



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

Lucas Possebon

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA ANTI-INFLAMATÓRIA ANEXINA A1 EM MODELO
DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA INDUZIDA POR
EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO CIGARRO**

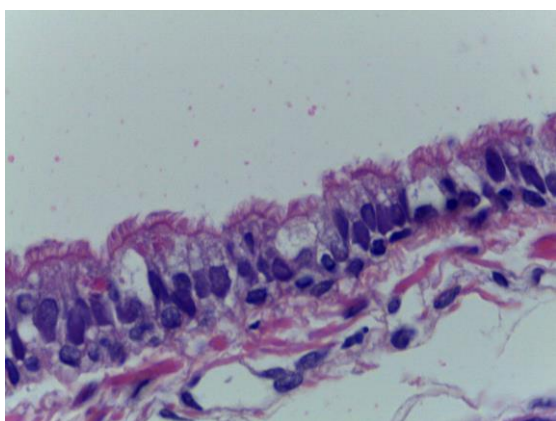
Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre em
Biociências

São José do Rio Preto, SP

2017

Lucas Possebon

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA ANTI-INFLAMATÓRIA ANEXINA A1 EM MODELO
DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA INDUZIDA POR
EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO CIGARRO**



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, área de concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Paula Girol

Coorientadora: Prof^a Dra. Sonia Maria Oliani

São José do Rio Preto, SP

2017

Possebon, Lucas.

Avaliação da proteína anti-inflamatória Anexina A1 em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica induzida por exposição à fumaça do cigarro / Lucas Possebon. -- São José do Rio Preto, 2017
116 f. : il.

Orientador: Ana Paula Girol

Coorientador: Sonia Maria Olini

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Proteínas. 3. Anexina A1. 4. Agentes anti-inflamatórios. 5. Pulmões - Doenças obstrutivas. 6. Fumo - Vício. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 577.112

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Lucas Possebon

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA ANTI-INFLAMATÓRIA ANEXINA A1 EM MODELO
DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA INDUZIDA POR
EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO CIGARRO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, área de concentração em genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^ª Dra. Ana Paula Girol
UNESP- São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^ª Dra. Eliane Gonçalves de Freitas
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^ª Dra. Carla Patrícia Carlos
FACERES – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, SP

2017

Dedico este trabalho aos meus pais, Sr. Luis Carlos Possebon e Sra. Rosemary da Cruz Possebon, irmãos, André Luís Possebon e Letícia Possebon, e amigo Luís Fernando Dyonísio, que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Paula Girol, meu reconhecimento pela competência e talento profissional. Agradeço por sua orientação nesse trabalho e por todo aprendizado desde o tempo da graduação, pela atenção e carinho que tem sido extremamente importante para meu desenvolvimento profissional e principalmente por sua amizade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Primeiramente à Deus por mais esta conquista.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

À Prof^a Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP), e aos demais professores do programa.

À minha coorientadora, Prof^a Dra. Sonia Maria Olini, pela participação fundamental neste trabalho e por todo conhecimento adquirido.

A instituição onde desenvolvi meu mestrado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas da Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), todos os funcionários que me atenderam nesse período.

Às Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), onde pude desenvolver parte do meu projeto de pesquisa nos Laboratório Multidisciplinar, Laboratório de Histopatologia e À Unidade Didática e de Pesquisas Experimentais (UDPE).

À minha família, meus pais, Luís Carlos Possebon e Rosemary da Cruz Possebon, meus irmãos Letícia Possebon e André Luis Possebon e cunhada Renata Olívio Morasca Possebon pelo apoio. Também à minha sobrinha Luiza Morasca Possebon, que nos alegrou com sua vinda em nossa família.

Ao Luís Fernando Dyonísio, que esteve ao meu lado por todo esse período, ajudando direta e indiretamente ao meu trabalho, sendo fundamental para conquista desse objetivo.

Às Técnicas e amigas Melina Mizusaki Iyomasa-Pilon e Helena Ribeiro Souza, que me auxiliaram com todo carinho e disposição neste trabalho.

Aos colegas e amigos da Pós-graduação, Lucas Azevedo, Monielle Santa'Ana e Sara de Souza Costa, pelos auxílios durante o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos amigos que sempre me apoiaram e incentivaram. Enfim, a tantos outros que de alguma maneira colaboraram com o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

“Não são as espécies mais fortes que sobrevivem, nem as mais inteligentes, e sim as
mais suscetíveis às mudanças.”

Charles Darwin

APRESENTAÇÃO

A DPOC é caracterizada pela limitação progressiva do fluxo de ar pelos pulmões e apresenta estimativa de ser a terceira causa de morte mundial em 2020. Por isso, é importante o desenvolvimento de novas terapias dirigidas à prevenção da progressão da doença e redução das exacerbações e mortalidade.

Alguns estudos têm buscado diferentes alternativas de tratamento em casos de inflamação aguda e crônica, como a proteína Anexina A1 (AnxA1), que está entre os mediadores anti-inflamatórios. A AnxA1 é uma proteína de 37 kDa, que exibe sítios de ligação ao cálcio e aos fosfolipídios de membrana e está envolvida na inibição das sínteses de eicosanoides e fosfolipase A₂ e pode representar uma alternativa terapêutica na DPOC.

Nesta investigação relatamos alguns fundamentos do papel da proteína AnxA1 no modelo de DPOC. Os resultados mostram as ações anti-inflamatórias e protetoras do peptídeo mimético da AnxA1, o Ac2-26, no modelo estudado e estimulam novos estudos dessa proteína como potencial estratégia terapêutica na DPOC.

Os dados obtidos neste trabalho foram compilados no manuscrito intitulado “Role of annexin a1 in copd to exposure to cigarette smoke”, que será submetido à revista internacional *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (ISSN: 0022-3565).

Paralelamente ao trabalho desenvolvido no mestrado, foi possível colaborar em outros projetos de pesquisa envolvendo o modelo de indução ao tabagismo e a expressão da AnxA1, sob orientação da Professora Dra. Ana Paula Girol. Neste outro trabalho, avaliamos os efeitos dos extratos das plantas medicinais de Bardana (*Arctium lappa*), Cavalinha (*Equisetum spp.*), Guaco (*Mikania glomerata spreng.*) e Tanchagem (*Plantago major*) em modelo de exposição à fumaça do cigarro. O conjunto desses dados originou a confecção do manuscrito “Ação protetora de fitoterápicos em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica induzida pela fumaça do cigarro”, que será submetida à revista internacional *Journal of Alternative and Complementary Medicine* (ISSN: 1075-5535).

O conjunto dos resultados obtidos das pesquisas, sobre os aspectos fisiológicos e farmacológicos da proteína AnxA1 em modelo de DPOC, elucidam os mecanismos anti-inflamatórios da proteína e fornecem subsídios para um futuro promissor em relação ao

desenvolvimento de novas terapias relacionadas a resolução das inflamações crônicas pulmonares.

Os artigos citados seguem anexados na íntegra.

RESUMO

O processo inflamatório causado pelo tabagismo está relacionado a diferentes tipos de doenças como enfisema pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e aterosclerose. Neste cenário, a proteína anti-inflamatória AnxA1 pode representar uma alternativa terapêutica. Por essas razões, o objetivo da pesquisa foi avaliar os efeitos do peptídeo mimético Ac2-26 da proteína AnxA1, em modelo de tabagismo. Ratas Wistar foram divididas em 3 grupos (n=10/grupo): expostos ao fumo não tratados (F) e tratados com o peptídeo (F+Ac2-26) e controles (C). Os grupos de animais expostos ao fumo foram colocados em um equipamento específico da Unidade Didática e de Pesquisa Experimental (UDPE) das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), e expostos à queima de 10 cigarros comerciais, um após o outro, 2x/dia, por 5 semanas. O grupo C foi mantido no mesmo regime, porém na ausência da fumaça do cigarro e tratamento. Para avaliar a eficácia do Ac2-26, animais F+Ac2-26 foram administrados intraperitonealmente com o peptídeo (1mg/kg), 1x/dia, antes da primeira exposição ao cigarro. As ratas foram pesadas e tiveram a pressão arterial aferida no início e final do experimento. No período final, a ventilação pulmonar foi verificada por meio da pletismografia e também foram realizadas imagens de raios-X. Os animais foram eutanasiados e coletados o lavado bronco alveolar (LBA) para quantificações de células inflamatórias e citocinas, o sangue para dosagens bioquímicas de citocinas e hemoglobina e os órgãos, pulmão e traqueia, para os estudos histopatológicos e imuno-histoquímicos. As análises fisiológicas mostraram perda de peso, aumento da pressão arterial, reduções da frequência e ventilação pulmonares, bem como alterações macroscópicas das dimensões pulmonares por imagens de raio-X no grupo F. Enquanto, nos F+Ac2-26, esses valores foram semelhantes aos controles. As análises histopatológicas mostraram maiores espaços intra-alveolares e aumento do tecido linfóide no pulmão e perda dos cílios no epitélio da traqueia no grupo F comparado as F+Ac2-26 e C. Nas análises do LBA, foi observado aumento na quantidade de linfócitos e macrófagos em F, com redução significativa dessas células promovida após o tratamento. Nas quantificações de células inflamatórias nos tecidos, os macrófagos e mastócitos foram observados aumentados no grupo F comparado aos C e F+Ac2-26. As análises imuno-histoquímicas do pulmão e da traqueia mostraram menor expressão de AnxA1, COX-2 e MMP-9 nos animais C e F+Ac2-26. As dosagens de citocinas e quimiocina indicaram aumento no sobrenadante do macerado do pulmão, plasma sanguíneo e LBA no grupo F e redução nos níveis desses mediadores em C e F+Ac2-26. Ainda, as

dosagens bioquímicas do sangue mostraram que o tratamento com o peptídeo ocasionou aumento da concentração de hemoglobina e glicose e redução do colesterol total e transaminase glutâmico oxalacética (TGO) comparados aos animais não tratados. Nossos resultados evidenciaram a ação protetora do peptídeo mimético Ac2-26 no modelo de DPOC, atenuando o processo inflamatório causado pela exposição à fumaça do cigarro e abre novas perspectivas para o tratamento das doenças relacionadas ao tabagismo.

PALAVRA-CHAVE: Tabagismo, AnxA1, LBA, mediadores inflamatórios, afecções pulmonares, Ac2-26.

ABSTRACT

The inflammatory process caused by smoking is related to different kinds of diseases such as pulmonary emphysema, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and atherosclerosis. In this scenario, an anti-inflammatory protein AnxA1 may represent a therapeutic alternative. For these reasons, the objective of this research was to analyze the effects of the mimetic peptide Ac2-26 of the AnxA1 protein, in a smoking model. Wistar rats were divided into 3 groups (n = 10/group). The groups of animals exposed to smoke were placed in a specific equipment of the Didactic and Experimental Research Unit (UDPE) of the Integrated Colleges Padre Albino (FIPA), and exposed to the burning of 10 cigarettes, one after another, 2x / day for 5 weeks. To evaluate the efficacy of Ac2-26, CS+Ac2-26 animals were administered intraperitoneally with peptide (1mg / kg), 1x / day, prior to first exposure to the cigarette. Group C was maintained in the same regimen, but in the absence of cigarette smoke or treatment. The rats were weighed and had blood pressure measured at the beginning and ending of the experiment. In the final period, pulmonary ventilation was verified through plethysmography and also performed ray-X images. The animals were euthanized and collected the alveolar bronchus (BAL) for quantification of inflammatory cells and cytokines, the blood for biochemical measurements of cytokines and hemoglobin and organs, lung and trachea, for histopathological and immunohistochemical studies. The physiological analyzes showed weight loss, increased blood pressure, reductions and in the pulmonary frequency and ventilation, as well as macroscopic alternative in the lung dimensions by X-ray images in group CS. While, in CS+Ac2-26, these values were similar to controls. The histopathological analyzes showed enlargement of the intra-alveolar spaces and increased lymphoid tissue (BALT), and loss of the cilia in the epithelium of the trachea in the CS group, compared to CS+Ac2-26 and C. Numerous lymphocytes and macrophages were observed in the BAL in CS, with significant reduction of the cells after treatment. In the quantifications of inflammatory cells in the tissues, macrophages and mast cells were increased in the CS+Ac2-26 group. The immunohistochemical analyzes of the lung and trachea showed lower expression of AnxA1, COX-2 and MMP-9 in C and CS+Ac2-26 animals. The dosages of cytokines and chemokine indicated increase in the supernatant of lung macerate, blood plasma and BAL in the F group and reduction of these mediators levels in C and CS+Ac2-26 groups. Also, the biochemical blood measurements showed that treatment with the peptide caused an increase in hemoglobin and glucose concentrations and reduction of total cholesterol and Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) compared to untreated animals.

Our results evidenced a protective action of the Ac2-26 mimetic peptide in the COPD model, by attenuating the inflammatory process caused by exposure to cigarette smoke, which opens new perspectives for the treatment of smoking-related diseases.

KEYWORDS: Smoking, AnxA1, BAL, inflammatory mediators, pulmonary affections, Ac2-26.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Resposta inflamatória na DPOC	21
Figura 2 - Estrutura da proteína Anexina A1 (AnxA1).....	23
Figura 3 - Esquema dos grupos de animais.	26
Figura 4 - Aparato específico para a indução à fumaça do cigarro da UDPE.....	27
Figura 5 – Análises fisiológicas e radiográficas do pulmão.....	32
Figura 6 – Análise histopatológica do pulmão, análise histopatológica da traqueia e análise quantitativa do lavado bronco alveolar.....	34
Figura 7 – Expressão das proteínas AnxA1, COX-2 e MMP-9 no pulmão e traqueia.....	35
Figura 8 – Macrófagos e mastócitos no pulmão e traqueia	37
Figura 9 - Análise bioquímicas do sangue	38
Figura 10 - Dosagem de citocinas pelo MAGPIX no macerado do pulmão, plasma sanguíneo e lavado broncoalveolar.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	<i>Graus Celsius</i>
μL	Micro litro
μm	Micrômetro
Ac2-26	Peptídeo mimético Ac2-26 da proteína anexina
ALBDIR	Níveis de rebaixamento diafragmático direito
ALBESQ	Níveis de rebaixamento diafragmático esquerdo
ANOVA	Análise de variância
AnxA A1	Proteína Anexina A1
BALT brônquio)	<i>Bronchus Associated Lymphoid Tissue</i> (Tecido linfático associado ao
C	Controle/ <i>Control</i>
Cm	Centímetro
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
COX-1	Ciclo-oxigenase 1
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
cPLA2	Fosfolipase A ₂ citosólica
DAB	Diaminobenzidina
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ED-1	Anticorpo marcador de macrófagos
EPO	Eritropoietina sérica
ERK	Quimase reguladora de sinal extracelular
F	Fumante
F+Ac2-26	Fumante Tratado com o peptídeo mimético Ac2-26
FIPA	Faculdades Integradas Padre Albino

FPR	<i>Formyl peptide receptor</i> (Receptores de peptídeos formilados)
FPR2	<i>Formyl peptide receptor</i> (Receptores de peptídeos formilados 2)
g	Grama
GAMA GT	Gama Glutamil Transferase
GCs	Glicocorticóides
HE	Hematoxilina-Eosina
IL-1 β	Interleucina -1beta
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IFN- γ	Interferon-gama
I.P.	Intraperitoneal
IR	Isquemia/Reperusão
kDa	Kilodaltons
L	Litro
LBA	Lavado broncoalveolar
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de baixa densidade)
LPS	Lipopolisacarídeo
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
MMP-9	Matrix metaloproteinase -9
NF-k β	<i>Nuclear transcription – kβ</i> (Fator de transcrição nuclear – kappa beta)
nm	nanômetro
P ou p	Valor de p (significância do teste estatístico)
PBS	<i>Phosphate buffered solution</i> (solução tampão de fosfato)
Pg	Picograma
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Acido ribonucleico)

R.P.M	Rotação por minuto
S.E.M	<i>Standard error of mean</i> = Erro padrão da média
siRNA	RNA de interferência pequeno
TGO	Transaminase Glutâmica Oxalacética
TGF- β 1 beta1)	<i>Transforming growth factor beta1</i> (Fator de crescimento transformador- beta1)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i> (Fator de necrose tumoral-alpha)
U/L	Ultra/litro
UDPE	Unidade didática e de pesquisa experimental
Vs	<i>Versus</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Tabagismo e inflamação.....	20
1.2. Anexina A1	23
2. OBJETIVO	25
2.1. Objetivos Gerais.....	25
2.2 Objetivos Específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Obtenção de animais	26
3.2 Protocolo de exposição à fumaça do cigarro e tratamento com o peptídeo mimético Ac2-26 ...	26
3.3 Análises fisiológicas de pletismografia, pressão arterial e peso.....	27
3.4 Análises por imagem de Raio X.....	28
3.5 Análises quantitativas do lavado broncoalveolar	28
3.6 Análises histopatológicas e imuno-histoquímicas.....	28
3.6.1 Quantificação de mastócitos.....	29
3.7 Análises bioquímicas do sangue	29
3.8 Dosagem de citocinas pelo MAGPIX	29
3.9 Análises estatísticas.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Análises das imagens de Raio X	31
4.2. Análises fisiológicas da pletismografia, pressão arterial e peso.....	31
4.3 Análise quantitativa do lavado bronco alveolar	33
4.4 Análises histopatológicas da traqueia e do pulmão	33
4.5. Análises imuno-histoquímicas do pulmão e da traqueia	34
4.6 Análises quantitativas de células inflamatórias no pulmão e traqueia	36
4.6.1 Macrófagos.....	36
4.6.2 Mastócitos	36
4.7. Análises bioquímicas do sangue	38

4.8 Análises de citocinas pelo MAGPIX	38
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXO A – Cópia do certificado de aprovação no CEUA (nº01/15)	55
APÊNDICE A – “Role of Annexin A1 in COPD to exposure to cigarette smoke”	56
APÊNDICE B – “Ação protetora de fitoterápicos em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica induzida pela fumaça do cigarro”	92

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

O processo inflamatório induzido pela inalação de partículas e gases nocivos do cigarro está relacionado ao desenvolvimento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) por causar alterações patológicas que incluem hipersecreção da mucosa, mudanças estruturais nas vias respiratórias e perda de alvéolos (COMPTON *et al.*, 2013; CARAMORI *et al.*, 2014) (Figura 1). Pacientes com DPOC exibem sintomas sistêmicos e comorbidades, incluindo fraqueza muscular, perda de peso, doença cardiovascular, osteoporose, hipertensão, depressão e declínio cognitivo (GAN *et al.*, 2004), sendo que a doença apresenta estimativa de ser a terceira causa de morte mundial em 2020 (TERAMOTO, 2007; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION: CONCERNS REGARDING TOBACCO USE, 2012; CARAMORI *et al.*, 2014).

A doença apresenta alta incidência em homens no mundo todo embora o número de mulheres com DPOC tenha aumentado de forma considerável e alarmante (AMARAL *et al.*, 2017). Ainda, as mulheres podem responder de forma diferente quanto ao dano pulmonar devido à exposição ao tabaco e idade avançada, apresentando aumento de TGF- β e estresse oxidativo, maior risco de obstrução do fluxo aéreo e comprometimento na função pulmonar comparado aos homens (HAN *et al.*, 2007, MARTINEZ *et al.*, 2007, GLASSBERG *et al.*, 2016).

A DPOC é apresentada de acordo com o tempo progressivo do hábito tabagista (HÉLIOT *et al.*, 2016). Contudo, em modelos animais, foi relatado que a redução no tempo de exposição ao tabaco associada ao aumento do número de cigarros por dia produz resultados semelhantes aos encontrados pela exposição por tempo prolongado (FUJIMOTO *et al.*, 2015).

No desenvolvimento da doença ocorre a participação de várias células, principalmente inflamatórias (SARIR *et al.*, 2008). Os macrófagos e as células epiteliais do trato respiratório, ativados pelos irritantes inalatórios liberam mediadores químicos (BARNES, SHAPIRO E PAUWELS, 2003; CARAMORI *et al.*, 2014), que atraem diferentes células inflamatórias às vias respiratórias. Os neutrófilos recrutados produzem proteases, que estimulam a secreção de muco associada à bronquite crônica, uma das principais características da DPOC. Já os linfócitos T recrutados têm a capacidade de causar a citólise e a apoptose de células epiteliais alveolares, contribuindo para o enfisema relacionado à doença (COMPTON *et al.*, 2013; CARAMORI *et al.*, 2014). O enfisema também pode ser causado pelos macrófagos, que além de orquestrarem a resposta inflamatória na DPOC, produzem enzimas elastolíticas, como as

metaloproteinase de matriz (MMP)-2 e MMP-9 (CARAMORI *et al.*, 2014), que destroem as fibras do conjuntivo pulmonar. Outras células, como mastócitos e eosinófilos, também são recrutados aos pulmões expostos à fumaça do cigarro, pela via de sinalização do fator de transcrição nuclear KB (NF- κ B) (CROTTY ALEXANDER, SHIN E HWANG, 2015). Além disso, a disfunção das vias aéreas pelo fumo está associada à alta expressão de citocinas liberadas especialmente pelos mastócitos (NUSSBAUMER-OCHSNER *et al.*, 2015).

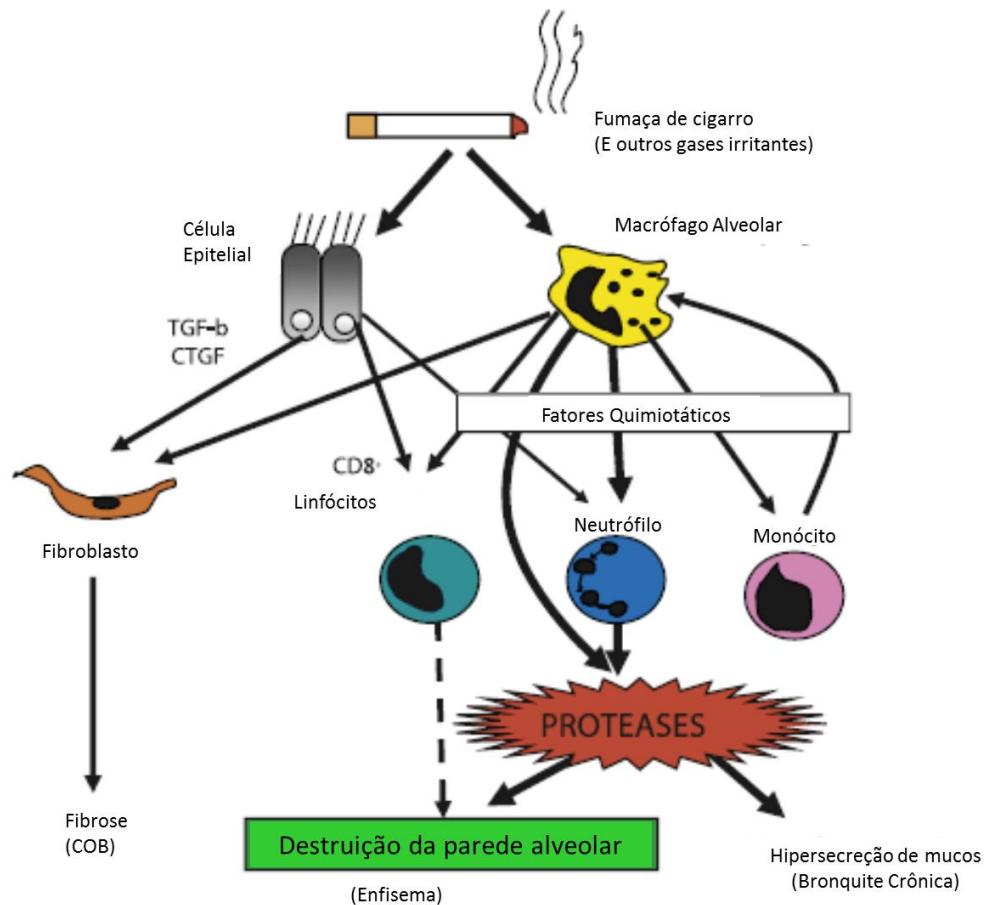


Figura 1 - Resposta inflamatória na DPOC - Muitas células inflamatórias e mediadores químicos estão envolvidos no processo inflamatório da DPOC. A fumaça do cigarro pode ativar diretamente as células epiteliais e macrófagos para liberar citocinas e quimiocinas, que levam ao recrutamento e ativação de células inflamatórias e a destruição do tecido pulmonar (Modificado de COMPTON *et al.*, 2013).

