

Remo de Castro Russo



Belo Horizonte
Agosto de 2005

Remo de Castro Russo

**Efeito da administração do antagonista de receptor
CXCR2 no modelo de fibrose pulmonar induzido por
bleomicina.**

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

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira
(Dpto. de Bioquímica e Imunologia)

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG
Agosto de 2005



Universidade Federal de Minas Gerais -
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte - MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE REMO DE CASTRO RUSSO. Aos doze dias do mês de agosto de 2005 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *Ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar em exame final, o trabalho intitulado “Efeito da Administração do Antagonista de Receptores CXCR2 no Modelo de Fibrose Pulmonar Induzido por Bleomicina” requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão Dr. Mauro Martins Teixeira da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Ana Maria Caetano de Faria da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Marcus Vinicius Andrade da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Mauro Martins Teixeira da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 12 de agosto de 2005.

Anamariacatania

Dra. Ana Maria Caetano de Faria - UFMG

Marcelo Santoro
 Prof. Marcelo Matos Santoro
 Coordenador do Curso de Pós-Graduação em
 Bioquímica e Imunologia - ICB-UFMG

Marcus V Andrade

Dr. Marcus Vinicius Andrade - UFMG

Mauro Martins Teixeira

Dr. Mauro Martins Teixeira - orientador - UFMG

“A verdade é que na vida nos dão muito enredo e muito pouco tempo.”

(Millôr Fernandes)

Aos meus pais Jones e Antônia, e irmãs Rafaela e Raíssa, por todo apoio, carinho e incentivo em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira, pela grande oportunidade que foi me dada e pela confiança depositada em meu trabalho. Agradeço por abrir as portas de seu laboratório, pelos ensinamentos passados, pela motivação, por participar de forma tão importante da minha formação, pelo convívio, paciência e puxões de orelha.

Aos meus grandes amigos Rodrigo, Adriano, Ester e Lucíola, que fiz no laboratório ao longo destes três anos de convívio e aprendizado, pela ajuda nos experimentos, pelas discussões científicas, pelos conselhos dados, sorrisos estampados no rosto e pela força nos momentos difíceis. Nada disso poderia se tornar realidade sem a ajuda de vocês;

A todos os alunos do laboratório de Imunofarmacologia, que participaram e colaboraram diretamente na execução deste trabalho, pelo incentivo, companheirismo e ensinamentos.

Ao Antônio Lúcio Teixeira Júnior, pelo apoio psiquiátrico;

À Valdinéria, Ilma e Tereza pelo apoio técnico;

Ao Zé Carlos e Carlinhos do biotério pelo cuidado com os nossos animais;

Ao Dr. Francesco Colotta e Dr. Ricardo Bertini (Dompé Research and Development, Dompé S.p.A., L'Aquila, Itália) pelo fornecimento do antagonista de receptor CXCR2;

Ao Prof. Geovani Dantas Cassali, pela imensa ajuda com as análises histopatológicas;

Ao Jamil, do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas;

À Celise e Débora, funcionárias do Departamento de Bioquímica e Imunologia pela atenção e auxílio com a parte burocrática;

Aos colegas do curso de Bases, por tudo que passamos juntos;

A Deus, por me guiar sempre.

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMO.....	13
1-INTRODUÇÃO.....	14
1.1-FIBROSE PULMONAR.....	14
1.2-BLEOMICINAS.....	17
1.3-MODELO EXPERIMENTAL DE ESTUDO.....	19
1.3.1-Características do modelo.....	19
1.3.2-Reparo tecidual pulmonar.....	20
1.3.3-Aspectos inflamatórios.....	22
1.3.4-Mediadores inflamatórios importantes no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina.....	23
1.4-NEUTRÓFILOS.....	28
1.5-QUIMIOCINAS COMO ALVO PARA INTERVENÇÃO FARMACOLÓGICA.....	31
2-OBJETIVOS.....	33
2.1-OBJETIVO GERAL.....	33
2.1.1-Objetivos específicos.....	33
3-MATERIAL E METODOS.....	34
3.1-ANIMAIS.....	34
3.2-MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR BLEOMICINA.....	34
3.3-TRATAMENTO COM ANTAGONISTA DE RECEPTOR CXCR2.....	34
3.4-LAVADO BRONCO-ALVEOLAR.....	35
3.5-DOSAGEM DE NITRITO DO LAVADO BRONCO-ALVEOLAR.....	35

3.6-RETIRADA DO PULMÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	36
3.7-ENSAIO PARA DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE <i>NAG</i> TECIDUAL.....	36
3.8-ENSAIO PARA DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE <i>MPO</i> TECIDUAL.....	37
3.9-ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL.....	37
3.10-DETECÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS.....	38
3.11-HISTOPATOLOGIA.....	38
3.12-ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	39
3.13-DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	39
4-RESULTADOS.....	41
4.1-PADRONIZAÇÃO DO MODELO.....	41
4.1.1-Bleomicina causa recrutamento celular para pulmão de maneira dose-dependente.....	41
4.1.2-Characterização da resposta inflamatória e fibrose pulmonar induzida por bleomicina.....	43
4.1.3-Characterização do perfil de produção de citocinas e quimiocinas após administração de bleomicina.....	47
4.2-TRATAMENTO COM ANTAGONISTA DE RECEPTOR CXCR2.....	49
4.2.1-O tratamento com antagonista de receptor CXCR2 inibiu o recrutamento de neutrófilos para o pulmão induzido por bleomicina de maneira dose-dependente.....	49
4.2.2-Efeito do tratamento com DF2162 6 mg/kg animal sobre o recrutamento celular.....	51
4.2.3-Efeito do tratamento com DF2162 6 mg/kg animal sobre a produção de citocinas e quimiocinas.....	53
4.2.4-Efeito do tratamento com DF2162 6 mg/kg animal na lesão pulmonar e fibrose.....	56

4.2.5-Efeito do tratamento com DF2162 na sobrevida dos animais desafiados com bleomicina.....	59
4.3-SUMÁRIO DOS RESULTADOS.....	60
5-DISCUSSÃO.....	61
6-CONCLUSÃO.....	68
7-ABSTRACT.....	69
8-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura – 1. Estrutura molecular bleomicina e seus domínios funcionais.....	18
Figura – 2. Família das quimiocinas e seus respectivos receptores.....	27
Figura – 3. Ilustração da migração neutrofílica do lúmen capilar para o espaço alveolar.....	29
Figura – 4. Delineamento experimental. Esquema demonstrando tratamento com DF2162, administração de bleomicina e tempos para coleta de material.....	40
Figura – 5. Recrutamento celular induzido por bleomicina ocorre de maneira dose-dependente.....	42
Figura – 6. Cinética para caracterização do modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal.....	44
Figura – 7. Cinética para caracterização do modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal.....	46
Figura – 8. Produção de citocinas e quimiocinas pelo pulmão induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal.....	48
Figura – 9. A administração de antagonista de receptor CXCR2 (DF2162) inibe o recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar de maneira dose-dependente no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal.....	50
Figura – 10. Efeito da administração de antagonista de receptor CXCR2 (DF2162) na dose de 6 mg/kg animal 2 x ao dia, sobre o recrutamento celular no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal.....	52
Figura – 11. Efeito da administração de antagonista de receptor CXCR2 (DF2162) na dose de 6 mg/kg animal 2 x ao dia, sobre a produção de citocinas e quimiocinas no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal.....	54

Figura – 12. Efeito da administração de antagonista de receptor CXCR2 (DF2162) na dose de 6 mg/kg animal 2 x ao dia, sobre a produção de citocinas e quimiocinas no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal.....	55
Figura – 13. Efeito da administração de antagonista de receptor CXCR2 (DF2162) na dose de 6 mg/kg animal 2 x ao dia, sobre lesão pulmonar no modelo experimental de fibrose induzida por bleomicina. Hematoxilina e Eosina.....	57
Figura – 14. Efeito da administração de antagonista de receptor CXCR2 (DF2162) na dose de 6 mg/kg animal 2 x ao dia, sobre a deposição de colágeno pulmonar no modelo experimental de fibrose induzida por bleomicina. Tricrômico de Gomori.....	58
Figura – 15. Letalidade. Efeito da administração de antagonista de receptor CXCR2 (DF2162) na dose de 6 mg/kg animal 2 x ao dia, sobre a letalidade no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

C5a – fator 5a do complemento
DNA – ácido desoxirribonucléico
ELR – glutamato-leucina-argina
fMLP – N-formil-metionil-leucil-fenilamina
GRO $\alpha/\beta/\gamma$ – growth-related oncogene $\alpha/\beta/\gamma$
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HOCl – ácido hipocloroso
IFN- γ – interferon- γ
IL-1 – interleucina-1
IL-12 – interleucina-12
IL-1 β – interleucina-1 β
IL-6 – interleucina-6
IL-8 – interleucina-8
IP-10 – interferon-inducible protein-10
KC – Keratinocytes chemoattractant
kD – kiloDalton
LPS – lipopolissacarídeo
LTB₄ – leucotrieno B₄
MIG – monokine induced by interferon
MIP-1 β - macrophage inflammatory protein1 β
MIP-1 α - macrophage inflammatory protein1 α
MIP-2 – macrophage inflammatory protein-2
MPO – mieloperoxidase
mRNA – ácido ribonucléico mensageiro
NK – natural killer
PAF – pletelet activacting factor
PGE – prostaglandina
RANTES - regulated on activation normal T cell expressed and secreted
RNA – ácido ribonucléico
TGF- β – transforming growth factor
TLRs – toll-like receptor
TNF- α – tumoral necrosis factor- α
VEGF – vascular endothelial growth factor

RESUMO

A fibrose pulmonar é uma doença caracterizada pela deposição intersticial progressiva de colágeno, que acarreta alterações na arquitetura normal pulmonar e perda da função, podendo levar ao óbito. As inflamações agudas pulmonares e a sua cronificação estão associadas a fenômenos fibróticos, sendo responsáveis por seu desencadeamento. A inflamação que precede a instalação da fibrose pulmonar é caracterizada pelo influxo de células inflamatórias, culminando na liberação de mediadores que perpetuam o dano inicial. Desta forma, é provável que a inibição da resposta inflamatória seja capaz de diminuir a deposição de colágeno intersticial. O modelo de fibrose pulmonar induzido por bleomicina é caracterizado por um intenso influxo de neutrófilos, concomitantemente com uma produção de citocinas, níveis elevados das quimiocinas CXCL1-3/KC e CXCL1-2/MIP-2, e posterior deposição de colágeno no parênquima pulmonar.

No presente trabalho, estudamos os efeitos da administração do DF2162, um antagonista de receptores de quimiocinas CXCR2, no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos. Nossos dados mostram que a administração da dose de 6 mg/kg de DF2162, duas vezes ao dia, inibiu de forma significativa os picos de influxo neutrofilicos após administração de 0,125 U de bleomicina por via intra-traqueal. Entretanto, DF2162 não alterou os níveis das citocinas de caráter modulatório tais como IFN γ , IL-10 e VEGF, importantes para o processo inflamatório. As quimiocinas CXCL1-3/KC, CXCL1-2/MIP-2, CCL2/JE, CCL3/MIP-1 α e CXCL10/IP-10 quantificadas também não apresentaram mudanças no seu perfil de produção, com exceção para CCL5/RANTES, que foi inibida, e CXCL9/MIG, que apresentou níveis elevados numa fase mais inicial, pelo tratamento com este antagonista. Além disso, foram verificadas alterações patológicas que revelaram uma inflamação menos severa e uma menor deposição de colágeno intersticial no pulmão dos animais tratados com DF2162. Entretanto, apesar de uma melhora em todos os aspectos inflamatórios estudados, os animais que receberam DF2162 apresentaram um índice de letalidade de 66,6%; enquanto que no grupo controle foi observado a morte de apenas 25% dos animais.

Estes dados em conjunto sugerem que o receptor CXCR2 exerça papel importante na regulação do processo inflamatório e fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Apesar disso, o incremento na taxa de letalidade no grupo de animais que receberam tratamento com DF2162 após instilação de bleomicina provavelmente não está relacionado ao processo fibrótico em si, mas depende de outros fatores que serão investigados em estudos posteriores.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – FIBROSE PULMONAR

Fibrose pulmonar é o estágio final comum entre um grupo diverso de distúrbios pulmonares conhecidos como Doença Intersticial Pulmonar. Aproximadamente cinco milhões de pessoas sofrem com a fibrose pulmonar no mundo todo, sendo que 200.000 destes são de nacionalidade americana, dos quais 40.000 morrem anualmente (MOHAMMED *et al.*, 2003). Apesar de possuírem diferenças peculiares, as Doenças Intersticiais Pulmonares são agrupadas por apresentarem manifestações clínicas semelhantes, classificadas por alterações patológicas, fisiológicas e radiográficas, e com graus de morbidade diferentes (SELMAN *et al.*, 2001).

Sua origem pode ser categorizada de duas formas: (i) de origem conhecida, tais como danos traumáticos, infecções, indução por drogas, autoimunidade ou exposição a produtos tóxicos, que desencadeiem uma resposta inflamatória potencialmente danosa e reparo tecidual, como no caso da Lesão Pulmonar Aguda; e (ii) de origem desconhecida, tais como sarcoidose e pneumonia intersticial descamativa, ambas causadas por inflamação sem ação direta de um agente lesivo conhecido, ou ainda que possam originar uma resposta fibrótica sem associação direta a um estímulo inflamatório, que também é conhecida como Fibrose Pulmonar Idiopática. Desta forma, são propostas duas rotas distintas que guiam o desenvolvimento de uma resposta fibrótica pulmonar, na qual a primeira é via inflamação, sendo responsável pela maior parte das doenças intersticiais pulmonares não idiopáticas; e a segunda, via um estado diferencial de ativação de células endoteliais independente de um processo inflamatório, nas quais estas células exibem um perfil de ativação que favorecem a expressão de fatores de crescimento, proliferação, ativação e mudança fenotípica de fibroblastos em miofibroblastos levando a uma excessiva deposição de matriz extracelular e formação de grandes centros de proliferação fibroblástica, chamados focos fibroblásticos. Alguns fatores importantes estão intimamente relacionados aos distúrbios pulmonares, que regem de certa forma a intensidade da resposta fibrosante, e dentre eles ressaltamos a idade, a pré-disposição genética e os fatores ambientais (KATZENSTEINE *et al.*, 1998; SELMAN *et al.*, 2002).

A resposta inflamatória pulmonar, independente do tipo de agente etiológico causador da lesão, envolve uma complexa gama de interações entre fatores solúveis, células e o micro-ambiente alveolar, que disparam assim uma resposta reparativa tecidual, também

complexa e com participação de mecanismos regulatórios necessários à resolução deste dano (LAWRENCE *et al.*, 2001; NATHAN, 2002).

Diversos distúrbios fibróticos pulmonares são atribuídos a diferentes estímulos inflamatórios correlacionados ao estilo de vida. A Fibrose Pulmonar Intersticial é encontrada em autópsia de usuários crônicos de tabaco, de forma microscópica difusa e com manifestações radiológicas visíveis, demonstrando a existência de uma relação intrínseca entre intensidade e exposição ao tabaco e o grau de severidade da fibrose. Isto é confirmado por estudos em modelos animais, com exposição prolongada ou intensa a fumaça de cigarro (WEISS, 1998).

Da mesma forma, a exposição a poeiras orgânicas e demais partículas como amianto e sílica podem iniciar uma inflamação pulmonar causada pela deposição destes antígenos potenciais durante um tempo mais prolongado. Isto é relatado em trabalhadores do campo, fazendeiros e trabalhadores de minas de extração de carvão e demais minerais. Em crianças, a inalação de poeiras orgânicas pode levar a uma pneumonite de hipersensibilidade, que inicialmente é diagnosticada por tosse e dispnéia. O estágio fibrótico dá-se por anos de exposição e cronificação desta pneumonite. Intimamente relacionada está a silicose, causando insuficiência respiratória e fibrose, que também tem perfil semelhante ao encontrado em indivíduos expostos a partículas de amianto. A deposição de colágeno nestes tipos de manifestações geralmente é resultado de uma falha ou remoção inefetiva destas partículas pelos macrófagos no tecido pulmonar (WRZASZCZYK *et al.*, 1996; ORTUNO, 1998; WIATR *et al.*, 2004).

A autoimunidade também tem participação, de forma menos significativa e com baixa incidência, no desencadeamento de uma resposta fibrótica pulmonar. Evidências clínicas de anormalidades na função pulmonar ocorrem em 70% dos pacientes diagnosticados com esclerose sistêmica; particularmente uma alveolite fibrosante é mais frequentemente observada em pacientes com a forma cutânea da esclerose sistêmica (SAHHAR *et al.*, 2004). Também há uma contribuição da autoimunidade desencadeada por agentes infecciosos para o aparecimento de fenômenos fibróticos pulmonares. Existe uma forte correlação entre alveolite fibrosante e crioglobulinemia mista, que é uma doença autoimune também disparada pelo vírus da hepatite C, e caracterizada por ser um distúrbio linfo-proliferativo, responsável pelo aumento imunocomplexos circulantes, com deposição destes nos vasos de pequeno a médio calibre, ativação do complemento, que levam a uma vasculite sistêmica, comprometendo o tecido pulmonar (FERRI *et al.*, 2002).

Outras doenças também participam como fenômeno de desencadeamento de uma resposta reparativa. A aspiração de suco gástrico em pacientes com refluxo gastroesofágico pode ser um estímulo inicial inflamatório, que pode se cronificar após sucessivas exposições. Estudos em modelos experimentais de instilação intra-traqueal de ácido em porcos confirmam estas evidências (RAGHU, 2003).

Nem toda inflamação crônica pulmonar deve necessariamente desencadear um quadro de fibrose pulmonar intersticial. Neste caso destacamos a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica, que apesar de serem guiadas por uma inflamação crônica das vias aéreas, com alteração morfológica e estrutural, é caracterizada pela alta deposição de elementos da matriz extracelular nos condutos aéreos (JEFFERY, 2001).

Alterações genéticas também já foram descritas como participantes diretas nos processos fibróticos. Mutações nos genes que codificam a Proteína C surfactante são responsáveis pela expressão de uma forma truncada desta proteína, que causa acúmulo no retículo endoplasmático das células alveolares do tipo II, levando a uma pneumonite progressiva e fibrose (NOGEE *et al.*, 2001).

Com o avanço tecnológico na área terapêutica, novas técnicas vêm sendo aplicadas no tratamento do câncer e de demais distúrbios proliferativos celulares. O uso de radioterapia ou de quimioterapia, ou o uso combinado de ambos estão associados a uma grande toxicidade pulmonar. Durante o tratamento radioterápico são relatadas lesões pulmonares agudas ou crônicas, de forma, dose e duração-dependentes, ou pela pré-existência de doença pulmonar, ou ainda, pelo uso concomitante de esteróides durante a radioterapia, que resultam em fibrose pulmonar severa. Neste tipo de intervenção clínica há o surgimento de efeitos adversos e indesejáveis, que limitam parcialmente a sua ampla utilização nos pacientes vítimas de câncer, uma vez que atuam de forma importante na sobrevida do doente. Estes fenômenos também são observados durante o tratamento baseado em quimioterapia que, também, tem papel importante na sobrevida destes. Dentre estes quimioterápicos destacamos as bleomicinas (ABID *et al.*, 2001).

1.2 – BLEOMICINAS

As bleomicinas pertencem a uma família de glicopeptídios classificados como um grupo de antibióticos antitumorais ou citotóxicos, primeiramente isolados de uma cepa do *Streptomyces verticillus* em 1966 por Umezawa e colaboradores (UMEZAWA *et al.*, 1966), *apud* (CHEN *et al.*, 2005).

Estudos de detalhamento estrutural, biossíntese, mecanismos de ação e terapêutica contribuíram para a ampla utilização clínica das bleomicinas, tornando-as um importante agente quimioterápico empregado no tratamento de neoplasias como carcinomas e linfomas (HECHT, 2000). Mesmo apresentando baixa mielossupressão e baixa imunossupressão (CHEN *et al.*, 2005), sua eficácia terapêutica é limitada devido ao aparecimento de reações pulmonares adversas, como pneumonite intersticial em 46% dos pacientes tratados com bleomicina, dos quais 3% morrem vítimas de fibrose pulmonar. Esta toxicidade é dependente da dose administrada e duração do tratamento, e envolve uma inflamação pulmonar que precede o aparecimento dos sintomas e do quadro de fibrose (SLEIJFER, 2001).

A forma comercial, Blenoxane[®] (Bristol-Myers Squibb), é composta por três formas de bleomicinas, que se diferem pela positividade de cargas da região de uma molécula denominada cauda bitiazol, sendo encontrados 60% de bleomicina A₂, 30% de bleomicina B₂ e 10% de componentes menores adicionais, dentre eles está a bleomicina A₅ (CHEN *et al.*, 2005). Sua forma ativada oxida lipídios, hidrolisa pontes amino das proteínas (RANA *et al.*, 1991), causa quebras duplas e simples de DNA (BURGER, 1998) e RNA (CARTER *et al.*, 1990) e demais conseqüências, como necrose tumoral e danos similares aos gerados pelo tratamento com radiação ionizante. Alguns tipos de tumores são mais susceptíveis ao tratamento com bleomicina em relação a outros tipos de tumores e demais tecidos normais, mas pouco se sabe ainda sobre essa citotoxicidade seletiva (CHEN *et al.*, 2005). Para se tornar ativa, cada molécula de bleomicina necessita da presença de um íon metal em transição reduzido, como por ferro (Fe²⁺) ou cobre (Cu⁺), assim como uma molécula de oxigênio (O₂) (KANE *et al.*, 1994. (a) e (b)).

Com o passar das décadas muito se aprendeu sobre a molécula de bleomicina. Hoje se sabe que esta molécula é muito conservada, com variação em apenas uma das três regiões que a compõem, sendo dividida por seus domínios funcionais (Figura 1): (i) Região de ligação ao metal, que forma complexos com os íons Fe²⁺ ou Cu⁺ e possui grupos amino N₃ e N₄ no domínio pirimidina, cuja função é definir a seqüência de clivagem e causar quebras duplas e simples dos ácidos nucléicos. Um dissacarídeo também é encontrado nesta região,

mas o papel destes açúcares permanece desconhecido; (ii) Região juncional, que é responsável pela união da cauda bitiazol à região de ligação ao metal. Esta porção dá flexibilidade à molécula e é essencial para que ocorra a quebra dupla de DNA; (iii) Cauda bitiazol, responsável pela ligação da bleomicina ao DNA baseada na positividade da cauda, que diferencia cada forma de bleomicina em A₂, A₅ e B₂ (CHEN *et al.*, 2005).

