tolerante BLM tiveram número de leucócitos total similares ao grupo controle.

O mesmo resultado foi visto na contagem diferencial, onde o número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos foi maior nos animais do grupo BLM quando comparados aos demais. Não houve diferença entre os animais dos grupos controle, imune BLM e tolerante BLM. Portanto, a injeção i.p de OVA+Al(OH)<sub>3</sub>, seja em

animais tolerantes ou não tolerantes a OVA, bloqueou o aumento de leucócitos no lavado brocoalveolar produzida pela instilação de sulfato de bleomicina. Estes resultados em que a injeção de OVA em animais não tolerantes a OVA bloqueia o aumento de leucócitos no lavado broncoalveolar foi inesperado.

Em outros modelos de inflamação pulmonar, modelos de asma e de granulomas por ovos de *S. mansoni*, apenas a injeção de proteínas toleradas em animais tolerantes bloqueou a inflamação. Assim, pode-se sugerir que a inflamação pulmonar produzida por bleomicina ocorre por mecanismos diferentes daqueles que ocorrem na inflamação alérgica pulmonar e na formação dos granulomas por ovos de *S. mansoni* injetados por via endovenosa (RUSSO et al. , 2001; AZEVEDO JUNIOR et al. , 2012).

Mais estudos são necessários para verificar estas diferenças uma vez que os mecanismos celulares que subjazem os eventos inflamatórios que foram bloqueados pela tolerância oral podem ser bastante diversos, quanto à quantidade/qualidade de células inflamatórias que é bloqueada.

Em outros modelos de inflamação, como a peritonite causada por imunização i.p. com OVA, também foi demonstrado que a apenas a injeção do antígeno tolerado inibe a inflamação e que isto pode ocorrer devido à interferência com a produção dos leucócitos na medula óssea, com a liberação para o sangue e com a migração para os tecidos periféricos (RAMOS et al. , 2008).

No modelo de peritonite induzido por OVA, a tolerância oral bloqueou o aumento do número total de leucócitos no fluido peritoneal, devido ao bloqueio do aumento de eosinófilos, mas não foi capaz de bloquear o número de neutrófilos e linfócitos, e bloqueou também a eosinofilia na medula óssea (RODRIGUES et al. , 2006).

Neste, apesar de animais imunes e tolerantes não possuírem diferença quanto ao número de linfócitos, a análise fenotípica dessas células demonstrou que nos animais tolerantes uma redução significativa na porcentagem de células CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e um aumento nos linfócitos CD45R<sup>+</sup> (RODRIGUES et al. , 2006).

Portanto, nosso trabalho com inflamação pulmonar induzida por sulfato de bleomicina condiz com os de Rodrigues et al. (2006) no que diz respeito ao fato de a tolerância não bloquear o número de neutrófilo e linfócito. Então, podem também estar ocorrendo diferenças no fenótipo dos leucócitos, bem como diferenças nos fatores inflamatórios produzidos pelas células no nosso modelo entre animais imunes e



tolerantes, diferenças que não são vistas apenas com a análise morfológica dos leucócitos.

No granuloma causado pela deposição de ovos de *Schistosoma mansoni* no pulmão, os efeitos indiretos da tolerância oral, produzidos pela injeção da proteína tolerada, foram capazes de reduzir a área do granuloma formado. Foi demonstrado que o influxo de células diminuído foi acompanhado pela redução da expressão da molécula de adesão ICAM-1. Apesar da redução no tamanho, foi visto que a composição celular dos granulomas em animais tolerantes foi similar aos demais grupos (CARVALHO et al. , 2002 ; AZEVEDO JÚNIOR et al. , 2012). Então, seria interessante também comparar as moléculas de adesão no pulmão de animais tolerantes e controle após a instilação com sulfato de bleomicina.