Diferentes investigações reforçam que a DPOC está intimamente ligada à inflamação, tanto local como sistemicamente, sendo o número de células inflamatórias em biópsias brônquicas e expectoração induzida, correlacionado com a gravidade da doença e declínios da função pulmonar e do estado de saúde. Também os mediadores inflamatórios aumentam na exacerbação da doença (SNOECK-STROBAND *et al.*, 2006; COMPTON *et al.*, 2013).

Estudos têm mostrado que biomarcadores séricos de inflamação, incluindo o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e MMP-9 estão aumentados em pacientes com DPOC e

correlacionados com o grau de obstrução do fluxo aéreo e mortalidade (BON *et al.*, 2009; AUGUSTI *et al.*, 2012). O aumento da citocina pró-inflamatória interleucina-1 beta (IL-1 β), da quimiocina proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e redução de citocinas anti-inflamatórias também podem estar envolvidos no processo inflamatório, em pacientes tabagistas com asma ou DPOC (ZHANG *et al.*, 2013; KASTELEI *et al.*, 2015; KLENIEWSKA *et al.*, 2016).

Outras pesquisas mostram que o hábito tabagista interfere nas análises bioquímicas do sangue, alterando os níveis de hemoglobina, colesterol, glicose, gama glutamil transferase (Gama GT) e transaminase glutâmica oxalacética (TGO) (NOBORISAKA *et al.*, 2014; HOESEIN *et al.*, 2015; XIROFOTOS *et al.*, 2015; MONTAÑO *et al.*, 2016).

Apesar dos avanços no tratamento da DPOC, ainda existe uma necessidade médica urgente para o desenvolvimento de novas terapias dirigidas à prevenção da progressão da doença e redução das exacerbações e mortalidade (COMPTON *et al.*, 2014). A influência da exposição à fumaça do cigarro em ratos é um modelo simples e bastante usado na literatura para estudar os efeitos adversos do tabagismo e as possibilidades de tratamento das enfermidades causadas por esse hábito (GENGE *et al.*, 2013; KOZMA *et al.*, 2014). Embora difiram no tipo e quantidade de cigarros e no tempo de exposição, vários estudos têm sido realizados para induzir a DPOC em ratos expostos ao fumo (WRIGHT, COSIO E CHURG, 2008; ZHENG *et al.*, 2009; GENG *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2013). Desse modo, o modelo de tabagismo é útil na compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos na DPOC e no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

Dado o papel central desempenhado pela inflamação na DPOC e histórico de efeitos colaterais dos medicamentos usados para tratamento, à base de corticosteroides inaláveis e broncodilatadores, como diabetes, osteoporose e risco aumentado de infecções, o desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias inovadoras é fundamental, em particular para retardar a progressão da doença e obter melhor controle das exacerbações (HANSEL e BARNES, 2009; COMPTON *et al.*, 2013; ARYAL, DIAZ-GUZMAN E MANNINO, 2014). Entre os mediadores anti-inflamatórios, a proteína endógena Anexina A1 (AnxA1), o primeiro membro caracterizado da superfamília das anexinas (LIM E PERVAIZ, 2007; PERRETTI E D'ACQUISTO, 2009; BOZINOVSKI, ANTHONY E VLAHOS, 2014), pode representar uma terapia alternativa para o tratamento da DPOC e de outras doenças causadas pelo tabagismo.

1.2. Anexina A1

A AnxA1, antigamente designada lipocortina 1, é uma proteína de 37 kDa que exibe sítios de ligação ao cálcio e aos fosfolipídios de membrana, e está envolvida na inibição das sínteses de eicosanoides e fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂), induzidas por glicocorticoides (GCs), o que confere propriedades anti-inflamatórias a essa proteína (D'ACQUISTO, PERRETTI E FLOWER, 2008). Estruturalmente, as anexinas compreendem dois domínios, uma pequena região N-terminal, que varia em comprimento e composição e, um domínio C-central altamente conservado (GERKE E MOSS, 2001). O domínio N-terminal é único para cada membro da superfamília, confere as atividades e funções específicas das anexinas e contém sítios para processos pós-traducionais, tais como, fosforilação, glicosilação e proteólise (PERRETTI E FLOWER, 2004; SOLITO *et al.*, 2006; PERRETTI E D'ACQUISTO, 2009; D'ACUNTO *et al.*, 2014).

Após a descoberta que atividade biológica anti-inflamatória da AnxA1 poderia ser reproduzida pelos primeiros aminoácidos da porção N-terminal da proteína (peptídeo Ac2-26), tornou-se uma prática comum o uso dessas moléculas em modelos experimentais de inflamação (SOLITO *et al.*, 2003; GAVINS *et al.*, 2007; GIROL *et al.*, 2013). A figura 2 apresenta a estrutura e o esquema da proteína AnxA1:

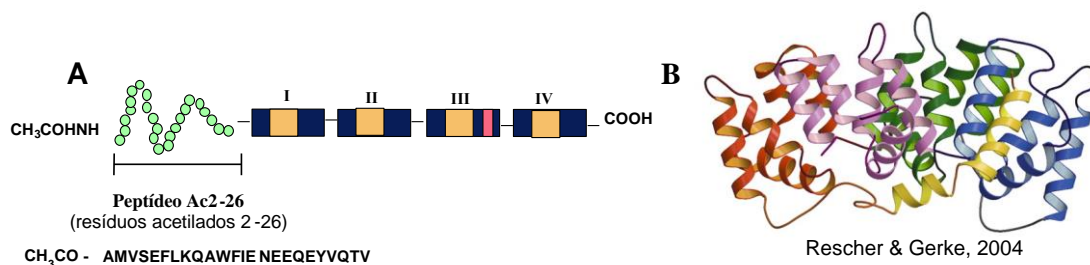


Figura 2 - Estrutura da proteína Anexina A1 (AnxA1) - A: Representação esquemática da estrutura primária da AnxA1, com destaque do sítio ativo anti-inflamatório (peptídeo Ac2-26). B: Ilustração do arranjo tridimensional da proteína (RESCHER E GERKE, 2004).

A AnxA1 é amplamente distribuída no organismo, exerce múltiplas funções em diferentes sistemas, entre elas, a fusão de membranas, fagocitose, proliferação e apoptose (PERRETTI E FLOWER, 2004; KAMAL, FLOWER E PERRETTI, 2005; LIM E PERVAIZ, 2007; PERRETTI E D'ACQUISTO, 2009) e pode ser encontrada em diversos tipos celulares, especialmente em células relacionadas aos processos de defesa como neutrófilos, mastócitos, monócitos e linfócitos (OLIANI *et al.*, 2001; KAMAL, FLOWER E PERRETTI, 2005;

OLIANI *et al.*, 2008; BOZINOVSKI, ANTHONY E VLAHOS, 2014; SUGIMOTO *et al.*, 2016). Nas células inativas, a AnxA1 apresenta, predominantemente, localização intracelular, sendo translocada, após ativação, para a superfície celular onde interage com receptores transmembranas de sete passagens acoplados à proteína G, os receptores para peptídeos formilados (FPRs) (PERRETTI E D'ACQUISTO, 2009; GIROL *et al.*, 2013; D'ACUNTO *et al.*, 2014).

A proteína AnxA1 é fortemente expressa nos macrófagos alveolares e células epiteliais das vias aéreas de humanos e animais, sendo que as ações da proteína têm sido investigadas em diferentes condições clínicas do pulmão (AMBROSE E HUNNINGHAKE, 1990; AMBROSE, BAHNS E HUNNINGHAKE, 1992; DAMAZO *et al.*, 2004; DAMAZO *et al.*, 2013). Atualmente está bem estabelecido que a inflamação contribui para o desenvolvimento do câncer de pulmão. A expressão aumentada da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) é frequentemente observada no câncer de pulmão de células não-pequenas humano e associada com mau prognóstico, indicando envolvimento crítico da via inflamatória pulmonar na carcinogênese por meio da resistência à apoptose, aumento da angiogênese, supressão da imunidade do hospedeiro, aumento da invasão celular e metástase (LU *et al.*, 2012).

Ainda, estudos indicam que o receptor FPR2 está presente nas células epiteliais e inflamatórias ativadas do pulmão e é particularmente importante na resolução da DPOC, podendo ser modulado pela AnxA1 e outros agonistas como amiloide sérica A e lipoxina A4 (BOZINOVSKI, ANTHONY E VLAHOS, 2014; CORMINBOEUF E LEROY, 2015). A contribuição da AnxA1 e do receptor FPR2, foi investigada na regulação de respostas inflamatórias em fibroblastos pulmonares humanos normais. O silenciamento da expressão da AnxA1 nos fibroblastos pelo RNA de interferência pequeno (siRNA) e o bloqueio do FPR2 foram associados a aumentos significantes de TNF- α e IL-6, acompanhados da redução da atividade de quimase reguladoras de sinal extracelular (ERK) e NF- κ B. Estes resultados sugerem que a AnxA1 possui potencial terapêutico em doenças pulmonares inflamatórias crônicas (JIA *et al.*, 2013).

Diante do exposto e da grande incidência de DPOC, especialmente associada ao fumo, fica evidente a importância do estudo da administração do peptídeo mimético da AnxA1 no tratamento dos processos inflamatórios induzidos pela exposição à fumaça de cigarro em modelo experimental, como possível alternativa terapêutica no manejo das enfermidades causadas pelo hábito do tabagismo.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da administração do peptídeo mimético Ac2-26 da AnxA1 em modelo de DPOC.

2.2 Objetivos Específicos

Em ratas Wistar expostas à fumaça do cigarro, tratadas ou não, com o peptídeo Ac2-26 e controle:

- Verificar os aspectos fisiológicos por meio da pesagem, aferição da pressão arterial e análise da ventilação pulmonar;
- Analisar alterações nas imagens radiológicas do tórax;
- Observar no sangue total a dosagem de hemoglobina e no plasma os níveis de glicose, colesterol, gama GT e TGO.
- Quantificar as células inflamatórias no LBA;
- Estudar as características histopatológicas e quantificar os mastócitos e macrófagos no pulmão e na traqueia;
- Investigar a expressão das proteínas AnxA1, COX-2 e MMP-9, no pulmão e na traqueia.
- Avaliar as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α e quimiocina MCP-1 no plasma, LBA e sobrenadante do macerado pulmonar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratas da linhagem Wistar (n=30), com 6 semanas de idade, foram obtidas da Unidade Didática e de Pesquisa Experimental (UDPE) das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA) de Catanduva-SP. Os animais foram avaliados pelo veterinário da própria instituição e após, divididos em 3 grupos (n=10/grupo): controle (C), expostos ao fumo sem tratamento (F) e tratados (F+Ac2-26) (Figura 3). As ratas foram mantidas em gaiolas, em um ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C) com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram realizados na UDPE e no Laboratório Multidisciplinar (FIPA) e conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA FIPA- Certificado nº 01/15).

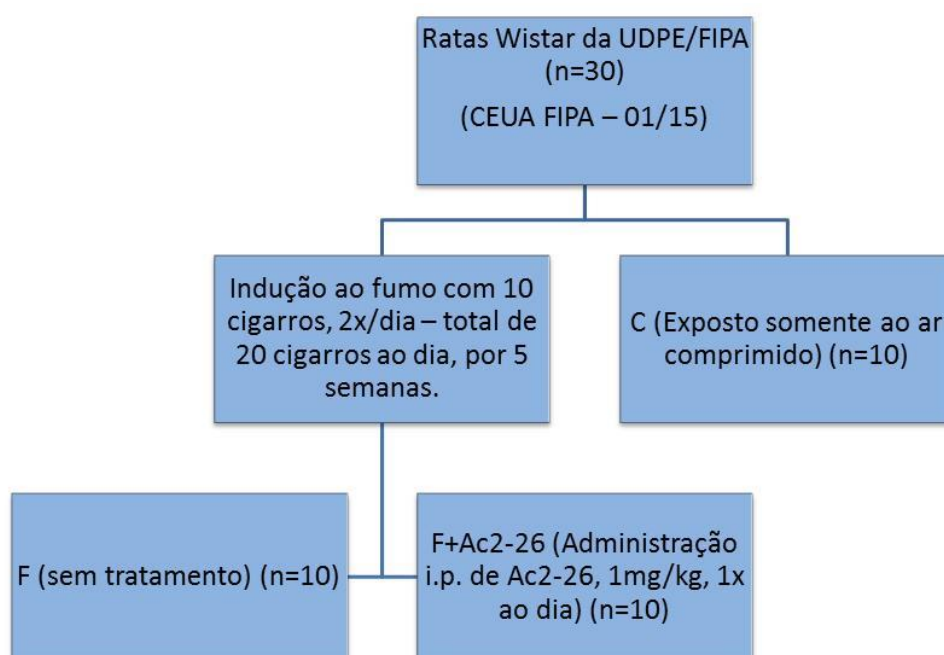


Figura 3 - Esquema dos grupos de animais.

3.2 Protocolo de exposição à fumaça do cigarro e tratamento com o peptídeo mimético Ac2-26

Dois grupos de animais foram induzidos à fumaça do cigarro, em aparato próprio para exposição ao fumo da UDPE-FIPA, por 5 semanas. O aparelho consiste em um sistema de contenção de animais e outro de liberação da fumaça do cigarro, com um suporte externo para o cigarro, conectado a uma bomba de sucção dinâmica (Figura 4). A bomba pode ser

programada de modo que períodos de sucção do cigarro se alternem com períodos de sucção de ar limpo, para prevenir a asfixia (KOZMA *et al.*, 2014). As exposições foram padronizadas e os animais expostos à queima de 10 cigarros comerciais (contendo 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono), um após o outro, duas vezes ao dia (total de 20 cigarros/dia), sendo a primeira exposição realizada no período da manhã (7:00 horas) e a segunda no início da noite (18:00 horas).

A eficácia do peptídeo mimético Ac2-26 da AnxA1, na proteção contra os processos inflamatórios causados pela exposição ao fumo, foi avaliada em um dos grupos expostos ao fumo (n=10) pela administração intraperitoneal (i.p) do Ac2-26 na dosagem de 1mg/Kg (GIROL *et al.*, 2013), 1x/dia, antes da primeira exposição à fumaça do cigarro, por 5 semanas. O grupo controle (n=10) foi exposto somente ao ar comprimido.

Ao final do experimento os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico isoflurano.



Figura 4 - Aparelho específico para a indução à fumaça do cigarro da UDPE. Seta indica a bomba dinâmica com capacidade de sucção à fumaça do cigarro na região externa à caixa de contenção dos animais.

3.3 Análises fisiológicas de pletismografia, pressão arterial e peso

Na última semana do protocolo de exposição à fumaça do cigarro, os grupos exposto ao fumo foram avaliados quanto à pletismografia medindo a ventilação pulmonar, a capacidade de respiração, frequência e o volume inspirado pelos animais em aparelho

específico e adaptado ao uso (*PowerLab, AD Instruments-Gas Analyzer*). O grupo controle também foi avaliado quanto à pletismografia, após a permanência no ambiente de exposição, porém na ausência da fumaça do cigarro. Nesse mesmo período também foi aferida a pressão arterial pela cauda de um modo não invasivo (*PowerLab, Transducer for rats, PanLab*) e realizada a pesagem das ratas de todos os grupos.

3.4 Análises por imagem de Raio X

Após o período de exposição os animais foram anestesiados i.p. com Ketamina (0,8 ml/kg) e Xylasina (0,2 ml/kg) e, em seguida, foram realizadas imagens radiográficas da região do tórax antero superior, indicando a via respiratória por imagens macroscópicas de 18 cm de largura por 24 cm de altura das pranchas dos pulmões em um aparelho específico (*Raio X – Astex, Vet maq*) adaptado para o uso em ratas Wistar. As variáveis consideradas foram a altura retroesternal pulmonar do pulmão direito e os níveis de rebaixamento diafragmático direito e esquerdo (MARCOS *et al.* 2013).

3.5 Análises quantitativas do lavado broncoalveolar

Ao final do experimento, para a obtenção do LBA, os animais tiveram a traqueia canulada e o pulmão direito clampado. O pulmão esquerdo foi lavado 3 vezes com PBS e o líquido obtido foi centrifugado por 10 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi armazenado a -70°C para posterior dosagens bioquímicas e de citocinas e o pellet foi ressuspenso em 500 µl de PBS e alíquotas de 10 µl corados em Turk (1:10) para quantificação de células inflamatórias em câmara de Neubauer (valores como número de células x 10³/ml).

3.6 Análises histopatológicas e imuno-histoquímicas

Após coleta do LBA, o pulmão direito e traqueia foram retirados, fixados em formol a 4% e processados para inclusão em parafina. Secções de 5µm foram usadas para análises histopatológicas, morfométricas e imuno-histoquímicas no microscópio Leica (DM500) do Laboratório Multidisciplinar das FIPA.

Para as análises histopatológicas as secções foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Os estudos morfométricos foram feitos por meio de medições de área dos alvéolos pulmonares com o uso de analisador de imagens (*Software Leica Image Analyses*).

Nos estudos imuno-histoquímicos foram avaliadas as expressões das proteínas AnxA1, COX-2 e MMP-9 e a identificação dos macrófagos. Para essas análises as secções foram processadas para recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 e bloqueio da atividade da peroxidase endógena e incubadas com os anticorpos primários policlonais rabbit: anti

AnxA1 (1:1000), COX-2 (1:300), MMP-9 (1:100) e ED-1 (1:150) (Zymed Laboratories, Cambridge, UK) por 12 horas. A seguir, incubadas com o anticorpo secundário biotilado (*Kit Histostain, Invitrogen*) e imersas em complexo estreptavidina peroxidase conjugada. O substrato diaminobenzidina (DAB) (*Kit DAB, Invitrogen*) foi usado para revelação e, após, as secções foram contra coradas com Hematoxilina. As proteínas foram quantificadas por densitometria (unidades arbitrárias de 0 a 255) no analisador de imagens (*software Leica Image Analysis*) e os macrófagos pulmonares quantificados em 10 imagens por lâmina obtidos pela objetiva 40x do microscópio Leica (DM500). As áreas de cada tecido foram obtidas utilizando o *Leica Image Analysis Software*.

3.6.1 Quantificação de mastócitos

Os mastócitos foram corados com azul de toluidina a 0,1% e analisados de acordo com suas características morfológicas em intactos ou desgranulados. A quantidade de histamina nos mastócitos foi avaliada nas condições de imaturidade e maturidade após as respectivas colorações com azul de Alcian (*EasyPath, Alcian Blue pH 2,5 PAS*) e safranina a 2,5% (HALLGREN E GURISH, 2014). A quantificação dos mastócitos foi realizada como descrito para os macrófagos no item 3.6.

3.7 Análises bioquímicas do sangue

O sangue foi coletado por punção cardíaca em seringas heparinizadas e separado em alíquotas para análise de hemoglobina com Kit comercial. Outras alíquotas foram centrifugadas por 15 minutos a 3.000 rpm e o plasma congelado a -70°C para posterior avaliações bioquímicas e dosagem de citocinas. As dosagem de colesterol total, glicose, gama GT e TGO foram realizadas por meio de Kits comerciais, em espectrofotômetro (absorbância 540nm).

3.8 Dosagem de citocinas pelo MAGPIX

Os fragmentos dos pulmões esquerdos dos grupos estudados foram macerados em nitrogênio líquido e adicionados 500 µL de uma solução contendo inibidores de protease e fosfatase (Merck, Millipore Corporation, EUA) seguindo as instruções do fabricante. O material foi incubado durante 20 minutos a 4 °C sob agitação constante e depois centrifugado a 15000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram recolhidos e congelados a -80 °C.

Os mediadores IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α e MCP-1 foram quantificados no plasma sanguíneo, LBA e sobrenadante do macerado pulmonar, utilizando o Kit *MILLIPLEX MAP* de citocinas de rato (RECYTMAG-65K; *Millipore Corporation, EUA*) e analisadas no

equipamento *LUMINEX xMAP MAGPIX* (Millipore Corporation, EUA). A concentração dos analitos foi determinada pelo *software MAGPIX xPONENT* (Millipore Corporation, USA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M.) das concentrações de citocinas (pg/ml).

3.9 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos previamente à análise descritiva e determinação da normalidade. Como as amostras apresentaram distribuição normal, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de *Bonferroni*. Todos os valores obtidos foram expressos como média \pm S.E.M. e os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Análises das imagens de Raio X

Nas imagens por radiografias (Figura 5) foram observadas reduções macroscópicas do pulmão e elevação do diafragma no momento de inspiração nas ratas expostas ao fumo não tratadas (Figura 5B), em comparação aos grupos controle (Figura 5A) e expostos ao fumo tratados (Figura 5C).

4.2. Análises fisiológicas da pletismografia, pressão arterial e peso

As análises da pletismografia mostraram redução significativa da frequência pulmonar nos animais F ($69,54 \pm 2,379$; $p < 0,05$) comparados aos controles ($87,10 \pm 3,634$) e F+Ac2-16 ($95,32 \pm 4,178$; $p < 0,001$; Figura 5F). A capacidade de ventilação final também foi reduzida no grupo exposto ao fumo sem tratamento ($762,3 \pm 11,53$) com relação aos grupos controle ($943,2 \pm 34,19$; $p < 0,05$) e tratado ($1076 \pm 71,90$; $p < 0,01$; Figura 5H). Não houve diferença significativa do volume inspirado entre os grupos (Figura 5G).