As bleomicinas não interferem diretamente na replicação de ácido dextrirribonucleico (DNA), síntese de ácido ribonucléico (RNA) ou síntese protéica, mas levam as mudanças globais na morfologia cromossômica, incluindo quebras, falhas, deleções e formações discêntricas e anelares, que ocorrem em concentração e tempo dependentes. Além disso, o dano ao DNA é dependente também da fase em que se encontra o ciclo celular. Células na fase estacionária (S) apresentam menos danos que células nas fases G1, G2 e M do ciclo celular. Outros mecanismos como os de captação extracelular e transporte intracelular da bleomicina, participação de ferramentas de reparo de DNA na morte tumoral por apoptose ou por necrose, e estudos da participação de cisteína-proteases que atuam no metabolismo da bleomicina em tecidos que não sofrem lesões tóxicas permanecem pouco conclusivos (CHEN *et al.*, 2005).

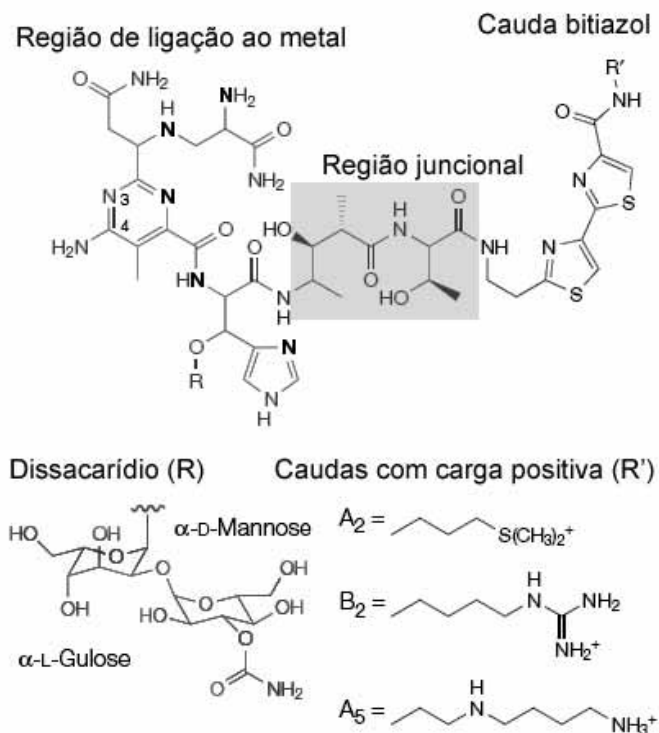


Figura – 1. Estrutura molecular bleomicina e seus domínios funcionais.

1.3 – O MODELO EXPERIMENTAL DE ESTUDO

A fibrose pulmonar experimental induzida por bleomicina em animais tornou-se um modelo sistemático de investigação dos mecanismos celulares e bioquímicos envolvidos na patogênese da fibrose pulmonar, uma vez que durante este processo o tecido pulmonar sofre mudanças morfológicas e bioquímicas bem semelhantes às observadas em pacientes (GIRI, 2002).

Nos últimos 30 anos, este modelo tem se tornado a principal ferramenta na pesquisa básica da regulação fibrogênica pulmonar, sendo utilizado primeiramente em cachorros por Fleischman e colaboradores em 1971. Posteriormente o modelo foi padronizado em pequenos mamíferos e popularizado por Snider e colaboradores em 1979, que utilizaram o modelo de administração intratraqueal de dose única, *apud* (CHUA *et al.*, 2005). As pesquisas baseadas neste modelo experimental propiciaram um aumento substancial na compreensão acerca da patologia básica da resposta fibrótica pulmonares; isso pode ser atribuído em sua grande parte ao avanço das técnicas de estudo empregadas, que tentam reproduzir por modelagem experimental as maiores anormalidades estruturais e bioquímicas similares às encontradas em pacientes. Entretanto, são encontradas limitações ao se mimetizar um processo; de fato é o que geralmente ocorre em todos os modelos de estudo animal. A maior delas é a escala de tempo em que ocorrem os eventos fibrótico-pulmonares em ambos os seres. A fibrose pulmonar no homem é resultado de meses ou até anos de excessivo remodelamento da matriz extracelular pulmonar, enquanto que em modelos animais estes eventos são reproduzidos em curtos períodos de tempo seqüenciais em resposta ao episódio específico de lesão pulmonar (CHUA *et al.*, 2005).

Os estudos mais recentes se concentram nas alterações ou variações dos fenômenos inflamatórios e imunomodulatórios, baseando-se no que caracteriza um quadro de fibrose pulmonar, onde são observados uma hiper celularidade e aumento nas quantidades de mediadores inflamatórios solúveis presentes. Vários destes estudos apresentam alguns dados conflitantes sobre qual o papel da inflamação crônica no direcionamento para uma resposta fibrótica. Estes estudos permanecem controversos (GAULDIE, 2002; STRIETER, 2002).

1.3.1 – Características do modelo

A linhagem de camundongos C57BL/6J é amplamente utilizada por ser mais susceptível à administração de uma alta dose única, via intratraqueal, suficiente para desencadear o processo inflamatório que precede o aparecimento da fibrose pulmonar

(CHUNG *et al.*, 2003), uma vez que estes animais expressam preferencialmente citocinas do tipo Th1, tais como interferon (IFN)- γ e interleucina (IL)-12 (SCOTT *et al.*, 1988), sendo assim um importante modelo de estudo da fase inflamatória pulmonar.

De forma geral, os processos que governam o desenvolvimento da fibrose pulmonar induzida por bleomicina são divididos em três etapas: (i) lesão aguda, incluindo morte celular; (ii) resposta inflamatória em vários graus, dependendo da dose e via de administração, caracterizada pelo comprometimento da microestrutura pulmonar, com lesão direta às células epiteliais, endotélio vascular e membrana basal; e (iii) resposta crônica, marcada por hiper celularidade e aumento da deposição de proteínas da matriz extracelular (ADAMSON, 1976), *apud* (GIRI, 2002).

Hoje é amplamente aceito é que uma fase inflamatória inicial reversível pode levar a uma fase fibrótica pulmonar irreversível em resposta a agentes lesivos. Eventos inflamatórios resultam da liberação de mediadores próteicos pelas células residentes danificadas, fazendo com que as células inflamatórias sejam recrutadas, ativadas e iniciem a liberação de mais mediadores solúveis. Estes fatores ativam diretamente os fibroblastos ou podem estimular as células residentes da parede alveolar para secreção de mediadores que levam à migração e à proliferação fibroblástica, que subsequentemente disparam uma excessiva deposição de colágeno. Da mesma forma, observa-se uma gama complexa de relações entre neutrófilos, macrófagos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, elementos da matriz extracelular, células epiteliais e endoteliais, que modulam a função dos fibroblastos em favor de um aumento da produção e excessiva deposição de colágeno no interstício pulmonar (GIRI, 2002).

1.3.2 – Reparo tecidual pulmonar

O pulmão pode ser dividido em duas partes principais: (i) as vias aéreas centrais, que compreendem traquéia, brônquios e bronquíolos terminais e (ii) parênquima periférico, composto por bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolos. A parede alveolar é composta de aproximadamente 8% de pneumócitos do tipo I, 16% de pneumócitos do tipo II, 30% de células do endotélio capilar, 36% de células intersticiais e 10% de macrófagos alveolares (BURNS *et al.*, 2003). Dois tipos de células recobrem a superfície alveolar. Os pneumócitos do tipo I são células epiteliais escamosas, e os do tipo II são células cubóides responsáveis pela produção e secreção de proteína surfactante; macrófagos e fibroblastos compõem o grupo de células presentes no interstício, responsáveis pela manutenção e organização da membrana basal (BURNS *et al.*, 2003).

Interstício ou matriz extracelular é constituído por uma rede complexa de macromoléculas que preenchem os espaços intercelulares. Entre suas malhas circula o líquido tecidual, que tem origem na microcirculação, banha as células e retorna aos vasos sanguíneos ou linfáticos. As macromoléculas da matriz extracelular podem estar estruturadas em forma de fibras ou sob a forma de um complexo amorfo, intimamente associado a fibras e denominado substância amorfa. Os componentes da matriz são sintetizados e excretados por fibroblastos, células epiteliais e musculares lisas, como constituintes das lamínas basais. Tais macromoléculas são: (i) proteínas fibrosas, que formam as fibras colágenas e reticulares (colágeno) e fibras elásticas (elastina); (ii) proteínas de aderência (laminina e fibronectina), que fixam as células à matriz; e (iii) glicosaminoglicanos e proteoglicanos, que formam um gel altamente hidratado que compõe a substância fundamental amorfa (ROBERTS *et al.*, 2002).

Os componentes da matriz extracelular são renovados constantemente e dependem diretamente de proteases específicas denominadas metaloproteinases. As metaloproteinases são sintetizadas por células fagocíticas e pelas células do tecido conjuntivo e sua atividade está sob controle das citocinas, dos produtos secretados por fagócitos e de seus inibidores naturais encontrados nos tecidos. Um balanço fisiológico deve existir entre a formação da matriz e a sua degradação. Em distúrbios fibróticos este balanço é quebrado e usualmente ocorre um aumento da produção de matriz extracelular e inibição da produção de proteínas de degradação, observados na fibrose pulmonar, cirrose hepática e fibrose renal (PARKS, 2003; PARKS *et al.*, 2004).

Fibroses são condições caracterizadas pelo aumento do estroma conjuntivo de um órgão decorrente de cicatrização normal ou exacerbada, ou ainda resultado de um processo reacional em que a produção da matriz extracelular não está relacionada com o processo reparativo. Na fibrose pulmonar, o acúmulo excessivo de colágeno intersticial destrói a arquitetura do pulmão, que subsequentemente leva à insuficiência respiratória (MOHAMMED *et al.*, 2003).

Células mortas se comportam como agentes desencadeadores do sistema imune, que promove a reabsorção e permite o reparo posterior (KUWANO *et al.*, 2004). Quando o tecido que sofreu dano possui capacidade regenerativa, os restos celulares são absorvidos e fatores de crescimento são liberados pelas células vizinhas, induzindo a multiplicação das células parênquimatosas e restabelecendo a integridade estrutural deste tecido. Por outro lado, tecidos sem capacidade regenerativa substituem tecido necrosado por tecido conjuntivo cicatricial. Como conseqüência, dois processos distintos podem ser observados: (a)

regeneração para restauração da integridade tecidual, sem deixar traços da lesão anterior a este processo; ou (b) reposição do parênquima respiratório por tecido conjuntivo, através do aumento da deposição de colágeno, ácido hialurônico e fibronectina, todos pela ativação de células epiteliais e fibroblastos (CHANSON *et al.*, 2005).

As interações complexas de regulação entre inflamação e reparo são fatores cruciais em resposta à exposição de bleomicina aos tecidos, que em condições normais exibem um caráter de regulação mais simples e estável da produção de mediadores inflamatórios e do perfil de proliferação e ativação celular (KUWANO *et al.*, 2001; LAWRENCE *et al.*, 2001).

1.3.3 – Aspectos Inflamatórios

O processo inflamatório pode ser visto como resultado de algum tipo de dano tecidual, em resposta a agentes infecciosos ou danos traumáticos, químicos, físicos ou de natureza autoimune (KATZENSTEINE *et al.*, 1998). Por outro lado, atua de forma muito importante como mecanismo de regulação fisiológico orgânico-imune, de padrão conservado ao longo da história evolutiva, e que objetiva garantir uma melhor condição do ser. Este tipo de resposta do sistema imune é guiado inicialmente por componentes inatos, tais como proteínas sinalizadoras, receptores e células, e posteriormente com participação de elementos da imunidade adquirida numa fase mais tardia (NATHAN, 2002).

Modificações na microcirculação, tais como os fenômenos angiogênicos, migração de leucócitos através do leito vascular e liberação de moléculas solúveis nos tecidos danificados são as principais características da inflamação, que é uma reação secundária em resposta às lesões a fim de que a estabilidade inicial seja restaurada (NATHAN, 2002).

Após dano tecidual causado pela ação da bleomicina, as células presentes no tecido pulmonar, destacando-se dentre estas as células epiteliais, células endoteliais e macrófagos residentes, liberam proteínas intracelulares produzidas constitutivamente ou produzidas ao sofrer algum estímulo físico ou químico (SHIMABUKURO *et al.*, 2003). Quando encontradas no meio extracelular por receptores solúveis específicos ou outros receptores presentes na superfície celular, como os receptores da citocinas, quimiocinas ou demais tipos de receptores específicos, têm a capacidade de disparar a produção de citocinas, quimiocinas, mediadores de origem lipídica e espécies reativas de oxigênio, que são importantes participantes da resposta inflamatória, atuando em diversos grupos celulares, inclusive nas células do próprio tecido danificado e que levam conseqüentemente à produção

e liberação de mais mediadores e novos fatores, importantes para evolução deste processo (RAHMAN, 2002; CRAPO, 2003).

O acúmulo de neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos e mastócitos no trato respiratório baixo são características dos estágios mais agudos que precedem as várias doenças fibróticas pulmonares. Macrófagos alveolares, células epiteliais e endoteliais são as primeiras células do tecido a responderem a algum tipo de agente danoso, seja químico ou físico, funcionando como sentinelas. Estas células secretam fatores quimiotáticos para neutrófilos, que medeiam o tráfego destes para o foco inflamatório através de um gradiente de concentração de fatores quimiotáticos. Fibroblastos em proliferação e células endoteliais ativadas são encontrados nestes sítios em resposta ao grande número de mediadores secretados por macrófagos teciduais, neutrófilos e disparados também por sinais de apoptose das células epiteliais. Estes fibroblastos, macrófagos e neutrófilos são capazes de regular estas respostas, direcionando-a para uma cronificação que leva um aumento da lesão ou resolução seguida de cicatrização (YARA *et al.*, 2001; GIRI, 2002; THANNICKAL *et al.*, 2004).

1.3.4 – Mediadores inflamatórios importantes no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina

Os mediadores inflamatórios são moléculas solúveis que atua de forma local ou sistêmica, de origem plasmática e de células inflamatórias ou do próprio tecido danificado. São secretados a partir de grânulos pré-formados ou sintetizados via *de novo* por vários tipos de células. Dentre estes mediadores destacamos alguns com participação importante no modelo de lesão e fibrose pulmonar induzida por bleomicina (NATHAN, 2002).

Fator de ativação de plaquetas (PAF)

O fator de ativação de plaquetas (PAF) é um fosfolípido derivado de membrana envolvido em amplas condições inflamatórias pulmonares, incluindo displasia bronco-pulmonar causada pela lesão pulmonar crônica que progride para obstrução das vias aéreas e fibrose intersticial.

A interação do PAF com o seu receptor específico leva à transdução de sinal via ativação de proteínas G heterotrimétricas, com conseqüente ativação de várias proteínas cinases e com mobilização do cálcio intracelular. Desta forma, PAF ativa monócitos e macrófagos para produção de mediadores tais como eicosanóides, citocinas pró-inflamatórias com o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1, IL-6 e aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície de neutrófilos (STENMARK *et al.*, 1987).

Eicosanóides

Diversos estudos têm se preocupado em definir o papel dos eicosanóides na patogênese da fibrose pulmonar. Já é descrito que derivados do ácido araquidônico, por exemplo, os leucotrienos, podem estimular a proliferação de células mesenquimais e fibroblastos e ainda a síntese de colágeno. De fato, leucotrieno B₄ é encontrado numa concentração 15 (quinze) vezes mais alta em homogenatos do pulmão de pacientes com fibrose, em relação aos pacientes normais (WILBORN *et al.*, 1996).

Controversamente, a prostaglandina E (PGE) é um potente inibidor da proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno. Esta molécula desempenha papel importante na manutenção da matriz extracelular, com função homeostásica em pulmões normais, que normalmente apresentam concentrações mais altas que as encontradas no plasma. Em pacientes com fibrose os níveis de prostaglandina E são 50% mais baixos que os encontrados em pacientes normais. A administração intravenosa de PGE em hamsters diminui o tráfego de neutrófilos pelas vias aéreas e reduz a lesão pulmonar, acarretando inibição do desenvolvimento de fibrose frente à estimulação por bleomicina (GRANT *et al.*, 1991).

Espécies reativas de oxigênio

A lesão celular observada na fibrose pulmonar induzida por bleomicina é inicialmente mediada por espécies reativas de oxigênio produzido pelo infiltrado celular inflamatório. Mas por sua atividade oxidante de membrana e DNA/RNA, a bleomicina é capaz de gerar radicais hidroxila e íons superóxido que promovem a produção de peroxinitrito, um potente oxidante envolvido em doenças inflamatórias pulmonares. Como descrito anteriormente, a fibrose pulmonar inicialmente resulta de uma reação inflamatória pulmonar, inicialmente mediada na sua maioria por neutrófilos e macrófagos. Estas células também produzem espécies reativas de oxigênio, assim como óxido nítrico, radicais hidroxila, íons superóxido e peróxido de hidrogênio, que ao serem liberados danificam diretamente o parênquima pulmonar, estimulam a ativação e transcrição de genes das células residentes e a expressão de mediadores do processo inflamatório, que com sua progressão leva à fibrose (GIRI, 2002).

Citocinas

Citocinas são proteínas secretadas com função na regulação da resposta imune, regulam também o tráfego e organização celular nos órgãos que compõem o sistema imune. As citocinas agem como fatores de crescimento, na diferenciação e proliferação de células da

medula óssea e maturação, possuem atividades quimiotáticas e propriedades ativadoras e supressoras, incluindo sinalização para morte celular programada, nos mais diversos grupos celulares que determinam à natureza da resposta imune (BORISH *et al.*, 2003).

Várias citocinas podem desempenhar funções pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. Estas atividades dependem do tipo celular em que atuam e do seu estado responsivo às citocinas, ou ainda pode depender do contexto em que elas se encontram. As citocinas são responsáveis por guiar o processo inflamatório, podendo agir de diversas maneiras. Acredita-se atualmente que variações entre os níveis de TNF- α , IL-1 β , CXCL8/IL-8, IFN- γ , fator de crescimento transformante (TGF)- β , IL-10 podem levar a uma ativação de macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e endoteliais, confirmado pelos dados clínicos observado em pacientes com lesão pulmonar aguda e fibrose (GOODMAN *et al.*, 2003).

O fator de crescimento transformante (TGF)- β é uma importante citocina multifuncional, com alto potencial pró-fibrogênico. Células inflamatórias como macrófagos e linfócitos produzem TGF- β , da mesma forma que os fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e demais tipos celulares. O TGF- β é secretado em uma forma latente e se torna ativado em seguida, para desempenhar suas funções biológicas que incluem angiogênese, primagem de neutrófilos humanos, quimiotaxia de monócitos, macrófagos e é um poderoso estimulador de fibroblastos para produção de componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina, fibrinas e proteoglicanas (KHALIL *et al.*, 1989; BARTRAM *et al.*, 2004).

O interferon (IFN)- γ é uma citocina que participa no modelo de fibrose pulmonar, exercendo funções anti-fibróticas, inibindo a síntese de colágeno e a proliferação de fibroblastos associada com acúmulo de leucócitos no pulmão. Este efeito está correlacionado com a capacidade do IFN- γ em regular a expressão de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) de TGF- β , e participa também da resposta angiogênica através da regulação dos níveis da quimiocina CXCL10/IP-10 controlando a fibroplasia e deposição de elementos da matriz extracelular. Desta forma destaca-se um importante balanço existente entre TGF- β e IFN- γ em condições normais, e quando este equilíbrio é quebrado torna-se aparente a manifestação de fenômenos patológicos, como no caso da fibrose pulmonar (SHIMABUKURO *et al.*, 2003).

A interleucina-10 (IL-10) exerce funções anti-inflamatórias em uma variedade de modelos experimentais, possuindo propriedades imunomodulatórias sobre citocinas do tipo Th-1, tais com IL-1 β , IL-6, CXCL8/IL-8, IL-12 e TNF- α , que participam dos fenômenos que levam à fibrose pulmonar, limitando a inflamação. A IL-10 produzida normalmente em níveis

constitutivos no pulmão, com papel na manutenção da tolerância a alérgenos ou a demais antígenos inalados (BOEHLER *et al.*, 2002; SHIMABUKURO *et al.*, 2003).

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um importante fator angiogênico com propriedades pró-inflamatórias. É descrita sua participação na proliferação celular, permeabilidade vascular e angiogênese em diversas lesões inflamatórias. No pulmão o VEGF é produzido por células epiteliais alveolares, macrófagos e miofibroblastos em resposta a vários estímulos, tais como estresse oxidativo e citocinas. Também participa indiretamente do recrutamento de leucócitos por levar à expressão de CXCL8/IL-8 e CCL2/MCP-1 (FEHRENBACH *et al.*, 1999).

Quimiocinas

São um grupo de moléculas relativamente pequenas (8 a 12 kD) pertencentes à classe das citocinas, com habilidade em induzir quimiotaxia em uma ampla variedade de células incluindo neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos e fibroblastos, através de interações com seus respectivos receptores, que pertencem à superfamília dos receptores de sete domínios transmembrana acoplados a proteína G. Mais de 50 quimiocinas descritas foram classificadas nas famílias C, CC, CXC e CX₃C (Figura 2), baseados na posição dos resíduos de aminoácidos entre as cisteínas na região amino-terminal (FERNANDEZ *et al.*, 2002; GANGUR *et al.*, 2002; OLSON *et al.*, 2002).