Tobagus, Thomas e Holt (2004) mostraram que o adjuvante é necessário para desencadear os mecanismos de tolerância oral e que o tipo de adjuvante usado na hora do desafio interfere em aspectos qualitativos desses mecanismos. Os autores mostraram que o adjuvante CFA induziu inibição significativa de IgG2a, IL-2, e respostas de IFN- $\gamma$ , enquanto que respostas IL-5 foram aumentadas. Em contraste, o desafio em hidróxido de alumínio Al(OH)<sub>3</sub> resultou numa significativa inibição de IGg1, IgE, IL-2, e respostas IL-5, enquanto respostas de IFN-  $\gamma$  foram aumentadas.

Apesar de não existir uma clara explicação para a patogênese da fibrose pulmonar induzida por sulfato de bleomicina, no nosso trabalho, a imunização com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> foi suficiente para bloquear o aumento de leucócitos total e diferencial no pulmão dos animais instilados com sulfato de bleomicina. Se a inibição das citocinas e imunoglobulinas vistas por Tobagus, Thomas e Holt (2004) podem influenciar nas reações desencadeadas por sulfato de bleomicina, são necessários mais estudos.

Apesar da diferença do influxo de células inflamatórias vista no lavado broncoalveolar, a análise fibrótica dos pulmões com 7 e 21 dias após a instilação com sulfato de bleomicina não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os animais tratados com a droga. Assim, acredita-se que pode ter acontecido uma redução na migração de células inflamatórias para o pulmão na primeira fase da doença pulmonar neste modelo experimental, o que é apoiado pela redução de células no lavado, mas a redução da inflamação não interferiu no estabelecimento da fibrose.

Os mecanismos patológicos da fibrose pulmonar idiopática e fibrose produzida por sulfato de bleomicina ainda não estão totalmente claros. O papel da inflamação na

doença vem sendo questionado desde que foi visto que terapias imunossupressivas/anti-inflamatórias não diminuíram a fibrose (DATTA , SCOTTON e CHAMBERS, 2011).

Em estudos recentes de fibrose pulmonar por sulfato de bleomicina, as lesões nas células epiteliais pulmonares e as transformações epitélio-mesenquimais nestas células têm sido consideradas como os fatores mais importantes para a ocorrência da fibrose (KARO-ATA et al. , 2016).

Collard et al (2004) estudaram o efeito do tratamento combinado de corticosteroide e ciclofosfamida em 164 pacientes com fibrose pulmonar idiopática e mostraram que a terapia usada não teve nenhum impacto na sobrevivência dos pacientes. Os autores sugeriram que esse achado apoia a teoria que a inflamação crônica desempenha um papel mínimo na progressão da fibrose intersticial pulmonar.

Como os efeitos indiretos da tolerância oral agem principalmente na inflamação, nosso trabalho é mais um indício de que a fibrose produzida por sulfato de bleomicina não é inflamação-dependente, já que neste modelo houve uma redução das células no lavado broncoalveolar, porém não houve alteração na fibrose segundo a escala de Ascroft.

A deposição de colágeno num modelo de ferida incisional foi alterada pelo efeito indireto da tolerância oral. Neste modelo foi visto redução na área da ferida com padrão de deposição da matriz extracelular similar ao da pele intacta. O número de miofibroblastos foi diminuído, mas a intensidade de fluorescência para colágenos I e II na área da ferida foi maior nos animais tolerantes não diferindo da pele intacta (COSTA et al. , 2011).

Quando analisada a fibrose causada por infarto do miocárdio induzida por isoproterenol em um modelo animal, foi visto que os animais tolerantes a componentes cardíacos tiveram resposta fibrótica reduzida com menor deposição de colágeno (RAMOS et al. , 2012).

Assim pode-se dizer que os efeitos indiretos da tolerância oral são capazes de bloquear certas reações inflamatórias e, às vezes, as consequências destas. Para auxiliar o entendimento de como esse bloqueio ocorre é necessário que os modelos de inflamação estudados sejam muito bem caracterizados. Assim, sabendo-se o que causa a inflamação ou quais vias levam a esta, pode-se tentar desvendar onde atua o efeito indireto para que ela seja bloqueada. Além disto, se a inflamação for um componente

importante do mecanismo da fibrose pode-se sugerir que os efeitos indiretos da tolerância oral serão capazes de bloqueá-la.