Com relação à pressão arterial, no final do protocolo de exposição à fumaça do cigarro ocorreu aumento significativo ($p < 0,001$) nos animais F ($80,15 \pm 1,722$) comparados aos controles ($69,00 \pm 1,317$) e tratados com o peptídeo ($67,22 \pm 1,461$ e Figura 5D).

As análises de pesagem final mostraram redução significativa no grupo exposto ao fumo sem tratamento ($288,3 \pm 5,831$; $p < 0,01$) comparado ao controle ($329,4 \pm 2,581$ e Figura 5E).

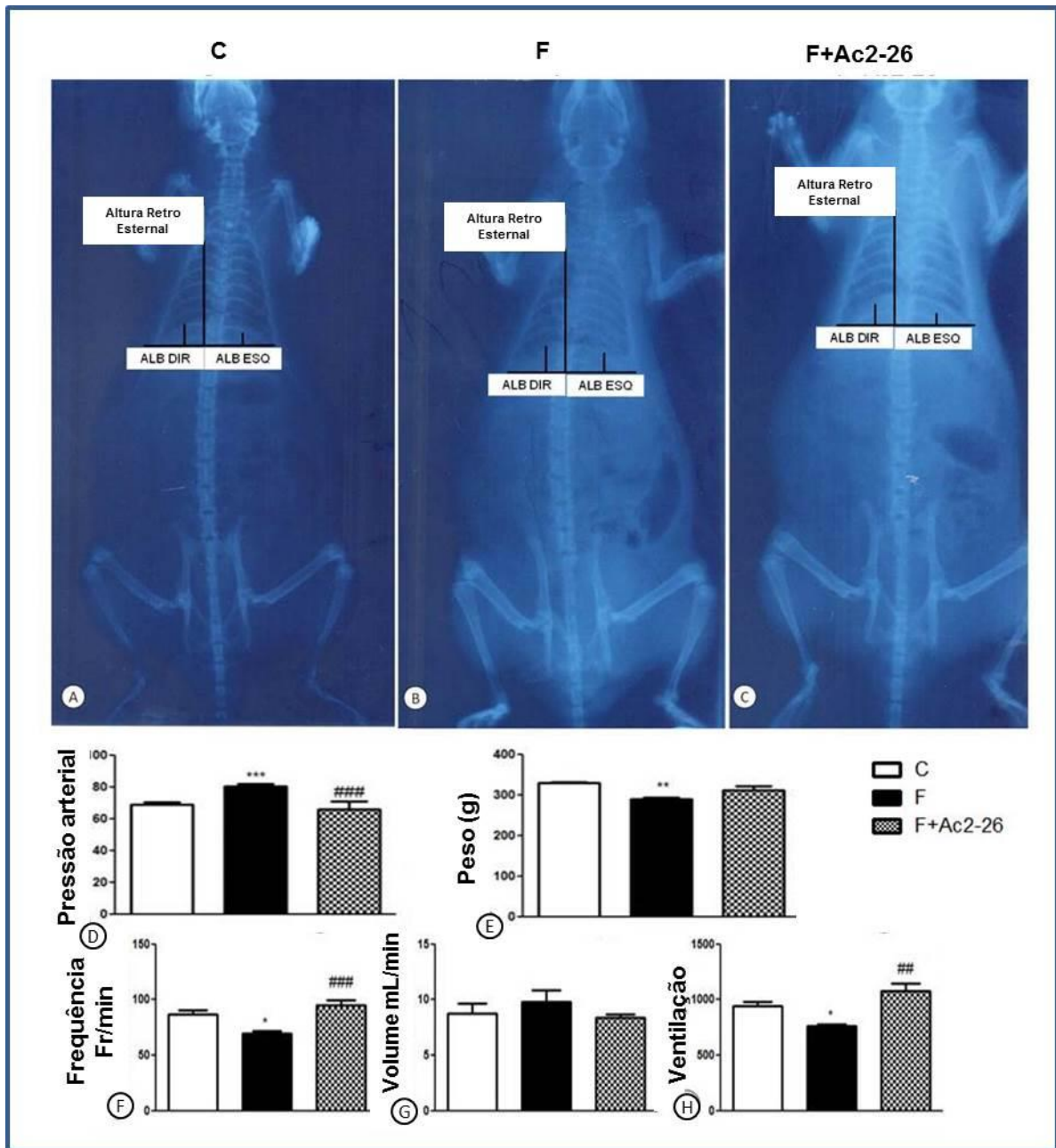


Figura 5 – Análises fisiológicas e radiográficas do pulmão – Nesses dados foram avaliadas as regiões do tórax, comparando o pulmão entre os grupos controle (A), exposto ao fumo (B) e exposto ao fumo tratado (C). Medida de 18cmx24cm. Variáveis: altura retroesternal pulmonar: do início ao fim do pulmão direito; níveis de rebaixamento diafragmático direito (ALBDIR) e esquerdo (ALBESQ). **Análises fisiológicas de pletismografia, pressão arterial e peso** – Análises da pressão arterial (D). Pesagem (E). Avaliação da frequência pulmonar por minutos (F) e capacidade do volume de ar inspirado em ml por minutos (G), capacidade de ventilação pulmonar por minuto (H); Resultados apresentados como média \pm S.E.M. (n=10), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs controle; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs exposto ao fumo sem tratamento.

4.3 Análises quantitativa do lavado bronco alveolar

Na análise do LBA foi observado aumento significativo dos macrófagos ($22,00 \pm 2,121$) ($p < 0,001$) (Figura 6H) e linfócitos ($47,75 \pm 11,86$) ($p < 0,01$ e Figura 6I) no grupo exposto ao fumo sem tratamento comparado ao controle (macrófago: $3,250 \pm 1,652$; linfócito: $2,250 \pm 1,109$). Enquanto, os animais tratados mostraram redução significativa dessas células (macrófagos: $10,00 \pm 2,483$ $p < 0,01$; linfócitos: $20,20 \pm 3,338$ $p < 0,05$).

4.4 Análises histopatológicas da traqueia e do pulmão

As análises histopatológicas da traqueia (Figura 6D-F) mostraram alterações no epitélio de revestimento causado pela exposição à fumaça do cigarro, com a perda dos cílios de proteção (Figura 6E) no grupo F com relação ao C (Figura 6D) e F+Ac2-26 (Figura 6F), no qual foi observada a preservação do tecido epitelial.

Nas análises histopatológicas (Figura 6A-C) e morfométricas do pulmão (Figura 6G), foram observadas modificações nos espaços intra-alveolares, com aumento nos grupos expostos ao fumo (24771 ± 2929), comparado aos controles ($9668 \pm 481,7$; $p < 0,01$) e tratados (13235 ± 1427 ; $p < 0,05$). Os animais F ainda apresentaram aumento do tecido linfoide associado à mucosa (BALT) (Figura 6B) e maior influxo de células inflamatórias no pulmão comparado aos outros grupos (Figura 6A e C).

Os resultados das análises histopatológicas e morfométricas indicaram a preservação dos tecidos nos grupos tratados com o peptídeo durante o protocolo de exposição à fumaça do cigarro.

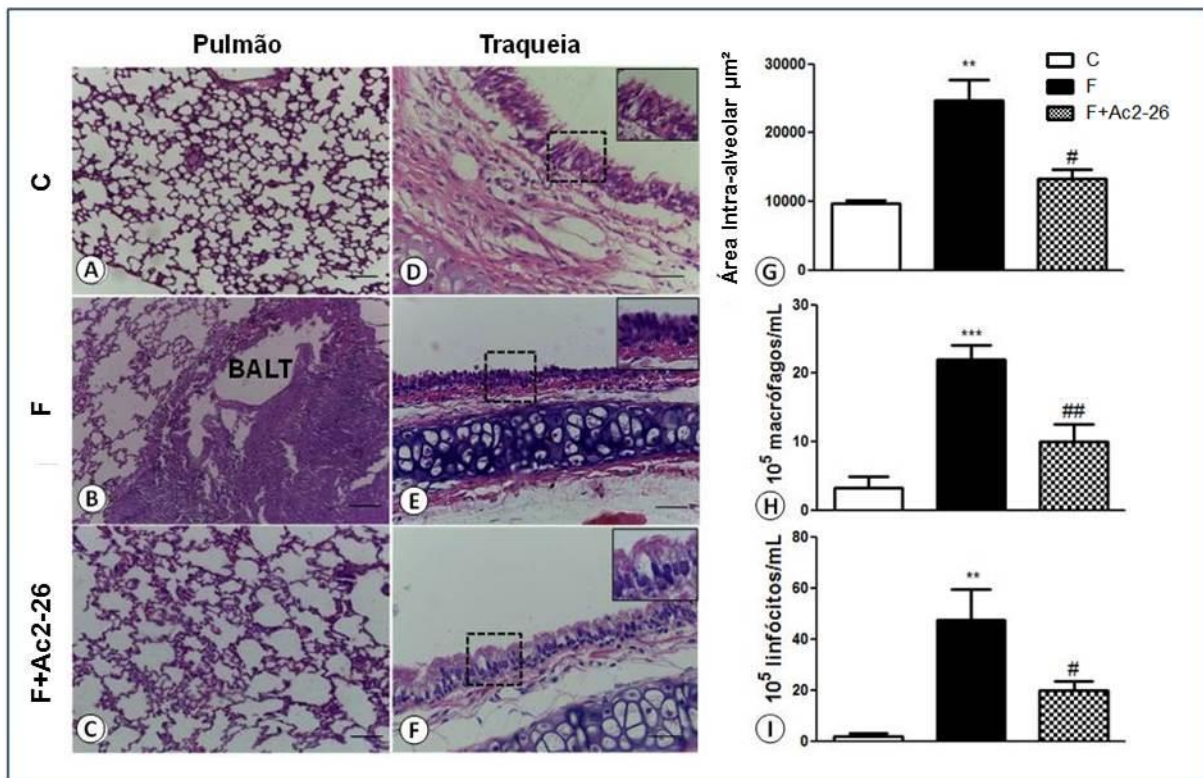


Figura 6 – Análise histopatológica do pulmão– Grupo controle com aspecto normal do tecido (A), grupo exposto ao fumo sem tratamento (B) com aumento dos espaços intra-alveolares e BALT e grupo exposto ao fumo tratado com o peptídeo (C). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras: 10 μm. Morfometria dos espaços intra-alveolares (G). Resultados apresentados como média ± S.E.M. (n=10/grupo). **Análise histopatológica da traqueia** –Controle (D), grupo exposto ao fumo sem tratamento com alteração no tecido e perda dos cílios (E) e grupo tratado com o peptídeo (F), com preservação do tecido epitelial. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras: 10 μm. **Análise quantitativa do lavado bronco alveolar** – Quantificação de macrófagos (H) e linfócitos (I), em câmara de Neubauer. Resultados apresentados como média ± S.E.M. (n=10), ** p<0,01 e *** p<0,001 vs controle; # p<0,05 e ## p<0,01 vs exposto ao fumo sem tratamento.

4.5. Análises imuno-histoquímicas do pulmão e da traqueia

As expressões das proteínas AnxA1, COX-2 e MMP-9 foram analisadas no pulmão e traqueia dos grupos expostos ao fumo tratados ou não e controle. A especificidade das imunomarcações foi comprovada pelos respectivos controles de reação (Figura 7D, H e L).

Os animais expostos ao fumo não tratados mostraram expressões aumentadas da AnxA1 no pulmão ($189,4 \pm 11,54$; $p < 0,01$; Figura 7B e M) e traqueia ($176,1 \pm 15,46$; $p < 0,05$; Figura 7P) comparadas ao grupo controle (pulmão: $169,5 \pm 7,238$; Figura 7A, traqueia: $152,3 \pm 14,83$, Figura 7P). Diferentemente, o grupo F+Ac2-26 apresentou redução na expressão da AnxA1 no pulmão ($167 \pm 5,984$; $p < 0,01$; Figura 7C e M) e traqueia ($153,8 \pm 11,92$; $p < 0,05$; Figura 7P) com relação ao grupo F.

A expressão da COX-2 foi aumentada nos pulmões ($189,2 \pm 7,520$; $p < 0,001$; Figura 7F e N) e traqueia ($182,4 \pm 13,94$; $p < 0,05$; Figura 7Q), no grupo F comparado ao controle

(pulmão: $152,3 \pm 8,678$; Figura 7E e traqueia $156,6 \pm 1,790$, Figura 7Q). O tratamento com o peptídeo reduziu a expressão dessa enzima no tecido pulmonar ($164,8 \pm 11,99$; $p < 0,001$; Figura 7G e N) com relação ao grupo não tratado.

Análises da imunorreatividade para MMP-9 mostraram aumento significativo ($p < 0,001$) na expressão da enzima no pulmão de animais expostos ao fumo não tratados ($175,6 \pm 10,16$; Figura 7J e O) e tratados ($176,2 \pm 2,831$; Figura 7K e O) com relação aos animais controle ($142,6 \pm 7,506$; Figura 7I e O). Na traqueia, reduções na expressão de MMP-9 ($p < 0,001$) foram observadas após o tratamento com o peptídeo ($159,9 \pm 12,94$; Figura 7R) comparado aos animais não tratados ($171,7 \pm 4,777$; Figura 7R).

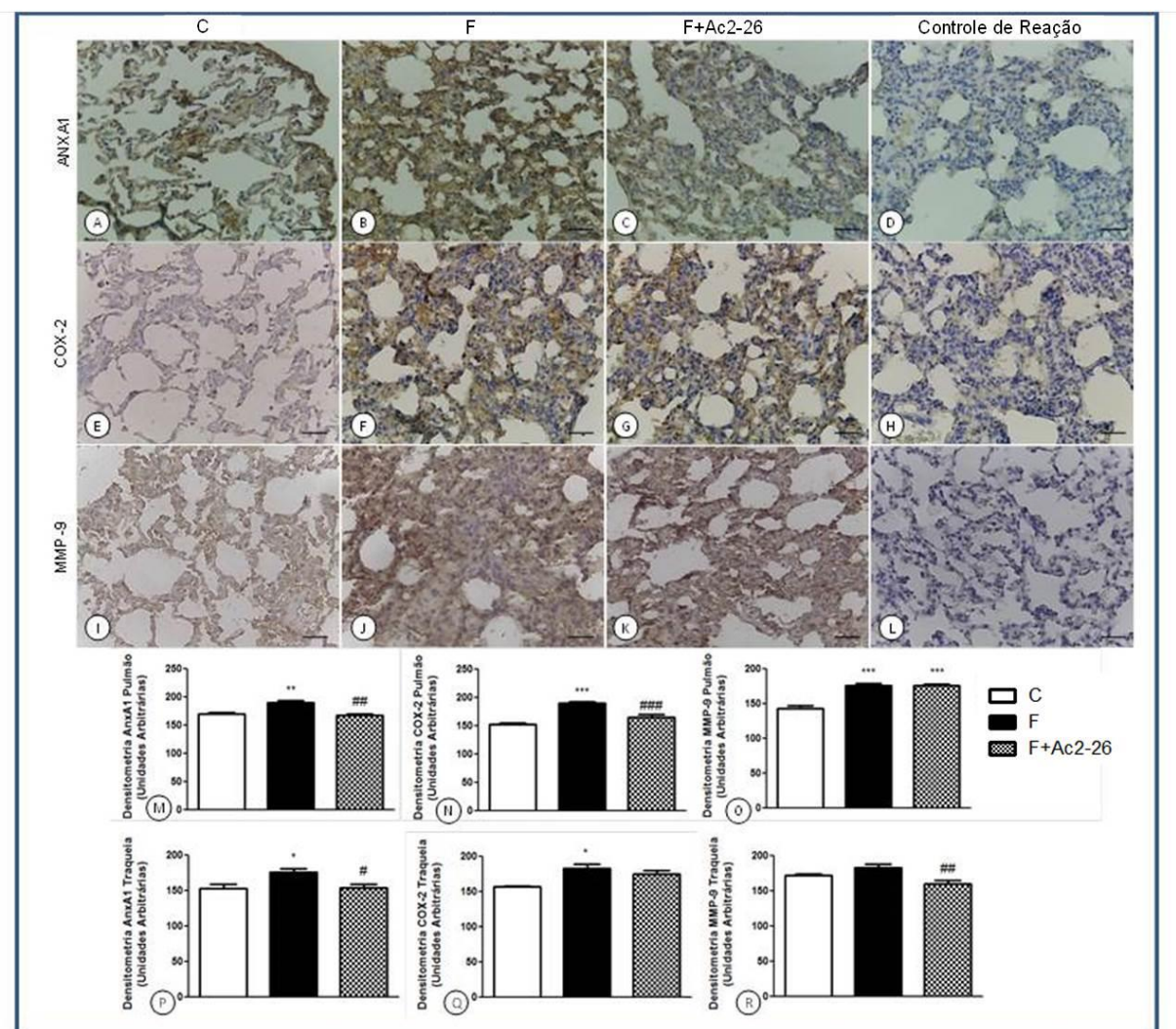


Figura 7 – Expressão das proteínas AnxA1, COX-2 e MMP-9 no pulmão e traqueia: Menor expressão das proteínas nos grupos controles (A, E e I), aumento da imunomarcagem no grupo exposto ao fumo sem tratamento (B, F e J) e redução na expressão da AnxA1 e COX-2 após tratamento com o peptídeo (C e G). Ausência de marcação no controle de reação (D, H e L). Contra-coloração: Hematoxilina. Barras 10 μ m. **Análises Densitométricas:** Resultados apresentados como média \pm S.E.M. (n=10/grupo) (M, N, O, P, Q e R). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs exposto ao fumo sem tratamento.

4.6 Análises quantitativas de células inflamatórias no pulmão e traqueia

4.6.1 Macrófagos

A quantificação dos macrófagos foi realizada por meio de imuno-histoquímica e avaliada no pulmão e na traqueia dos grupos controle e expostos ao fumo tratados ou não. A especificidade desta análise foi comprovada pelo controle de reação.

No pulmão, essas análises indicaram aumento ($11,0 \pm 4,74$) (Figura 8A) no grupo F ($135,0 \pm 54,56$) ($p < 0,001$) comparado ao controle e redução dessas células no grupo F+Ac2-26 ($43,75 \pm 20,75$) ($p < 0,001$). Resultados semelhantes foram observados na traqueia, com maior quantidade de macrófagos nos animais não tratados ($67,19 \pm 20,76$; $p < 0,001$; Figura 8F) com relação ao controle ($24,40 \pm 7,917$) e animais tratados com o peptídeo ($26,50 \pm 8,023$; $p < 0,001$).

4.6.2 Mastócitos

No pulmão, a exposição ao fumo promoveu aumento significativo de mastócitos totais ($17,00 \pm 7,321$; $p < 0,05$) e intactos ($23,75 \pm 1,531$; $p < 0,001$) no grupo sem tratamento comparado ao controle (totais: $17,00 \pm 7,321$; intactos: $5,833 \pm 4,233$) e redução significativa de mastócitos totais ($12,75 \pm 5,108$; $p < 0,01$), intactos ($5,313 \pm 1,875$; $p < 0,001$) e desgranulados ($6,000 \pm 3,687$; $p < 0,01$) no grupo tratado comparado ao F (desgranulados: $26,38 \pm 10,18$) (Figura 8B). Dados semelhantes foram encontrados nas observações realizadas na traqueia (Figura 8G), com aumento significativo de mastócitos totais ($17,16 \pm 8,077$; $p < 0,05$), intactos ($9,792 \pm 3,393$; $p < 0,05$) e desgranulados ($9,464 \pm 3,740$; $p < 0,05$) no grupo F comparado ao controle (totais: $7,800 \pm 3,304$; intactos: $5,500 \pm 2,092$; degranulados: $5,208 \pm 2,426$) e tratados (totais: $3,344 \pm 2,150$; $p < 0,001$; intactos: $1,875 \pm 0,6847$; $p < 0,001$; desgranulados: $2,708 \pm 1,840$; $p < 0,01$; Figura 8C e H).

Os mastócitos também foram quantificados após coloração com safranina e azul de alcian no pulmão e traqueia em todos os grupos (Figura 8D, E, I e J). Nas análises do pulmão, foi observado aumento de mastócitos azul de alcian positivos ($p < 0,05$) e especialmente safranina positivos ($p < 0,01$) no grupo exposto ao fumo sem tratamento ($34,11 \pm 18,72$) comparado ao controle ($6,750 \pm 3,010$), e tratado ($15,00 \pm 8,385$). As análises dos mastócitos na traqueia também indicaram aumento dessas células, especialmente safranina positivas ($p < 0,01$), nos animais não tratados ($16,46 \pm 9,982$) comparados aos controles ($2,500 \pm 1,976$) com redução pela administração do peptídeo ($2,083 \pm 2,041$).

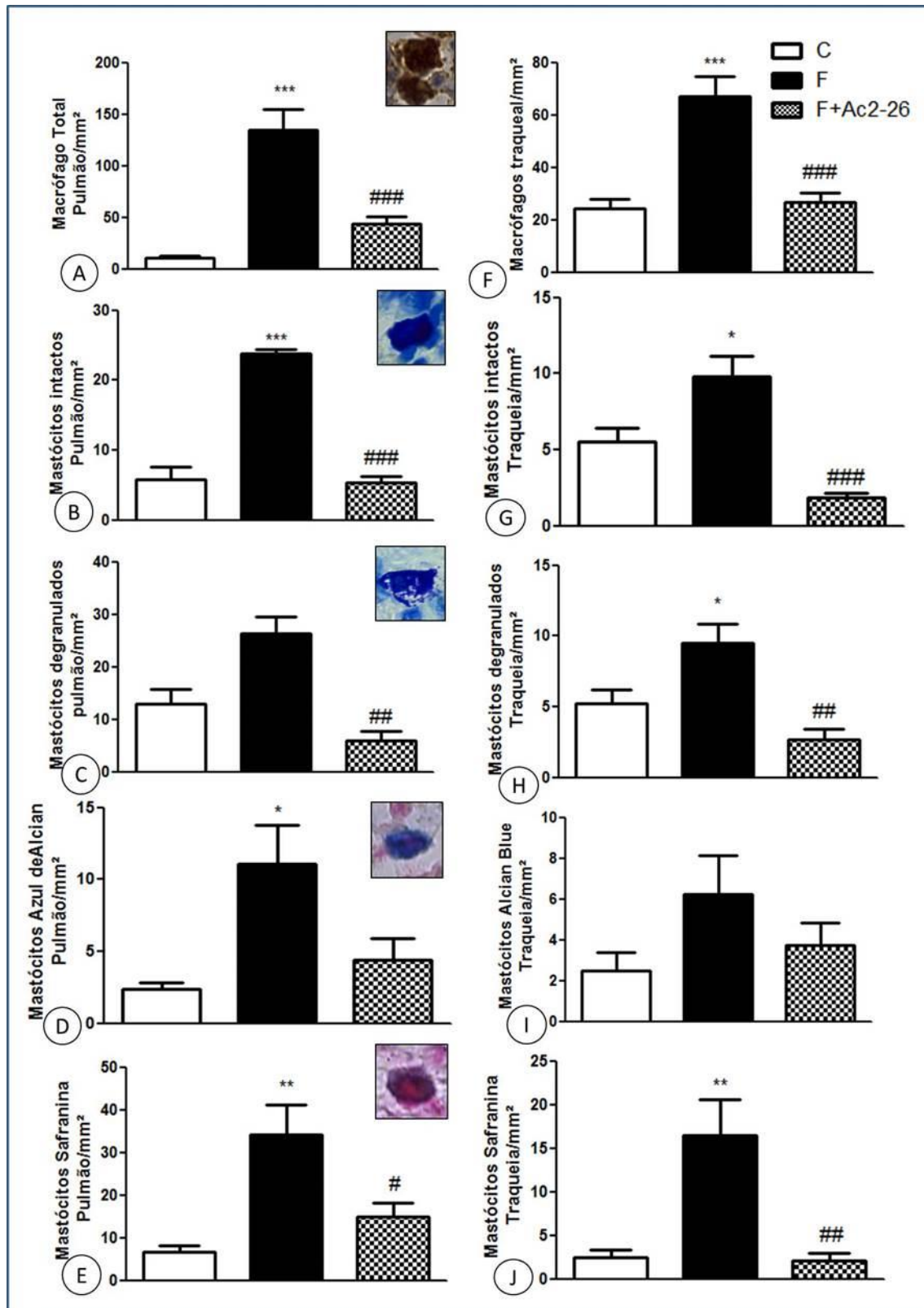


Figura 8 – Macrófagos e mastócitos no pulmão e traqueia - Poucos macrófagos (A e F) e mastócitos (B-E, G-J) nos grupos controles. Aumento dessas células no grupo exposto ao fumo sem tratamento e redução após tratamento com o peptídeo. (n=10/grupo). Contra-coloração: Hematoxilina. Coloração: Azul de toluidina (B, C, G e H), azul de alcian (D e I) e safranina (E e J). Barras 10 μ m. Resultados apresentados como média \pm S.E.M. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs exposto ao fumo sem tratamento.