Diversas quimiocinas estão envolvidas no processo de fibrose pulmonar, várias já foram observadas e descritas nos processos inflamatórios agudos, crônicos e fibróticos pulmonares. As quimiocinas da família CC, incluindo CCL2/JE, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES, participam do recrutamento e ativação de mononucleares, linfócitos e células natural killer (NK), contribuindo de forma importante para a instalação da inflamação e sua cronificação, que guia este processo gerando uma resposta fibrótica pulmonar. CCL2/JE é um fator quimiotático para células mononucleares que tem importante papel no modelo de fibrose pulmonar, participando da regulação da deposição de colágeno pela ativação de fibroblastos. CCL3/MIP-1 α promove o acúmulo e ativação de leucócitos que levam à fibrose. A administração de anticorpos anti-CCL3/MIP-1 α diminui, mas não totalmente, o acúmulo de mononucleares no pulmão e fibrose. CCL5/RANTES é um importante fator quimiotático para eosinófilos e linfócitos, participa como mediador do influxo de linfócitos T na alveolite fibrosante (SMITH *et al.*, 1995; SMITH *et al.*, 1996; GHARAEI-KERMANI, *et al.*, 2003; KUNKEL *et al.*, 2003).

1.4 – NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos representam o maior grupo de leucócitos encontrados no sangue e são indispensáveis na defesa do organismo contra infecções e regulação do processo inflamatório. Eles exercem funções especializadas como fagocitose, geração de metabólitos reativos de oxigênio, produção e secreção de proteinases e mediadores do processo inflamatório, possuindo papel importante na eliminação de microorganismos e remoção dos restos celulares (BURNS *et al.*, 2003). Hoje são conhecidos três subtipos de neutrófilo, com divisão baseada em 3 características principais: (i) seu perfil de produção de citocinas e quimiocinas, (ii) sua capacidade em ativar macrófagos e (iii) seu perfil de expressão dos receptores do tipo Toll-like receptor (TLRs) (TSUDA *et al.*, 2004).

Quando ativados por mediadores do processo inflamatório ou por peptídeos bacterianos, os neutrófilos aumentam sua capacidade fagocítica, aumentam a expressão de moléculas de adesão, migram para os tecidos em direção a um gradiente quimiotáticos e produzem fatores importantes que atuam como efetores da resposta neutrofílica. Dentre estes produtos destacam-se novos mediadores inflamatórios que funcionam como amplificadores deste processo, e produtos tóxicos bactericidas que podem aumentar ainda mais a extensão do foco inflamatório. Estes produtos tóxicos são secretados por grânulos que se fundem a membrana para liberação extracelular de Mieloperoxidase (MPO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido hipocloroso (HOCl), proteinase 3, gelatinases, colagenases, elastase, defencinas, metaloproteinases e fosfolipase A₂ (BURG *et al.*, 2001).

Infecção ou dano do tecido pulmonar resultam na migração dos neutrófilos da circulação para o espaço alveolar, de forma diferente à encontrada na circulação sistêmica durante uma resposta inflamatória, que ocorre normalmente através das vênulas pós-capilares. A migração dos neutrófilos para o espaço alveolar ocorre diretamente pelos capilares alveolares, e é influenciada por características únicas encontradas na organização da parede alveolar. Esta migração pode ser paracelular ou transcelular. Preferencialmente ocorre migração paracelular, através da junção tricelular, onde três células endoteliais capilares se convergem. No interstício, fibroblastos e miofibroblastos conectam a membrana basal do endotélio à membrana basal do epitélio alveolar. Estes fibroblastos participam diretamente do processo de migração, guiando os neutrófilos do interstício em direção ao espaço alveolar onde se encontra um gradiente elavado de fatores quimiotáticos, fazendo com que este neutrófilo passe através da junção tricelular formada por 2 pneumócitos do tipo I e pneumócitos do tipo II (BURNS *et al.*, 2003) (Figura 3).

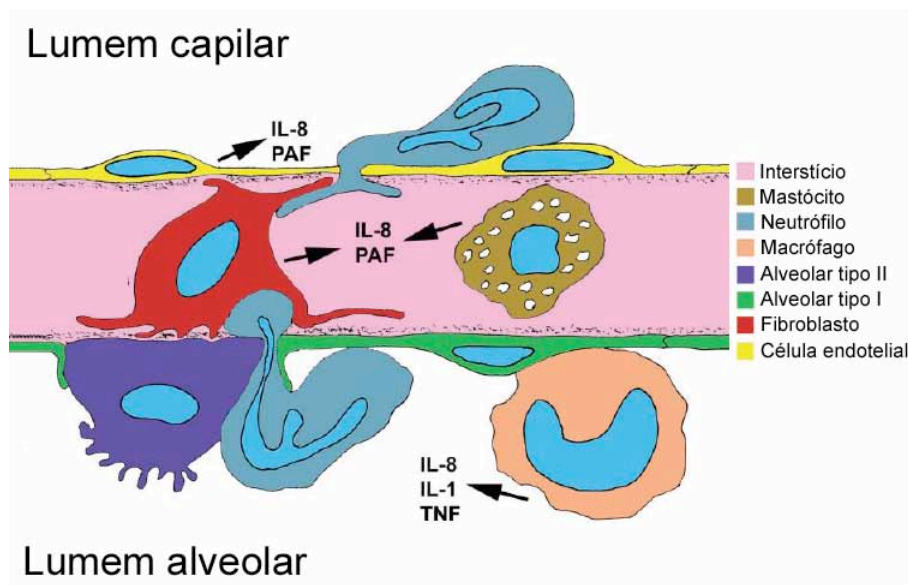


Figura – 3. Ilustração da migração neutrofílica do lumem capilar para o espaço alveolar.

O acúmulo de neutrófilos é considerado como marco inicial da resposta inflamatória iniciada pela lesão tecidual pulmonar após administração de bleomicina (THRALL *et al.*, 1982). O fator chave para migração e ativação do neutrófilo é a participação de moléculas quimioatrativas que se ligam aos seus receptores específicos, gerados no sítio inflamatório na ausência ou quando se antecede uma resposta imune específica, mediada por linfócitos. Após interação ligante/receptor, sinalizam em sua maioria via proteína G heterotrimétrica acoplada aos seus receptores de sete domínios transmembrana, disparando cascatas intracelulares que culminam na ativação de genes específicos, que ditarão as mudanças a serem sofridas pela célula (PIERCE *et al.*, 2002). Dentre estas mudanças, destacam-se as alterações no citoesqueleto, modificação da expressão de moléculas de adesão e perfil de ativação. Também participam da modulação do processo, uma vez que pertencem da principal linha da resposta imune inata, respondendo em poucas horas após dano ou infecção (BURG *et al.*, 2001), oferecendo uma contribuição para desenvolvimento do processo inflamatório e sua regulação, pela produção de fatores que coordenarão as funções efetoras dos demais leucócitos, tais como eosinófilos, monócitos, basófilos, células NK, linfócitos e neutrófilos. Estes fatores são as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-12 e VEGF, e as quimiocinas IL-8/CXCL8, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9 (SCAPINI *et al.*, 2000).

Alguns fatores quimiotáticos e de ativação podem ser de origem exógena, produzidos por microorganismo como, por exemplo, n-formil-metionil-leucil-fenilamina (fMLP) e lipopolissacarídeo (LPS), derivados bacterianos. Os principais mediadores endógenos envolvidos no recrutamento de neutrófilos são o PAF, que tem papel pró-adesivo. Os seguintes mediadores, quando expressos na superfície da célula endotelial são reconhecidos pelos seus receptores na superfície dos polimorfonucleares durante o processo de rolamento no leito vascular: leucotrieno B4 (LTB₄), com ações semelhantes às do PAF; fator 5a do complemento (C5a), que é um subproduto originado das cascatas do complemento, com atividade de estimular a expressão de moléculas de adesão; e por último o mais importante fator quimiotático para neutrófilos, as quimiocinas pertencentes família do IL-8 humano, ligantes dos receptores CXCR1 e CXCR2 (BURG *et al.*, 2001).

Em camundongos apenas a participação do receptor CXCR2 foi descrito participando da quimiotaxia de neutrófilos, com ligantes homólogos aos encontrados em humanos. Dentre eles estão CXCL1-3/KC e CXCL1-2/MIP-2 murinos, homólogos de CXCL1/GRO α , CXCL2/GRO β e CXCL3/GRO γ humano (TEKAMP-OLSON *et al.*, 1990; BOZIC *et al.*, 1994). Uma seqüência conservada de glutamato-leucina-arginina (ELR) localizada próxima à região amino terminal de certas quimiocinas CXC conferem alta afinidade de ligação ao receptor CXCR2. As quimiocinas CXC ELR⁺ são geralmente pró-inflamatórias. Como por exemplo, podemos citar IL-8 humana, uma das quimiocinas mais estudadas, participa do recrutamento de neutrófilos, fagocitose de microorganismos e do processo angiogênico. É produzida primariamente não só por mononucleares, células epiteliais e endoteliais, mas também por linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e fibroblastos. Uma variedade de efeitos biológicos é atribuída aos ligantes de CXCR2, principalmente envolvendo neutrófilos, nos quais participam da ativação e quimiotaxia, produção de espécies reativas de oxigênio, aumento da expressão de integrinas e selectinas, promovendo a adesão a células endoteliais, modulação da angiogênese e liberação de histamina e grânulos azurófilos (MEHRAD *et al.*, 1999; McCOLL *et al.*, 1999; ADDISON *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2001; RAMJEESINGH *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2004).

1.5 – QUIMIOCINAS COMO ALVO PARA INTERVENÇÃO FARMACOLÓGICA

Os receptores de quimiocina são importantes alvos para desenvolvimento de novos fármacos, por possuírem importantes papéis, com função na inflamação aguda e crônica, angiogênese, angiostase e como co-receptores para a entrada de vírus nas células (ONUFFER *et al.*, 2002). Desta forma, ocorre uma expansão do potencial terapêutico sobre o sistema imune, a partir da descrição de novos papéis para quimiocinas (AJUEBOR *et al.*, 2002).

Dentre as estratégias farmacológicas anti-quimiocinas estudadas atualmente estão a aplicação de anticorpos, quimiocinas com modificação na região amino-terminal e pequenas moléculas antagonistas. Diversos antagonistas seletivos e potentes já foram descritos para os receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR2, CXCR3 e CXCR4, que são o grupo dos receptores mais bem estudados diretamente relacionados às doenças, e também por serem os principais alvos dos programas de desenvolvimento de drogas atualmente (CASCIERI *et al.*, 2002)..

Alguns antagonistas de receptor CXCR2 descritos têm por objetivo regular as funções efetoras dos neutrófilos, com habilidade em modificar o recrutamento e a ativação destas células, prevenindo uma resposta inflamatória excessiva associada com dano tecidual mediado pela resposta neutrofílica intensa, que eleva o dano tecidual pulmonar (PEASE *et al.*, 2002).

A repertaxina, um antagonista seletivo de receptor CXCR2, age de modo alostérico não competitivo, ligando-se diretamente aos domínios transmembrana 1, 3 e 6 do receptor e causando uma alteração conformacional que bloqueia a transdução de sinais gerados pelas cascatas de sinalização intracelular disparadas pelo contato ligante/receptor. Desta forma, neutrófilos são impedidos de exercer suas funções. Já foram descritos trabalhos utilizando este novo fármaco *in vivo*, nos modelos de isquemia e reperfusão hepática, intestinal e renal após transplante. A repertaxina também foi efetiva em inibir o recrutamento de polimorfonucleares em todos estes modelos experimentais após trauma isquêmico-cerebral (BERTINI *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2004; CASSILI *et al.*, 2005; GARAU *et al.*, 2005; CUGINI *et al.*, 2005).

Com objetivo de inibir uma resposta inflamatória pulmonar, baseando-se na premissa de que a inflamação é um fenômeno que precede um excessivo reparo tecidual que caracteriza a fibrose pulmonar, estudaremos o efeito do fármaco DF2162, um derivado da repertaxina, sobre a resposta inflamatória e fibrose pulmonar experimental induzida por

bleomicina, principal modelo de estudo da fibrose pulmonar, doença grave e progressiva que atinge 5 milhões de pessoas em todo o mundo (MOHAMMED *et al.*, 2003).

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito do DF2162, que é um novo antagonista experimental de receptores CXCR2, no modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina.

2.1.1 – Objetivos específicos

- Estabelecer o modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos;
- Estudar o efeito do antagonista de receptor CXCR2 sobre o recrutamento de neutrófilos no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina;
- Estudar o efeito do antagonista de receptor CXCR2 sobre a produção de citocinas e quimicinas no pulmão, no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina;
- Estudar o efeito do antagonista de receptor CXCR2 sobre as alterações patológicas pulmonares no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina;

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – ANIMAIS

Camundongos C57Bl/6j machos com 8 a 10 semanas pesando aproximadamente 20 – 25g, fornecidos pelo CEBIO (Centro de Bioterismo) da Universidade Federal de Minas Gerais foram utilizados para realização dos experimentos. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia, em caixas com água e ração *ad libitum*, sob condições controladas de temperatura, umidade e ciclo claro/escuro de 12 horas.

3.2 – MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR BLEOMICINA

Sulfato de bleomicina (Bonar®, Laboratório Biossintética) foi utilizado como estímulo para a indução do modelo experimental de fibrose pulmonar (IZBICKI *et al.*, 2002). Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 80 µL de uma solução à base de ketamina e xilazina (respectivamente 3.2 mg e 0.16 mg/animal, em solução salina 0.9%, em uma proporção de 4:1:5) para subsequente traqueotomia. Cada animal recebeu uma injeção por via intra-traqueal de 25 µL de veículo (salina 0,9% estéril) ou bleomicina. No primeiro experimento de padronização do modelo utilizamos as doses de bleomicina de 0.025U/animal, 0.125U/animal e 0.625U/animal para descrever uma curva dose-resposta. Nos demais experimentos foram utilizados a dose de 0.125U/animal. Nos respectivos tempos estabelecidos (6, 12 e 24 horas, 2, 4, 8 e 24 dias) os animais foram sacrificados com uma dose letal de ketamina e xilazina (500 µL/animal) com subsequente deslocamento cervical, para posterior realização do lavado bronco-alveolar e retirada do pulmão. Foram analisadas as contagens celulares do lavado, ensaios enzimáticos com o lavado bronco-alveolar e pulmão, e análises histopatológicas descritas abaixo.

3.3 – TRATAMENTO COM ANTAGONISTA DE RECEPTOR CXCR2

Para estudar o seu efeito no modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, utilizamos um antagonista do receptor de quimiocinas CXCR2, o DF2162, um derivado da Repertaxina, cedido gentilmente com fins de colaboração, pelos Drs. Francesco Colotta e Ricardo Bertini (Dompé Research and Development, Dompé S.p.A., L'Aquila, Itália). Os

animais foram tratados com 200 µL de carboximetilcelulose 0.05% ou suspensão contendo DF2162 em carboximetilcelulose 0.05%, por via oral, de 12 em 12 horas, após administração de bleomicina, com um pré-tratamento de 12 horas e uma hora antes da instilação intratraqueal. Experimentos iniciais foram realizados com a administração das doses de 1.2, 6 e 30 mg/kg. A dose de 6 mg/kg foi tomada como padrão para os demais experimentos, administrada duas vezes ao dia, num total de 12 mg/kg/dia.

3.4 – LAVADO BRONCO-ALVEOLAR

O lavado bronco-alveolar foi realizado para se obter leucócitos presentes no espaço alveolar. Após sacrifício nos tempos determinados, a traquéia de cada animal foi exposta novamente e canulada com um catéter de polipropileno de 1.7 mm. O lavado foi feito através da injeção de duas alíquotas de 1 mL de PBS 1X estéril, injetadas e recolhidas 3 vezes cada uma, obtendo-se 1.7 – 2.0 mL de volume final recuperado do lavado. O líquido recolhido do lavado foi centrifugado em tubos de 5 mL a 4 °C, por 5 minutos, a uma velocidade de 1500 RPM, formando um *pellet* de células utilizado para contagem total e diferencial de células. O sobrenadante do centrifugado foi congelado para posteriores ensaios de detecção de nitrito, citocinas e quimiocinas. O *pellet* de células foi ressuspensão em 100 µL de BSA 3%, e o número total de leucócitos foi determinado por contagem das células coradas com solução de Turk em câmaras de Neubauer. As contagens totais foram feitas em microscópios ópticos com objetiva de 40X. Para a contagem diferencial, as lâminas foram preparadas por *cytospin* (Cytospin 3, Shandon) e foram coradas com May-Grunwald-Giemsa. As contagens diferenciais foram realizadas em microscópios ópticos com objetiva de 100X, utilizando óleo de imersão.

3.5 – DOSAGEM DE NITRITO DO LAVADO BRONCO-ALVEOLAR

Para a dosagem de nitrito do lavado bronco-alveolar foi utilizada a técnica descrita por Griess e modificada posteriormente (Green *et al.*, 1981). Basicamente, em placas de 96 poços (NUNC FLAT, FALCON), adicionou-se 100 µL do lavado bronco-alveolar e em seguida 50 µL de uma solução 1:1 contendo 1% de sulfanilamida (Sigma) em H₃PO₄ 2,5% e 0,1% de naphthylethylenodiamida – NEED (Sigma) em H₃PO₄ 2,5%. Após cerca de 10 minutos houve formação de cor e a concentração de nitrito foi calculada de acordo com uma curva-padrão, submetida ao mesmo procedimento, construída utilizando-se diferentes

concentrações de nitrito de sódio (NaNO_2) diluído em PBS 1X. A leitura foi feita a 540 nm em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices).

3.6 – RETIRADA DO PULMÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Ao término do lavado bronco-alveolar, os pulmões dos animais foram perfundidos com 5 mL de PBS 1x pelo ventrículo direito do coração, para remoção de sangue do leito vascular pulmonar, e imediatamente extraídos. O pulmão direito foi congelado para posterior dosagem de citocinas, quimiocinas, NAG e MPO, e o pulmão esquerdo foi utilizado para quantificação de hidroxiprolina ou para análise histopatológica. Foram pesados 100 mg do pulmão direito e homogeneizados em 0.9 mL de uma solução para extração de citocinas (NaCl 0.4 M, NaPO_4 10 mM, PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0.1 mM, EDTA 10 mM, tween 20 0.05%, 0.5% de BSA, 20 KI aprotinina), numa relação de 10% peso/volume, e posteriormente centrifugados a 3000 RPM durante 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi utilizado para detecção de citocinas e quimiocinas teciduais pelo método de ELISA. A detecção das atividades de NAG e MPO foram feitas no *pellet*, após processamento das amostras para estes ensaios. Desta maneira, o *pellet* foi ressuspensão em 2 mL de tampão fosfato (0.1 M NaCl , 0.02 M NaPO_4 , 0.015 M NaEDTA ; pH 4.7), homogeneizado por 1 minuto; 1,5 mL de NaCl 0.2% foi adicionado e homogeneizado novamente; 1,5 mL de NaCl 1.6% com 5% de glicose foi adicionado, homogeneizado e vortexado. Após esta etapa, o volume total (1.6 mL) foi dividido em dois tubos, 0.8 mL para cada tubo, para determinação de NAG e MPO. Estas amostras foram centrifugadas a 4° C, por 15 minutos, a uma velocidade de 10.000 RPM e o sobrenadante foi posteriormente descartado. Para o ensaio de NAG, as amostras foram ressuspensas e homogeneizadas em 0.8 mL de salina 0.9% com 0.1% v/v de Triton X-100, centrifugadas a 4° C, por 10 minutos a 1.500 RPM e o ensaio foi feito com o sobrenadante destas amostras. Para o ensaio de MPO, as amostras foram ressuspensas e homogeneizadas em 0.8 mL de tampão fosfato (0.05 M Na_3PO_4 , 0.5% HETAB; pH 5.4), congeladas em nitrogênio líquido e então descongeladas, sendo este processo repetido por 3 vezes. Após esta etapa, as amostras para MPO foram centrifugadas a 4° C, por 15 minutos a 10.000 RPM e o sobrenadante utilizado para o ensaio.

3.7 – ENSAIO PARA DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE N-ACETILGLICOSAMINIDASE (NAG) TECIDUAL

A reação é iniciada pela adição de 100 μ L de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminidina (Sigma), diluídos em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0.1 M, Na_2HPO_4 0.1 M, pH 4.5) na concentração final de 2.24 mM, a 100 μ L de sobrenadante das amostras previamente processadas e diluídas em tampão citrato/fosfato, em placas de 96 poços, por 10 minutos a 37° C. Ao final desta etapa adicionou-se 100 μ L de tampão glicina 0.2 M (pH 10.6) para término da reação. As placas de 96 poços foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) a 405 nm. O conteúdo de macrófagos foi calculado com base na curva-padrão de NAG, feita pela coleta de macrófagos peritoneais recolhidos de animais estimulados com 3 mL de tioglicolato 3% (dados não mostrados).

3.8 – ENSAIO PARA DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE MIELOPEROXIDASE (MPO) TECIDUAL

O ensaio utiliza 25 μ L de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) com concentração final de 1.6mM, 100 μ L de tampão fosfato (0.05 M Na_3PO_4 , 0.5% H-TAB; pH 5.4) com H_2O_2 diluído numa concentração final de 0.003% v/v, e 25 μ L de sobrenadante das amostras de tecidos previamente processadas. A reação se inicia pela adição de tetrametilbenzidina as amostras em placas de 96 poços, a 37° C por 5 minutos. Após esta etapa, adicionou-se H_2O_2 diluída em tampão fosfato e encubou-se a 37° C por 5 minutos. Ao final desta etapa adicionou-se 100 μ L de H_2SO_4 4M para término da reação. As placas de 96 poços foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) a 450 nm. O conteúdo de neutrófilos foi calculado com base em curva padrão de MPO, feita pela coleta de neutrófilos peritoneais recolhidos de animais estimulados com 3 mL de caseína 5% (dados não mostrados).

3.9 – ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL

A quantificação da hidroxiprolina é uma medida indireta do conteúdo de colágeno dos tecidos (REDDY *at al.*, 1996). Foram homogeneizados 100 mg do pulmão esquerdo em 5 mL de solução salina 0.2%, sendo estes homogenatos subsequentemente congelados e liofilizados. Dez miligramas (10 mg) de tecido liofilizado foi submetido a uma hidrólise alcalina em 375 μ L de NaOH 2N por 25 minutos a 125° C. Uma alíquota de 50 μ L do hidrolisado, ou padrão, foram adicionados a 450 μ L do reagente oxidante cloramina T (cloramina T, VETEC, 0.056 M, em tampão acetato/citrato com 10% de n-propanol, pH 6.5)

por 20 minutos. Após esta etapa foram adicionados 500 µL de p-dimetilaminobenzaldeído (VETEC) diluídos em n-propanol/ácido perclórico (2:1 v/v) seguido de incubação por 20 minutos a 65° C. As placas de 96 poços foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) a 540 nm.