## **7 CONCLUSÃO**

- A imunização parenteral com OVA+Al (OH)<sub>3</sub>, independente de o animal ter ingerido OVA anteriormente, foi capaz de reduzir a quantidade de leucócitos total, bem como de macrófagos, neutrófilos e linfócitos no lavado broncoalveolar, produzido por sulfato de bleomicina.

- O bloqueio da inflamação induzida por sulfato de bleomicina no pulmão não alterou a fibrose encontrada posteriormente neste órgão. Assim nossos resultados reforçam a linha de estudos sobre a patogênese da fibrose pulmonar que afirma que a inflamação não é essencial ou não influencia na fibrose por sulfato de bleomicina.

- O modelo de fibrose pulmonar induzida por sulfato de bleomicina não é um bom modelo para estudar os mecanismos que envolvem os efeitos indiretos da tolerância oral porque não há uma distinção clara entre animais tolerantes e não tolerantes.

## REFERÊNCIAS

ARIZMENDI , N. *et al.* Rac2 is involved in bleomycin-induced lung inflammation leading to pulmonary fibrosis. **Respiratory Research** v. 15, n.71, p.1-13, 2014.

AKRAM, K. M. *et al.* Alveolar epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis display upregulation of TRAIL, DR4 and DR5 expression with simultaneous preferential over-expression of pro-apoptotic marker p53. **Int J Clin Exp Pathol** , v.7, n. 2, p. 552-64, 2014.

AKGÜN, K. M. ; CROTHERS, K. e PISANI, M. Epidemiology and Management of Common Pulmonary Diseases in Older Persons. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** , v. 67A, n.3 , p.276–91, 2012.

AZEVEDO JÚNIOR, G. M. *et al.* Indirect effects of oral tolerance inhibit pulmonary granulomas to *Schistosoma mansoni* eggs. **Clin Dev Immunol**, 2012.

BARBAS-FILHO, J. , V. *et al.* Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP). **J Clin Pathol.** , v.54, p 132–38, 2001.

BORENSZTAJN, K. ; CRESTANI, B. ; KOLB, M. Idiopathic pulmonary fibrosis: from epithelial injury to biomarkers – insights from the bench side. **Respiration**, v. 86, p. 441–52, 2013.

BRAUN, R. K. *et al.* Transfer of tolerance to collagen type V suppresses Th-17 lymphocyte mediated acute lung transplant rejection. **Transplantation** v.88, n. 12, p.1341–48, 2009.

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

BRINGARDNER, B. D. *et al.* The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Antioxid Redox Signal.** , v.10, n.2, p. 287–301, 2008.

BRUECE, M. G. e FERGUSON, A. Oral tolerance to ovalbumin in mice: studies of chemically modified and 'biologically filtered' antigen. **Immunology** , v. 57, p. 627-30, 1986.

CARVALHO, C. R. *et al.* Indirect effects of oral tolerance in mice. **Scand. J Immunol.** ,v. 9, p.533-38, 1994.

CARVALHO, C. R. e VAZ, N. M. Indirect effects are independent of the way of tolerance induction. **Scand. J Immunol.** ,v. 43, p. 613-18, 1996.

CARVALHO, C. R.; VERDOLIN, B. A.; VAZ, N. M. Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. **Scand. J Immunol.** , v. 45, p. 276-81, 1997.

CARVALHO, C. R. et al. Indirect effects of oral tolerance to ovalbumin interfere with the immune responses triggered by *Schistosoma mansoni* eggs. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** v.35, p. 1195-99, 2002.

CASTRO-JÚNIOR, A. B. et al. Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity. **Cellular Immunology**, v. 280, p. 171–81, 2012.

CHAUDHARY, N. I.; SCHNAPP, A.; PARK, J. E. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. **Am J Respir Crit Care Med.** , v. 173, p. 769–76, 2006.

COLLARD, H. R. et al. Combined corticosteroid and cyclophosphamide therapy does not alter survival in idiopathic pulmonary fibrosis. **Chest** , v.125, n.6, p. 2169-74, 2004.