4.7. Análises bioquímicas do sangue

A dosagem da hemoglobina no sangue total mostrou aumento significativo ($p<0,01$) nos animais F ($16,92\pm 1,224$), comparado aos grupos controle ($10,23\pm 1,229$) (Figura 9A). Nas análises bioquímicas do plasma sanguíneo, foram avaliadas as dosagens de glicose em mg/dl, colesterol em mg/dl, gama GT em U/L e TGO em U/mL.

Níveis reduzidos de glicose (Figura 9B) foram observados no grupo exposto ao fumo sem tratamento ($374,6\pm 99,27$) com relação ao C ($461,1\pm 35,39$), e aumento significativo no grupo F+Ac2-26 ($477,0\pm 64,11$) comparado ao F.

Na dosagem de gama GT (Figura 9C) foi observado aumento ($p<0,05$) nas ratas expostas ao fumo não tratadas ($15,97\pm 5,559$) com relação às controles ($7,644\pm 2,049$) e redução significativa ($p<0,01$) com o tratamento ($4,860\pm 3,519$).

Reduções dos níveis de colesterol (Figura 9D) e TGO ($p<0,05$) (Figura 9E) também foram observadas nos animais F+Ac2-26 (TGO: $111,2\pm 8,565$; colesterol: $65,02\pm 18,33$) comparado ao grupo sem tratamento (TGO: $127,8\pm 9,230$; colesterol: $91,91\pm 26,70$).

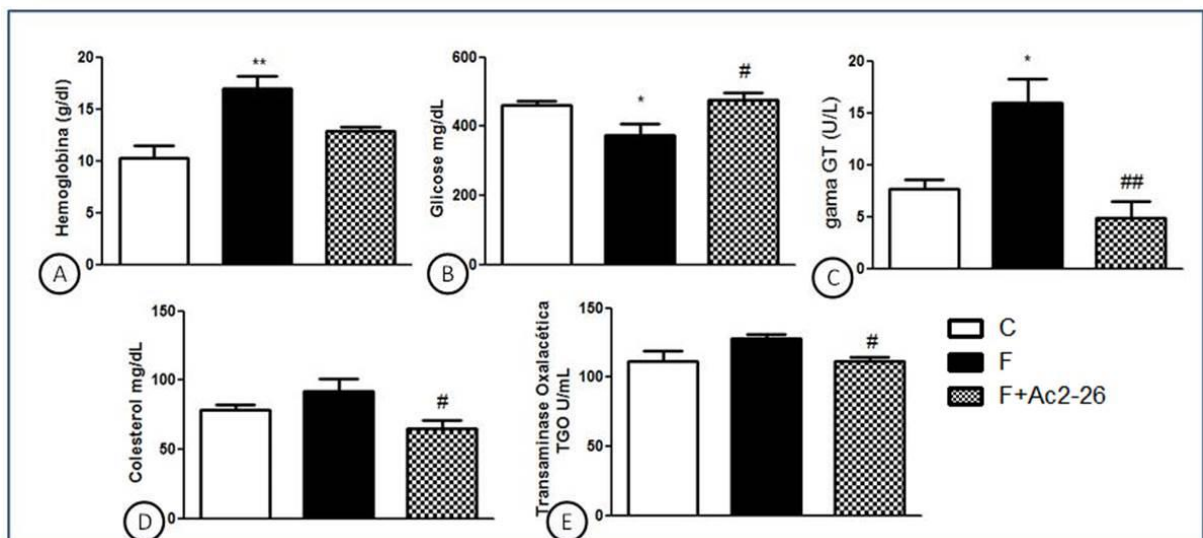


Figura 9 - Análise bioquímicas do sangue – A dosagem de hemoglobina (A) foi realizada no sangue total por g/dl nos grupos controle, exposto ao fumo e exposto ao fumo tratado. As dosagens de glicose (B), gama GT (C), colesterol (D) e TGO (E) foram realizadas no plasma sanguíneo, respectivamente por mg/dL, U/L e U/mL, todos os grupos. Resultados apresentados como média ± S.E.M. (n=10/grupo). * $p<0,05$; ** $p<0,01$ vs controle # $p<0,05$; ## $p<0,001$ vs exposto ao fumo sem tratamento.

4.8 Análises de citocinas pelo MAGPIX

No sobrenadante pulmonar dos animais F foram observados níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β ($p<0,01$), IL-6 e TNF- α ($p<0,001$) e da quimiocina MCP-1 ($p<0,001$) com redução nos animais controle (Figura 10 A, B, D e E). Similarmente, foram

encontrados aumentos nas dosagens de IL-1 β , IL-6 ($p<0,001$) e MCP-1 ($p<0,01$) no plasma sanguíneo (Figura 10F, G e I) e de IL-1 β ($0,001$) e MCP-1 ($0,01$) no LBA (Figura 10K e N).

A administração do peptídeo promoveu redução significativa nos níveis dos mediadores pró-inflamatório no sobrenadante do macerado pulmonar (IL-1 β e MCP-1 $p<0,01$; IL-6 e TNF- α $p<0,001$) (Figura 10A, B, D e E), no plasma sanguíneo (IL-1 β e IL-6 $p<0,001$; TNF- α $p<0,01$) (Figura 10F, G e J) e no LBA (IL-1 β $p<0,001$; TNF- α $p<0,05$) (Figura 10K e O).

Diferentemente, nos animais expostos ao fumo não tratados, níveis reduzidos da citocina anti-inflamatória IL-10 foram observados no LBA ($p<0,01$), comparado ao controle. Enquanto nos animais tratados, níveis aumentados de IL-10 foram encontrados no sobrenadante pulmonar e LBA ($p<0,001$) com redução nos sem tratamento (Figura 10C, H e M).

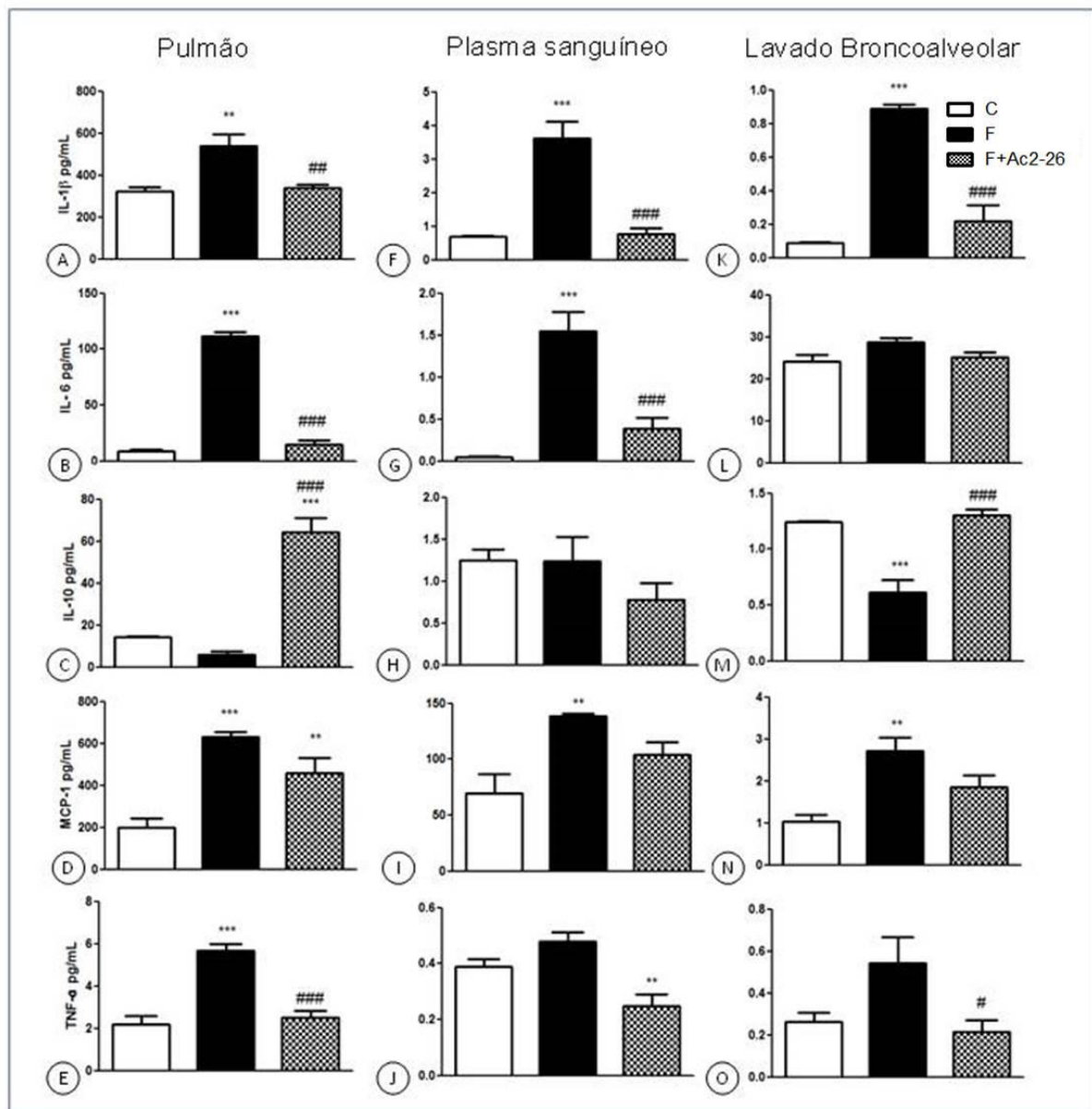


Figura 10 - Dosagem de citocinas no macerado do pulmão, plasma sanguíneo e lavado broncoalveolar - IL-1β (A, F e K); IL-6 (B, G e L); IL-10 (C, H e M); MCP-1 (D, I e N); TNF-α (E, J e O). Resultados apresentados como média ± S.E.M. (n=10/grupo). ** p< 0,01; * p< 0,001 vs controle # p<0,05; ## p<0,01 #### p<0,001 vs exposto ao fumo sem tratamento**

5. DISCUSSÃO

O hábito tabagista é um importante problema de saúde mundial e mesmo pessoas não tabagistas, que convivem com a fumaça produzida por fumantes, sofrem os danos causados por esta exposição (COMPTON *et al.*, 2013; CAMARONI *et al.*, 2014). O fumo está fortemente associado, entre outras afecções, ao desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), uma grave condição de saúde, induzida por processo inflamatório e caracterizada pela limitação progressiva do fluxo de ar (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION: CONCERNS REGARDING TOBACCO USE, 2012). Atualmente para o tratamento da DPOC são administrados broncodilatadores à base de corticoides, e existem poucos estudos sobre alternativas com anti-inflamatórios, e outras terapias para tratamento da doença (HANSEL E BARNES, 2009). Diante disso, é importante o desenvolvimento de novas terapias dirigidas à prevenção da progressão da doença e redução das exacerbações e mortalidade (COMPTON *et al.*, 2014). Entre os mediadores anti-inflamatórios, particularmente a proteína AnxA1 pode representar uma alternativa terapêutica no manejo das enfermidades causadas pelo tabagismo. Por essas razões investigamos os efeitos da administração do peptídeo mimético da AnxA1, o Ac2-26, em modelo de exposição à fumaça de cigarro em ratas.

Sobre o modelo proposto, de modo geral, nossos dados reforçam que o modelo utilizado foi eficaz na indução da DPOC, promovendo alterações morfofisiológicas importantes nas ratas estudadas. Os resultados obtidos relacionados ao uso de fêmeas estão de acordo com a literatura e mostram a susceptibilidade a danos das vias aéreas em menor período de exposição ao tabagismo comparado aos machos, embora as fêmeas possam apresentar maior recuperação quando ex-fumantes, devido ao efeito do estrógeno (GLASSBERG *et al.*, 2016; AMARAL *et al.*, 2017).

Inicialmente, analisamos os dados fisiológicos relacionados a peso, pressão arterial e ventilação pulmonar e, como esperado, ocorreu perda de peso, aumento da pressão e redução da frequência e capacidade de ventilação nos ratas expostas ao fumo sem tratamento, o que indica diminuição da capacidade pulmonar nos animais expostos ao fumo e corroboram a viabilidade do modelo usado. Além disso, nossos dados de imagem por radiografia mostraram reduções no perímetro pulmonar no grupo exposto ao fumo sem tratamento comparado com os grupos controle e exposto ao fumo e tratado, em concordância com os obtidos da ventilação pulmonar. Estudos indicam que pacientes com paredes pulmonares mais espessas, devido ao enfisema ou DPOC, apresentam quadro clínico grave e limitação no fluxo de ar,

com comprometimento da função pulmonar (HOESEIN *et al.*, 2015). Desse modo nossos resultados apontam que a limitação do fluxo de ar ocorre devido à redução do diâmetro das vias aéreas em nível baixo, em conformidade com dados de literatura (VENEGAS, *et al.* 2005; DIJKSTRA, *et al.* 2011).

Nossas análises fisiológicas reforçam os efeitos prejudiciais e as comorbidades que acompanham o hábito tabagista (GAN *et al.*, 2004; TERAMOTO, 2007; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION: CONCERNS REGARDING TOBACCO USE, 2012; CARAMORI *et al.*, 2014). Contudo, nos animais tratados com o peptídeo o peso, a pressão arterial, ventilação e as dimensões pulmonares foram semelhantes às encontradas nos animais controle, evidenciando os efeitos benéficos do tratamento contra as ações sistêmicas da exposição ao fumo. Ainda, estão de acordo com estudos que apontam o papel protetor do Ac2-26 em afecções do pulmão (DAMAZO *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2012).

Além da hipertensão, o tabagismo pode estar ligado à elevação dos níveis de hemoglobina (MAIA *et al.*, 2011; LÜDICKE *et al.*, 2015). Por essa razão, investigamos a taxa de hemoglobina no sangue dos animais expostos ao fumo e, novamente, verificamos o efeito protetor do peptídeo no grupo tratado, o qual manteve a concentração de hemoglobina semelhante ao grupo controle, e, diferentemente, elevada nos animais expostos ao fumo não tratados. A alta taxa de hemoglobina no grupo exposto ao fumo está associada à glicoproteína eritropoietina sérica (EPO) que estimula a produção de células vermelhas. Contudo, nos casos de exacerbação de DPOC a EPO pode estar reduzida, indicando que na fase aguda da doença, a associação hemoglobina/ EPO é inversa e está ligada ao aumento de IL-6, mostrando resistência da EPO por meio de mecanismos que estão associados ao aumento do processo inflamatório sistêmico (SALA *et al.* 2010; MARKOULAKI *et al.*, 2011; SINGH *et al.* 2016).

Nas outras análises bioquímicas, observamos aumento do colesterol no grupo exposto ao fumo sem tratamento comparado ao controle e redução significativa com o tratamento. Outra investigação também indica o aumento de colesterol total e LDL em pacientes fumantes comparado aos não fumantes (XIROFOTOS *et al.*, 2015) e ainda indicam a relação da doença cardiovascular ligada a DPOC (HUNNINGHAKE, 2005). Nossos dados mostraram, ainda, valores reduzidos de glicose no sangue dos animais expostos ao fumo não tratado, comparado ao controle e tratados, e estão de acordo com estudos que observaram a redução de glicose em ratos expostos ao fumo não obesos (MONTAÑO *et al.*, 2016). Diferentemente, outros estudos indicam a DPOC como um fator de risco para diabetes mellitus 2 em pacientes

hiperglicêmicos ligado aos fatores de inflamação e estresse oxidativo. (MIRRAKHIMOV, 2012)

Nas dosagens de TGO e gama GT observamos aumento no grupo exposto ao fumo sem tratamento corroborando com dados de literatura que indicam o tabagismo com grande potencial para riscos no desenvolvimento de doenças renais e toxicidade (NOBORISAKA *et al.*, 2014). Por outro lado, a redução nos níveis dessas enzimas observadas pela administração do peptídeo da AnxA1 apontam, novamente, o efeito protetor do tratamento.

O papel anti-inflamatório do Ac2-26 também foi observado pelas análises de células inflamatórias no LBA, as quais mostraram maior quantidade de leucócitos, especialmente linfócitos e monócitos, nos animais expostos ao fumo não tratados e redução pós-tratamento. O aumento de leucócitos após a exposição à fumaça do cigarro, especialmente no grupo sem tratamento, está de acordo com investigações que correlacionam o elevado número de células inflamatórias em biópsias brônquicas e expectoração à gravidade da doença com declínio da função pulmonar e estado de saúde na DPOC (COMPTON *et al.*, 2013). A redução do influxo leucocitário promovida pelo Ac2-26 também foi observada em diversos modelos experimentais (BOZINOVSKI, ANTHONY, VLAHOS, 2014; SUGIMOTO *et al.*, 2016) e confirmaram o potencial anti-inflamatório do peptídeo.

As análises histopatológicas do pulmão e da traqueia mostraram aumento dos espaços intra-alveolares e influxo de células inflamatórias no grupo exposto ao fumo comparado com os animais controles. A degeneração do parênquima pulmonar foi mais acentuada nos animais expostos ao fumo não tratados, nos quais foi observado aumento de BALT. A redução do fluxo de ar e consequente dificuldade para respirar podem estar relacionadas ao desequilíbrio entre as proteases responsáveis pela destruição do parênquima pulmonar e antiproteases que inibem a ação das enzimas proteolíticas, podendo ocasionar o enfisema pulmonar (RICHMOND *et al.*, 1993; RUFINO *et al.*, 2006; KOZMA *et al.*, 2014). Contudo, menores alterações foram observadas nas ratas tratadas com o peptídeo Ac2-26 que mostraram a preservação do parênquima pulmonar. De acordo com Cunha e colaboradores (2012) no modelo experimental de inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS), o pré-tratamento com peptídeo mimético Ac2-26 inibe a migração de leucócitos para o tecido pulmonar.

Nas quantificações teciduais das células inflamatórias identificamos por imuno-histoquímica maior quantidade de macrófagos nos espaços intra-alveolares e septos teciduais bem como na traqueia do grupo exposto ao fumo sem tratamento comparado ao controle e tratados, corroborando com outros estudos que mostraram o aumento dessas células e o desenvolvimento da disfunção das vias aéreas em grupos expostos ao fumo

(NUSSBAUMER-OCHSNER *et al.*, 2015). Os estudos histopatológicos também evidenciaram numerosos mastócitos no pulmão e traqueia, intactos e desgranulados, e também azul de alcian positivos e, principalmente safranina positivos, nos grupos expostos ao fumo sem tratamento, mas com redução acentuada dessas células pela administração do Ac2-26. Outras investigações indicam que o tabagismo aumenta a liberação de histamina pelos mastócitos alveolares com sua subsequente desgranulação o que contribui para a destruição das paredes alveolares, recrutamento de neutrófilos e liberação de citocinas e quimiocinas (KALENDERIAN *et al.*, 1988; MORTAZ, FOLKERTS E REDEGELD, 2011).

Na continuidade do trabalho, observamos a maior expressão da AnxA1 no grupo exposto ao fumo sem tratamento no pulmão e na traqueia, comparado aos demais grupos, indicando a participação da proteína endógena no controle da inflamação e na preservação tecidual. O aumento na expressão da AnxA1 também foi observado em outras investigações, em fases aguda do processo inflamatório em diferentes modelos (OLIANI *et al.*, 2001; DAMAZO *et al.*, 2008; DAMAZO *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2012; GIROL *et al.*, 2013). Por outro lado, no grupo exposto ao fumo tratado ocorreu redução da imunomarcagem indicando o envolvimento da AnxA1 na fisiologia das células epiteliais e inflamatórias do pulmão, comprovando a ação anti-inflamatória do Ac2-26. A redução na expressão da AnxA1 endógena, possivelmente, está associada a um processo de *feed back* negativo (GIROL *et al.*, 2013).

Nas análises de expressão da COX-2 no pulmão e traqueia, também observamos maior imunorreatividade da enzima nos animais expostos ao fumo não tratados comparados aos controles e expostos ao fumo tratados. A expressão aumentada da COX-2 foi associada ao elevado grau de inflamação na DPOC e ao câncer de pulmão (MIYATA *et al.*, 2015). Outros estudos indicam que a COX-1 e COX-2 agem como mediadoras dos efeitos desfavoráveis do hábito tabagista, como a rigidez arterial (VLACHOPOULOS *et al.*, 2015). Além disso, estudos com cultura de células tumorais de pulmão relatam que a atividade anti-inflamatória do chá verde é mediada pela superexpressão da AnxA1 e redução na expressão da COX-2 e prostagladina 2 (LU *et al.*, 2012; SEIDEL *et al.*, 2012).