3.10 – DETECÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS

Para a dosagem das citocinas IFN- γ , VEGF e IL-10 e das quimioquinas CCL2/JE, CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CXCL1-3/KC, CXCL1-2/MIP-2, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 foram utilizados kits murinos específicos (DuoSet R&D SYSTEMS) onde foram seguidas as instruções do fabricante. Basicamente, 100 µL/poço do anticorpo de captura (5,5 µL/mL) diluído em PBS estéril foram adicionados a cada placa (NUNC FLAT, 96-well, FALCON). Estas foram vedadas e incubadas a 4°C *overnight*. O conteúdo de cada placa foi retirado e esta foi lavada 3 vezes (300 µL/poço) com um tampão de lavagem (PBS/TWEEN 20 0,05%). Após este procedimento, adicionou-se 300 µL/poço do tampão de bloqueio (BSA 1% em PBS). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por no mínimo uma hora. Repetiu-se o procedimento de lavagem e adicionou-se 100 µL/poço das amostras, lavado bronco-alveolar ou tecido, e padrões, diluídos em tampão de diluição (BSA 0,1% em PBS 1x). As placas foram novamente incubadas *overnight*. Repetiu-se o procedimento de lavagem e foram adicionados 100µL/poço do anticorpo de detecção biotilado (5,55 µL/mL) diluído em tampão de diluição (o mesmo das amostras e padrões). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas. Após mais um procedimento de lavagem, adicionou-se 100 µL/poço de estreptavidina – HRP 1:200 em tampão de diluição e incubou-se as placas à temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente as placas foram lavadas e adicionou-se 100 µL/poço do substrato OPD (em tampão citrato pH 5 com adição de H₂O₂). As placas foram incubadas por 20-30 minutos, à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período observou-se a formação de cor e foram adicionados 50 µL/poço de H₂SO₄ 1M para interromper a reação. As placas foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) a 492 nm.

3.11 – HISTOPATOLOGIA

O pulmão esquerdo foi retirado da cavidade torácica e colocado em PBS 1X com 10% de formaldeído, para posterior inclusão em parafina. Estas amostras foram colocadas em uma câmara de vácuo, com pressão negativa de 1.33×10^4 Pa (VAN KUPPEVELT *et al.*, 2000), equivalentes a 99.758246 mmHg, durante 10 minutos, para que os pulmões fossem inflados, restabelecendo sua morfologia normal. A lesão pulmonar e fibrose foram analisadas qualitativamente, após coloração por Hematoxilina/Eosina e Tricrômico de Gomori respectivamente, em microscópios ópticos com objetiva de 20 e 40X.

3.12 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (One-way ANOVA), seguida do teste Newman-Keuls, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $P < 0.05$. Os dados foram expressos em média \pm EPM. As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o *software* GraphPad Prism 3.0.

3.13 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para padronização do modelo, inicialmente foi realizada uma curva dose-resposta à bleomicina, observando-se o recrutamento celular para o pulmão 48 horas após administração de bleomicina. As doses de 0.025U, 0.125U e 0.625U por animal foram avaliadas. Após a escolha da dose de 0.125U, foi realizada uma cinética para melhor caracterização do modelo. Os tempos escolhidos foram: 6 horas, 12 horas, 1 dia, 2 dias, 4 dias, 8 dias e 24 dias após instilação intra-traqueal de bleomicina. Após esses experimentos de padronização, realizamos experimentos para avaliar o efeito da administração de antagonista de receptor CXCR2, denominado DF2162. Inicialmente uma dose-resposta deste fármaco, DF2162, foi realizada para escolha da dose após desafio com bleomicina. A dose escolhida foi de 6 mg/kg e tomada como padrão para os experimentos específicos. Três grupos experimentais foram montados: (i) controle (instilados com 25 μ L PBS 1x estéril e tratados com 200 μ L de carboximetilcelulose 0.05% por via oral, 2x ao dia); (ii) bleomicina (instilados com 25 μ L de bleomicina 0.125U/animal e tratados com 200 μ L de carboximetilcelulose 0.05% por via oral, 2x ao dia); e (iii) DF2162 (instilados com 25 μ L de bleomicina 0.125U/animal e tratados com DF2162 6mg/kg em 200 μ L carboximetilcelulose 0.05% por

via oral, 2x ao dia). Todos os animais receberam um pré-tratamento com DF2162 ou veículo (carboximetilcelulose) 12 horas e uma hora antes da instilação intra-traqueal de bleomicina ou veículo (PBS 1x estéril). A administração diária de DF2162 foi estudada nos dias 2, 8 e 16 (Figura 4) após desafio com bleomicina, com base na cinética descrita anteriormente.

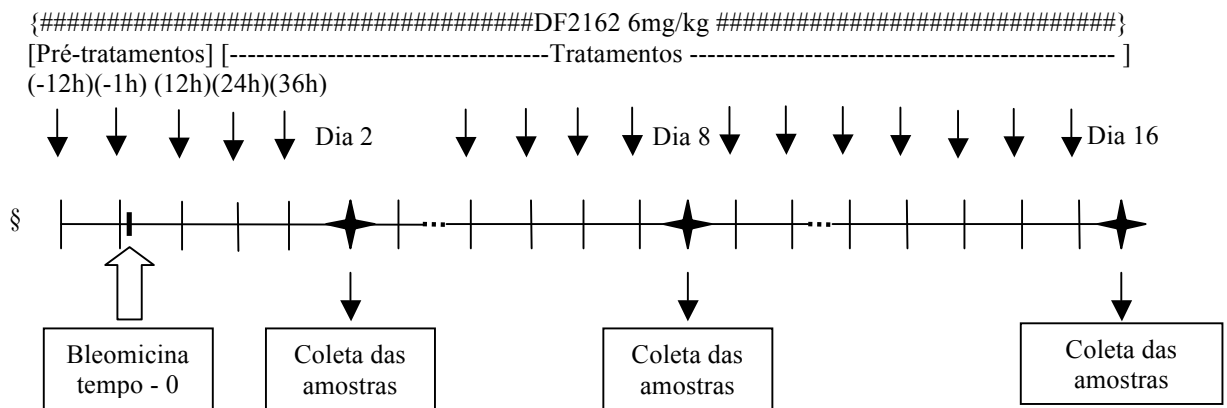


Figura – 4. Delineamento experimental. Esquema demonstrando tratamento com DF2162, administração de bleomicina e tempos para coleta de material.

4 – RESULTADOS

4.1 – PADRONIZAÇÃO DO MODELO

4.1.1 – Bleomicina causa recrutamento celular para pulmão de maneira dose-dependente

Para este experimento inicial, três doses diferentes de bleomicina foram utilizadas para se determinar qual seria a dose mais eficaz no recrutamento de células para a cavidade alveolar, 48 horas após instilação intra-traqueal de bleomicina ou veículo. Os resultados demonstram um aumento do número de células totais recolhidas no lavado bronco-alveolar de forma dose-dependente ao estímulo e estatisticamente significativo para as doses de 0.125 U/animal ($P < 0.05$) e 0.625 U/animal ($P < 0.001$) em relação ao grupo controle (Figura 5 a). Da mesma maneira, foi observado um aumento significativo do número absoluto de neutrófilos do lavado bronco-alveolar para as doses de 0.125 U/animal ($P < 0.01$) e 0.625 U/animal ($P < 0.001$) (Figura 5 b). Não foram detectadas diferenças no acúmulo de células totais e neutrófilos quando administrada a dose de 0.025U/animal em relação ao grupo controle. Não houve alteração significativa do perfil de migração de mononucleares (Figura 5 c). A quantificação da mieloperoxidase no tecido pulmonar mostrou a presença de neutrófilos com as doses de 0.125 U/animal ($P < 0.05$) e 0.625 U/animal ($P < 0.001$) (Figura 5 d). As doses de bleomicina de 0.125 U/animal ($P < 0.05$) e 0.625 U/animal ($P < 0.001$) foram eficazes em promover um influxo celular inflamatório para o pulmão, caracterizado por uma marcante resposta neutrofilica 48 horas após administração. Por outro lado, animais tratados com a dose de 0.625 U/animal apresentaram maior índice de letalidade (dados não mostrados), que nos levou a tomar a dose de 0.125 U/animal como padrão para os demais experimentos decorrentes.

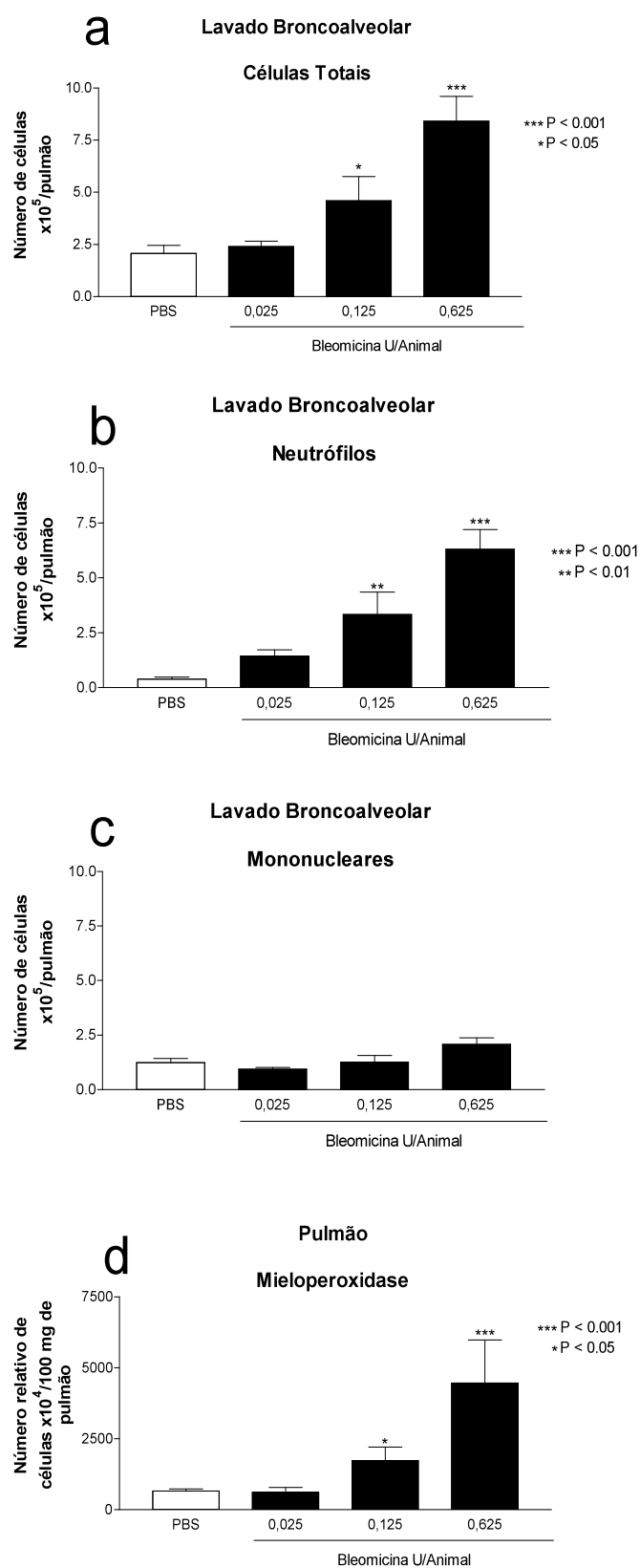


Figura – 5. Recrutamento celular induzido por bleomicina ocorre de maneira dose-dependente. a) células totais, b) neutrófilos e c) mononucleares do lavado bronco-alveolar; d) MPO do pulmão. 48 horas após administração de bleomicina intra-traqueal. Valores expressos como média \pm EPM. One-way ANOVA seguida do teste Newman-Keuls.

4.1.2 – Caracterização da resposta inflamatória e fibrose pulmonar induzida por bleomicina

Os animais foram tratados com 0.125 U/animal via intra-traqueal no dia 0 com veículo ou bleomicina e sacrificados nos tempos 6 horas, 12 horas, dia 1, dia 2, dia 4, dia 8 e dia 24 após instilação. Em relação às células totais recolhidas do lavado bronco-alveolar a cinética demonstrou que nas 12 primeiras horas após estímulo não ocorreu aumento do seu número. O acúmulo de células totais foi observado nos dias 1 ($P < 0.01$), 2 ($P < 0.001$) e 24 ($P < 0.001$), com queda próxima aos níveis basais no dia 4 e pico máximo de concentração no dia 8 ($P < 0.001$) em relação ao grupo controle (Figura 6 a). Neutrófilos são encontrados em maior número já nas 12 primeiras horas ($P < 0.05$), com aumento gradativo entre o dia 1 ($P < 0.01$) e dia 2 ($P < 0.001$), apresentando pequena queda no 4º dia ($P < 0.01$). No 8º dia o número de neutrófilos aumenta novamente atingindo um pico máximo de acúmulo durante a cinética ($P < 0.001$), seguida de diminuição por volta do dia 24 (Figura 6 b). Mononucleares são encontrados aumentados nos dias 1 ($P < 0.05$) e 2 ($P < 0.01$), retornam a níveis basais no 4º dia, aumentam de forma significativa no dia 8 ($P < 0.001$) e estes níveis permanecem aumentados até o 24º dia ($P < 0.001$) (Figura 6 c). Estes resultados mostram um perfil bifásico do influxo celular para a região alveolar em resposta a bleomicina, caracterizado por um pico de concentração inicial do número de células, seguido de queda próxima aos níveis basais e com subsequente aumento do número celular, recolhidas pelo lavado bronco-alveolar.

Foram encontrados níveis elevados de nitrito (NO_2) no lavado broncoalveolar 6 horas após desafio com bleomicina ($P < 0.01$) e também nos dias 2 ($P < 0.01$) e 8 ($P < 0.001$) (Figura 6 d).

Lavado bronco-alveolar

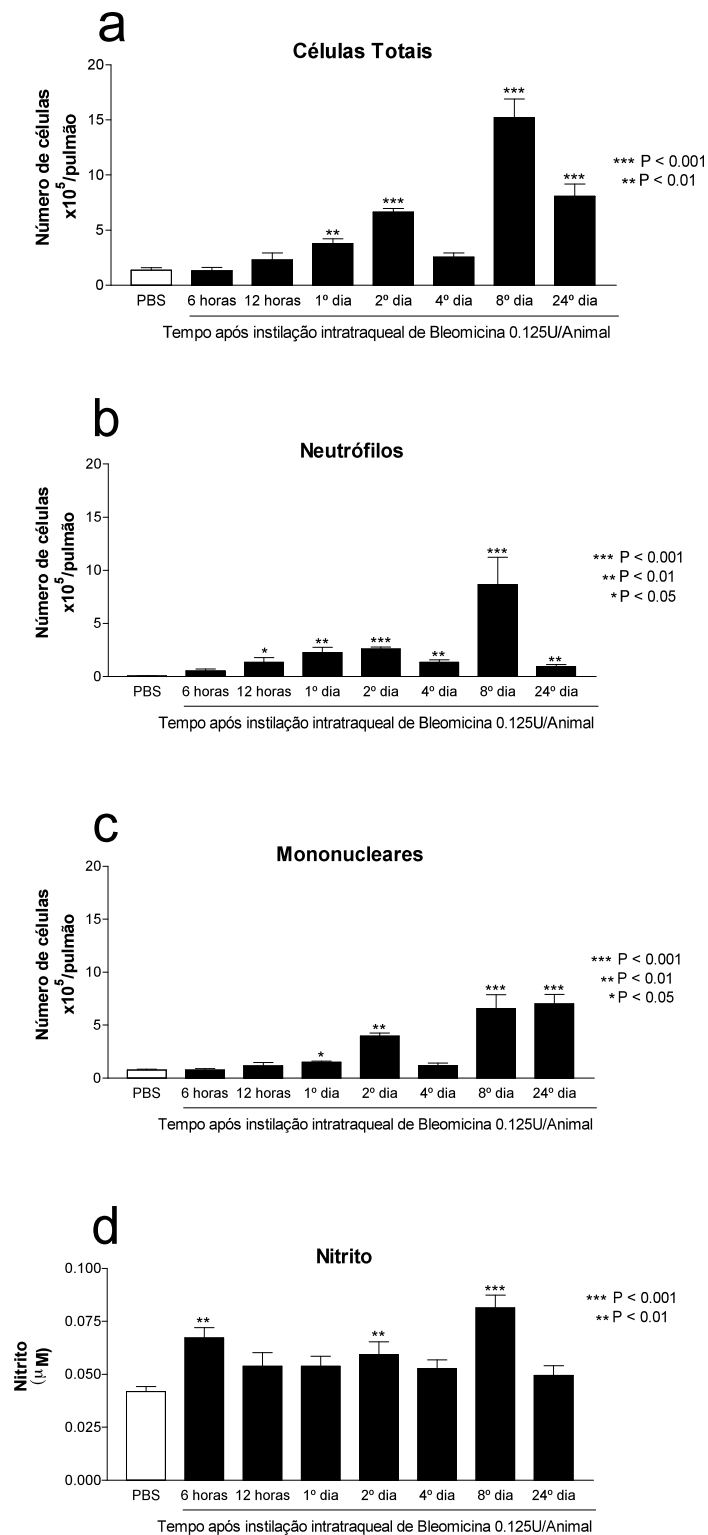


Figura – 6. Cinética para caracterização do modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal. a) células totais, b) neutrófilos e c) mononucleares; d) nitrito do lavado bronco-alveolar. Valores expressos como média ± EPM. One-way ANOVA seguida do teste Newman-Keuls.

Índices de mieloperoxidase demonstram a presença marcante de neutrófilos no tecido pulmonar 12 horas ($P < 0.01$) a partir do estímulo persistindo em maior quantidade nos dias 1 ($P < 0.01$), 2 ($P < 0.001$) e 4 ($P < 0.001$), e decaindo a partir do 8º dia (Figura 7 a). Da mesma forma os índices de N-acetilglicosaminidase indicam a presença relativa de macrófagos no tecido pulmonar em todos os tempos a partir das 6 primeiras horas ($P < 0.01$), com aumento máximo observado no dia 8 ($P < 0.001$) e seguida de pequena queda por volta do 24º dia ($P < 0.01$) (Figura 7 b).

A quantificação da hidroxiprolina tecidual demonstrou um aumento tempo-dependente após tratamento com bleomicina, iniciando no 1º dia ($P < 0.05$) seguido de um aumento no 8º dia ($P < 0.001$) com aumento máximo da concentração no pulmão por volta do 24º dia ($P < 0.001$) (Figura 7 c). Este dado indica indiretamente um aumento da deposição de fibras do colágeno no tecido pulmonar com o passar do tempo, chegando a atingir níveis mais elevados numa fase mais tardia do processo desencadeado pela bleomicina, que é a principal característica da fibrose pulmonar.

De maneira geral, a partir destes dados podemos dividir este processo em três fases: (i) aguda, que é a resposta inflamatória inicial desencadeada pela ação da bleomicina sobre o tecido pulmonar, predominantemente neutrofílica que surge a partir das primeiras horas e se estende até por volta do 4º dia; (ii) agudo-crônica, caracterizada por uma resposta inflamatória secundária mista, com menor presença de neutrófilos e mononucleares, que compreende do 4º ao 8º dia e (iii) crônico-fibrótica, caracterizada pela presença predominante de mononucleares e com excessiva deposição de colágeno a partir do 8º dia em diante.

Pulmão

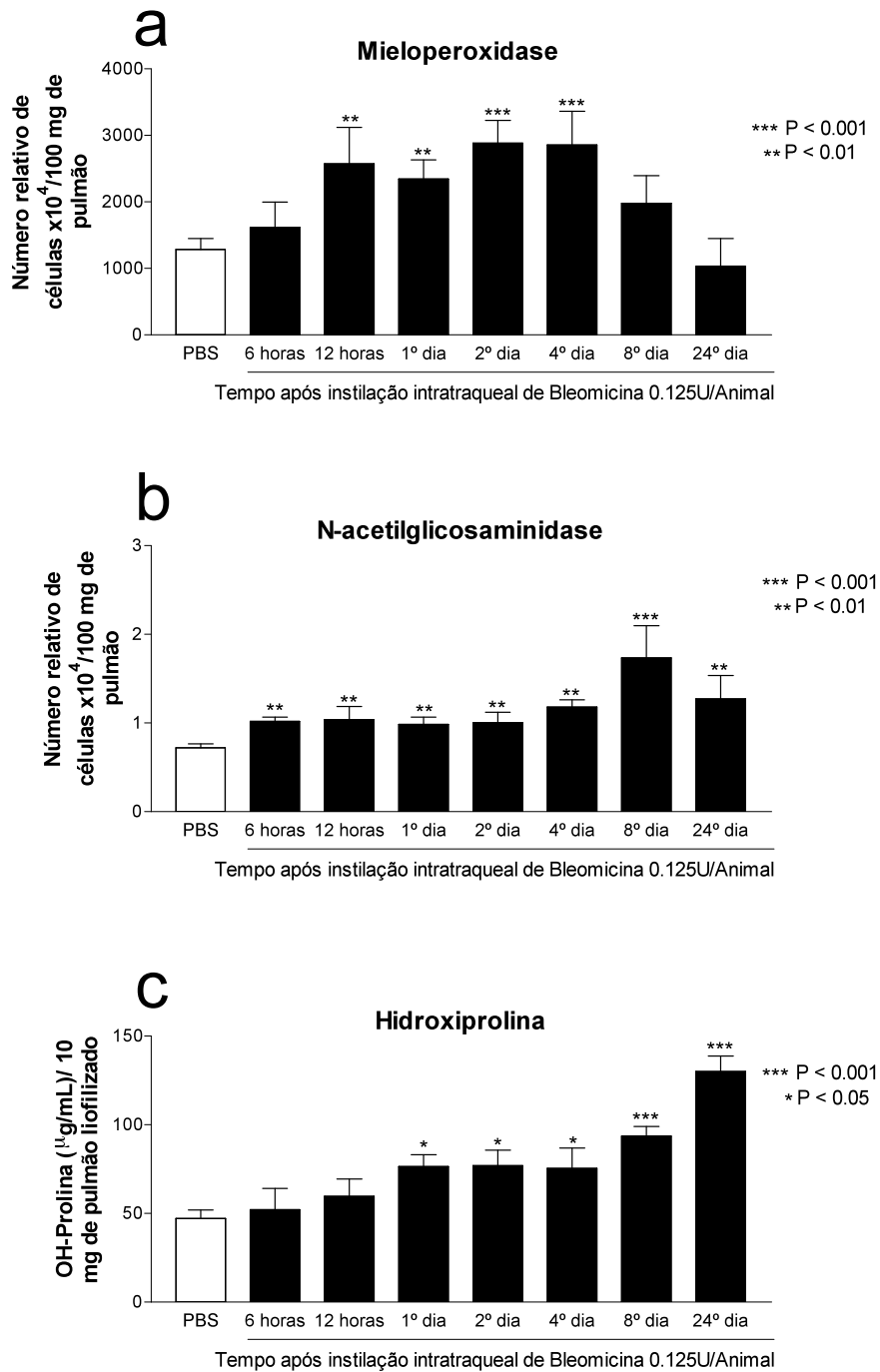


Figura – 7. Cinética para caracterização do modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal. a) MPO, b) NAG e c) OH-prolina do pulmão. Valores expressos como média \pm EPM. One-way ANOVA seguida do teste Newman-Keuls.