COLETTA, E. N. A. M. et al. Achados histológicos e sobrevida na fibrose pulmonar idiopática. **J Pneumol** ,v. 29, n.6, p.371-78 ,2003.

COSTA, R. A. et al. Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin. **Wound Rep Reg.** , v. 19, n. 4, p. 487-97, 2011.

COSTA, R. A. *et al.* Systemic effects of oral tolerance reduce the cutaneous scarring. **Immunobiology**. 2015. DOI: 10.1016/j.imbio.2015.11.002 Disponível online <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171298515300863>. Acesso em 18/12/2015

CUNHA, A. P. da . et al. Different requirements for the adoptive transfer of oral tolerance and its indirect effects assessed by DTH and antibody responses in mice. **Cellular Immunology**, v. 258, p. 152–60, 2009.

DATTA, A. ; SCOTTON, C. J. E CHAMBERS, R. C. Novel therapeutic approaches for pulmonary fibrosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, p. 141–172, 2011.

EGGER, C. et al. Administration of bleomycin via the oropharyngeal aspiration route leads to sustained lung fibrosis in mice and rats as quantified by UTE-MRI and histology. **Plos One** , v. 8, n. 5, p. 1- 13, 2013.

ERMIS, H. et al. Protective effect of dexpanthenol on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** , v.386, p.1103–10, 2013.

FARIA, A. M. C. *et al.* Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization. **Immunology** , v.78, p.147-51, 1993.

FARIA, A. M. C. *et al.* Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. **Mechanisms of Ageing and Development** , v.102, p.67-80, 1998.

FARIA, A. M. C. ; WEINER, H. L. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. **Adv. Immunol.** , v. 73, p. 153-208, 1999.

FARIA, A. M. C. ; WEINER, H. L. Oral Tolerance. **Immunological Reviews**, v.206, p.232-59, 2005.

FATTMAN, C. L. Apoptosis in pulmonary fibrosis: too much or not enough? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 2, p. 379-85, 2008.

GUNTHER, A. *et al.* Unravelling the progressive pathophysiology of idiopathic pulmonary fibrosis. **Eur Respir Rev** , p. 152–60 n. 21, v. 124, 2012.

HANSON, D. G. *et al.* Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. **Int. Arch. Allergy** , v. 55, p.526–32, 1977.

HUBER, A. *et al.* Spontaneously relapsing-remitting experimental autoimmune uveitis in rats allows successful therapeutic oral tolerance induction in ongoing disease. **Mol Immunol**, v. **63**, n.2, 215-26, 2015.

IZBICKI, G. *et al.* Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. **Int. J Exp. Path.** , v. 83, p. 111-19, 2002.

JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KARO-ATA, D. *et al.* A protective role for IL-13 receptor  $\alpha$  1 in bleomycin-induced pulmonary injury and repair. **Mucosal Immunology**, v.9, p. 240-53, 2016.

KAWANO-DOURADO, L. , KAIRALLA, R. A. , CARVALHO, C. R. R . Fibrose Pulmonar Idiopática: Uma Atualização. **Pulmão RJ**, v. 22, p. 33-37, 2013.

KEKEVIAN, A. ; GERSHWIN, M. E. ; CHANG, C. Diagnosis and classification of idiopathic pulmonary fibrosis. **Autoimmunity Reviews** , v. 13 , p. 508–12, 2014.

KILIC, T. *et al.* Protective and Therapeutic Effect of Apocynin on Bleomycin- Induced Lung Fibrosis in Rats. **Inflammation**, v. 38, n. 3, p. 1166-80, 2014.

KIM, K. K. *et al.* Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. **PNAS** , v. 103, n. 35, 2006.

KINDER, B. W. *et al.* Baseline BAL Neutrophilia Predicts Early Mortality in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **CHEST** , v.133 p.226-32, 2008.

KING, T. E. *et al.* Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Relationship between Histopathologic Features and Mortality. **Am J Respir Crit Care Med** , v. 164, p. 1025–32, 2001.

KORFEI, M. et al. Epithelial Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Sporadic Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med** v.178, p. 838–46, 2008.