Ainda nas análises de imuno-histoquímica, identificamos maior imunorreação de MMP-9 no grupo exposto ao fumo sem tratamento no pulmão e na traqueia, indicando a participação dessa enzima na destruição do tecido. Outras investigações associam várias MMPs, incluindo a MMP-9, às alterações de tecidos em paciente com enfisema pulmonar (MIYATA *et al.*, 2015; OSTRIDGE *et al.*, 2016) Em outro estudo, a AnxA1 foi fortemente caracterizada como reguladora positiva da MMP-9, por meio da via de NF- κ B em casos de

câncer de mama, apresentando papel protetor contra a invasão de células cancerosas (KANG, KO E JANG, 2012).

No contexto da inflamação pulmonar, na fibrose cística, a diminuição da expressão endógena da AnxA1 foi observada no LBA de pacientes (TSAO *et al.*, 1998) e em modelos animais (DALLI *et al.*, 2014). O impacto da AnxA1, como mediador no controle das fases inflamatórias e fibróticas, foi estudado em modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina usando camundongos nocautes para a AnxA1 (DAMAZO *et al.*, 2011). A ausência da proteína provocou aumentos no grau de inflamação, nos índices de fibrose e nos níveis de fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- β 1), interferon gamma (IFN- γ) e TNF- α (JIA *et al.*, 2013). Contudo, o tratamento com o Ac2-26 melhorou os sinais de inflamação e fibrose. O efeito protetor do Ac2-26 também foi investigado em um modelo de endotoxemia pulmonar pela administração local ou sistêmica de LPS (DA CUNHA, OLIANI E DAMAZO, 2012). O pré-tratamento com o peptídeo foi capaz de regular a inflamação endotoxêmica, por meio da diminuição do extravasamento de leucócitos para o tecido conjuntivo e a cavidade alveolar, redução da liberação das citocinas pró-inflamatórias no plasma sanguíneo e aumento do mediador anti-inflamatório no LBA e plasma sanguíneo, corroborando com os dados do nosso trabalho.

Outro evento bem reconhecido envolvido na indução da injúria pulmonar aguda é a isquemia e reperfusão (I/R) intestinal, condição caracterizada por intenso recrutamento de neutrófilos e permeabilidade microvascular aumentada, sendo responsável pela síndrome da angústia respiratória do adulto (GROPPER E WIENER-KRONISH, 2008; VICTONI *et al.*, 2010). A administração do peptídeo mimético da AnxA1 em modelo de IR intestinal foi benéfica, com atenuação da migração dos leucócitos para o pulmão e indução da liberação da IL-10 para o sangue (DAMAZO *et al.*, 2013).

Finalmente, sabendo da importância das citocinas nos processos inflamatórios, procedemos às análises das citocinas pró-inflamatória IL1 β , IL-6 e TNF- α , da quimiocina MCP-1 e da citocina anti-inflamatória IL-10. Nossos resultados mostraram níveis elevados de IL-1 β , IL-6 e TNF- α nas ratas expostas ao fumo sem tratamento, no sobrenadante do pulmão, plasma sanguíneo e LBA, e corroboram com outros estudos que indicam a presença elevada dessas citocinas em expostos ao fumo, pacientes asmáticos e/ou com DPOC (KLENIEWSKA *et al.*, 2016). Assim, a redução desses mediadores químicos no grupo exposto ao fumo tratado com o peptídeo mimético, novamente indica o papel protetor do Ac2-26. De modo semelhante, os dados obtidos das dosagens de MCP-1 indicaram aumento da quimiocina no pulmão dos animais expostos ao fumo não tratados e redução nos expostos ao fumo tratados e

estão de acordo com a quantificação de macrófagos pulmonares nesta investigação e com outros estudos que mostraram que o hábito tabagista prolongado, promove o aumento de MCP-1 e contribui para os perfis inflamatórios (KASTELEI *et al.*, 2015).

Nas dosagens da citocina anti-inflamatória IL-10, identificamos diminuição dessa citocina no grupo exposto ao fumo sem tratamento no pulmão e plasma sanguíneo, comparado aos grupos controle e exposto ao fumo tratado. A baixa dosagem de IL-10 em expostos ao fumo, com ou sem DPOC, comparados aos não expostos ao fumo, indicam que esta citocina é afetada pela exposição a fumaça do cigarro (ZHANG *et al.*, 2013).

Em conjunto, nossas análises mostraram que a administração do Ac2-26 no modelo de DPOC estudado atuou sistemicamente pela melhora das características fisiológicas e bioquímicas, atenuação do processo inflamatório com a preservação tecidual das vias respiratórias, redução do influxo de células inflamatórias e das expressões de AnxA1, COX-2 e MMP-9 nos pulmões e traqueia dos animais tratados. Além disso, a administração do Ac2-26 reduziu a produção de mediadores pró-inflamatórios e estimulou a liberação de IL-10. Esses dados apontam o envolvimento da AnxA1 nas vias respiratórias em condições normais e durante o estímulo inflamatório e indicam o potencial terapêutico preventivo dessa proteína, em especial, na proteção contra a DPOC.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, nas condições propostas, permitem concluir que a administração do Ac2-26:

- Mantém as características fisiológicas e radiográficas semelhantes aos controles.
- Preserva os níveis de hemoglobina no sangue e de glicose, colesterol, gama GT e TGO no plasma sanguíneo próximos aos do grupo controle.
- Atenua o processo inflamatório pela redução de linfócitos e monócitos no LBA, e dos macrófagos e mastócitos nos pulmões e traqueia, com preservação tecidual das vias respiratórias.
- Reduz a expressão endógena de AnxA1, COX-2 e MMP-9 no pulmão e na traqueia.
- Diminui a liberação de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-6, TNF- α e MCP-1 e estimula a produção de IL-10 no plasma, LBA e sobrenadante do macerado pulmonar.

Associados, nossos dados mostram que a administração do peptídeo mimético da AnxA1 promove efeitos anti-inflamatórios preventivos contra o desenvolvimento da DPOC no modelo proposto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTI A, EDWARDS LD, RENNARD SI, MACNEE W, TAL-SINGER R, MILLER BE, et al. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *PLoS One* 2012;7. e37483.

AMARAL AF, STRACHAN DP, BURNEY PG, JARVIS DL. Female Smokers are at Greater Risk of Airflow Obstruction than Male Smokers: UK Biobank. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Jan 11. doi: 10.1164/rccm.201608-1545OC.

AMBROSE MP, HUNNINGHAKE GW. Corticosteroids increase lipocortin I in BAL fluid from normal individuals and patients with lung disease. *J Appl Physiol* (1985). 1990 Apr;68(4):1668-71.

AMBROSE MP, BAHNS CL, HUNNINGHAKE GW. Lipocortin I production by human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992 Jan;6(1):17-21.

ARYAL, S.; DIAZ-GUZMAN, E.; MANNINO, D. M. Influence of sex on chronic obstructive pulmonary disease risk and treatment outcomes. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 9, p. 1145-1154, 2014. ISSN 1178-2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25342899>>.

BARNES PJ, SHAPIRO SD, PAUWELS RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003;22:672e88.

BON JM, LEADER JK, WEISSFELD JL, COXSON HO, ZHENG B, BRANCH RA, *et al*. The influence of radiographic phenotype and smoking status on peripheral blood biomarker patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2009;4. e6865.

BOZINOVSKI S., ANTHONY D., VLAHOS R., Targeting pro-resolution pathways to combat chronic inflammation in COPD *J Thorac Dis* 2014;6(11):1548-1556

CARAMORI, G. et al. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 9, p. 397-412, 2014. ISSN 1178-2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24812504>>.

COMPTON C, *et al* The Novartis view on emerging drugs and novel targets for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 26 (2013) 562e57.

CORMINBOEUF O, LEROY X. FPR2/ALXR. Agonists and the resolution of inflammation. *J Med Chem*. 2015 Jan 22;58(2):537-59

CROTTY ALEXANDER LE, SHIN S, HWANG JH. Inflammatory Diseases of the Lung Induced by Conventional Cigarette Smoke: A Review. *Chest*. 2015 Nov;148(5):1307-22. doi: 10.1378/chest.15-0409.

D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. **Br J Pharmacol**, v. 155, n. 2, p. 152-69, Sep 2008. ISSN 0007-1188. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18641677>.

D'ACUNTO, C. W. et al. The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation. **Cell Signal**, v. 26, n. 1, p. 173-8, Jan 2014. ISSN 1873-3913. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24103589>>.

DA CUNHA, E. E.; OLIANI, S. M.; DAMAZO, A. S. Effect of annexin-A1 peptide treatment during lung inflammation induced by lipopolysaccharide. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 25, n. 4, p. 303-11, Aug 2012. ISSN 1522-9629. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546484>>.

DALLI J, ROSIGNOLI G, HAYHOE RP, EDELMAN A, PERRETTI M: CFTR inhibition provokes an inflammatory response associated with an imbalance of the annexin A1 pathway. *Am J Pathol* 2010, 177:176-86.

DAMAZO, A. S. et al. Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. **BMC Immunol**, v. 12, p. 59, 2011. ISSN 1471-2172. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22011168>>.

DAMAZO AS, PAUL-CLARK MJ, STRAUS AH, TAKARASHI HK, PERRETTI M, OLIANI SM: Analysis of the annexin 1 expression in rat trachea: study of the mast cell heterogeneity. *Annexins* 2004, 1:12-18.

DIJKSTRA A. E., POSTMA D.S. , HACKEN N.T. , VONK J.M., OUDKERK M. , OOIJEN P.M.V, ZANEN P. , HOESEIN F.A.M. , GINNEKEN B.V. , SCHMIDT M., GROEN H.J.M.: Low-dose CT measurements of airway dimensions and emphysema associated with airflow limitation in heavy smokers: a cross sectional study. *Respiratory Research* 2013, 14:11.

FUJIMOTO H., TSUJI H., OKUBO C., FUKUDA I., NISHINO T., LEE K.M., RENNE R. , YOSHIMURA H. Biological responses in rats exposed to mainstream smoke from a heated cigarette compared to a conventional reference cigarette. *Inhalation Toxicology*. 2015 Mar;27(4):224-36. doi: 10.3109/08958378.2015.1027799. Epub 2015 May 13.

GAN WQ, MAN SF, SENTHILSELVAN A, SIN DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004;59:574e80.

GAVINS, F. et al. Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. **FASEB J**, v. 21, n. 8, p. 1751-8, Jun 2007. ISSN 1530-6860. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17317721>.

GENG, W. Y. et al. Effects of electroacupuncture at Zusanli (ST36) on inflammatory cytokines in a rat model of smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. **J Integr Med**, v. 11, n. 3, p. 213-9, May 2013. ISSN 2095-4964. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23743164>>.

GERKE V., MOSS S.E. Annexins: From Structure to Function. *Physiol Ver*. 2001. 82: 331–371; 10.1152/physrev.00030.

GIROL, A. P. et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. **J Immunol**, v. 190, n. 11, p. 5689-701, Jun 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23645879> >.

GLASSBERG M.K., CATANUTO P., SHAHZEIDI, S., ALINIAZEE M., LILO S., RUBIO G.A., ELLIOT S.J. Estrogen Deficiency Promotes Cigarette Smoke-Induced Changes in the Extracellular Matrix in the Lungs of Aging Female Mice. *Tranlation Research*, 2016. doi: 10.1016/j.trsl.2016.07.015.

GROPPER MA, WIENER-KRONISH J: The epithelium in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2008, 14(1):11–15

HALLGREN J. and GURISH M.F. Granule maturation in mast cells: Histamine in control. *Eur. J. Immunol.* 2014. 44: 33–36

HAN MK, POSTMA D, MANNINO DM, et al. Gender and chronic obstructive pulmonary disease: why it matters. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(12):1179-84.

HANSEL T.T., BARNES P.J. New drugs for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2009; 374: 744–55

HANNON R, CROXTALL JD, GETTING SJ, ROVIEZZO F, YONA S, PAUL-CLARK MJ, GAVINS FN, PERRETTI M, MORRIS JF, BUCKINGHAM JC, FLOWER RJ: Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. *FASEB J* 2003, 17:253-255.

HÉLIOT A, LANDKOCZ Y, ROY SAINT-GEORGES F, GOSSET P, BILLET S, SHIRALI P, COURCOT D, MARTIN PJ. Smoker extracellular vesicles influence status of human bronchial epithelial cells. *Int J Hyg Environ Health.* 2016 Dec 30. pii: S1438-4639(16)30277-2. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.12.010.

HOESEIN F.A.A.M., JONG P.A., LAMMERS J.W.J, MALI W.P.T., SCHMIDT M., KONING H.J., AALST C.V.D, OUDKERK M., Vliegenthart R., GROEN H.J.M, GINNEKEN B.V., RIKXOORT E.M.V. ZANEN P. Airway wall thickness associated with forced expiratory volume in 1 second decline and development of airflow limitation. *ERJ Express*. Published on January 22, 2015 as doi: 10.1183/09031936.00020714

HUNNINGHAKE DB. Cardiovascular disease in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005; 2:44–49

JIA Y, MORAND EF, SONG W, CHENG Q, STEWART A, YANG YH. Regulation of lung fibroblast activation by annexin A1. *J Cell Physiol.* 2013 Feb;228(2):476-84. doi: 10.1002/jcp.24156.

KALENDERIAN R, RAJU L, ROTH W, SCHWARTZ LB, GRUBER B, JANOFF A. Elevated histamine and tryptase levels in smokers' bronchoalveolar lavage fluid. Do lung mast cells contribute to smokers' emphysema? *Chest.* 1988 Jul;94(1):119-23.

KAMAL, A.; FLOWER, R.; PERRETTI, M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100 Suppl 1, p. 39-47, Mar 2005. ISSN 0074-0276. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15962097 >.

KANG H, KO J, JANG SW. The role of annexin A1 in expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jun 22;423(1):188-94. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.114. Epub 2012 May 26.

KAUKINEN A, FITZGIBBON A, OIKARINEN A, HINKKANEN L, VIINIKANOJA M, HARVIMA IT. Increased numbers of tryptase-positive mast cells in the healthy and sun-protected skin of tobacco smokers. *Dermatology*. 2014;229(4):353-8. doi: 10.1159/000365189. Epub 2014 Nov 1.

KLENIEWSKA A, WALUSIAK-SKORUPA J, PIOTROWSKI W, NOWAKOWSKA-ŚWIRTA E, WISZNIEWSKA M. Comparison of biomarkers in serum and induced sputum of patients with occupational asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Occup Health*. 2016 Jul 22;58(4):333-9. doi: 10.1539/joh.15-0317-BR. Epub 2016 Jun 6.

KOZMA R. D. L. H., ALVES E. M, OLIVEIRA V. A. B., LOPES F. D. T. Q. S, GUARDIA E. C., BUZO H. V., FARIA C. A., YAMASHITA C., CAVAZZANA M., FREI F., PAES M. J. O. R., PAES J. T. R. Um novo modelo experimental murino de enfisema: enfisema induzido pela fumaça do cigarro em ratos Wistar* *J Bras Pneumol*. 2014;40(1):46-54

LIM, L.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **FASEB J**, v. 21, n. 4, p. 968-75, Apr 2007. ISSN 1530-6860. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17215481 >.

LU Q., *et al*. Green Tea Inhibits Cyclooxygenase-2 in Non-Small Cell Lung Cancer Cells through the Induction of Annexin-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 November 2; 427(4): 725–730.

LÜDICKE F., MAGNETTE J., BAKER G., WEITKUNAT R. A Japanese cross-sectional multicentre study of biomarkers associated with cardiovascular disease in smokers and non-smokers. 2015; *Biomarkers*, 20(6–7): 411–421.

MAIA LF, CASTRO QJT, RESENDE FMF, RODRIGUES-DAS-DORES RG: Plantas medicinais e hipertensão. **Farmácia Revista**. 2011, http://www.ufop.br/downloads/farmacia_revista24_artigo_tecnico.pdf.

MARCOS L., BICHINHO G.L., PANIZZI E.A., STORINO K.K.G., PINTO D.C: Classificação da doença pulmonar obstrutiva crônica pela radiografia do tórax. **Radiol Bras**. 2013 Nov/Dez;46(6):327–332.

MARKOULAKI D, KOSTIKAS K, PAPTAEODOROU G, KOUTSOKERA A, ALCHANATIS M, BAKAKOS P, GOURGOULIANIS KI, ROUSSOS C, KOULOURIS NG, LOUKIDES S. Hemoglobin, erythropoietin and systemic inflammation in exacerbations

of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Intern Med.* 2011 Feb;22(1):103-7. doi: 10.1016/j.ejim.2010.07.010. Epub 2010 Aug 14.

MARTINEZ F, CURTIS J, SCIURBA F, MUMFORD J, GIARDINO N, WEINMANN G, KAZEROONI E, MURRAY S, CRINER G, SIN D, et al.; NETT Research Group. Sex differences in severe pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:243–252.

MIRRAKHIMOV A.E. Chronic obstructive pulmonary disease and glucose metabolism: a bitter sweet symphony. *Cardiovasc Diabetol.* 2012 Oct 27;11:132. doi: 10.1186/1475-2840-11-132.

MIYATA Y, MITSUNARI K, AKIHIRO A, WATANABE SI, MOCHIZUKI Y, SAKAI H. Smoking-induced changes in cancer-related factors in patients with upper tract urothelial cancer. *Mol Clin Oncol.* 2015 Mar;3(2):287-294. Epub 2014 Dec 2.

MONTAÑO M, PÉREZ-RAMOS J, ESQUIVEL A, RIVERA-ROSALES R, GONZÁLEZ-AVILA G, BECERRIL C, CHECA M, RAMOS C. Obesity decreases the oxidant stress induced by tobacco smoke in a rat model. *Toxicol Mech Methods.* 2016 Jul 28;1-10

NUSSBAUMER-OCHSNER Y, STOLK J, FERRAZ DA SILVA LF, VAN SCHADEWIJK A, DE JEU RC, PRINS FA, MAUAD T, RABE KF, HIEMSTRA PS. Association of Lung Inflammatory Cells with Small Airways Function and Exhaled Breath Markers in Smokers - Is There a Specific Role for Mast Cells?. *PLoS One.* 2015 Jun 12;10(6):e0129426. doi: 10.1371/journal.pone.0129426. eCollection 2015.

NOBORISAKA Y, ISHIZAKI M, YAMAZAKI M, HONDA R, YAMADA Y. Elevated Blood Pressure and Serum γ -Glutamyltransferase as Significant Characteristics of Smokers With Chronic Kidney Disease. *Nephrourol Mon.* 2014 Jul 5;6(4):e20746. doi: 10.5812/numonthly.20746. eCollection 2014.

OLIANI, S. et al. Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **Am J Pathol**, v. 158, n. 2, p. 603-15, Feb 2001. ISSN 0002-9440. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11159197 >.

OLIANI, S. M. et al. Fluctuation of annexin-A1 positive mast cells in chronic granulomatous inflammation. **Inflamm Res**, v. 57, n. 10, p. 450-6, Oct 2008. ISSN 1023-3830. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18827967> >.

OSTRIDGE K. , WILLIAMS N., KIM V., HARDEN S. , BOURNE S., COOMBS N.A. , ELKINGTON P.T., ESTEPAR R.S.J., WASHKO G. , STAPLES K.J., WILKINSON T.M.A. Distinct emphysema subtypes defined by quantitative CT analysis are associated with specific pulmonary matrix metalloproteinases. *Respiratory Research* (2016) 17:92 DOI 10.1186/s12931-016-0402-z

Pan American Health Organization and World Health Organization: concerns regarding tobacco use. **Int Q Community Health Educ**, v. 33, n. 2, p. 225-7, 2012-2013 2012. ISSN 0272-684X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23666165> >.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 1, p. 62-70, Jan 2009. ISSN 1474-1741. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19104500 >.

PERRETTI, M.; FLOWER, R. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. **J Leukoc Biol**, v. 76, n. 1, p. 25-9, Jul 2004. ISSN 0741-5400. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14966195 >.

RICHMOND I., PRITCHARD G.E., ASHCROFT T., AVERY A., CORRIS P.A., WALTERS E.H. Bronchus associated lymphoid tissue (BALT) in human lung: its distribution in smokers and non-smokers. *Thorax*, 1993;48:1 130-1134.

SALA E, BALAGUER C, VILLENA C, RÍOS A, NOGUERA A, NÚÑEZ B, AGUSTÍ A. Low erythropoietin plasma levels during exacerbations of COPD. *Respiration*. 2010;80(3):190-7. doi: 10.1159/000264604. Epub 2009 Dec 2.

SARIR H, HENRICKS PA, VAN HOUWELINGEN AH, NIJKAMP FP, FOLKERTS G. Cells, mediators and Toll-like receptors in COPD. *Eur J Pharmacol*. 2008; 585(2-3): 346-353.

SEIDEL S, NEYMEYER H, KAHL T, RÖSCHEL T, MUTIG K, FLOWER R, SCHNERMANN J, BACHMANN S, PALIEGE A. Annexin A1 modulates macula densa function by inhibiting cyclooxygenase 2. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Sep 15;303(6):F845-54. doi: 10.1152/ajprenal.00704.2011. Epub 2012 Jul 11.

SINGH V., TANWAR A.S., HUNGUND A.S., HUNGUND S.A., NAGARAJA C. Comparison of serum erythropoietin levels in smokers and nonsmokers with periodontitis: A biochemical study. *Journal of Indian Society of Periodontology* - Vol 20, Issue 3, May-Jun 2016

SOLITO, E. et al. Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. **FASEB J**, v. 20, n. 9, p. 1498-500, Jul 2006. ISSN 1530-6860. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16720734 >.

SNOECK-STROBAND JB, POSTMA DS, LAPPERRE TS, GOSMAN MM, THIADENS HA, KAUFFMAN HF, et al. Airway inflammation contributes to health status in COPD: a cross-sectional study. *Respir Res* 2006;7:140.

SUGIMOTO M.A, VAGO J.P, TEIXEIRA M.M, SOUSA L.P. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and

Clearance. Hindawi Publishing Corporation Journal of Immunology Research Volume 2016, Article ID 8239258, 13 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8239258>

VLACHOPOULOS C, AZNAOURIDIS K, BRATSAS A, IOAKEIMIDIS N, DIMA I, XAPLANTERIS P, STEFANADIS C, TOUSOULIS D. Arterial stiffening and systemic endothelial activation induced by smoking: The role of COX-1 and COX-2. *Int J Cardiol.* 2015;189:293-8. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.04.029. Epub 2015 Apr 6.

VENEGAS JG, WINKLER T, MUSCH G, VIDAL MELO MF, LAYFIELD D, TGAVALEKOS N, FISCHMAN AJ, CALLAHAN RJ, BELLANI G, HARRIS RS: Self-organized patchiness in asthma as a prelude to catastrophic shifts. *Nature* 2005, 434:777–782.

WRIGHT, J. L.; COSIO, M.; CHURG, A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 295, n. 1, p. L1-15, Jul 2008. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18456796> >.