4.1.3 – Caracterização do perfil de produção de citocinas e quimiocinas após administração de bleomicina

Após caracterização da cinética celular, quantificamos a produção de citocinas e quimiocinas importantes neste modelo. Ensaios foram feitos para detecção de TGF- β , IFN- γ e VEGF, que são citocinas descritas como participantes no processo que envolve a fibrose pulmonar, possuindo respectivamente funções pró-fibrogênica, anti-fibrogênica e pró-angiogênica, no tecido pulmonar (FEHRENBACH *et al.*, 1999; SHIMABUKURO *et al.*, 2003). Nossos ensaios falharam em detectar TGF- β tecidual (dados não apresentados). IFN- γ apresentou uma cinética similar à descrita na literatura, com queda significativa a partir do 2º dia ($P < 0.05$), persistindo até o 8º dia onde atingiu valores mais baixos ($P < 0.01$) em relação ao grupo controle, esses níveis se mantiveram baixos até o 24º dia ($P < 0.05$) (Figura 8. a). Esta queda dos níveis de IFN- γ está correlacionada com a deposição de colágeno demonstrada pela quantificação de hidroxiprolina no tecido (Figura 7 c).

Os níveis de VEGF, importante fator angiogênico, foi encontrado com níveis elevados nas 6 primeiras horas ($P < 0.001$), retornando a níveis basais com 12 horas e apresentou queda gradativa a partir do 1º dia ($P < 0.001$), atingindo níveis mais baixo no 4º dia ($P < 0.001$) em relação ao controle. No dia 8 os níveis de VEGF ainda permanecem baixos ($P < 0.001$) e só retornam aos níveis basais no 24º dia (Figura 8 b).

As quimiocinas que participam do recrutamento e ativação de neutrófilos (CXCL1-3/KC 3 e CXCL1-2/MIP-2) e mononucleares (CCL2/JE e CCL5/RANTES) foram quantificadas no tecido. CXCL1-3/KC apresentou níveis elevados a partir das 6 primeiras horas ($P < 0.001$) que persistiram até o dia 4 ($P < 0.001$). No 8º dia após desafio com bleomicina CXCL1-3/KC retorna aos níveis basais que se mantêm até o 24º dia (Figura 8 c). CXCL1-2/MIP-2 apresentou elevação dos seus níveis teciduais apenas nos dias 1 ($P < 0.001$) e 4 ($P < 0.01$), com pico máximo alcançado no 1º dia e sem alteração dos níveis nos demais tempos (Figura 8 d). Os valores encontrados de CXCL1-3/KC e CXCL1-2/MIP-2 correspondem com o influxo de neutrófilos para o pulmão, demonstrado na cinética celular do lavado bronco-alveolar (Figura 6) e ensaios de MPO (Figura 7 a). As quimiocinas CCL2/JE e CCL5/RANTES participam do recrutamento de mononucleares, tais como monócitos, macrófagos e linfócitos. CCL2/JE foi detectada em concentrações elevadas já no 1º dia ($P < 0.001$) após tratamento com bleomicina, com pequeno aumento no 2º dia e atingindo um pico máximo no 4º dia ($P < 0.001$). No 8º dia os níveis decrescem, mas ainda estão altos em relação ao grupo controle ($P < 0.001$) e normalizam por volta do 24º dia (Figura 8 e).

CCL5/RANTES, apresentou elevação apenas no 2º dia em relação ao grupo controle ($P < 0.001$) e nos demais tempos não foram observadas alterações na sua concentração (Figura 8 f).

Pulmão

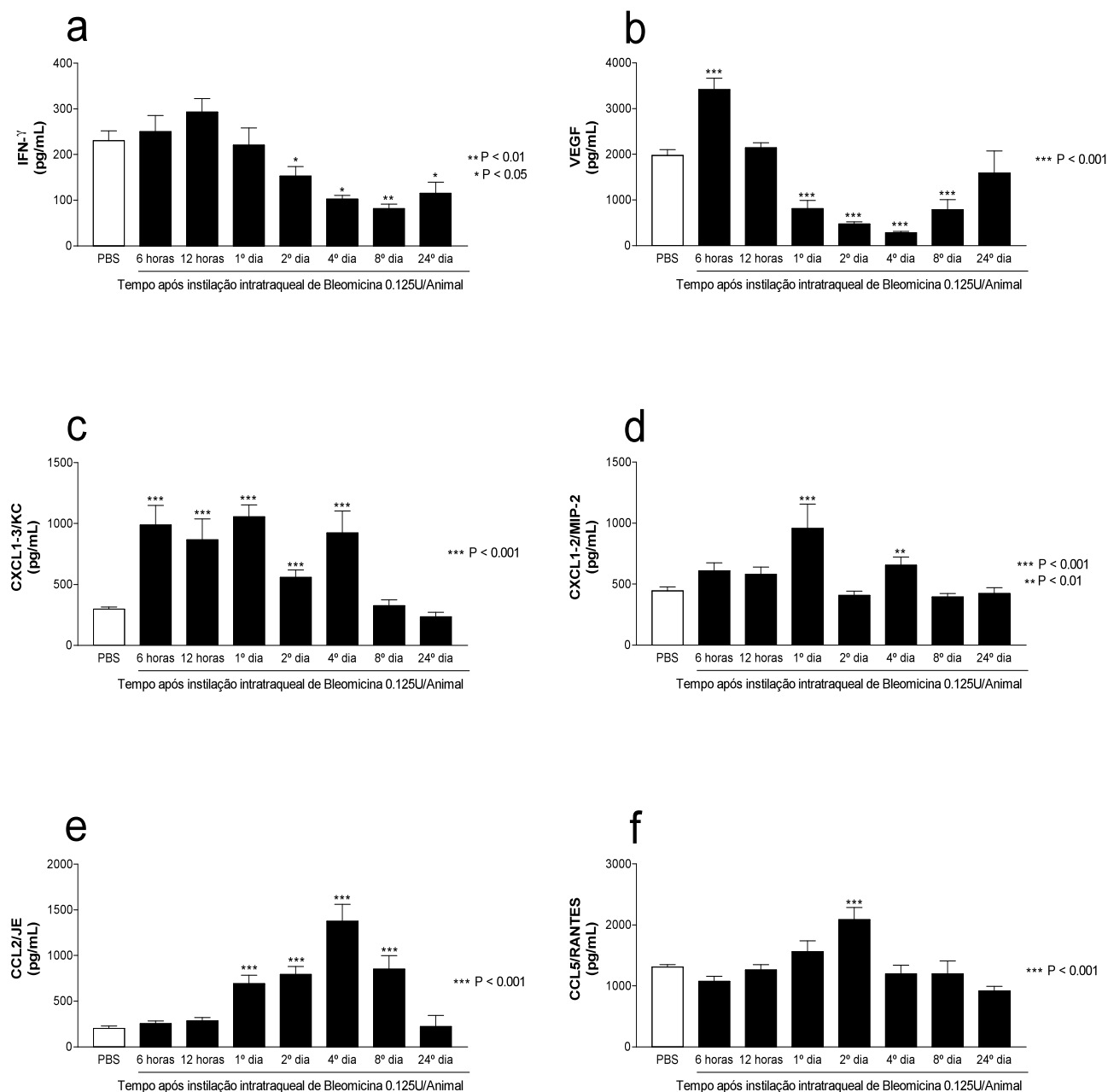


Figura – 8. Produção de citocinas e quimiocinas pelo pulmão induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal. a) IFN- γ , b) VEGF, c) CXCL1-3/KC, d) CXCL1-2, e) CCL2/JE e e) CCL5/RANTES. Valores expressos como média \pm EPM. One-way ANOVA seguida do teste Newman-Keuls.

4.2 – TRATAMENTO COM ANTAGONISTA DE RECEPTOR CXCR2

4.2.1 – O tratamento com antagonista de receptor CXCR2 inibiu o recrutamento de neutrófilos para o pulmão induzido por bleomicina de maneira dose-dependente

Uma vez padronizado o modelo, nosso próximo passo foi avaliar o efeito do antagonista de receptor CXCR2, DF2162, na migração de neutrófilos, produção de quimiocinas e citocinas, alterações histopatológicas e letalidade no modelo. Experimentos iniciais foram realizados com as doses de 1.2, 6 e 30 mg/kg animal, duas vezes ao dia. Dois pré-tratamentos com DF2162 foram feitos, um 12 horas e outro 1 hora antes da instilação de bleomicina, e após este desafio os animais foram tratados de 12 em 12 horas e sacrificados para análise com 48 horas, sendo que o sacrifício ocorreu 12 horas após último tratamento. O tratamento com as doses de 1.2, 6 e 30 mg/kg animal, duas vezes ao dia falhou em inibir o recrutamento de células totais para a cavidade alveolar 48 horas após administração de bleomicina (Figura 9 a). Entretanto, DF2162 inibiu o influxo de neutrófilos para o espaço alveolar com todas as três doses testadas, com inibição máxima alcançada com as doses de 6 e 30 mg/kg animal ($P < 0.01$). A dose de 1.2 mg/kg animal foi capaz de inibir o influxo de neutrófilos, entretanto em menor intensidade das outras doses testadas (Figura 9 b). A administração de DF2162 em todas as doses utilizadas nesse tempo observado não alterou o recrutamento de mononucleares em nenhum grupo avaliado. (Figura 9 c).

Lavado bronco-alveolar

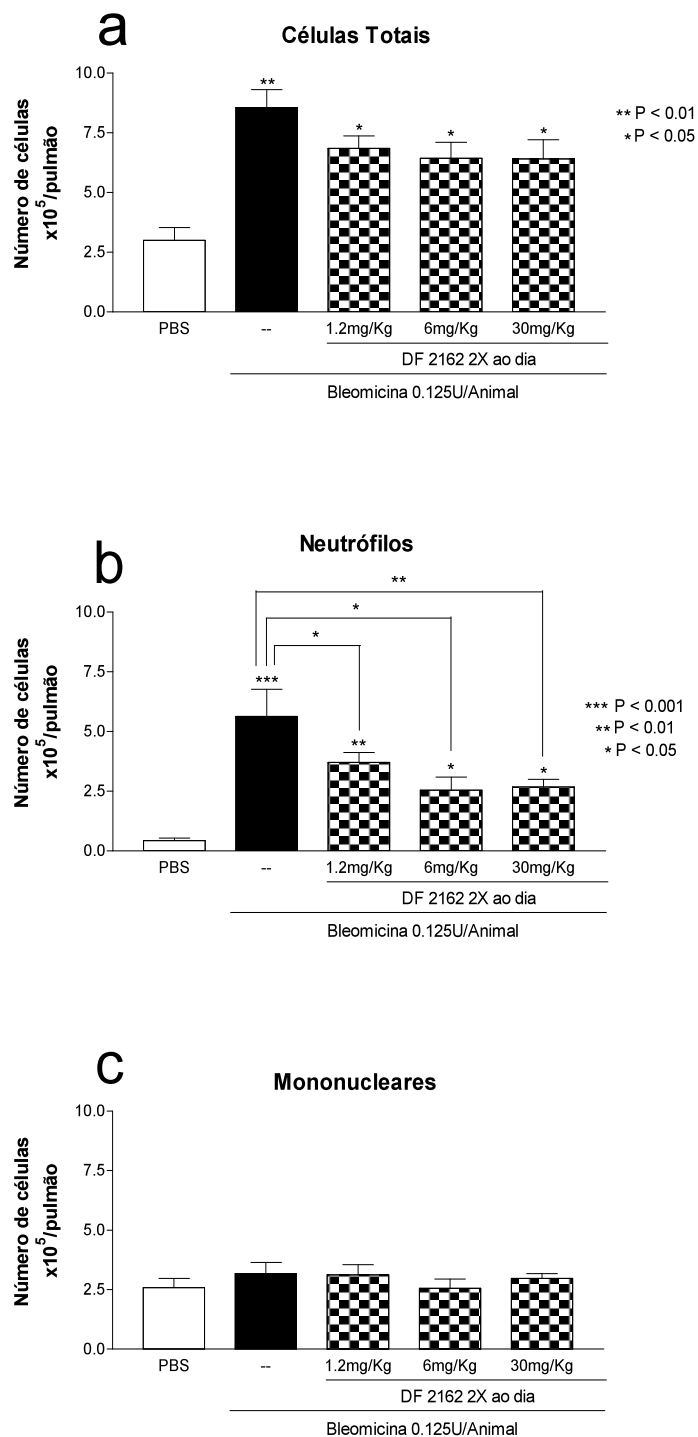


Figura – 9. A administração de antagonista de receptor CXCR2 (DF2162) inibe o recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar de maneira dose-dependente no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal. a) células totais, b) neutrófilos e c) mononucleares do lavado bronco-alveolar. Valores expressos como média \pm EPM. One-way ANOVA seguida do teste Newman-Keuls.

4.2.2 – Efeito do tratamento com DF2162 6 mg/kg animal sobre o recrutamento celular

Após a escolha da dose de 6 mg/kg animal, por apresentar efeito similar a dose máxima utilizada no experimento anterior (Figura 9), testamos o efeito desta dose no recrutamento celular nos demais tempos, baseando-se na cinética descrita anteriormente (Figura 6). O tratamento com DF2162 6 mg/kg animal inibiu o recrutamento de células totais para o espaço alveolar nos dias 2 ($P < 0.05$) e 8 ($P < 0.01$) em relação ao grupo que recebeu apenas veículo, sem alteração do número total de células no 16º dia (Figura 10 a). Da mesma maneira, o tratamento com DF2162 6 mg/kg animal inibiu o recrutamento de neutrófilos nos dias 2 ($P < 0.05$) e 8 ($P < 0.001$), sem alteração no 16º dia após desafio com bleomicina (Figura 10 b). Não houve alteração do recrutamento de mononucleares mediante a administração do DF2162 (Figura 10 c). Desta forma, observamos que a inibição do influxo de células totais é um reflexo causado pela inibição do influxo de neutrófilos pelo tratamento com DF2162, uma vez que não houve alteração do perfil de mononucleares encontrados no lavado bronco-alveolar, em comparação com o grupo tratado apenas com veículo. A administração de DF2162 não interferiu nos níveis de MPO encontrados nos dias 2 e 8, mas aumentou significativamente a quantidade dessa enzima uma diferença estatisticamente significativa foi observada no 16º dia após instilação de bleomicina. O grupo tratado com DF2162 apresentou níveis mais elevados de mieloperoxidase em relação ao grupo tratado apenas com veículo ($P < 0.05$), 16 dias após desafio (Figura 10 d). Já os níveis de N-acetilglicosaminidase encontrados não apresentaram diferenças entre os grupos tratados com DF2162 e veículo (Figura 10 e). Observou-se apenas um aumento gradativo da atividade ao longo do tempo.

4.2.3 – Efeito do tratamento com DF2162 6 mg/kg animal sobre a produção de citocinas e quimiocinas

Confirmadas as alterações no recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar (Figura 10), estudamos então o efeito do tratamento com DF2162 sobre a produção de citocinas no pulmão e no lavado bronco-alveolar após administração de bleomicina. Não foram encontradas diferenças na produção das citocinas IFN- γ e VEGF no pulmão dos animais tratados com DF2162 ou veículo (Figura 11 a e b), mantendo-se um perfil semelhante ao encontrado na cinética de padronização do modelo (Figura 8). O mesmo ocorreu para as quimiocinas CXCL1-3/KC e CXCL10/IP-10 (Figura 11 c e e), sem alterações observadas entre os grupos tratados com DF2162 ou veículo. Alterações foram observadas entre grupos tratados com DF2162 ou veículo durante a produção de CCL5/RANTES. Animais tratados com DF2162 apresentaram uma inibição da produção de CCL5/RANTES ($P < 0.01$) em relação ao grupo tratado com veículo dois dias após desafio com bleomicina (Figura 11 d). Com 8 dias, o grupo tratado com DF2162 apresentou uma queda abaixo dos níveis basais na produção de CCL5/RANTES ($P < 0.01$), e no 16º dia os níveis de CCL5/RANTES do grupo tratado com veículo volta a normalidade, enquanto que no grupo tratado com DF2162 estes níveis permanecem abaixo dos níveis basais, sendo significativa a diferença entre estes grupos ($P < 0.05$) (Figura 11 d).

Os níveis de citocinas e quimiocinas do lavado bronco-alveolar também foram investigados. Da mesma forma, a administração de DF2162 não interferiu na produção das quimiocinas CXCL1-3/KC, CXCL1-2/MIP-2, CCL2/JE E CCL3/MIP-1 α encontradas no lavado bronco-alveolar (Figura 12 a, b, c e d). Entretanto, animais tratados com DF2162 apresentaram níveis elevados ($P < 0.05$) de CXCL9/MIG em relação ao grupo tratado com veículo, apenas no 2º dia após a administração de bleomicina (Figura 12 e). Nenhuma alteração no perfil de produção de IL-10 foi observada entre o grupo de tratados com DF2162 ou veículo (Figura 12 f).

Pulmão

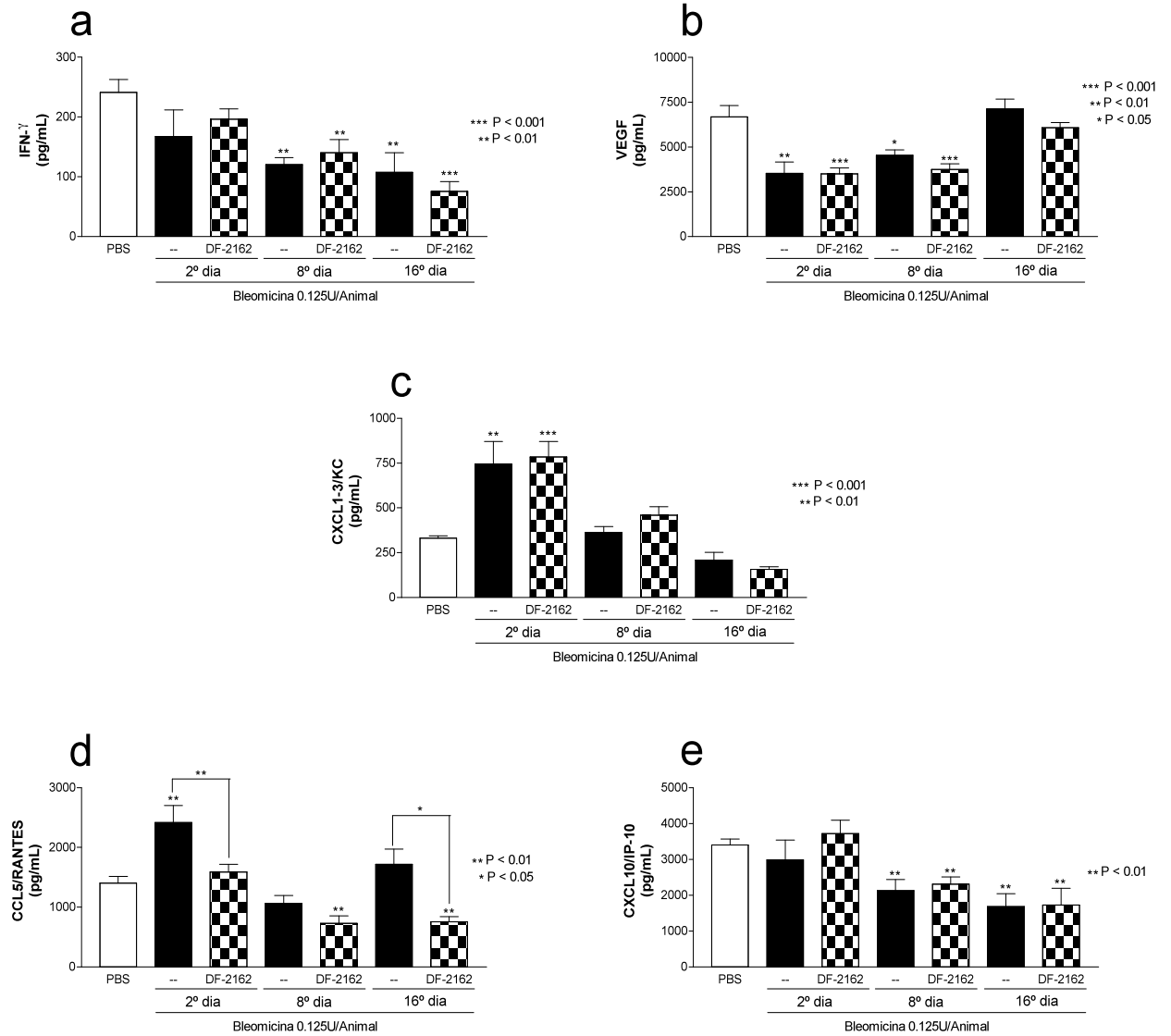


Figura – 11. Efeito da administração de antagonista de receptor CXCR2 (DF2162) na dose de 6 mg/kg animal 2 x ao dia, sobre a produção de citocinas e quimiocinas no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal. a) IFN- γ , b) VEGF, c) CXCL1-3/KC, d) CCL5/RANTES e e) CXCL10/IP-10 do pulmão. Valores expressos como média \pm EPM. One-way ANOVA seguida do teste Newman-Keuls.