KOTSIANIDIS, I. et al. Global Impairment of CD4 + CD 25+ FOXP3+ Regulatory T Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 179. p 1121–30, 2009.

LATTA, V. D. et al. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. **Pharmacological Research**, v. 97, p. 122–30, 2015.

LEKKERKERKER, A. N. et al. Cellular Players in Lung Fibrosis. **Current Pharmaceutical Design**, v.18, p. 4093-102, 2012.

LIU, W. et al. Antiflammin-1 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Respiratory Research**, v.14, n. 101, p. 1-11, 2013.

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

MORRISON, L. D. ; NOBLE, P. W. Doenças Pulmonares Intersticiais e Fibróticas. Disponível em: [http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/5307/doencas\\_pulmonares\\_intersticiais\\_e\\_fibroticas\\_%E2%80%93lake\\_d\\_morrison\\_paul\\_w\\_noble.htm](http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/5307/doencas_pulmonares_intersticiais_e_fibroticas_%E2%80%93lake_d_morrison_paul_w_noble.htm), acesso: 01/07/2015.

MOWAT, A. M. Anatomical Basis of Tolerance and Immunity to Intestinal Antigens. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p. 331-41, 2003.

MOWAT, A. M. e AGACE , W. W.Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* v.**14**, n.10, p. 667-85, 2014.

MUNGUNSUKH, O. et al. Bleomycin induces the extrinsic apoptotic pathway in pulmonary endothelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v. 298, n. 5 , p. 696-703, 2010.

MURAKAMI, K. et al. Knock Out of S1P3 Receptor Signaling Attenuates Inflammation and Fibrosis in Bleomycin-Induced Lung Injury Mice Model. **PLOS ONE**, v. 9, n.9, p.1-10, 2014.

NICHOLSON, A. G. et al. The Relationship between Individual Histologic Features and Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med** ,v. 166, p. 173–77, 2002.

OLIVEIRA, R. P. et al. Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects. **J Immunol Methods**, v. **421**, p.36-43, 2015.

PENG, R. et al. Bleomycin Induces Molecular Changes Directly Relevant to Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Model for “Active” Disease. **PLOS ONE** , v. 8, n.4, p.1 -15, 2013.

PÉREZ, E. R. F. et al. Incidence, Prevalence, and Clinical Course of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. A Population-Based Study. **Chest** , v. 137, p.129–137, 2010.

RANG, H. P. et al. Farmacologia. 6° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAMOS, G. C. et al. Cell-mediated immune response to unrelated proteins and unspecific inflammation blocked by orally tolerated proteins. **Immunology**, v. 126, n.3, p. 354-62, 2008.

RAMOS, G. C. et al. The autoimmune nature of post-infarct myocardial healing: oral tolerance to cardiac antigens as a novel strategy to improve cardiac healing. **Autoimmunity**, v. 45, n. 3, p. 233-44, 2012.

RAGHU, G. et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. **Am J Respir Crit Care Med** , v. 183, p. 788–824, 2011.

RAZZAQUE, M. S. e TAGUCHI, T. Pulmonary fibrosis: Cellular and molecular events. **Pathology International** , v.53, p. 133-45, 2003.

RHEE, C. K. *et al.* Effect of Nilotinib on Bleomycin-Induced Acute Lung Injury and Pulmonary Fibrosis in Mice. **Respiration** , v.82, p. 273–87, 2011.

RODRIGUES, C. M. et al. Systemic effects of oral tolerance on inflammation: mobilization of lymphocytes and bone marrow eosinopoiesis. **Immunology**, v. 117, p. 517–25, 2006.

RUBIN, A. S. et al. Pneumopatas induzidas por fármacos. **Revista AMRIGS**, v.44, n.3, p. 174-80,200.

RUSSO, M. et al. Suppression of Asthma-like Responses in Different Mouse Strains by Oral Tolerance. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** ,v. 24, p. 518–26, 2001.

SAITO, F. *et al.* Role of Interleukin-6 in Bleomycin-Induced Lung Inflammatory Changes in Mice. **Am J Respir Cell Mol Biol** , v. 38. p. 566–71, 2008.