XIROFOTOS D., TRAKAKIS E., PEPPA M., CHRELIAS C, PANAGOPOULOS P., CHRISTODOULAKI C., SIOUTIS D., KASSANOS D. The amount and duration of smoking is associated with aggravation of hormone and biochemical profile in women with PCOS. *Gynecological Endocrinology.* 2015 Taylor & Francis. DOI: 10.3109/09513590.2015.1101440

YAN H., *et al.* Inflammation and pathological damage to the lungs of mice are only partially reversed following smoking cessation on subacute exposure to cigarette smoke. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS* 11: 4246-4254, 2015.

ZHANG L, CHENG Z, LIU W, WU K. Expression of interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in serum and sputum of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *COPD.* 2013 Aug;10(4):459-65. doi: 10.3109/15412555.2013.770456. Epub 2013 Mar 28.

ZHENG, H. *et al.* Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke. *Toxicol Lett*, v. 189, n. 3, p. 225-34, Sep 2009. ISSN 1879-3169. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19524650> >.

ZHOU, S. *et al.* Aging does not enhance experimental cigarette smoke-induced COPD in the mouse. *PLoS One*, v. 8, n. 8, p. e71410, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23936505> >.

ANEXO A – Cópia do certificado de aprovação no CEUA (nº01/15)

Faculdades Integradas “Padre Albino”
Comissão de Ética para o Uso de Animais
Rua dos Estudantes, 225 – Catanduva – SP – CEP: 15.809-144
Fone: (17) 3311-3229 – 3311-3340 – e-mail: ceua@fipa.com.br

**C E R T I F I C A D O****Nº 01/15**

Certificamos que o Trabalho (**Protocolo nº 15.11.03-01**), intitulado: **“Avaliação da proteína Anexina A1 em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica induzida por exposição à fumaça do cigarro”**, de autoria da **Profa. Dra. Ana Paula Girol**, foi **APROVADO** sob o **Registro nº 01/15**, em 29/05/2015, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) das Faculdades Integradas Padre Albino - FIPA – Catanduva – SP.

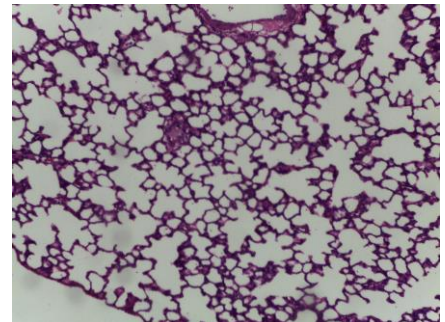
Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA, os relatórios parciais e/ou final do desenvolvimento do Projeto de Pesquisa.

Catanduva (SP), 29 de maio de 2015.

Profa. Dra. Ana Paula Girol
Coordenadora da CEUA-FIPA

CEUA - FIPA

APÊNCICE A – “Role of Annexin A1 in COPD to exposure to cigarette smoke”



Article Type: Regular Article

ROLE OF ANNEXIN A1 IN COPD TO EXPOSURE TO CIGARETTE SMOKE

POSSEBON L., COSTA S.S., SOUZA H.R., AZEVEDO L.R., SANT'ANA M., IYOMASA-PILON M.M., OLIANI S.M., GIROL A.P.

1 – Integrated College Padre Albino Foundation (FIPA), Catanduva, SP, Brazil

2 – São Paulo State University, (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil (Department of Biology, Laboratory of Immunomorphology)

ROLE OF ANNEXIN A1 IN COPD TO EXPOSURE TO CIGARETTE SMOKE

Correspondence:

Ana Paula Girol

Department of Physical and Biological Sciences, Integrated College Padre Albino Foundation (FIPA), Rua dos Estudantes, 225, Catanduva, SP, Brazil, 15.809-144

Tel.: +55-17-3311-3340/3361

e-mail: anapaulagirol@hotmail.com

Number of pages: 36

Number of figures: 6

Number of references: 47

Number of abstract words: 250

Number of introduction words: 513

Number of discussion words: 1,500

LIST OF ABBREVIATIONS

°C	Celcius degrees
μL	Microliter
μm	Micrometer
Ac2-26	Mimetic peptide Ac2-26 of annexin protein
ALBDIR	Levels of right diaphragmatic lowering
ALBESQ	Levels of left diaphragmatic kneeling
ANOVA	Analysis of variance
AnxA A1	Annexin A1 Protein
BAL	Bronchoalveolar lavage
BALT	Bronchus Associated Lymphoid Tissue
C	Control
Cm	centimeter
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
COX-1	Cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
CPLA2	Cytosolic phospholipase A2
CS	Cigarette smoke
CS+Ac2-26	Cigarette smoke with mimetic peptide Ac2-26
DAB	Diaminobenzine
ED-1	Antibody macrophage marker
EPO	Serum erythropoietin
FIPA	Integrated Colleges Father Albino
FPR2	Formyl peptide receptor (Formyl peptide receptors 2)
G	gram
GAMA GT	Gama Glutamyl Transferase
HE	Hematoxylin-Eosin
IL-1β	Interleukin-1beta
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10

IFN- γ	Interferon-gamma
I.P.	Intraperitoneal
L	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein (Low Density Lipoprotein)
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
Mg	Milligram
ML	Mililiter
MMP-9	Matrix metalloproteinase -9
Nm	nanometer
P or p	value of p (significance of the statistical test)
PBS	Phosphate buffered solution
Pg	Picogram
RPM	Rotation per minute
S.E.M	Standard error of mean = Standard error of mean
TGO	Transaminase Oxalacetic Glutamic
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
U / L	Ultra / liter
UDPE	Didactic unit and experimental research
Vs	Versus

Section options

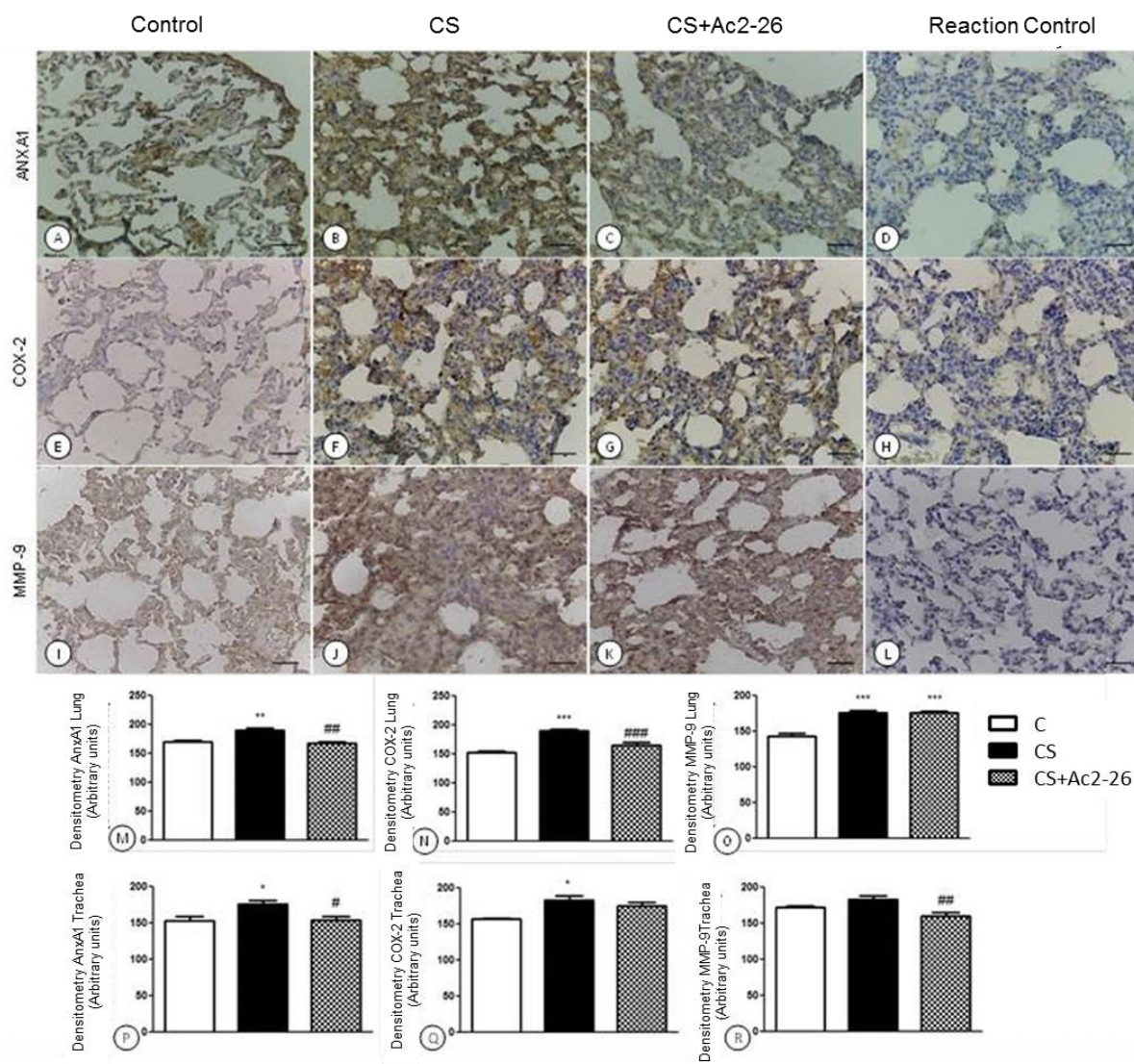
Inflammation, Immuno-histochemistry

Cellular and Molecular

ABSTRACT

The objective of this research was to analyze the effects of the Annexin A1 (AnxA1) protein mimetic peptide Ac2-26, in a smoking model. Group CS was exposed to the smoke of 10 cigarettes, 2x/day for 5 weeks. The efficacy of Ac2-26 was evaluated in CS+Ac2-26 animals. Group C was not exposed to cigarette nor treated. The weigh, blood pressure, plethysmography and ray-X images were analyzed. After euthanasia the bronchoalveolar lavage (BAL), blood, lungs and trachea were collected for leukocytes quantification, cytokines and biochemical measurements, histopathological and immunohistochemical studies. The physiological analyzes showed weight loss, increased blood pressure, reductions in the pulmonary frequency and ventilation, as well as macroscopic alterations in the lung dimensions in CS group. The histopathological studies showed enlargement of the intra-alveolar spaces and lymphoid tissue in the lung, and also loss of the tracheal cilia in the CS group. Numerous lymphocytes and macrophages were observed in the BAL in CS, with significant reduction in CS+Ac2-26 animals. Tissue macrophages and mast cells were also increased in the CS group. The immunohistochemical analyzes of the lung and trachea showed lower expression of AnxA1, COX-2 and MMP-9 in C and CS+Ac2-26 animals. High cytokines levels were observed in the macerated lung supernatant, blood plasma and BAL of the CS group compared to C and CS+Ac2-26. The biochemical assays showed that treatment increased hemoglobin and glucose levels and reduced total cholesterol and glutamic oxaloacetic transaminase measurements. Our results highlighted a protective effect of the Ac2-26 mimetic peptide in the COPD.

VISUAL ABSTRACT



INTRODUCTION

Smoking is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), a serious health condition characterized by progressive limitation of airflow (Compton, et al., 2013; Camaron et al., 2014). Patients with COPD also exhibit systemic symptoms and comorbidities, including muscle weakness, weight loss, cardiovascular disease, osteoporosis, hypertension, depression and cognitive decline (GAN et al., 2004), and the disease is estimated to be the third cause of Death in 2020 (TERAMOTO, 2007; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION: CONCERNS REGARDING TOBACCO USE, 2012; CARAMORI et al., 2014). The COPD has a high incidence in men worldwide although the number of women with the disease has considerably increased at an alarming rate. In addition, women may respond differently to the type and site of lung damage due to tobacco exposure and may also present increased respiratory distress (HAN et al., 2007, MARTINEZ et al., 2007, AMARAL et al., 2017).

COPD is presented according to the progressive intensity of the smoking habit (HELIOT et al., 2016). However, in animal models, it has been reported that the reduction in the time of exposure to tobacco associated with increasing of the number of cigarettes per day produces similar results to those found by long-term exposure (FUJIMOTO et al., 2015).

The inflammatory process induced by the inhalation of noxious particles and gases is responsible for COPD because it causes pathological changes including mucosal hypersecretion, structural changes in the airways and loss of alveoli (Compton et al., 2013; Caramori et al., 2014). In the development of the disease, macrophages and respiratory tract epithelial cells activated by inhaled irritants release chemical mediators (BARNES, SHAPIRO and PAUWELS, 2003; CARAMORI et al., 2014), which attract different inflammatory cells into the airways.

Different investigations confirm that COPD is closely linked to inflammation, both locally and systemically, with the number of inflammatory cells in bronchial biopsies and induced sputum correlated with disease severity and declines in lung function and health status. Also, inflammatory mediators increase in disease exacerbation (SNOECK-STROBAND et al., 2006; COMPTON et al, 2013).

The central role played by inflammation in COPD indicates that the development of novel anti-inflammatory therapies is critical, in particular to slow disease progression and ameliorate the control of exacerbations (COMPTON et al., 2013, ARYAL, DIAZ-GUZMAN,

AND MANNINO , 2014). Among the anti-inflammatory mediators, the endogenous protein Annexin A1 (AnxA1), the first characterized member of the annexin superfamily (LIM E PERVAIZ, 2007; PERRETTI AND D'ACQUISTO, 2009, BOZINOVSKI; ANTHONY; VLAHOS, 2014) may represent an alternative therapy for the treatment of COPD and other diseases caused by smoking.

After the discovery that the biological activity of AnxA1 could be reproduced by the first amino acids of the N-terminal portion of the protein (peptide Ac2-26), it has become common practice to use these molecules in experimental models of inflammation (SOLITO et al., 2003 Gavins et al., 2007, Girol et al., 2013).

AnxA1 protein is strongly expressed in alveolar macrophages and in human and animal airway epithelial cells, and the actions of the protein have also been investigated in different clinical conditions of the lung (AMBROSE and HUNNINGHAKE, 1990; AMBROSE, BAHNS and HUNNINGHAKE, 1992; DAMAZO et al., 2004; DAMAZO et al, 2013).

In this investigation, we performed the administration of the mimetic peptide of AnxA1 in an experimental cigarette smoke model, as a possible therapeutic alternative in the management of the illnesses caused by the habit of smoking.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS

Female Wistar rats (n = 30), 6 weeks old, were obtained from the Didactic and Experimental Research Unit (UDPE) of the Padre Albino Integrated Colleges (FIPA) of Catanduva-SP. The animals were evaluated by the institution's veterinarian and then divided into 3 groups (n = 10 / group): control (C), exposed to smoke without treatment (CS) and treated (CS + Ac2-26). The rats were kept in cages in a temperature controlled environment (22 to 25 °C) with water and food ad libitum. The experimental procedures were conducted according to the standards of the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA FIPA - Certificate nº 01/15).

EXPOSURE TO CIGARETTE SMOKE AND TREATMENT WITH THE PEPTIDE MIMETIC AC2-26 PROTOCOLS

Two groups of animals were induced to cigarette smoke in a UDPE-FIPA smoke exposure apparatus for 5 weeks. The apparatus consists of an animal containment system and a cigarette smoke release system, with an external cigarette holder connected to a dynamic suction pump. The pump can be programmed so that cigarette suction periods alternate with periods of clean air suction to prevent asphyxiation (KOZMA et al., 2014). The exposures were standardized and the animals exposed to the burning of 10 commercial cigarettes (containing 0.8 mg of nicotine, 10 mg of tar and 10 mg of carbon monoxide), one after another, twice a day (total of 20 cigarettes / day), with the first exposure being performed in the morning (7:00 a.m.) and the second in the early evening (6:00 p.m.).

The efficacy of the AnxA1 mimetic peptide, Ac2-26, in protecting against inflammatory processes caused by exposure to tobacco smoke was evaluated in one of the smoke-exposed groups (n = 10) by intraperitoneal (ip) administration of Ac2-26 at the dosage of 1mg / kg (GIROL et al., 2013), 1x / day, before the first exposure to cigarette smoke, for 5 weeks. The control group (n = 10) was exposed only to compressed air. At the end of the experiment the animals were euthanized by excessive dose of anesthetic.

PHYSIOLOGICAL ANALYZES OF PLETHYSMOGRAPHY, BLOOD PRESSURE AND WEIGHT

In the first and last weeks of the protocol for exposure to cigarette smoke, smoke-exposed groups were evaluated for plethysmography by measuring lung ventilation, breathability, frequency and the volume inspired by the animals in a specific apparatus adapted to the use (PowerLab , AD Instruments-Gas Analyzer). The control group was also evaluated for plethysmography, after being in the exposure environment, but in the absence of cigarette smoke. In the same period, the rats were weighed and blood pressure was also measured by the tail in a non-invasive manner (PowerLab, TransLower for rats, PanLab).

X-RAY IMAGE ANALYSIS

After the exposure period the animals were anesthetized i.p. With Ketamine (0.8 ml / kg) (BioChimico, Itatiaia, Brazil) and Xylasin (0.2 ml / kg) (Ceva Santé Animale, Paulínea, Brazil), and then radiographic images were taken of the upper anterior chest region, indicating the airway by macroscopic images of 18 cm wide by 24 cm of height of the planks of the lungs in a specific device (X-ray - Astex, Vet maq) adapted for use in Wistar rats. The variables considered were the pulmonary retrosternal height of the right lung and the right and left diaphragmatic lowering levels (MARCOS et al., 2013).

QUANTITATIVE ANALYZES OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE

The BAL was obtained at the end of the experiment. The animals had the trachea cannulated and the right lung clamped. The left lung was washed 3 times with PBS and the liquid collected was centrifuged for 10 minutes at 1500 rpm. The supernatant was stored at -70 ° C for subsequent biochemical and cytokine assays and the pellet was resuspended in 500 µl PBS and 10 µl aliquots stained in Turk (1:10) for quantification of inflammatory cells in a Neubauer camera (values as number of cells x 10³ / ml).

HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYZES

Trachea and right lung were removed, fixed in 4% formaldehyde and processed for paraffin inclusion. Sections of 5 µm were used for histopathological, morphometric and immunohistochemistry analyzes in the Leica microscope (DM500).

For histopathological studies the tissue sections were stained with Hematoxylin and Eosin (HE). Morphometric studies were performed by means of pulmonary alveolar area measurements using an image analyzer (Software Leica Image Analyzes).

In the immunohistochemistry studies the expressions of the proteins AnxA1, COX-2 and MMP-9 and the identification of the macrophages were evaluated. After antigenic recovery with citrate buffer pH 6.0 and blockade of the endogenous peroxidase activity the sections were incubated with the rabbit polyclonal primary antibodies: anti-AnxA1 (1: 1000), COX-2 (1: 300), MMP-9 (1: 100) and ED-1 (1: 150) (Zymed Laboratories, Cambridge, UK) for 12 hours. They were then incubated with the biotinylated secondary antibody (Histostain Kit, Invitrogen) and immersed in conjugated streptavidin peroxidase complex. The substrate diaminobenzidine (DAB) (DAB Kit, Invitrogen) was used for development and, thereafter, the sections were stained with Hematoxylin. The proteins were quantified by densitometry (arbitrary units 0 to 255) in the image analyzer (Leica Image Analysis software) and the lung macrophages quantified in 10 images per slide under the 40x objective of the Leica microscope (DM500). The areas of each tissue were obtained using the Leica Image Analysis Software.

QUANTIFICATION OF MAST CELLS

The mast cells were stained with 0.1% toluidine blue and analyzed according to their intact or degranulated morphological characteristics. The amount of histamine in the mast cells was evaluated in the conditions of immaturity and maturity after the respective stains with Alcian blue (EasyPath, Alcian Blue pH 2.5 PAS) and 2.5% Safranin (HALLGREN and GURISH, 2014). Quantification of mast cells was performed as described for macrophages in the previous item.

BIOCHEMICAL BLOOD TESTS

The blood was collected by cardiac puncture in heparinized syringes and separated in aliquots for analysis of hemoglobin with commercial Kit. Other aliquots were centrifuged for 15 minutes at 3000 rpm and plasma frozen at -70 ° C for further biochemical evaluations and cytokine dosing. Total cholesterol, glucose, gamma GT and TGO were measured by means of commercial kits (LAB Test) in a spectrophotometer (absorbance 540nm).

DOSAGE OF CYTOKINES BY MAGPIX

The fragments of the left lungs were macerated in liquid nitrogen and 500 µl of a solution containing protease inhibitors and phosphatase (Merck, Millipore Corporation, USA) were added following the manufacturer's instructions. The material was incubated for 20 minutes at 4 ° C under constant stirring and then centrifuged at 15,000 rpm for 10 minutes at 4 ° C. The supernatants were collected and frozen at -80 ° C.

The IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α and MCP-1 mediators were quantified in blood plasma, BAL and lung macerate supernatants using the mouse cytokine MILLIPLEX MAP Kit (RECYTMAG-65K; Millipore Corporation, USA) and analyzed on LUMINEX xMAP MAGPIX equipment (Millipore Corporation, USA). The concentration of the analytes was determined by MAGPIX xPONENT software (Millipore Corporation, USA). Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) cytokine concentrations (pg / ml).

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyzes were performed by ANOVA (one-way) followed by Bonferroni post-test and P values less than 0,05 were considered statistically significant.

RESULTS

X-RAY IMAGE ANALYSIS

Macroscopic lung reductions and elevation of the inspiratory diaphragm were observed in radiographic images in the untreated smoke-exposed rats (Figure 1B), compared to the treated (Figure 1A) and exposed to the smoke groups (Figure 1C).

PHYSIOLOGICAL ANALYZES OF PLETHYSMOGRAPHY, BLOOD PRESSURE AND WEIGHT

The plethysmography analysis showed a significant reduction in lung frequency in CS animals (69.54 ± 2.379) compared to controls (87.10 ± 3.634 , $p < 0.05$) and CS + Ac2-16 (95.32 ± 4.178 ; $p < 0.001$, Figure 1H). The final ventilation capacity was also reduced in the group exposed to smoke and untreated (762.3 ± 11.53) in relation to the control (943.2 ± 34.19 , $p < 0.05$) and treated (1076 ± 71.90 , $p < 0.01$, Figure 1J) groups. There was no significant difference in inspiratory volume between groups (Figure 1I).

In relation to blood pressure, as expected, pressures at the end of the exposure to cigarette smoke protocol there was a significant increase ($p < 0.001$) in CS animals (80.15 ± 1.722) compared to control (69.00 ± 1.317) and treated with the peptide (67.22 ± 1.461 and Figure 1E). The final weighing analyzes showed a significant reduction in the CS animals (288.3 ± 5.831 ; $p < 0.01$) compared to the control group (329.4 ± 2.581 and Figures 1F and G).

QUANTITATIVE ANALYSIS OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE

In the BAL analysis, a significant increase of macrophages (22.00 ± 2.121) ($p < 0.001$) (Figure 2H) and lymphocytes (47.75 ± 11.86) ($p < 0.01$ and Figure 2I) was observed in the CS group compared to control (macrophage: $3,250 \pm 1,652$; lymphocyte: $2,250 \pm 1,109$). Though treated animals showed a significant reduction of these cells (macrophages: 10.00 ± 2.483 , $p < 0.01$, lymphocytes: 20.20 ± 3.338 , $p < 0.05$).