Lavado bronco-alveolar

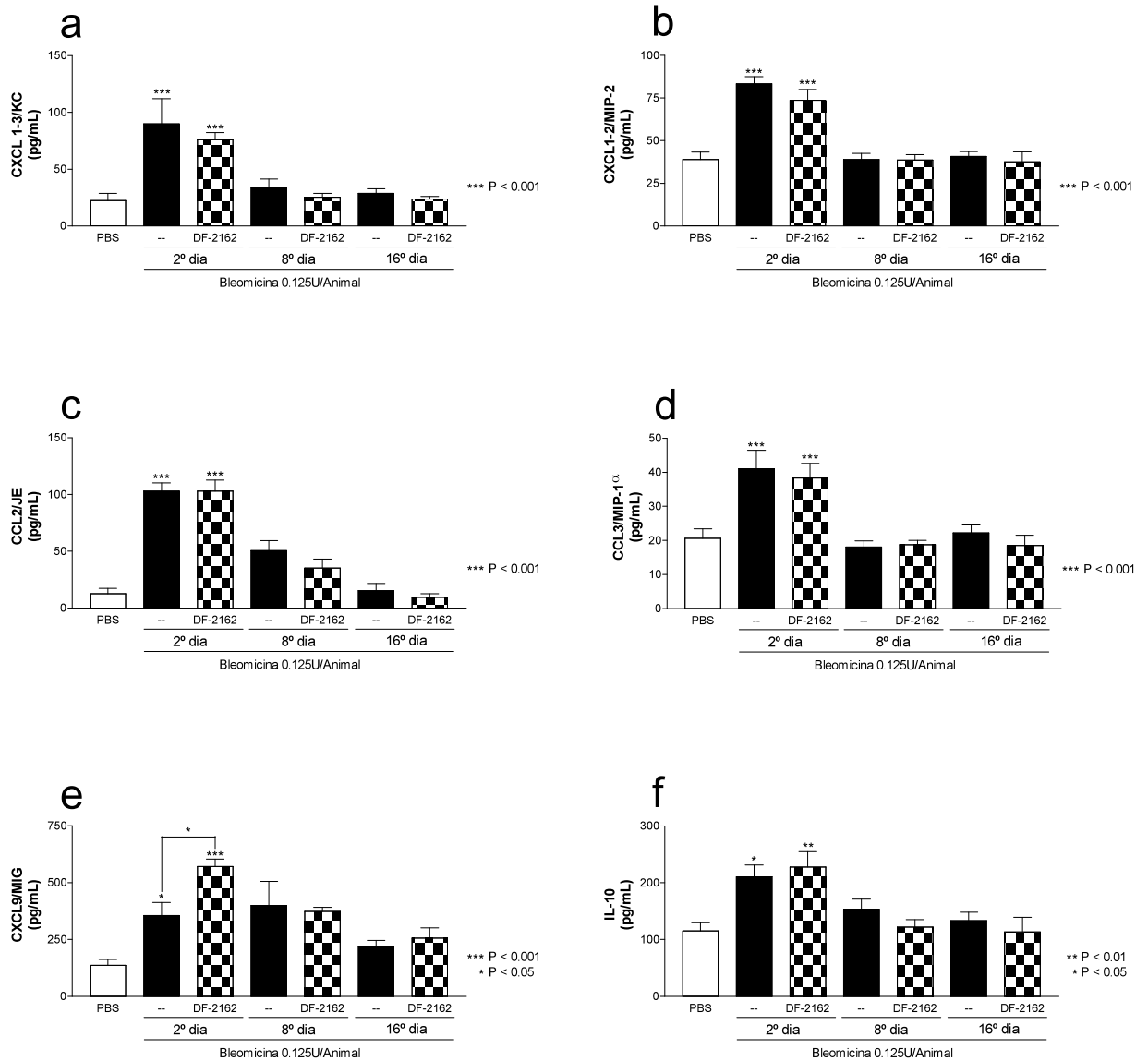


Figura – 12. Efeito da administração de antagonista de receptor CXCR2 (DF2162) na dose de 6 mg/kg animal 2 x ao dia, sobre a produção de citocinas e quimiocinas no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal. a) CXCL1-3/KC, b) CXCL1-2/MIP-2, c) CCL2/JE, d) CCL3/MIP-1 α , e) CXCL9/MIG e f) IL-10 do lavado bronco-alveolar. Valores expressos como média \pm EPM. One-way ANOVA seguida do teste Newman-Keuls.

4.2.4 – Efeito do tratamento com DF2162 6 mg/kg animal na lesão pulmonar e fibrose

A análise histopatológica revelou diferenças nas alterações morfológicas do tecido pulmonar observadas entre os grupos tratados com DF2162 ou veículo após administração intratraqueal de bleomicina. Na avaliação do pulmão com dois dias após instilação de bleomicina foi observada hiperemia dos vasos da parede alveolar, com exudação predominante de neutrófilos no grupo que recebeu apenas veículo (Figura 13 b). Já o grupo tratado com DF2162 apresentou uma menor exudação celular, mas com hiperemia persistente (Figura 13 c). Com oito dias, foi observado no grupo tratado apenas com veículo, pneumonite intersticial difusa, com aumento da hiperemia e edema da parede alveolar e infiltrado celular composto predominantemente por neutrófilos (Figura 13 d). O grupo tratado com DF2162 apresentou uma pneumonite intersticial multifocal, com hiperemia, edema alveolar e discreto infiltrado inflamatório oito dias após a instilação de bleomicina (Figura 13 e). No 16º dia os animais que receberam apenas veículo, apresentaram um quadro de fibrose intersticial difusa severa com formações císticas em forma de colméia alterando a arquitetura pulmonar (Figura 13 f e h). O infiltrado inflamatório, neste grupo, era predominantemente mononuclear. No grupo tratado com DF2162, adjacente as áreas de fibrose eram observadas áreas de parênquima pulmonar mais preservadas, caracterizando um quadro de fibrose difusa multifocal com discreta infiltrado inflamatório (Figura 13 g e i).

A deposição de colágeno foi melhor evidenciada pela coloração com Tricrômico de Gomori, que cora o tecido conjuntivo em verde. Deposição de colágeno progressiva foi observada nos animais tratados apenas com veículo, que apresentaram áreas de fibrose densa difusa a partir do 8º dia, com remodelamento intenso e perda da arquitetura pulmonar normal encontrada no 16º (Figura 14 b, d e f). Também foi observada progressiva deposição de colágeno na parede alveolar dos animais tratados com DF2162, mas de maneira menos acentuada e de forma multifocal, apresentando ainda áreas preservadas próximas a áreas de comprometimento tecidual pulmonar, causado pelo espessamento alveolar (Figura 14 c, e, g).

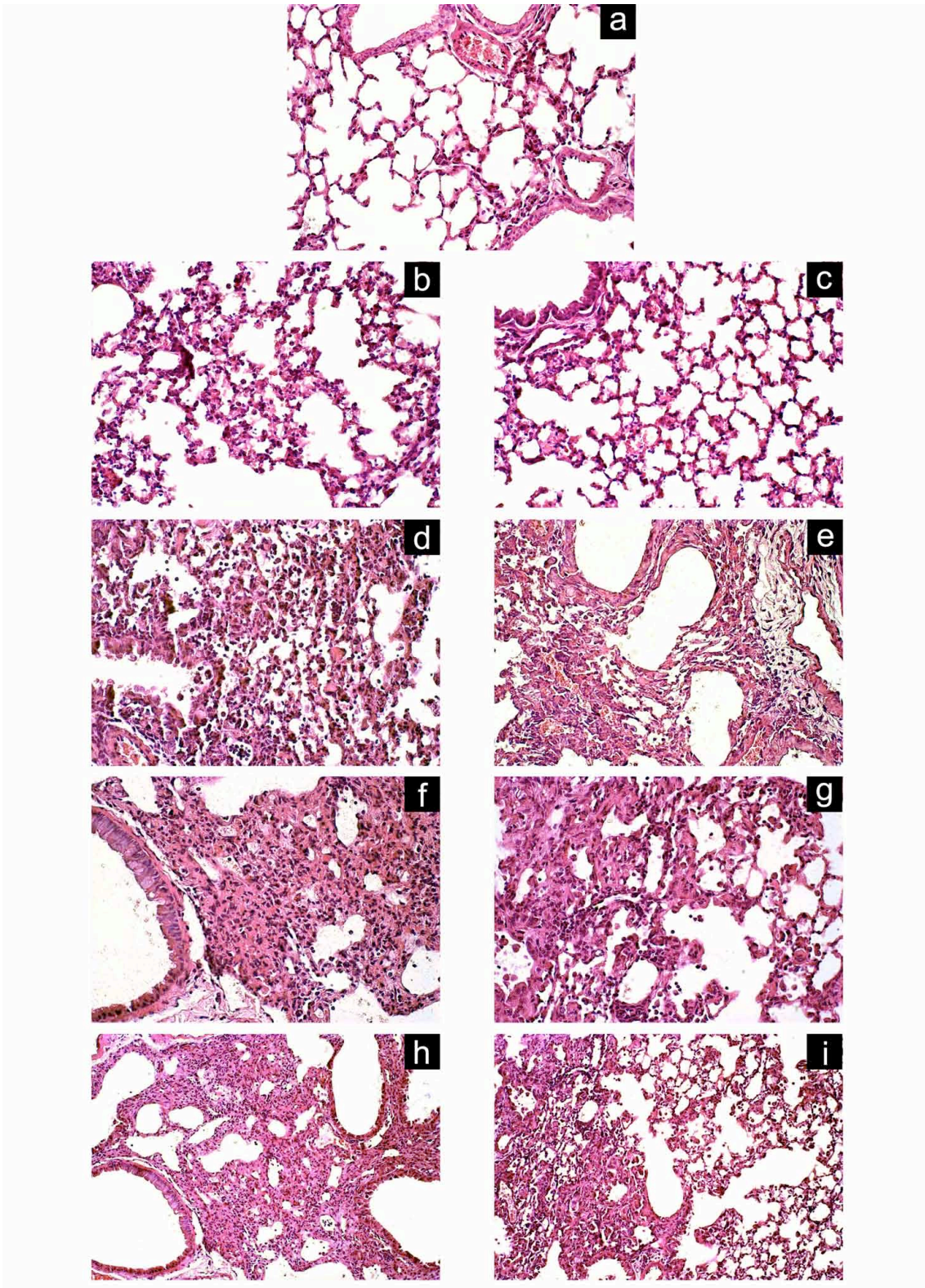


Figura – 13. Efeito da administração de antagonista de receptor CXCR2 (DF2162) na dose de 6 mg/kg animal 2 x ao dia, sobre lesão pulmonar no modelo experimental de fibrose induzida por bleomicina. Hematoxilina e Eosina. a) controle (aumento de 40x), b) veículo 2 dias (aumento de 40x), c) DF2162 2 dias (aumento de 40x), d) veículo 8 dias (aumento de 40x), e) DF2162 8 dias (aumento de 40x), f) veículo 16 dias (aumento de 40x), g) DF2162 16 dias (aumento de 40x), h) veículo 16 dias (aumento de 20x), i) DF2162 16 dias (aumento de 20x).

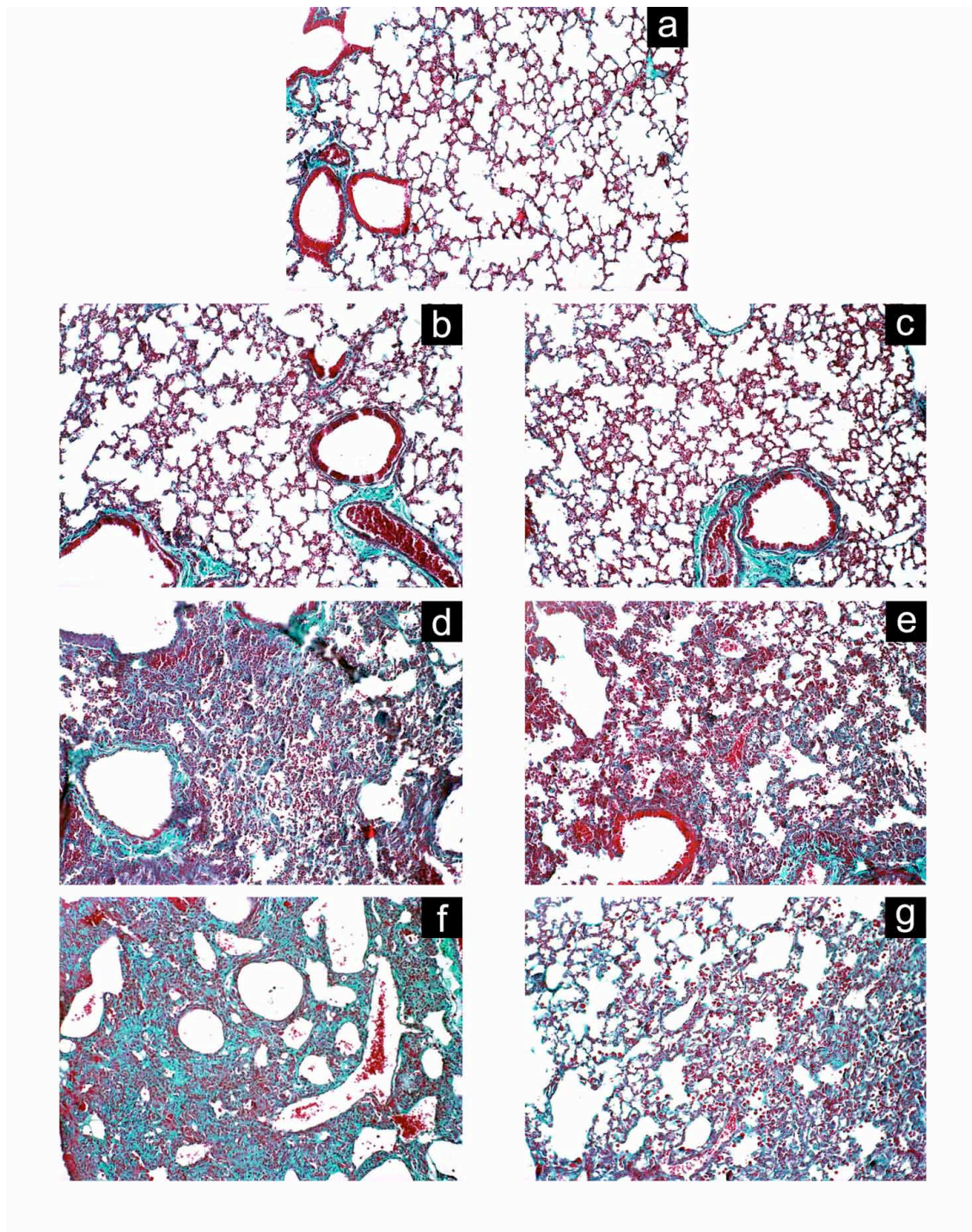


Figura – 14. Efeito da administração de antagonista de receptor CXCR2 (DF2162) na dose de 6 mg/kg animal 2 x ao dia, sobre a deposição de colágeno pulmonar no modelo experimental de fibrose induzida por bleomicina. Tricromicro de Gomori. a) controle (aumento de 20x), b) veículo 2 dias (aumento de 20x), c) DF2162 2 dias (aumento de 20x), d) veículo 8 dias (aumento de 20x), e) DF2162 8 dias (aumento de 20x), f) veículo 16 dias (aumento de 20x), g) DF2162 16 dias (aumento de 20x).

4.2.5 – Efeito do tratamento com DF2162 na sobrevida dos animais desafiados com bleomicina

Após verificarmos a sua capacidade em diminuir o influxo de neutrófilos para o espaço alveolar, diminuição da lesão pulmonar e diminuição da deposição de colágeno intersticial, sem alterações diretas sobre a produção de citocinas e quimiocinas estudamos a participação do tratamento com DF2162 na letalidade dos animais desafiados com bleomicina. Intrigantemente, animais tratados com DF2162 apresentaram uma taxa de letalidade de 66.6%, este valor foi superior ao encontrado no grupo tratado apenas com veículo (25%) no final dos 16 dias de experimento, com uma diferença observada de 41.6% entre os grupos (Figura 15). No grupo controle, animais instilados apenas com PBS 1x estéril não apresentaram nenhuma morte.

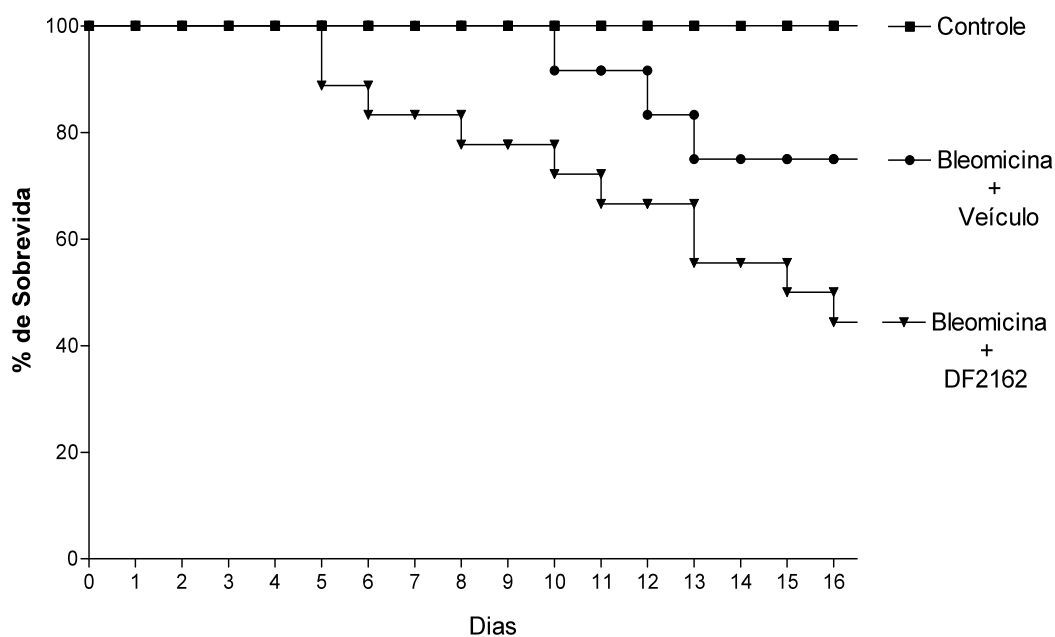


Figura – 15. Letalidade. Efeito da administração de antagonista de receptor CXCR2 (DF2162) na dose de 6 mg/kg animal 2 x ao dia, sobre a letalidade no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina na dose de 0.125U/animal.

4.3 – SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, podemos sumarizar:

- A bleomicina causa recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar de maneira dose-dependente;
- Os neutrófilos são as principais células presentes na resposta inflamatória pulmonar aguda desencadeada pela bleomicina;
- Os fatores quimiotáticos para neutrófilos, tais como as quimiocinas CXCL1-3/KC e CXCL1-2/MIP-2, são detectadas em níveis elevados no pulmão nos primeiros momentos após administração intra-traqueal de bleomicina.
- O tratamento com o antagonista do receptor CXCR2, DF2162, inibe o recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar de maneira dose-dependente;
- O tratamento com DF2162, na dose de 6 mg/kg duas vezes ao dia, inibe os principais picos de recrutamento dos neutrófilos para o espaço alveolar, induzida pela administração de bleomicina.
- O tratamento com DF2162 não tem efeito sobre a produção das citocinas IFN- γ , VEGF e IL-10 induzida pela administração de bleomicina.
- O tratamento com DF2162 não tem efeito sobre a produção das quimiocinas CXCL1-3/KC, CXCL1-2/MIP-2, CCL2/JE, CCL3/MIP-1 α e CXCL10/IP-10 induzida pela administração de bleomicina.
- O tratamento com DF2162 inibiu a produção de CCL5/RANTES e aumento da produção de CXCL9/MIG, após administração de bleomicina.
- O tratamento DF2162 reduz a lesão e a deposição progressiva de colágeno no interstício pulmonar, induzidas pela administração de bleomicina.
- O tratamento com DF2162 levou a um maior índice de mortalidade sob administração de bleomicina.

5 – DISCUSSÃO

A bleomicina, apesar de ser utilizada clinicamente como fármaco no tratamento de vários tipos de neoplasias, tem sido amplamente utilizada também como modelo experimental de estudo dos mecanismos que estão envolvidos no desenvolvimento de uma resposta fibrótica pulmonar (CHEN *et al.*, 2005). Estudos realizados com esse fármaco nos permitem um melhor entendimento dos processos que governam a fibrose pulmonar (GIRI, 2002), doença que atinge cerca de 5 milhões de pessoas em todo o mundo. Mais de 30 anos já se passaram desde o início dos estudos neste modelo, mas pouco se sabe ainda acerca dos seus mecanismos (MOHAMMED *et al.*, 2003). Hoje em dia é amplamente aceito que uma resposta inflamatória possa ser o principal fator desencadeante do excessivo reparo tecidual e deposição de colágeno, que é marca registrada do processo fibrótico pulmonar (GIRI, 2002).

Muitos estudos têm provido novas visões sobre a participação dos mediadores do processo inflamatório (KUWANO *et al.*, 2001), em particular os aspectos funcionais das citocinas e quimiocinas nesta patogênese (ZHANG *et al.*, 1996), exigindo-se uma maior atenção sobre o estudo do seu papel. Entretanto, os mecanismos responsáveis pela regulação da fibrose intersticial progressiva permanecem incompletamente caracterizados (MOHAMMED *et al.*, 2003). Dessa forma, hoje, tem-se buscado novas terapias que têm como alvo a intervenção farmacológica sobre as quimiocinas, objetivando-se uma resposta imunomodulatória durante a inflamação aguda e crônica. Essas estratégias buscam intervir diretamente sobre o tráfego celular e perfil de ativação (CASCIERI *et al.*, 2000), diminuindo-se, assim, a destruição e cicatrização tecidual.