SELMAN, M. e PARDO, A. Role of Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. From Innocent Targets to Serial Killers. **Proc Am Thorac Soc** , v. 3 , p. 364–72, 2006.

SEBTI, S. M. et al. Bleomycin Hydrolase: Molecular Cloning, Sequencing, and Biochemical Studies Reveal Membership in the Cysteine Proteinase Family. **Biochemistry** , v. 28, p. 6544-48, 1989.

SILVA, Diana Vilas Boas e. Efeitos sistêmicos da tolerância oral diminuem a gravidade da reação de enxerto-*versus*-hospedeiro em camundongos. 2008. 73f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SISSON, T. , H. et al. Targeted Injury of Type II Alveolar Epithelial Cells Induces Pulmonary Fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med.** ,v.181, p. 254-63, 2010.



Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. CARVALHO, C. R. R. (Ed. chefe). Diretrizes de doenças pulmonares intersticiais da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **J Bras Pneumol.** , v.38, Suplemento 2, p. S1-S133, 2012. Disponível em: [http://www.jornaldepneumologia.com.br/pdf/suple\\_209\\_71\\_completo\\_supl02\\_jbp\\_2012\\_.pdf](http://www.jornaldepneumologia.com.br/pdf/suple_209_71_completo_supl02_jbp_2012_.pdf) , acesso : 01/07/2015.

STROBEL, S. ; MOWAT, A. M. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. **Immunology Today**, v. 19, n. 4, p. 173-81, 1998.

SWIGRIS, J. , J. *et al.* Ethnic and racial differences in the presence of idiopathic pulmonary fibrosis at death. **Respir Med**, v.106, n.4, p.588–93, 2012.

TANJORE, H. *et al.* Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med** , v.180. p. 657–65, 2009.

TOBAGUS, I. T. ; THOMAS, W. R. e HOLT, P. G. Adjuvant Costimulation during Secondary Antigen Challenge Directs Qualitative Aspects of Oral Tolerance Induction, Particularly during the Neonatal Period. **J Immunol**, v. 172, p.2274-85, 2004.

VAZ, N. M. et al. Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 76 , p. 83-91, 1981.

VAZ, N. M. et al. The conservative physiology of the immune system. **Braz J Med Biol Res** , v. 36, p. 13-22, 2003.

VAZ, N. M. e CARVALHO, C. R. On the origin of immunopathology. **J Theor Biol** , v. 375, p.61-70, 2015.

VERDOLIN, B. A. et al. Systemic immunization of mature mice by the oral route. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** ,v. 26, n.7, p.725-34, 1993.

VERDOLIN, B. A. et al. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n.2, p. 211-19, 2001.

WARD, P. A. e HUNNINGHAKE, G. W. Lung Inflammation and Fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med** ,v. 157, p S123–29, 1998.

VITTAL, R. *et al.* Type V collagen induced tolerance suppresses collagen deposition, TGF-b and associated transcripts in pulmonary fibrosis. **Plos One**, v. 8, n. 10, 2013.

WEINER, H. L. Oral Tolerance. **Proc. Nadl. Acad. Sci.** ,v.91, p. 10762-65, 1994.

WEINER, H. L. Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. **The Journal of Clinical Investigation**, v.106, n. 8, p. 935-37, 2000.

WEINER, H. L. Oral Tolerance. **Immunological Reviews** , v. 241, p.241-59, 2011.

WOLTERS, P. J., Collard, H. R. , Jones, K. D. Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Annu Rev Pathol** , v.9, p.157–79, 2014.

WORBS, T. et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. **JEM**, v. 203, n.3, p. 519–27, 2006.

WUYTS, W. A. et al. Differential diagnosis of usual interstitial pneumonia: when is it truly idiopathic?. **Eur Respir Rev** v.23 p.308–19, 2014.

YANG, S. et al. Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. *Science* , v. **348**, n.6234, p. 589-94, 2015.

YASUFUKU, K. et al. Oral Tolerance Induction by Type V Collagen Downregulates Lung Allograft Rejection. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** v. 25, p. 26–34, 2001.