HISTOPATHOLOGICAL ANALYZES OF THE TRACHEA AND LUNG

Histopathological analyzes of the trachea (Figure 2D-F) showed changes in the lining epithelium caused by exposure to cigarette smoke, with loss of protection cilia (Figure 2E) in

CS group relative to C (Figure 2D) and CS + Ac2-26 (Figure 6F), in which the preservation of epithelial tissue was observed.

In the histopathological (Figure 2A-C) and morphometric studies of the lung (Figure 2G), alterations were observed in the intra-alveolar spaces, with increase in the groups exposed to smoke (24771 ± 2929), compared to controls (9668 ± 481.7 ; $P < 0.01$) and treated (13235 ± 1427 ; $p < 0.05$). CS animals also showed increased mucosal lymphoid tissue (BALT) (Figure 2B) and greater influx of inflammatory cells in the lung compared to the other groups (Figure 2A and C).

The results of the histopathological and morphometric analyzes indicated the preservation of the tissues in the groups treated with the peptide during the protocol of exposure to cigarette smoke.

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYZES OF THE LUNG AND TRACHEA

Expressions of the AnxA1, COX-2 and MMP-9 proteins were analyzed in the lung and trachea of all groups. The specificity of the immunolabeling was confirmed by the respective reaction controls (Figure 3D, H and L).

Untreated smoke-exposed animals showed increased expression of AnxA1 in the lung (189.4 ± 11.54 , $p < 0.01$, Figure 3B and M) and trachea (176.1 ± 15.46 , $p < 0.05$, Figure 3P) compared to the control group (lung: 169.5 ± 7.238 ; Figure 3A, trachea: 152.3 ± 14.83 , Figure 3P). In contrast, the CS + Ac2-26 group had a reduction in the expression of AnxA1 in the lung (167 ± 5.984 , $p < 0.01$, Figure 3C and M) and trachea (153.8 ± 11.92 ; $p < 0.05$; Figure 3P) with respect to the CS group.

The expression of COX-2 was also increased in the lungs (189.2 ± 7.520 , $p < 0.001$, Figure 3F and N) and trachea (182.4 ± 13.94 , $p < 0.05$, Figure 3Q), in group CS compared to control (lung: 152.3 ± 8.678 ; Figure 3E and trachea 156.6 ± 1.790 , Figure 3Q). Treatment with the peptide reduced the expression of this enzyme in lung tissue (164.8 ± 11.99 ; $p < 0.001$; Figure 3G and N) in relation to the untreated group.

Immunoreactivity analyzes for MMP-9 showed a significant increase ($p < 0.001$) in lung enzyme expression in untreated (175.6 ± 10.16 ; Figure 3J and O) and treated animals (176.2 ± 2.831 , Figure 3K and O) in relation to the control animals (142.6 ± 7.506 ; Figure 3I and O). In the trachea, reductions in MMP-9 expression ($p < 0.001$) were observed after treatment with the peptide (159.9 ± 12.94 ; Figure 3R) compared to untreated animals (171.7 ± 4.777 ; Figure 3R).

QUANTITATIVE ANALYSIS OF INFLAMMATORY CELLS IN THE LUNG AND TRACHEA

MACROPHAGES

Quantification of macrophages was performed by immunohistochemistry and the specificity of this analysis was confirmed by the reaction control.

In the lung, these analyzes indicated an numerous macrophages (11.0 ± 4.74) (Figure 4A) in the CS group (135.0 ± 54.56) ($p < 0.001$) compared to control and reduction of these cells in the CS + Ac2- 26 (43.75 ± 20.75) ($p < 0.001$). Similar results were observed in the trachea, with a higher amount of macrophages in the untreated animals (67.19 ± 20.76 , $p < 0.001$, Figure 4F) in relation to the control (24.40 ± 7.917) and animals treated with the peptide (26.50 ± 8.023 , $p < 0.001$).

MAST CELLS

In the lung, exposure to smoke promoted a significant increase in total (17.00 ± 7.321 , $p < 0.05$) and intact (23.75 ± 1.531 ; $p < 0.001$) mast cells in the untreated group compared to the control group (totals: $17,00 \pm 7,321$; intact: $5,833 \pm 4,233$) but a significant reduction of total ($12,75 \pm 5,108$; $p < 0,01$), intact ($5,313 \pm 1,875$; $p < 0,001$) and degranulated ($6,000 \pm 3,687$; $p < 0,01$) mast cells in the treated group compared to CS (degranulated: 26.38 ± 10.18) (Figure 4B). Similar data were found in the observations performed on the trachea (Figure 4G), with a significant increase in total (17.16 ± 8.077 ; $p < 0.05$), intact ($9,792 \pm 3,393$; $p < 0,05$) and degranulated ($9,464 \pm 3,740$, $p < 0.05$) mast cells in CS group compared to control (total: $7,800 \pm 3,304$, intact: $5,500 \pm 2,092$, degranulated: $5,208 \pm 2,426$) and treated (total: $3,344 \pm 2,150$, $p < 0,001$, intact: $1,875 \pm 0.6847$, $p < 0.001$, degranulated: 2.708 ± 1.840 , $p < 0.01$, Figure 4C and H) animals.

Mast cells were also quantified following Safranin and Alcian Blue staining in the lung and trachea of all groups (Figure 4D, E, I and J). In the lung analyzes, there was an increase in Alcian Blue ($p < 0.05$) and especially Safranin ($p < 0.01$) positive mast cells in the group exposed to untreated smoke (34.11 ± 18.72) compared to control ($6,750 \pm 3,010$), and treated (15.00 ± 8.385) animals. The mast cell quantification in the trachea also indicated an increase in these cells, especially Safranin positive ($p < 0.01$), in the untreated animals (16.46 ± 9.982) compared to controls ($2,500 \pm 1,976$) and reduction by administration of the peptide (2.083 ± 2.041).

BIOCHEMICAL BLOOD TESTS

The hemoglobin concentration in the blood showed a significant increase ($p < 0.01$) in the CS animals (16.92 ± 1.224), compared to the control groups (10.23 ± 1.229) (Figure 5A). In the biochemical analyzes of the blood plasma, the dosages of glucose in mg / dl, cholesterol in mg / dl, GT range in U / L, and UGT in U / mL were evaluated.

Reduced levels of glucose (Figure 5B) were observed in the untreated smoke-exposed animals (374.6 ± 99.27) with respect to C (461.1 ± 35.39), and a significant increase in the CS + Ac2-26 group (477.0 ± 64.11) compared to CS.

Regarding the GT measurements (Figure 9C) higher dosages ($p < 0.05$) were observed in the CS rats (15.97 ± 5.559) in relation to controls (7.644 ± 2.049) and a significant reduction ($p < 0, 01$) with the treatment ($4,860 \pm 3,519$).

Decreased cholesterol levels (Figure 9D) and TGO ($p < 0.05$) (Figure 9E) were also observed in CS + Ac2-26 animals (TGO: 111.2 ± 8.565 , cholesterol: 65.02 ± 18.33) compared to the untreated group (TGO: 127.8 ± 9.230 , cholesterol: 91.91 ± 26.70).

ANALYSIS OF CYTOKINES BY MAGPIX

In the supernatant of the CS animals, higher levels of the proinflammatory cytokines IL-1 β ($p < 0.01$), IL-6 and TNF- α ($p < 0.001$) and the chemokine MCP-1 ($p < 0.001$) were observed in relation to control animals (Figure 6A, B, D and E). Similarly, were found increases of IL-1 β , IL-6 ($p < 0.001$) and MCP-1 ($p < 0.01$) in blood plasma (Figure 10F, G and I) and IL-1 β (0.001) and MCP-1 (0.01) in BAL (Figure 6K and N).

The peptide administration promoted significant reduction in the levels of pro-inflammatory mediators in the supernatant of the lung macerate (IL-1 β and MCP-1 $p < 0.01$, IL-6 and TNF- α $p < 0.001$) (Figure 6A, B, D and E), in the blood plasma (IL-1 β and IL-6 $p < 0.001$; TNF- α $p < 0.01$) (Figure 6F, G and J) and in BAL (IL- A $p < 0.05$) (Figure 6K and O). Differently, in the untreated smoke-exposed animals, reduced levels of IL-10 anti-inflammatory cytokine were observed in BAL ($p < 0.01$), compared to control. While in the treated animals, increased IL-10 levels were found in lung supernatant and BAL ($p < 0.001$) with reduction in untreated group (Figure 6C, H and M).

DISCUSSION

Smoking is strongly associated, among other conditions, with the development of chronic COPD, a serious health condition, induced by an inflammatory process and

characterized by progressive limitation of airflow (CAMARONI *et al.*, 2014). Among the anti-inflammatory mediators, particularly the AnxA1 protein may represent a therapeutic alternative in the management of diseases caused by smoking. For these reasons we investigated the effects of administration of the mimetic peptide of AnxA1, Ac2-26, in a model of exposure to cigarette smoke in rats.

Initially, the physiological data were analyzed related to weight, blood pressure and pulmonary ventilation. As expected, there was weight loss, increased blood pressure and reduction of the frequency and ventilation capacity in untreated- exposed to smoke rats. In addition, our radiographic imaging data showed reductions in the pulmonary perimeter in the untreated-exposed to smoke animals compared to the control and treated-exposed to smoke groups. Studies indicate that patients with thicker lung walls, due to emphysema or COPD, present severe clinical condition and airflow limitation, with compromised lung function (HOESEIN *et al.*, 2015). Thus, our results indicate that airflow limitation occurs due to reduction of the airway diameter at low level, according to literature data (VENEGAS, *et al.*, 2005; DIJKSTRA, *et al.*, 2011).

However, in the animals treated with the peptide, the weight, blood pressure, ventilation and lung dimensions were similar to those found in control animals, evidencing the beneficial effects of the treatment against the systemic damages of smoking exposure. Moreover, our data are in agreement with studies that point to the protective role of Ac2-26 in lung diseases (DAMAZO *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2012).

Beyond hypertension, smoking may be linked to elevated hemoglobin levels (MAIA *et al.*, 2011; LÜDICKE *et al.*, 2015). For this reason, we investigated the hemoglobin concentration in the blood of the animals exposed to the smoke and, again, we verified the protective effect of the peptide in the treated group, which maintained the hemoglobin level similar to the control group, and, differently, elevated in the exposed to smoke and untreated animals. The high concentration of hemoglobin in the untreated-exposed to smoke group is associated with serum erythropoietin (EPO), a glycoprotein that stimulates red cell production. However, in cases of exacerbation of COPD, EPO may be reduced (SALA *et al.*, 2010, SINGH *et al.*, 2016).

In the other biochemical analyzes, we observed high cholesterol level in the group exposed to smoke without treatment compared to control and significant reduction after treatment. Other researches also indicate the increase in total and LDL cholesterol in smokers compared to nonsmokers (XIROFOTOS *et al.*, 2015). In the dosages of TGO and GT, we also observed increased levels in the untreated- exposed to smoke group, corroborating with

literature data that indicate smoking to great potential in the development of renal diseases and toxicity (NOBORISAKA et al, 2014). On the other hand, the reduction in the levels of these enzymes observed by the administration of the AnxA1 peptide points again the protective effect of the treatment.

The anti-inflammatory role of Ac2-26 was also observed by analyzes of inflammatory cells in BAL, which showed a higher amount of leukocytes, especially lymphocytes and monocytes, in the untreated smoke exposed animals and reduction after treatment. The increase in leukocytes after exposure to cigarette smoke, especially in the untreated group, is in accordance with investigations that correlate the high number of inflammatory cells in bronchial biopsies and expectoration to the severity of the disease with a decline in lung function and health status in the COPD (COMPTON et al., 2013). The reduction of the leukocyte influx promoted by Ac2-26 was also observed in several experimental models (BOZINOVSKI, ANTHONY, VLAHOS, 2014; SUGIMOTO et al, 2016) and confirmed the anti-inflammatory potential of the peptide.

Histopathological analyzes showed increased intra-alveolar spaces and influx of inflammatory cells in the group exposed to smoke compared to controls. The lung parenchyma degeneration was more pronounced in the untreated smoke exposed animals, in which an increase of BALT was observed. The reduction of airflow and consequent difficulty in breathing may be related to the imbalance between the proteases responsible for the destruction of the pulmonary parenchyma and antiproteases that inhibit the action of the proteolytic enzymes and may cause pulmonary emphysema (RICHMOND et al., 1993, RUFINO et al. KOZMA et al., 2014). However, minor changes were observed in the rats treated with the peptide Ac2-26 that showed the preservation of the pulmonary parenchyma. According to Cunha and collaborators (2012) in the experimental model of inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS), the pre-treatment with Ac2-26 peptide mimetic inhibits the migration of leukocytes to the lung tissue.

In tissue quantifications of inflammatory cells, by immunohistochemistry numerous macrophages were identified in the intra-alveolar spaces and tissue septa as well as in the trachea of the group exposed to smoke without treatment compared to control and treated animals, corroborating with other studies that showed the increase of these cells and the development of airway dysfunction in groups exposed to smoke (NUSSBAUMER-OCHSNER et al, 2015). Our histopathological studies also revealed numerous mast cells in the lung and trachea. These cells were found intact and degranulated, as well as Alcian Blue positive and mainly Safranin positive, in the untreated-exposed to smoke group, but a marked

reduction of these cells occurred by Ac2-26 administration. Other investigations indicate that smoking increases the production of histamine by alveolar mast cells with subsequent degranulation, which contributes to destruction of the alveolar septa, recruitment of neutrophils, and release of cytokines and chemokines (KALENDERIAN, et al., 1988; OLIANI *et al.*, 2001; OLIANI *et al.*, 2008; MORTAZ, FOLKERTS, REDEGELD, 2011).

In the continuity of the study, we observed the higher expression of AnxA1 in the group exposed to smoke without treatment in the lung and trachea, compared to the other groups, indicating the participation of the endogenous protein in the control of inflammation and tissue preservation. In the treated- exposed to smoke group, a reduction in the immunostaining was observed, indicating the involvement of AnxA1 in the physiology of the epithelial and inflammatory cells of the lung and the anti-inflammatory action of Ac2-26. The reduction in the expression of the endogenous AnxA1 is possibly associated with a negative feed back process (GIROL *et al.*, 2013).

Analysis of COX-2 expression in the lung and trachea, showed increased immunoreactivity of the enzyme in the untreated smoke exposed animals compared to the treated and control animals. Increased expression of COX-2 was associated with the high degree of inflammation in COPD (MIYATA *et al* 2015). Moreover, studies with culture of lung tumor cells report that the anti-inflammatory activity of green tea is mediated by the overexpression of AnxA1 and reduction in the expression of COX-2 and prostagladine 2 (LU *et al.*, 2012; SEIDEL *et al.* , 2012).

Following the immunohistochemical analysis, we identified a higher MMP-9 immunolabeling in the group exposed to smoke without treatment in the lung and trachea, indicating the participation of this enzyme in tissue destruction. Other investigations associate several MMPs, including MMP-9, to tissue changes in patients with pulmonary emphysema (MIYATA *et al*, 2015; OSTRIDGE *et al*, 2016). In another study, AnxA1 was strongly characterized as a positive regulator of MMP-9, via the NF- κ B pathway in cases of breast cancer, presenting a protective role against the invasion of cancer cells (KANG, KO, JANG, 2012) .

In the context of pulmonary inflammation, in cystic fibrosis, the decrease in the endogenous expression of AnxA1 was observed in BAL of patients (TSAO *et al.*, 1998) and in animal models (DALLI *et al.*, 2014). The impact of AnxA1, as mediator in the control of inflammatory and fibrotic phases, was studied in a model of pulmonary fibrosis induced by bleomycin using knockout mice for the AnxA1 (DAMAZO *et al.*, 2011). The absence of the protein caused increases in the degree of inflammation, fibrosis rates and transforming growth

factor beta-1, interferon gamma and TNF- α levels (JIA et al, 2013). However, treatment with Ac2-26 improved the signs of inflammation and fibrosis. The administration of the AnxA1 mimetic peptide in a model of intestinal ischemia-reperfusion was beneficial, with attenuation of leukocyte migration to the lung and induction of IL-10 release into the blood (DAMAZO et al., 2013). Similar to our results the protective effect of Ac2-26 was also investigated in a model of pulmonary endotoxemia by local or systemic administration of LPS (DA CUNHA, OLIANI, DAMAZO, 2012), in which the pre-treatment with the peptide was able to regulate endotoxemic inflammation by decreasing the leukocyte extravasation to the connective tissue and alveolar cavity, reducing the release of pro-inflammatory cytokines in the blood plasma and increasing the anti-inflammatory mediator In BAL and blood plasma,.

Finally, knowing the importance of cytokines in inflammatory processes, we proceeded to the analysis of the pro-inflammatory cytokines IL1 β , IL-6 and TNF- α , chemokine MCP-1 and the anti-inflammatory cytokine IL-10. Our results showed elevated levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in untreated-exposed to smoke rats, in lung supernatant, blood plasma and BAL, and corroborate with other studies indicating the elevated presence of these cytokines in asthmatic and/or COPD patients exposed to smoke (KLENIEWSKA et al 2016). Thus, the reduction of these chemical mediators in the group exposed to the smoke and treated with the mimetic peptide again indicates the protective role of Ac2-26. Similarly, data obtained from MCP-1 dosages indicated increased chemokine dosages in the lung of the untreated smoke-exposed rats and reduced levels in treated smoke-exposed animals and are consistent with the quantification of lung macrophages in this investigation and with other studies that showed that prolonged smoking habit promotes the increase of MCP-1 and contributes to inflammatory profiles (KASTELEI et al, 2015).

In the dosages of the anti-inflammatory cytokine IL-10, we identified a decrease of this cytokine in the untreated-exposed to smoke group in the lung and blood plasma, compared to the control and smoke-exposed and treated groups. The low dosage of IL-10 in exposed to smoke, with or without COPD, compared to those not exposed to smoke, indicates that this cytokine is affected by exposure to cigarette smoke (ZHANG et al, 2013).

Together our analyzes showed that the administration of Ac2-26 in the studied COPD model acted systemically by the improvement of the physiological and biochemical characteristics, attenuation of the inflammatory process with tissue preservation of the airways, reduction of influx of inflammatory cells and expressions of AnxA1, COX-2 and MMP-9 in the lungs and trachea of treated animals. In addition, administration of Ac2-26 reduced the production of pro-inflammatory mediators and stimulated the release of IL-10.

These data point to the involvement of the AnxA1 in the respiratory tract under normal conditions and during the inflammatory stimulus and highlight the therapeutic potential of this protein against the diseases caused by smoking, especially in the protection against COPD.

Acknowledgments: To UNESP, FIPA, CAPES and FAPESP for structural and financial supports.

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

Participated in research design: Possebon, Souza, Costa, Sant'Ana, Azevedo, Iyomasa-Pilon, Oliani and Girol.

Conducted experiments: Possebon, Souza, Iyomasa-Pilon.

Contributed new reagents or analytic tools: Girol.

Performed data analysis: Possebon, Costa, Azevedo, Sant'Ana, Oliani and Girol.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Possebon, Oliani and Girol.

REFERENCES

AMARAL AF, STRACHAN DP, BURNEY PG, JARVIS DL. Female Smokers are at Greater Risk of Airflow Obstruction than Male Smokers: UK Biobank. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Jan 11. doi: 10.1164/rccm.201608-1545OC.

AMBROSE MP, HUNNINGHAKE GW. Corticosteroids increase lipocortin I in BAL fluid from normal individuals and patients with lung disease. *J Appl Physiol* (1985). 1990 Apr;68(4):1668-71.

AMBROSE MP, BAHNS CL, HUNNINGHAKE GW. Lipocortin I production by human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992 Jan;6(1):17-21.

ARYAL, S.; DIAZ-GUZMAN, E.; MANNINO, D. M. Influence of sex on chronic obstructive pulmonary disease risk and treatment outcomes. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, v. 9, p. 1145-1154, 2014. ISSN 1178-2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25342899>>.

BARNES PJ, SHAPIRO SD, PAUWELS RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003;22:672e88.

BOZINOVSKI S., ANTHONY D., VLAHOS R., Targeting pro-resolution pathways to combat chronic inflammation in COPD *J Thorac Dis* 2014;6(11):1548-1556

CARAMORI, G. et al. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, v. 9, p. 397-412, 2014. ISSN 1178-2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24812504>>.

COMPTON C, *et al* The Novartis view on emerging drugs and novel targets for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 26 (2013) 562e57.

D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br J Pharmacol*, v. 155, n. 2, p. 152-69, Sep 2008. ISSN 0007-1188. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18641677>.

DA CUNHA, E. E.; OLIANI, S. M.; DAMAZO, A. S. Effect of annexin-A1 peptide treatment during lung inflammation induced by lipopolysaccharide. *Pulm Pharmacol Ther*, v. 25, n. 4, p. 303-11, Aug 2012. ISSN 1522-9629. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546484>>.

DALLI J, ROSIGNOLI G, HAYHOE RP, EDELMAN A, PERRETTI M: CFTR inhibition provokes an inflammatory response associated with an imbalance of the annexin A1 pathway. *Am J Pathol* 2010, 177:176-86.

DAMAZO, A. S. et al. Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. *BMC Immunol*, v. 12, p. 59, 2011. ISSN 1471-2172. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22011168>>.

DAMAZO AS, PAUL-CLARK MJ, STRAUS AH, TAKARASHI HK, PERRETTI M, OLIANI SM: Analysis of the annexin 1 expression in rat trachea: study of the mast cell heterogeneity. *Annexins* 2004, 1:12-18.

DIJKSTRA A. E., POSTMA D.S. , HACKEN N.T. , VONK J.M., OUDKERK M. , OOIJEN P.M.V, ZANEN P. , HOESEIN F.A.M. , GINNEKEN B.V. , SCHMIDT M., GROEN H.J.M.: Low-dose CT measurements of airway dimensions and emphysema associated with airflow limitation in heavy smokers: a cross sectional study. *Respiratory Research* 2013, 14:11.

FUJIMOTO H., TSUJI H., OKUBO C., FUKUDA I., NISHINO T., LEE K.M., RENNE R. , YOSHIMURA H. Biological responses in rats exposed to mainstream smoke from a heated cigarette compared to a conventional reference cigarette. *Inhalation Toxicology*. 2015 Mar;27(4):224-36. doi: 10.3109/08958378.2015.1027799. Epub 2015 May 13.

GAN WQ, MAN SF, SENTHILSELVAN A, SIN DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004;59:574e80.

GAVINS, F. et al. Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. *FASEB J*, v. 21, n. 8, p. 1751-8, Jun 2007. ISSN 1530-6860. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17317721>.