Em nosso modelo, a resposta inflamatória aguda pulmonar é particularmente caracterizada pela presença marcante de neutrófilos no pulmão e no espaço alveolar, concomitantemente com a produção das quimiocinas CXCL1-3/KC e CXCL1-2/MIP-2. Essas quimiocinas são ligantes de receptores CXCR2 e descritas como importantes para o recrutamento de neutrófilos para o foco da lesão (YARA *et al.*, 2001) e para a angiogênese inflamatória (KEANE *et al.*, 1999). Estudos anteriores demonstram que estas quimiocinas são produzidas por macrófagos alveolares (LIU *et al.*, 2002), neutrófilos ativados (SCAPINI *et al.*, 2000), células epiteliais do tipo II (WITHERDEN *et al.*, 2004) e células endoteliais (SCHRAUFSTATTER *et al.*, 2001) em resposta a agentes lesivos, tais como bleomicina. Com base neste princípio, é nossa hipótese que o bloqueio de receptores CXCR2, pode ser um importante método anti-inflamatório a ser estudado, com finalidade de: (i) ser utilizado no tratamento de inflamações pulmonares, prevenindo-se uma cronificação da resposta e

posterior cicatrização; e (ii) utilizada como agente paliativo com uso concomitante durante tratamento quimioterápico com bleomicina.

A destruição tecidual que precede a fibrose pode estar correlacionada com a liberação de vários produtos originados das células inflamatórias ativadas, presentes no tecido após a lesão ser causada (SHIMABUKURO *et al.*, 2003). Em nosso modelo, isso foi demonstrado pela presença de neutrófilos e macrófagos ativados no tecido pulmonar e pela produção e liberação de óxido nítrico (NO) nas 6 primeiras horas após a instilação de bleomicina. Além disso, há tanto influxo celular quanto produção de radicais de óxido nítrico (NO) no 2º e 8º dia após administração de bleomicina. Estes eventos inflamatórios precedem à deposição progressiva de colágeno, quantificada pela detecção de hidroxiprolina tecidual.

Os nossos resultados demonstram uma cinética de IFN- γ similar à descrita na literatura, com queda após a instilação de bleomicina, possivelmente pela regulação existente entre TGF- β e IFN- γ (GRANSTEIN *et al.*, 1990; GURUJEYALAKSHMI *et al.*, 1995; VENKATESAN *et al.*, 2002). Estudos anteriores demonstram que há um aumento de TGF- β após a instilação de bleomicina, assim, apesar de não termos avaliado os níveis dessa citocina, podemos inferir que ela pode ser a responsável pela diminuição dos níveis de IFN- γ . Da mesma maneira, VEGF foi encontrado em níveis baixos. Esses dados são sustentados por dados prévios que demonstram que pacientes fumantes e com doenças pulmonares fibróticas exibem níveis baixos da produção desta citocina, e pacientes saudáveis apresentam altos níveis desta (KOYAMA *et al.*, 2002).

Outros fatores, como as quimiocinas CXCL1-3/KC, CXCL1-2/MIP-2, CCL2/JE e CCL5/RANTES apresentaram aumento de sua produção pelo tecido pulmonar na fase inicial da lesão, de tal forma que precederam os picos de influxo celular, desempenhando importante papel no recrutamento de leucócitos após a instilação de bleomicina, esses resultados estão em acordo com estudos prévios (PETREK *et al.*, 1997; KEANE *et al.*, 1999; YARA *et al.*, 2001; KUMA *et al.*, 2004).

Alguns antagonistas de receptor CXCR2 já descritos têm habilidade em modificar o recrutamento e a ativação dos neutrófilos, objetivando-se uma regulação das funções efetoras destas células, prevenindo-se assim uma resposta inflamatória excessiva associada a um dano tecidual mediado por resposta neutrofílica intensa, que eleva o dano tecidual pulmonar (PEASE *et al.*, 2002).

No presente trabalho, demonstramos os efeitos da administração de um antagonista de receptor CXCR2, inibidor alostérico não competitivo, análogo estrutural da repertaxina (BERTINI *et al.*, 2004) neste modelo de fibrose pulmonar induzida por

bleomicina com finalidade de se inibir a resposta neutrofílica observada e conseqüentemente se obter uma diminuição da lesão tecidual e reparo.

Apesar dos elevados níveis de CXCL1-3/KC e CXCL1-2/MIP-2 encontrados no pulmão e no lavado bronco-alveolar dos animais tratados com DF2162, há uma significativa inibição do recrutamento de neutrófilos para o pulmão nesse grupo. Essa inibição ocorre provavelmente porque os neutrófilos apresentam receptores CXCR2 que participam da adesão ao endotélio (CASILLI *et al.*, 2005). Provavelmente isto ocorre por um efeito secundário à inibição de neutrófilos, uma vez que estas células são hábeis em aumentar a lesão pulmonar causada por um recrutamento massivo e com liberação de produtos tóxicos que danificam diretamente a estrutura pulmonar (HIEMSTRA *et al.*, 1998), visto que os animais tratados com DF2162 apresentam uma diminuição da resposta inflamatória, como avaliado por análises histopatológicas.

Da mesma maneira em que a inibição do recrutamento pode ser controlada, a modulação do perfil de ativação dos neutrófilos pelo bloqueio com antagonista de receptor CXCR2 faz com que estas células também percam algumas de suas funções efetoras, tais como fagocitose de microorganismos (TSAI *et al.*, 2000), liberação de produtos tóxicos (VARANI *et al.*, 1994) e produção de citocinas e quimiocinas que regulam o processo inflamatório (SCAPINI *et al.*, 2000). Estudos anteriores demonstram que o uso dessa classe de drogas diminui a lesão tecidual por inibir influxo e ativação de neutrófilos (SOUZA *et al.*, 2004; CASILLI *et al.*, 2005; CUGINI *et al.*, 2005). Dentre os produtos liberados por neutrófilos, entre os que podem ser danosos ao tecido estão metaloproteinases, gelatinases, colagenases e elastase (BURG *et al.*, 2001). Essas enzimas podem interferir diretamente com a arquitetura pulmonar agindo sobre a matriz extracelular e causando ruptura de sua estrutura e desorganização tecidual (BURG *et al.*, 2001).

Outros produtos liberados por neutrófilos que também podem induzir dano tecidual são os radicais livres. Já é descrito que radicais de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e íons superóxido produzidos e liberados mediante um perfil de ativação destas células danificam diretamente o parênquima pulmonar (CHABOT *et al.*, 1998) por induzirem a ativação e a transcrição de genes da resposta imune em células residentes, tais como fibroblastos, macrófagos residentes, células epiteliais e alveolares. Todo esse processo culmina na expressão de mediadores inflamatórios e amplificam a resposta lesiva. Então uma modulação indireta, por inibição, do estresse oxidativo gerado pela ativação de neutrófilos pode contribuir para um menor dano tecidual quando o antagonista de receptores CXCR2 é administrado. Isso também pode afetar a produção de mediadores como citocinas e

quimiocinas pelas células do parênquima pulmonar, uma vez que estes fatores podem ser produzidos via ativação de NFκB perante dano oxidativo (WANG *et al.*, 2002), evitando-se uma amplificação do processo inflamatório.

Mais amplamente podemos considerar que uma modulação da resposta inflamatória pode ser feita pela regulação das funções efetoras dos neutrófilos neste modelo, pelo controle do seu perfil de ativação. Os nossos resultados demonstram que a inibição do influxo de neutrófilos neste modelo é possível através do bloqueio dos receptores CXCR2 (CASILLI *et al.*, 2005). A produção de citocinas e quimiocinas por neutrófilos ativados também é uma das funções efetoras mais importantes deste grupo de células que orquestram o processo inflamatório, sua cronificação e reparo (SCAPINI *et al.*, 2000).

Os neutrófilos ativados são importantes fontes de produção das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-12 e VEGF, e das quimiocinas IL-8/CXCL8, MIP-1α/CCL3, MIP-1 β/CCL4, IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9. Estes fatores produzidos coordenam as funções efetoras dos leucócitos, tais como eosinófilos, monócitos, basófilos, células NK, linfócitos e neutrófilos, e também atuam sobre as células endoteliais, epiteliais, macrófagos alveolares e fibroblastos que compõem o parênquima pulmonar. Estes fatores pró-inflamatórios produzidos são responsáveis pela ativação de células endoteliais, macrófagos residentes, e células epiteliais que se tornam capazes de produzirem mais mediadores inflamatórios e expressam novos receptores e moléculas de adesão; junto com a quimiotaxia e ativação dos demais grupos celulares envolvidos neste processo (SCAPINI *et al.*, 2000). Então, o bloqueio desta atividade neutrofílica observada pode reduzir a amplitude da inflamação e conseqüentemente a extensão da lesão pulmonar. Em contraste, há trabalhos na literatura que atribuem um papel imunomodulatório aos neutrófilos durante a lesão e reparo tecidual, sendo desempenhado pela liberação de fatores que regulam o processo inflamatório, tais como TGF-β, IL-10, IFN-γ, TNF-α, IL-8/CXCL8, quimiocinas e proteinases, uma vez que estes fatores determinam as características e a amplitude deste processo. Assim, uma inibição da participação dos neutrófilos, que é o elemento central da resposta inflamatória, pode causar modificações fisiológicas, influenciando no direcionamento e evolução deste processo imune (CASTELLA, 1995; PISKIN *et al.*, 2005; NANCE *et al.*, 2005).

Não apenas a modulação da resposta neutrofílica pode estar sob controle do bloqueio dos receptores CXCR2. Este receptor de quimiocinas está intimamente relacionado com o processo de angiogênese inflamatória, que participa significativamente do processo de fibrose pulmonar (KEANE *et al.*, 1999). CXCL1-3/KC e CXCL1-2/MIP-2 são descritas como quimiocinas de potencial pró-angiogênico, capazes de ativar células do endotélio vascular,

uma vez que estas células também possuem receptores CXCR2 e sua sinalização participa da migração destas (STRIETER *et al.*, 2005). A ativação das células endoteliais pelo receptor CXCR2 também leva a um aumento da permeabilidade vascular pela retração e formação de *gaps* entre células endoteliais adjacentes, que podem contribuir também para a transmigração celular (SCHRAUFSTATTER *et al.*, 2001). O bloqueio desta atividade pelo DF2162 também pode estar associado com um menor influxo celular observado nas análises histopatológicas e lavado bronco-alveolar.

Poucas alterações nos perfis de produção de quimiocinas foram constatadas no pulmão e lavado bronco-alveolar entre os grupos tratados com DF2162 em relação ao grupo tratado com veículo. Não foram encontradas mudanças causadas pelo tratamento com DF2162 sobre a produção das citocinas IFN γ e VEGF, e das quimiocinas CXCL1-3/KC e CXCL10/IP-10 no tecido pulmonar. O mesmo ocorreu para a produção de IL-10 e para a produção das quimiocinas CXCL1-3/KC, CXCL1-2/MIP-2, CCL2/JE e CCL3/MIP-1 α encontradas no lavado bronco-alveolar, sugerindo que este fármaco não interfere diretamente na produção destes fatores.

Uma inibição significativa da produção de CCL5/RANTES, encontrada no pulmão, foi observada nos animais tratados com DF2162, após 2 dias e 16 dias após a instilação de bleomicina. Isto pode estar correlacionado com as células epiteliais e endoteliais que são produtoras de CCL5/RANTES (OLSZEWKA-PAZDRAK *et al.*, 1998; HILLYER *et al.*, 2003). CCL5/RANTES é uma quimiocina que é produzida no parênquima pulmonar por células epiteliais tipo II (WITHERDEN *et al.*, 2004) e células endoteliais (OLSZEWKA-PAZDRAK *et al.*, 1998) mediante ativação. Assim como as células endoteliais humanas (SCHRAUFSTATTER *et al.*, 2001), as células epiteliais do tipo II apresentam receptores CXCR2 (VANDERBILT *et al.*, 2003), que também participam da sua ativação da mesma maneira que os neutrófilos são ativados pelo contato CXCL8/CXCR2, um homólogo de CXCL1-3/KC e CXCL1-2/MIP-2 (CASILLI *et al.*, 2005). Pode ser que uma inibição ou uma estimulação parcial das células epiteliais do tipo II e endoteliais como efeito do DF2162, causando uma alteração do perfil de produção de CCL5/RANTES de forma reduzida. Esta baixa produção de CCL5/RANTES também pode estar correlacionada com as observações na diminuição da deposição de colágeno no interstício pulmonar encontradas em nossos resultados, pois altos níveis detectados de RANTES estão associados com ativação de leucócitos (TOKUDA *et al.*, 2000), inflamação crônica (CONTI *et al.*, 2001) e reparo (FRANK *et al.*, 2000). Esta inibição da produção de CCL5/RANTES e a diminuição da deposição de colágeno também podem estar correlacionadas com a regulação da produção de

TGF- β controlada por CCL5/RANTES, uma vez que experimentos utilizando Met-RANTES, um antagonista de receptores CCR5, demonstraram que este antagonista foi capaz de suprimir a expressão de mRNA de TGF- β no modelo de transplante renal em ratos (SONG *et al.*, 2002).

Também, foi verificado um aumento na produção da quimiocina CXCL9/MIG encontrada no lavado bronco-alveolar, apenas no grupo tratado com DF2162, dois dias após administração de bleomicina intra-traqueal. Este resultado está de acordo com a literatura, que descreve que animais deficientes para a expressão de receptor CXCR2 (CXCR2^{-/-}) apresentaram um aumento da produção de CXCL9/MIG no modelo de asma induzida por *Aspergillus fumigatus*, e que a produção desta quimiocina junto com CXCL10/IP-10 pode ser devida a um mecanismo compensatório ainda não determinado, mas causado pela perda funcional do receptor CXCR2 (SCHUH *et al.*, 2002).

Outros leucócitos podem ser coordenados pela modulação do tráfego via receptor CXCR2. Linfócitos T, mastócitos e células *natural killer* são importantes componentes do sistema imune que possuem estes receptores funcionais e respondem a um gradiente de CXCL8/IL-8 (LIPPERT *et al.*, 2004, CASILLI *et al.*, 2005). Os efeitos do bloqueio alostérico do receptor CXCR2 sobre estas células, pelo DF2162, podem contribuir para uma menor extensão da lesão no parênquima pulmonar e inibindo-se assim uma resposta inflamatória mais severa. Uma regulação do processo de reparo pode ser devida à diminuição da produção de TGF- β por linfócitos (ATAMAS *et al.*, 2003), células epiteliais e endoteliais (BARTRAM *et al.*, 2005), mediante ativação por receptores CXCR2, levando a uma menor ativação dos fibroblastos (VENKATESAN *et al.*, 2002).

Este possível papel imunomodulatório do antagonista de receptor CXCR2 parece ser bem amplo, uma vez que pode contribuir de várias formas para uma melhora do processo inflamatório, como por exemplo pela inibição de recrutamento e ativação de leucócitos (CASILLI *et al.*, 2005), células endoteliais (SCHRAUFSTATTER *et al.*, 2001) e epiteliais (VANDERBILT *et al.*, 2003), contribuindo para uma menor extensão da lesão e ainda modulando o processo angiogênico (KEANE *et al.*, 1999), a liberação de produtos tóxicos (VARANI *et al.*, 1994) e a produção dos demais mediadores inflamatórios (SCAPINI *et al.*, 2000) responsáveis pela amplificação da lesão e reparo.

Como observado em nossos experimentos, o processo inflamatório pulmonar realmente precede a resolução e reparo tecidual, de forma que quanto maior o grau de inflamação, maior é a fibrose intersticial obtida; e que a modulação da inflamação de forma

negativa resultante da administração de DF2162 leva a uma menor gravidade da doença e menor deposição de colágeno, culminando numa menor perda funcional do tecido pulmonar.

Apesar de termos obtido uma melhora em todos os aspectos inflamatórios estudados e melhora no quadro fibrótico-pulmonar, verificamos um alto índice de mortalidade nos animais tratados com DF2162. Talvez essa letalidade observada possa ser devida ao surgimento de infecções secundárias não controladas, causado pela perda parcial das funções efetoras dos neutrófilos, que poderia ser a perda de parte da sua capacidade migratória, fagocítica e bactericida (TSAI *et al.*, 2000), impossibilitando a eliminação do patógeno. Estudos posteriores serão realizados para responder esta questão. Já foi descrito dado semelhante ao do aumento de letalidade observado neste trabalho, através da inibição por anticorpos anti-receptores CXCR2 no modelo murino de infecção pulmonar induzida por *Nocardia asteroides*, o que indica fortemente que o receptor CXCR2 constitui um mediador essencial na resposta inata do hospedeiro (MOORE *et al.*, 2000).

Desta forma, o receptor CXCR2 exerce papel importante na regulação do processo inflamatório e fibrose pulmonar induzida por bleomicina, uma vez que este novo fármaco inibe o recrutamento e ativação de neutrófilos, principal célula responsável pelo dano tecidual pulmonar que precede a fibrose.

6 – CONCLUSÃO

Estes dados em conjunto sugerem que a modulação através da intervenção farmacológica do DF2162 sobre os receptores CXCR2 pode interferir com o processo de reparo, possivelmente por inibir uma resposta inflamatória potencialmente lesiva, principalmente pelo bloqueio do recrutamento e ativação de leucócitos, e também pela diminuição da vascularização e re-epitelização do parênquima pulmonar, sugerindo que os receptores CXCR2 têm papel fundamental na regulação do processo inflamatório pulmonar e fibrose.

7 – ABSTRACT

Pulmonary fibrosis is a disease characterized by progressive interstitial collagen deposition, which causes changes in the normal lung architecture and loss of function, which could lead to death. Acute pulmonary inflammatory processes and their chronification are associated with fibrotic phenomena acting as triggering events. The inflammation that precedes the emergence of pulmonary fibrosis is characterized by an increased cell influx, which culminates in the liberation of inflammatory mediators, which perpetuate the initial lesion. Therefore it is likely that the inhibition of the inflammatory response might be able to decrease the interstitial collagen deposition. The bleomycin-induced pulmonary fibrosis model is characterized by intense neutrophil influx concomitant with cytokine production, high levels of chemokines CXCL1-3/KC and CXCL1-2/MIP-2, followed by collagen deposition on the pulmonary parenchyma.

In this study, we analyzed the effects of DF2162 administration, which is a CXCR2 chemokine receptor antagonist on bleomycin-induced pulmonary fibrosis model in mice. Our results show that the administration of 6 mg/kg of DF2162 twice a day significantly inhibited the neutrophilic influx peaks caused by intra-tracheal instillation of 0,125 U of bleomycin. However, DF2162 did not promote changes in the levels of modulatory cytokines such as IFN γ , IL-10 e VEGF, which are important for the inflammatory process. We did not observe changes in the levels of chemokines CXCL1-3/KC, CXCL1-2/MIP-2, CCL2/JE, CCL3/MIP-1 α and CXCL10/IP-10 with the exception of CCL5/RANTES, whose production was inhibited and CXCL9/MIG, whose levels increased during the early phase of DF2162 treatment. Furthermore, we observed pathological changes revealing less severe and reduced interstitial collagen deposition in the lungs of DF2162-treated animals. In spite of the observed improvement in all inflammatory aspects studied, the animals receiving DF2162 had a higher mortality (66.6%) than the animals in the control group, which showed only 25% lethality.

These data suggest that the CXCR2 receptor exerts an important role in the regulation of the inflammatory process and pulmonary fibrosis induced by bleomycin. Notwithstanding, the increment in lethality in the group of mice that received DF2162 treatment after bleomycin instillation is likely not associated with the fibrotic process itself, but depends on factors which shall be later studied.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abid, S.H., Malhotra, V., Perry, M.C. 2001. *Radiation-induced and chemotherapy-induced pulmonary injury*. *Curr Opin Oncol*. 13(4):242-8.
- Adamson, I.Y. 1976. *Pulmonary toxicity of bleomycin*. *Environ Health Perspect*. 16:119-25.
- Addison, C.L., Daniel, T.O., Burdick, M.D., Liu, H., Ehlert, J.E., Xue, Y.Y., Buechi, L., Walz, A., Richmond, A., Strieter, R.M. 2000. *The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity*. *J Immunol*. 1;165(9):5269-77.
- Ajuebor, M.N., Swain, M.G., Perretti, M. 2002. *Chemokines as novel therapeutic targets in inflammatory diseases*. *Biochem Pharmacol*. 1;63(7):1191-6.
- Atamas, S.P., White, B. 2003. *Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma*. *Cytokine Growth Factor Rev*. 14(6):537-50.
- Bartram, U., Speer, C.P. 2004. *The role of transforming growth factor beta in lung development and disease*. *Chest*. 125(2):754-65.
- Bertini, R., Allegretti, M., Bizzarri, C., Moriconi, A., Locati, M., Zampella, G., Cervellera, M.N., Di Cioccio, V., Cesta, M.C., Galliera, E., Martinez, F.O., Di Bitondo, R., Troiani, G., Sabbatini, V., D'Anniballe, G., Anacardio, R., Cutrin, J.C., Cavalieri, B., Mainiero, F., Strippoli, R., Villa, P., Di Girolamo, M., Martin, F., Gentile, M., Santoni, A., Corda, D., Poli, G., Mantovani, A., Ghezzi, P., Colotta, F. 2004. *Noncompetitive allosteric inhibitors of the inflammatory chemokine receptors CXCR1 and CXCR2: prevention of reperfusion injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10;101(32):11791-6.
- Boehler, A. 2002. *The role of interleukin-10 in lung transplantation*. *Transpl Immunol*. 9(2-4):121-4.
- Borish, L.C., Steinke, J.W. 2003. *Cytokines and chemokines*. *J Allergy Clin Immunol*. 111(2 Suppl):S460-75.
- Bozic, C.R., Gerard, N.P., von Uexkull-Guldenband, C., Kolakowski, L.F. Jr., Conklyn, M.J., Breslow, R., Showell, H.J., Gerard, C. 1994. *The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization*. *J Biol Chem*. 25;269(47):29355-8.
- Burg, N.D., Pillinger, M.H. 2001. *The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity*. *Clin Immunol*. 99(1):7-17.
- Burger, R.M. 1998. *Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycin*. *Chem Rev*. 98(3):1153-1170.
- Burns, A.R., Smith, C.W., Walker, D.C. 2003. *Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung*. *Physiol Rev*. 83(2):309-36.
- Carter, B.J., de Vroom, E., Long, E.C., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Hecht, S.M. 1990. *Site-specific cleavage of RNA by Fe(II) bleomycin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

87(23):9373-7.

Cascieri, M.A., Springer, M.S. 2000. *The chemokine/chemokine-receptor family: potential and progress for therapeutic intervention*. *Curr Opin Chem Biol*. 4(4):420-7.

Casilli, F., Bianchini, A., Gloaguen, I., Biordi, L., Alesse, E., Festuccia, C., Cavalieri, B., Strippoli, R., Cervellera, M.N., Di Bitondo, R., Ferretti, E., Mainiero, F., Bizzarri, C., Colotta, F., Bertini, R. 2005. *Inhibition of interleukin-8 (CXCL8/IL-8) responses by repertaxin, a new inhibitor of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2*. *Biochem Pharmacol*. 1;69(3):385-94.

Cassatella, M.A. 1995. *The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils*. *Immunol Today*. 16(1):21-6.

Chabot, F., Mitchell, J.A., Gutteridge, J.M., Evans, T.W. 1998. *Reactive oxygen species in acute lung injury*. *Eur Respir J*. 11(3):745-57.

Chanson, M., Derouette, J.P., Roth, I., Foglia, B., Scerri, I., Dudez, T., Kwak, B.R. 2005 *Gap junctional communication in tissue inflammation and repair*. *Biochim Biophys Acta*. 10;1711(2):197-207.

Chen, J., Stubbe, J. 2005. *Bleomycins: towards better therapeutics*. *Nat Rev Cancer*. 5(2):102-12.

Chua, F., Gauldie, J., Laurent, G.J. 2005. *Pulmonary fibrosis: searching for model answers*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 33(1):9-13.

Chung, M.P., Monick, M.M., Hamzeh, N.Y., Butler, N.S., Powers, L.S., Hunninghake, G.W. 2003. *Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced fibrosis* *Am J Respir Cell Mol Biol*. 29(3 Pt 1):375-80.

Conti, P., DiGioacchino, M. 2001. *MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation*. *Allergy Asthma Proc*. 22(3):133-7.

Crapo, J.D. 2003. *Oxidative stress as an initiator of cytokine release and cell damage*. *Eur Respir J Suppl*. 44:4s-6s.

Cugini, D., Azzollini, N., Gagliardini, E., Cassis, P., Bertini, R., Colotta, F., Noris, M., Remuzzi, G., Benigni, A. 2005. *Inhibition of the chemokine receptor CXCR2 prevents kidney graft function deterioration due to ischemia/reperfusion*. *Kidney Int*. 67(5):1753-61.

Fehrenbach, H., Kasper, M., Haase, M., Schuh, D., Muller, M. 1999. *Differential immunolocalization of VEGF in rat and human adult lung, and in experimental rat lung fibrosis: light, fluorescence, and electron microscopy*. *Anat Rec*. 254(1):61-73.

Fernandez, E.J., Lolis, E. 2002. *Structure, function, and inhibition of chemokines*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 42:469-99.

Ferri, C., Zignego, A.L. 2000. *Relation between infection and autoimmunity in mixed cryoglobulinemia*. *Curr Opin Rheumatol*. 12(1):53-60.

- Fleischman, R.W., Baker, J.R., Thompson, G.R., Schaeppi, U.H., Illievski, V.R., Cooney, D.A., Davis, R.D. 1971. *Bleomycin-induced interstitial pneumonia in dogs*. Thorax. 26(6):675-82.
- Frank, S., Kampfer, H., Wetzler, C., Stallmeyer, B., Pfeilschifter, J. 2000. *Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: a regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression*. Biochem J. 1;347 Pt 1:265-73.
- Gangur, V., Birmingham, N.P., Thanavorakul, S. 2002. *Chemokines in health and disease*. Vet Immunol Immunopathol. 86(3-4):127-36.
- Garau, A., Bertini, R., Colotta, F., Casilli, F., Bigini, P., Cagnotto, A., Mennini, T., Ghezzi, P., Villa, P. 2005. *Neuroprotection with the CXCL8 inhibitor repertaxin in transient brain ischemia*. Cytokine. 7;30(3):125-31.
- Gauldie, J. 2002. *Inflammatory mechanisms are a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med. 1;165(9):1205-6.
- Gharaee-Kermani, M., McCullumsmith, R.E., Charo, I.F., Kunkel, S.L., Phan, S.H. 2003. *CC-chemokine receptor 2 required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis*. Cytokine. 21;24(6):266-76.
- Giri, S.N. 2003. *Novel pharmacological approaches to manage interstitial lung fibrosis in the twenty-first century*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 43:73-95.
- Goodman, R.B., Pugin, J., Lee, J.S., Matthay, M.A. 2003. *Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury*. Cytokine Growth Factor Rev. 14(6):523-35.
- Granstein, R.D., Flotte, T.J., Amento, E.P. 1990. *Interferons and collagen production*. J Invest Dermatol. 95(6 Suppl):75S-80S.
- Grant, M.M., Burnett, C.M., Fein, A.M. 1991. *Effect of prostaglandin E1 infusion on leukocyte traffic and fibrosis in acute lung injury induced by bleomycin in hamsters*. Crit Care Med. 19(2):211-7.
- Green, L.C., Tannenbaum, S.R., Goldman, P. 1981. *Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat*. Science. 3;212(4490):56-8.
- Gurujeyalakshmi, G., Giri, S.N. 1995. *Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: downregulation of TGF-beta and procollagen I and III gene expression*. Exp Lung Res. 21(5):791-808.
- Hayashi, S., Yatsunami, J., Fukuno, Y., Kawashima, M., Miller, E.J. 2002. *Antileukinate, a hexapeptide inhibitor of CXC-chemokine receptor, suppresses bleomycin-induced acute lung injury in mice*. Lung. 180(6):339-48.
- Hecht, S.M. 2000. *Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action*. J Nat Prod. 63(1):158-68.
- Hiemstra, P.S., van Wetering, S., Stolk, J. 1998. *Neutrophil serine proteinases and defensins in*

chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. Eur Respir J. 12(5):1200-8.

Hillyer, P., Mordelet, E., Flynn, G., Male, D. 2003. *Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration.* Clin Exp Immunol.;134(3):431-41.

Huang, S., Paulauskis, J.D., Godleski, J.J., Kobzik, L. 1992. *Expression of macrophage inflammatory protein-2 and KC mRNA in pulmonary inflammation.* Am J Pathol. 141(4):981-8.

Izbicki, G., Segel, M.J., Christensen, T.G, Conner, M.W., Breuer, R. 2002. *Time course of bleomycin-induced lung fibrosis.* Int J Exp Pathol. 83(3):111-9.

Jeffery, P.K. 2001. *Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease.* Am J Respir Crit Care Med. 15;164(10 Pt 2):S28-38.

Jiang, D., Liang, J., Hodge, J., Lu, B., Zhu, Z., Yu, S., Fan, J., Gao, Y., Yin, Z., Homer, R., Gerard, C., Noble, P.W. 2004. *Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3.* J Clin Invest. 114(2):291-9.

Kane, S.A., Hecht, S.M. 1994 (a). *Polynucleotide recognition and degradation by bleomycin.* Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.49:313-52.

Kane, S.A., Natrajan, A., Hecht, S.M. 1994 (b). *On the role of the bithiazole moiety in sequence-selective DNA cleavage by Fe.bleomycin.* J Biol Chem. 269(14):10899-904.

Katzenstein, A.L., Myers, J.L. 1998. *Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification.* Am J Respir Crit Care Med. 157(4 Pt 1):1301-15.

Keane, M.P., Arenberg, D.A., Lynch, J.P. 3rd., Whyte, R.I., Iannettoni, M.D., Burdick, M.D., Wilke, C.A., Morris, S.B., Glass, M.C., DiGiovine, B., Kunkel, S.L., Strieter, R.M. 1997. *The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis.* J Immunol. 1;159(3):1437-43

Keane, M.P., Belperio, J.A., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Xu, Z.J., Xue, Y.Y., Strieter, R.M. 1999. *IFN-gamma-inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis.* J Immunol. 15;163(10):5686-92

Keane, M.P., Belperio, J.A., Moore, T.A., Moore, B.B., Arenberg, D.A., Smith, R.E., Burdick, M.D., Kunkel, S.L., Strieter, R.M. 1999. *Neutralization of the CXC chemokine, macrophage inflammatory protein-2, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis.* J Immunol. 1;162(9):5511-8.

Khalil, N., Berezney, O., Sporn, M., Greenberg, A.H. 1989. *Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation.* J Exp Med. 1;170(3):727-37.

Koyama, S., Sato, E., Haniuda, M., Numanami, H., Nagai, S., Izumi, T. 2002. *Decreased level*

of vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage fluid of normal smokers and patients with pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 1;166(3):382-5.

Kunkel, S.L., Chensue, S.W., Lukacs, N., Hogaboam, C. 2003. *Cytokine phenotypes serve as a paradigms for experimental immune-mediated lung diseases and remodeling.* Am J Respir Cell Mol Biol. 29(3 Suppl):S63-6.

Kuwano, K., Hagimoto, N., Hara, N. 2001. *Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis and current treatment.* Curr Mol Med. 1(5):551-73.

Kuwano, K., Hagimoto, N., Nakanishi, Y. 2004. *The role of apoptosis in pulmonary fibrosis.* Histol Histopathol. 19(3):867-81.

Lawrence, T., Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willoughby, D.A. 2001. *Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation.* Nat Med. (12):1291-7.

Lippert, U., Zachmann, K., Henz, B.M., Neumann, C. 2004. *Human T lymphocytes and mast cells differentially express and regulate extra- and intracellular CXCR1 and CXCR2.* Exp Dermatol. 13(8):520-5.

Liu, Y., Quinn, M.R. 2002. *Chemokine production by rat alveolar macrophages is inhibited by taurine chloramine.* Immunol Lett. 1;80(1):27-32.

Matzer, S.P., Zombou, J., Sarau, H.M., Rollinghoff, M., Beuscher, H.U. 2004. *A synthetic, non-peptide CXCR2 antagonist blocks MIP-2-induced neutrophil migration in mice.* Immunobiology. 209(3):225-33.

McColl, S.R., Clark-Lewis, I. 1999. *Inhibition of murine neutrophil recruitment in vivo by CXC chemokine receptor antagonists.* J Immunol. 1;163(5):2829-35.

Mehrad, B., Strieter, R.M., Moore, T.A., Tsai, W.C., Lira, S.A., Standiford, T.J. 1999. *CXC chemokine receptor-2 ligands are necessary components of neutrophil-mediated host defense in invasive pulmonary aspergillosis.* J Immunol. 1;163(11):6086-94.

Moore, B.B., Keane, M.P., Addison, C.L., Arenberg, D.A., Strieter, R.M. 1998. *CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family.* J Investig Med. 46(4):113-20.

Moore, T.A., Newstead, M.W., Strieter, R.M., Mehrad, B., Beaman, B.L., Standiford, T.J. 2000. *Bacterial clearance and survival are dependent on CXC chemokine receptor-2 ligands in a murine model of pulmonary Nocardia asteroides infection.* J Immunol. 15;164(2):908-15.

Nance, S., Cross, R., Yi, A.K., Fitzpatrick, E.A. 2005. *IFN-gamma production by innate immune cells is sufficient for development of hypersensitivity pneumonitis.* Eur J Immunol. 35(6):1928-38.

Nathan, C. 2002. *Points of control in inflammation.* Nature. 420(6917):846-52.

Nogee, L.M., Dunbar, A.E. 3rd, Wert, S.E., Askin, F., Hamvas, A., Whitsett, J.A. 2001. *A*

mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. N Engl J Med. 344(8):573-9

Okuma, T., Terasaki, Y., Kaikita, K., Kobayashi, H., Kuziel, W.A., Kawasuji, M., Takeya, M. 2004. *C-C chemokine receptor 2 (CCR2) deficiency improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuation of both macrophage infiltration and production of macrophage-derived matrix metalloproteinases.* J Pathol. 204(5):594-604.

Olson, T.S., Ley, K. 2002. *Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 283(1):R7-28.

Olszewska-Pazdrak, B., Casola, A., Saito, T., Alam, R., Crowe, S.E., Mei, F., Ogra, P.L., Garofalo, R.P. 1998. *Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus.* J Virol. 72(6):4756-64.

Onuffer, J.J., Horuk, R. 2002. *Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments.* Trends Pharmacol Sci. 23(10):459-67.

Ortuno, P. G. 1998. *Pulmonary fibrosis caused by inhalation: silicosis.* Rev Med Univ Navarra. 42(4):208-19.

Parks, WC, Wilson, C.L., Lopez-Boado, Y.S. 2004. *Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity.* Nat Rev Immunol. 4(8):617-29.

Parks, W.C. 2003. *Matrix metalloproteinases in lung repair.* Eur Respir J Suppl. 44:36s-38s.

Pease, J.E., Sabroe, I. 2002. *The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: implications for therapy.* Am J Respir Med. 1(1):19-25.

Petrek, M., Pantelidis, P., Southcott, A.M., Lympny, P., Safranek, P., Black, C.M., Kolek, V., Weigl, E., du Bois, R.M. 1997. *The source and role of RANTES in interstitial lung disease.* Eur Respir J. 10(6):1207-16.

Pierce, K.L., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J. 2002. *Seven-transmembrane receptors.* Nat Rev Mol Cell Biol. 3(9):639-50.

Piskin, G., Bos, J.D., Teunissen, M.B. 2005. *Neutrophils infiltrating ultraviolet B-irradiated normal human skin display high IL-10 expression.* Arch Dermatol Res. 296(7):339-42.

Raghu, G. 2003. *The role of gastroesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis.* Am J Med. 115 Suppl 3A:60S-64S.

Rahman, I. 2002. *Oxidative stress, transcription factors and chromatin remodelling in lung inflammation.* Biochem Pharmacol. 64(5-6):935-42.

Ramjeesingh, R., Leung, R., Siu, CH. 2003. *Interleukin-8 secreted by endothelial cells induces chemotaxis of melanoma cells through the chemokine receptor CXCR1.* FASEB J. 17(10):1292-4.

Rana, T.M., Meares, C.F. 1991. *Transfer of oxygen from an artificial protease to peptide carbon during proteolysis.* Proc Natl Acad Sci U S A. 88(23):10578-82.

- Reddy, G.K., Enwemeka, C.S. 1996. *A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues*. Clin Biochem. 29(3):225-9.
- Roberts, C.R., Walker, D.C., Schellenberg, R.R. 2002. *Extracellular matrix*. Clin Allergy Immunol. 16:143-78.
- Sahhar, J., Littlejohn, G., Conron, M. 2004. *Fibrosing alveolitis in systemic sclerosis: the need for early screening and treatment*. Intern Med J. 34(11):626-38.
- Scapini, P., Lapinet-Vera, J.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., Cassatella, M.A. 2000. *The neutrophil as a cellular source of chemokines*. Immunol Rev. 177:195-203.
- Schraufstatter, I.U., Chung, J., Burger, M. 2001. *IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 280(6):L1094-103.
- Schuh, J.M., Blease, K., Hogaboam, C.M. 2002. *CXCR2 is necessary for the development and persistence of chronic fungal asthma in mice*. J Immunol. 1;168(3):1447-56.
- Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R.L., Pearce, E., Sher, A. 1988. *Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens*. J Exp Med. 1;168(5):1675-84.
- Selman, M., King, T.E., Pardo, A. 2001. American Thoracic Society; European Respiratory Society; American College of Chest Physicians. *Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy*. Ann Intern Med. 134(2):136-51.
- Selman, M., Pardo, A. 2002. *Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder*. Respir Res. 3(1):3.
- Shimabukuro, D.W., Sawa, T., Gropper, M.A. 2003. *Injury and repair in lung and airways*. Crit Care Med. 31(8 Suppl):S524-31.
- Sleijfer, S. 2001. *Bleomycin-induced pneumonitis*. Chest. 120(2):617-24.
- Smith, M.L., Olson, T.S., Ley, K. 2004. *CXCR2- and E-selectin-induced neutrophil arrest during inflammation in vivo*. J Exp Med. 4;200(7):935-9.
- Smith, R.E., Strieter, R.M., Phan, S.H., Kunkel, S.L. 1996. *C-C chemokines: novel mediators of the profibrotic inflammatory response to bleomycin challenge*. Am J Respir Cell Mol Biol. 15(6):693-702.
- Smith, R.E., Strieter, R.M., Zhang, K., Phan, S.H., Standiford, T.J., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L. 1995. *A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease*. J Leukoc Biol. 57(5):782-7.
- Snider, G.L., Hayes, J.A., Korthy, A.L. 1978. *Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin: pathology and stereology*. Am Rev Respir Dis.

117(6):1099-108.

Song, E., Zou, H., Yao, Y., Proudfoot, A., Antus, B., Liu, S., Jens, L., Heemann, U. 2002. *Early application of Met-RANTES ameliorates chronic allograft nephropathy*. *Kidney Int.* 61(2):676-85.

Souza, D.G., Bertini, R., Vieira, A.T., Cunha, F.Q, Poole, S., Allegretti, M., Colotta, F., Teixeira, M.M. 2004. *Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury*. *Br J Pharmacol.* 143(1):132-42.

Stenmark, K.R., Eyzaguirre, M., Westcott, J.Y., Henson, P.M., Murphy, R.C. 1987. *Potential role of eicosanoids and PAF in the pathophysiology of bronchopulmonary dysplasia*. *Am Rev Respir Dis.* 136(3):770-2.

Strieter, R.M., Belperio, J.A., Keane, M.P. 2003. *CXC chemokines in vascular remodeling related to pulmonary fibrosis*. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 29(3 Suppl):S67-9.

Strieter, R.M., Burdick, M.D., Gomperts, B.N., Belperio, J.A., Keane, M.P. 2005. *CXC chemokines in angiogenesis*. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18;

Strieter, R.M. 2002. *Inflammatory mechanisms are not a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med.* 1;165(9):1206-7; discussion 1207-8.

Tager, A., Luster, A., Kradin, R. 1999. *T-cell chemokines interferon-inducible protein-10 and monokine induced by interferon-gamma are upregulated in bleomycin-induced lung injury*. *Chest.* 116(1 Suppl):90S

Tekamp-Olson, P., Gallegos, C., Bauer, D., McClain, J., Sherry, B., Fabre, M., van Deventer, S., Cerami, A. 1990. *Cloning and characterization of cDNAs for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues*. *J Exp Med.* 1;172(3):911-9.

Thannickal, V.J., Toews, G.B., White, E.S., Lynch, J.P, 3rd., Martinez, F.J. 2004. *Mechanisms of pulmonary fibrosis*. *Annu Rev Med.* 55:395-417.

Thrall, R.S., Barton, R.W., D'Amato, D.A., Sulavik, S.B. 1982. *Differential cellular analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained at various stages during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat*. *Am Rev Respir Dis.* 126(3):488-92.

Tokuda, A., Itakura, M., Onai, N., Kimura, H., Kuriyama, T., Matsushima, K. 2000 *Pivotal role of CCR1-positive leukocytes in bleomycin-induced lung fibrosis in mice*. *J Immunol.* 1;164(5):2745-51.

Tsai, W.C., Strieter, R.M., Mehrad, B., Newstead, M.W., Zeng, X., Standiford, T.J. 2000. *CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine Pseudomonas aeruginosa pneumonia*. *Infect Immun.* 68(7):4289-96.

- Tsuda, Y., Takahashi, H., Kobayashi, M., Hanafusa, T., Herndon, D.N., Suzuki, F. 2004. *Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Immunity*. 21(2):215-26.
- Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., Okami, Y. 1966. *New antibiotics, bleomycin A and B*. *J Antibiot (Tokyo)*. 19(5):200-9.
- van Kuppevelt, T.H., Robbesom, A.A., Versteeg, E.M., Veerkamp, J.E., van Herwaarden, C.L., Dekhuijzen, P.N. 2000. *Restoration by vacuum inflation of original alveolar dimensions in small human lung specimens*. *Eur Respir J*. 15(4):771-7.
- Vanderbilt, J.N., Mager, E.M., Allen, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J., Gonzalez, R., Dobbs, L.G. 2003. *CXC chemokines and their receptors are expressed in type II cells and upregulated following lung injury*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 29(6):661-8.
- Varani, J., Ward, P.A. 1994. *Mechanisms of endothelial cell injury in acute inflammation*. *Shock*. 2(5):311-9.
- Venkatesan, N., Roughley, P.J., Ludwig, M.S. 2002. *Proteoglycan expression in bleomycin lung fibroblasts: role of transforming growth factor-beta(1) and interferon-gamma*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 283(4):L806-14.
- Wang, T., Zhang, X., Li, J.J. 2002. *The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses*. *Int Immunopharmacol*. 2(11):1509-20.
- Weiss, W. 1988. *Smoking and pulmonary fibrosis*. *J Occup Med*. (1):33-9.
- Wiatr, E., Radzikowska, E., Pawlowski, J. 2004. *Pulmonary fibrosis in young patients with hypersensitivity pneumonitis*. *Pneumonol Alergol Pol*. 72(3-4):111-6.
- Wilborn, J., Bailie, M., Coffey, M., Burdick, M., Strieter, R., Peters-Golden, M. 1996. *Constitutive activation of 5-lipoxygenase in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. *J Clin Invest*. 15;97(8):1827-36.
- Witherden, I.R., Vanden Bon, E.J., Goldstraw, P., Ratcliffe, C., Pastorino, U., Tetley, T.D. 2004. *Primary human alveolar type II epithelial cell chemokine release: effects of cigarette smoke and neutrophil elastase*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 30(4):500-9.
- Wrzaszczyk, B., Owczarek, H. 1996. *Relationship between the physiochemical properties of asbestos and pulmonary fibrosis*. *Med Pr*. 47(4):401-9.
- Yara, S., Kawakami, K., Kudeken, N., Tohyama, M., Teruya, K., Chinen, T., Awaya, A., Saito, A. 2001. *FTS reduces bleomycin-induced cytokine and chemokine production and inhibits pulmonary fibrosis in mice*. *Clin Exp Immunol*. 124(1):77-85.
- Zhang, K., Phan, S.H. 1996. *Cytokines and pulmonary fibrosis*. *Biol Signals*. 5(4):232-9.
- Zhang, X.W., Liu, Q., Wang, Y., Thorlacius, H. 2001. *CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo*. *Br J Pharmacol*. 133(3):413-21