GIROL, A. P. et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. *J Immunol*, v. 190, n. 11, p. 5689-701, Jun 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23645879>>.

HALLGREN J. and GURISH M.F. Granule maturation in mast cells: Histamine in control. *Eur. J. Immunol*. 2014. 44: 33–36

HAN MK, POSTMA D, MANNINO DM, et al. Gender and chronic obstructive pulmonary disease: why it matters. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(12):1179-84.

HOESEIN F.A.A.M., JONG P.A., LAMMERS J.W.J, MALI W.P.T., SCHMIDT M., KONING H.J., AALST C.V.D, OUDKERK M., VLIEGENTHART R., GROEN H.J.M,

GINNEKEN B.V., RIKXOORT E.M.V. ZANEN P. Airway wall thickness associated with forced expiratory volume in 1 second decline and development of airflow limitation. *ERJ Express*. Published on January 22, 2015 as doi: 10.1183/09031936.00020714.

KALENDERIAN R, RAJU L, ROTH W, SCHWARTZ LB, GRUBER B, JANOFF A. Elevated histamine and tryptase levels in smokers' bronchoalveolar lavage fluid. Do lung mast cells contribute to smokers' emphysema? *Chest*. 1988 Jul;94(1):119-23.

KLENIEWSKA A, WALUSIAK-SKORUPA J, PIOTROWSKI W, NOWAKOWSKA-ŚWIRTA E, WISZNIEWSKA M. Comparison of biomarkers in serum and induced sputum of patients with occupational asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Occup Health*. 2016 Jul 22;58(4):333-9. doi: 10.1539/joh.15-0317-BR. Epub 2016 Jun 6.

KOZMA R. D. L. H., ALVES E. M, OLIVEIRA V. A. B., LOPES F. D. T. Q. S, GUARDIA E. C., BUZO H. V., FARIA C. A., YAMASHITA C., CAVAZZANA M., FREI F., PAES M. J. O. R., PAES J. T. R. Um novo modelo experimental murino de enfisema: enfisema induzido pela fumaça do cigarro em ratos Wistar* *J Bras Pneumol*. 2014;40(1):46-54

LIM, L.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J*, v. 21, n. 4, p. 968-75, Apr 2007. ISSN 1530-6860. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17215481>.

LU Q., *et al.* Green Tea Inhibits Cyclooxygenase-2 in Non-Small Cell Lung Cancer Cells through the Induction of Annexin-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 November 2; 427(4): 725–730.

LÜDICKE F., MAGNETTE J., BAKER G., WEITKUNAT R. A Japanese cross-sectional multicentre study of biomarkers associated with cardiovascular disease in smokers and non-smokers. 2015; *Biomarkers*, 2015; 20(6–7): 411–421.

MAIA LF, CASTRO QJT, RESENDE FMF, RODRIGUES-DAS-DORES RG: Plantas medicinais e hipertensão. *Farmácia Revista*. 2011, http://www.ufop.br/downloads/farmacia_revista24_artigo_tecnico.pdf.

MARCOS L., BICHINHO G.L., PANIZZI E.A., STORINO K.K.G., PINTO D.C: Classificação da doença pulmonar obstrutiva crônica pela radiografia do tórax. *Radiol Bras*. 2013 Nov/Dez;46(6):327–332.

MARTINEZ F, CURTIS J, SCIURBA F, MUMFORD J, GIARDINO N, WEINMANN G, KAZEROONI E, MURRAY S, CRINER G, SIN D, *et al.*; NETT Research Group. Sex differences in severe pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:243–252.

MIYATA Y, MITSUNARI K, AKIHIRO A, WATANABE SI, MOCHIZUKI Y, SAKAI H. Smoking-induced changes in cancer-related factors in patients with upper tract urothelial cancer. *Mol Clin Oncol*. 2015 Mar;3(2):287-294. Epub 2014 Dec 2.

NUSSBAUMER-OCHSNER Y, STOLK J, FERRAZ DA SILVA LF, VAN SCHADEWIJK A, DE JEU RC, PRINS FA, MAUAD T, RABE KF, HIEMSTRA PS. Association of Lung Inflammatory Cells with Small Airways Function and Exhaled Breath Markers in Smokers - Is There a Specific Role for Mast Cells?. PLoS One. 2015 Jun 12;10(6):e0129426. doi: 10.1371/journal.pone.0129426. eCollection 2015.

NOBORISAKA Y, ISHIZAKI M, YAMAZAKI M, HONDA R, YAMADA Y. Elevated Blood Pressure and Serum γ -Glutamyltransferase as Significant Characteristics of Smokers With Chronic Kidney Disease. Nephrourol Mon. 2014 Jul 5;6(4):e20746. doi: 10.5812/numonthly.20746. eCollection 2014.

OLIANI, S. et al. Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. Am J Pathol, v. 158, n. 2, p. 603-15, Feb 2001. ISSN 0002-9440. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11159197 >.

OLIANI, S. M. et al. Fluctuation of annexin-A1 positive mast cells in chronic granulomatous inflammation. Inflamm Res, v. 57, n. 10, p. 450-6, Oct 2008. ISSN 1023-3830. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18827967> >.

OSTRIDGE K. , WILLIAMS N., KIM V., HARDEN S. , BOURNE S., COOMBS N.A. , ELKINGTON P.T., ESTEPAR R.S.J., WASHKO G. , STAPLES K.J., WILKINSON T.M.A. Distinct emphysema subtypes defined by quantitative CT analysis are associated with specific pulmonary matrix metalloproteinases. Respiratory Research (2016) 17:92 DOI 10.1186/s12931-016-0402-z

Pan American Health Organization and World Health Organization: concerns regarding tobacco use. Int Q Community Health Educ, v. 33, n. 2, p. 225-7, 2012-2013 2012. ISSN 0272-684X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23666165> >.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. Nat Rev Immunol, v. 9, n. 1, p. 62-70, Jan 2009. ISSN 1474-1741. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19104500 >.

RICHMOND I., PRITCHARD G.E., ASHCROFT T., AVERY A., CORRIS P.A., WALTERS E.H. Bronchus associated lymphoid tissue (BALT) in human lung: its distribution in smokers and non-smokers. Thorax, 1993;48:1 130-1134.

SALA E, BALAGUER C, VILLENA C, RÍOS A, NOGUERA A, NÚÑEZ B, AGUSTÍ A. Low erythropoietin plasma levels during exacerbations of COPD. Respiration. 2010;80(3):190-7. doi: 10.1159/000264604. Epub 2009 Dec 2.

SINGH V., TANWAR A.S., HUNGUND A.S., HUNGUND S.A., NAGARAJA C. Comparison of serum erythropoietin levels in smokers and nonsmokers with periodontitis: A biochemical study. *Journal of Indian Society of Periodontology* - Vol 20, Issue 3, May-Jun 2016

SOLITO, E. et al. Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. *FASEB J*, v. 20, n. 9, p. 1498-500, Jul 2006. ISSN 1530-6860. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16720734 >.

SNOECK-STROBAND JB, POSTMA DS, LAPPERRE TS, GOSMAN MM, THIADENS HA, KAUFFMAN HF, *et al.* Airway inflammation contributes to health status in COPD: a cross-sectional study. *Respir Res* 2006;7:140.

SUGIMOTO M.A, VAGO J.P, TEIXEIRA M.M, SOUSA L.P. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. Hindawi Publishing Corporation *Journal of Immunology Research* Volume 2016, Article ID 8239258, 13 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8239258>

VENEGAS JG, WINKLER T, MUSCH G, VIDAL MELO MF, LAYFIELD D, TGAVALEKOS N, FISCHMAN AJ, CALLAHAN RJ, BELLANI G, HARRIS RS: Self-organized patchiness in asthma as a prelude to catastrophic shifts. *Nature* 2005, 434:777–782.

XIROFOTOS D., TRAKAKIS E., PEPPA M., CHRELIAS C, PANAGOPOULOS P., CHRISTODOULAKI C., SIOUTIS D., KASSANOS D. The amount and duration of smoking is associated with aggravation of hormone and biochemical profile in women with PCOS. *Gynecological Endocrinology*. 2015 Taylor & Francis. DOI: 10.3109/09513590.2015.1101440

ZHANG L, CHENG Z, LIU W, WU K. Expression of interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in serum and sputum of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *COPD*. 2013 Aug;10(4):459-65. doi: 10.3109/15412555.2013.770456. Epub 2013 Mar 28.

FOOTNOTES

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), 2011/00128-1

FIGURE LEGENDS

Figure I.

Physiological and radiographic analyzes of the lung - the chest regions were evaluated by comparing the lungs between the control groups (A), untreated-exposed to smoke (B) and exposed to smoke and treated (C). Measure of 18cmx24cm. Variables: pulmonary retrosternal height: from the beginning to the end of the right lung; Levels of right (ALBDIR) and left (ALBESQ) diaphragmatic lowering. **Physiological analyzes of plethysmography, blood pressure and weight** - blood pressure analyzes (D). weighing (E). Assessment of lung frequency per minute (F) and air volume capacity inspired by ml per minute (G), lung ventilation capacity per minute (H); Results presented as mean \pm S.E.M. (N = 10), * p <0.05; ** p <0.01 and *** p <0.001 vs control; ## p <0.01 and ### p <0.001 vs untreated-exposed to smoke.

Figure II.

Histopathological analysis of the lung - Control group with normal aspect of the tissue (A), untreated-exposed to smoke group (B) with increased intra-alveolar spaces and BALT and smoke-exposed treated with the peptide animals (C). Color: Hematoxylin-Eosin. Bars: 10 μ m. Morphometry of intra-alveolar spaces (G). Results presented as mean \pm S.E.M. (N = 10 / group). Histopathological analysis of trachea-Control (D), untreated-smoke-exposed group with tissue alteration and loss of cilia (E) and treated with peptide group (F), with preservation of epithelial tissue. Color: Hematoxylin-Eosin. Bars: 10 μ m. **Quantitative analysis of bronchoalveolar lavage** - Quantification of macrophages (H) and lymphocytes (I), in a Neubauer camera. Results presented as mean \pm S.E.M. (N = 10), ** p <0.01 and *** p <0.001 vs control; # P <0.05 and ## p <0.01 vs untreated-exposed to smoke.

Figure III.

Expression of the AnxA1, COX-2 and MMP-9 proteins in the lung and trachea: Reduced expression of the proteins in the control group (A, E and I), increased immunolabeling in the untreated- exposed to smoke group (B, F and J) and reduction in the expression of AnxA1 and COX-2 after treatment with the peptide (C and G). Absence of marking on reaction control (D, H and L). Counter-staining: Hematoxylin. 10 μ m bars. Results presented as mean \pm S.E.M. (N = 10 / group) (M, N, O, P, Q and R). * P <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 vs control; # P <0.05; ## p <0.01; ### p <0.001 vs untreated-exposed to smoke.

Figure IV.

Macrophages and mast cells in the lung and trachea - Few macrophages (A and F) and mast cells (B-E, G-J) in the control group. Increase of these cells in the group exposed to smoke without treatment and reduction after treatment with the peptide. (N = 10 / group). Counter-staining: Hematoxylin. Color: Toluidine blue (B, C, G and H), alcian blue (D and I) and safranin (E and J). 10 μ m bars. Results presented as mean \pm S.E.M. * P <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 vs control; # P <0.05; ## p <0.01; ### p <0.001 vs untreated-exposed to smoke.

Figure V.

Biochemical analysis of blood - Hemoglobin (A) was measured in blood per g / dl. The dosages of glucose (B), gamma GT (C), cholesterol (D) and TGO (E) were performed in blood plasma, respectively per mg / dl, U / L and U / mL. Results presented as mean \pm S.E.M. (N = 10 / group). * P <0.05; ** p <0.01 vs control # p <0.05; ## p <0.001 vs untreated-exposed to smoke..

Figure VI.

Cytokine levels in lung macerate supernatant, blood plasma and bronchoalveolar lavage - IL-1 β (A, F and K); IL-6 (B, G and L); IL-10 (C, H and M); MCP-1 (D, I and N); TNF- α (E, J and O). Results presented as mean \pm S.E.M. (N = 10 / group). ** p <0.01; *** p <0.001 vs control # p <0.05; ## p <0.01 ### p <0.001 vs exposed to smoke without treatment.

FIGURE I

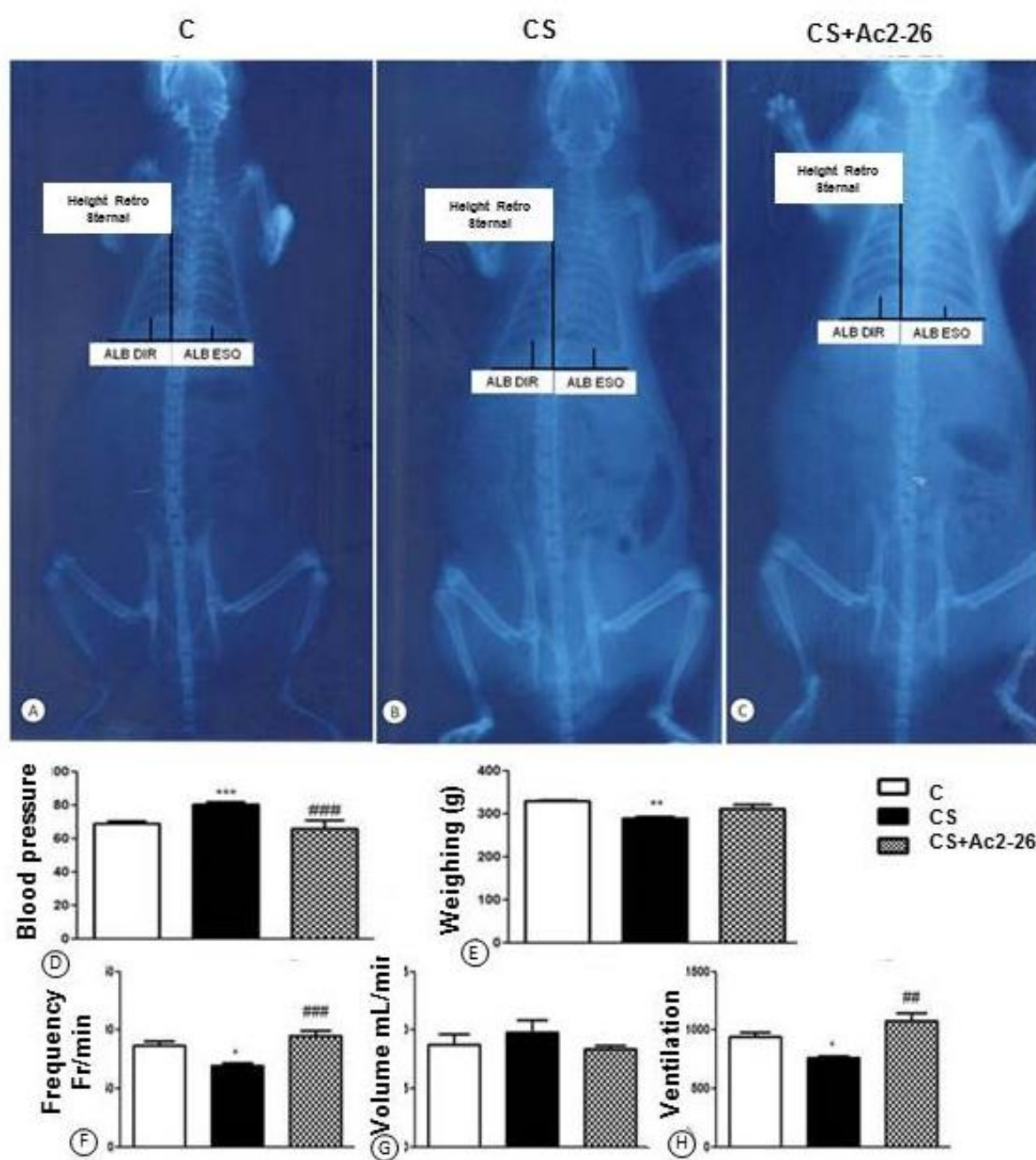


FIGURE II

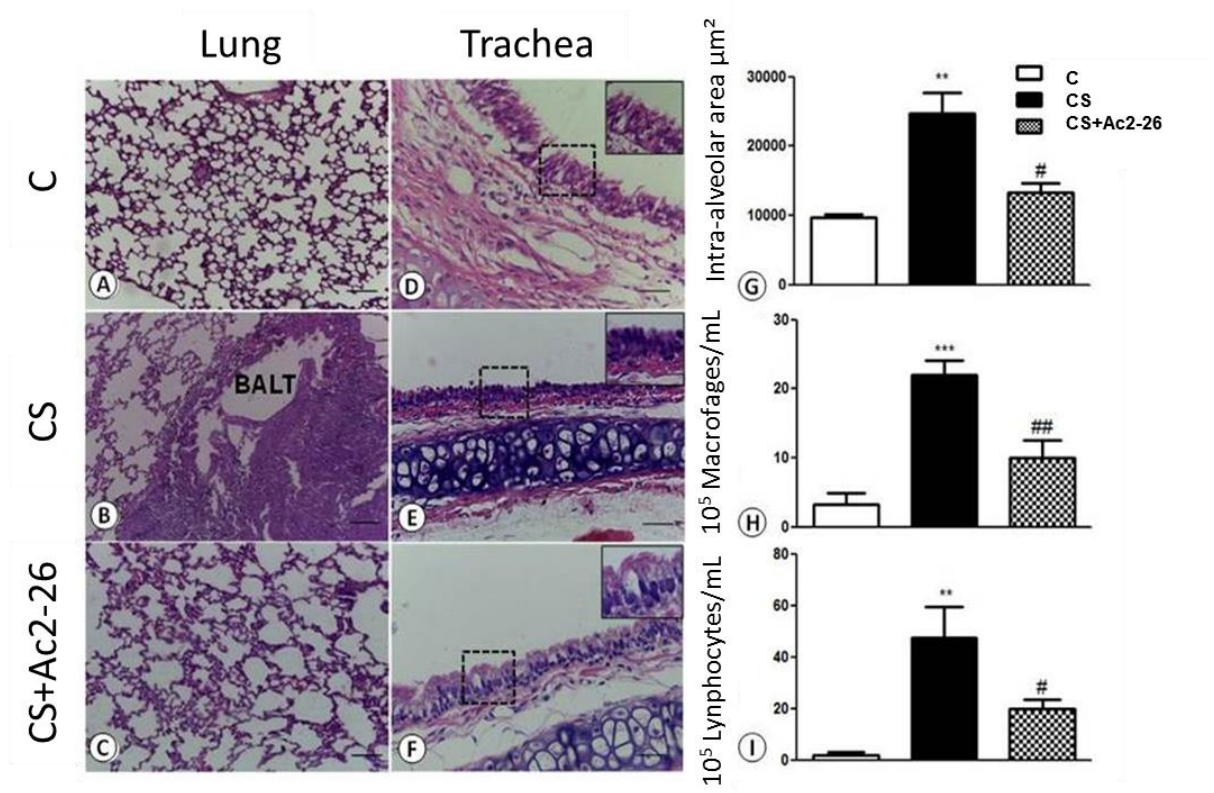


FIGURE III

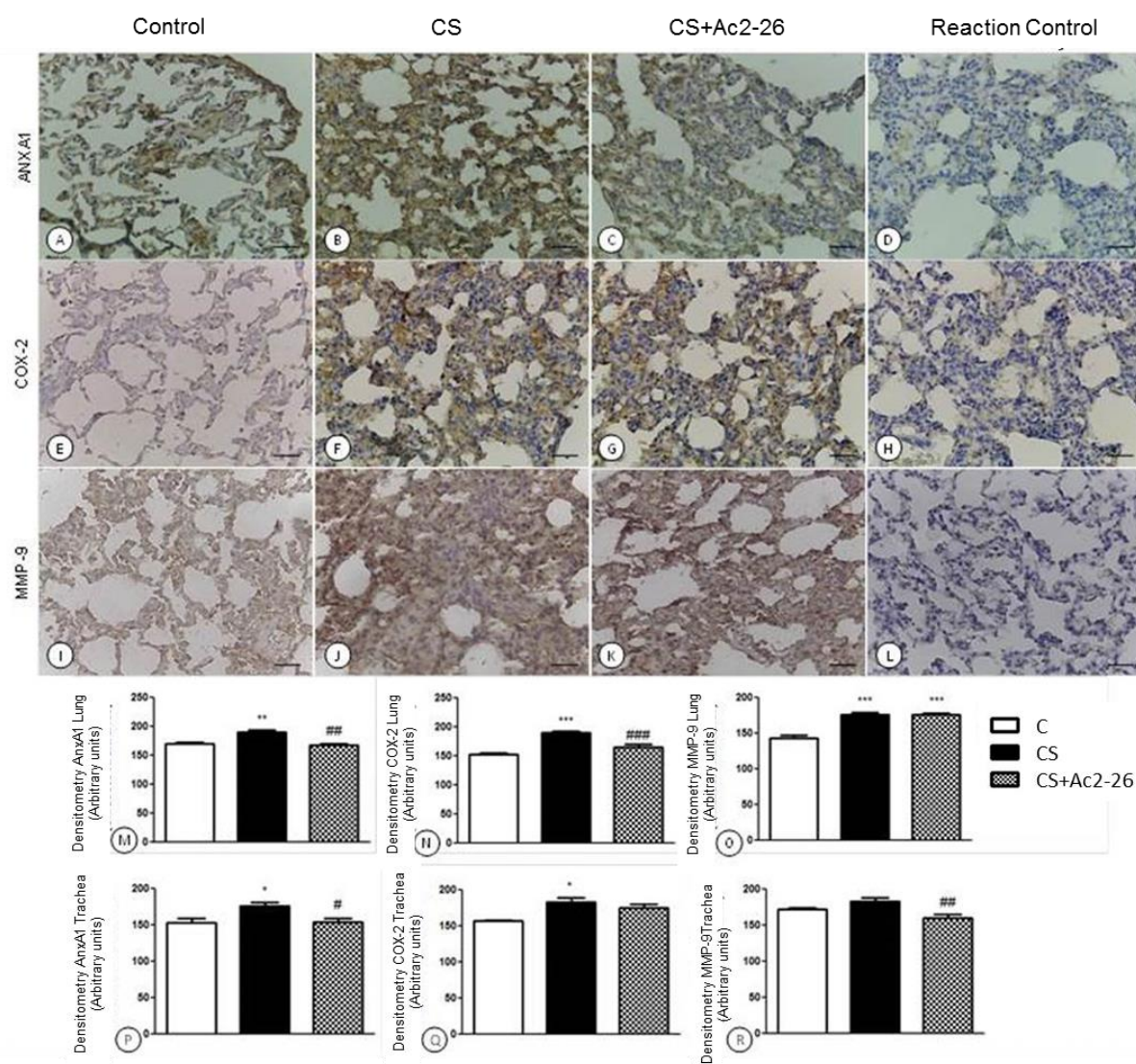


FIGURE IV

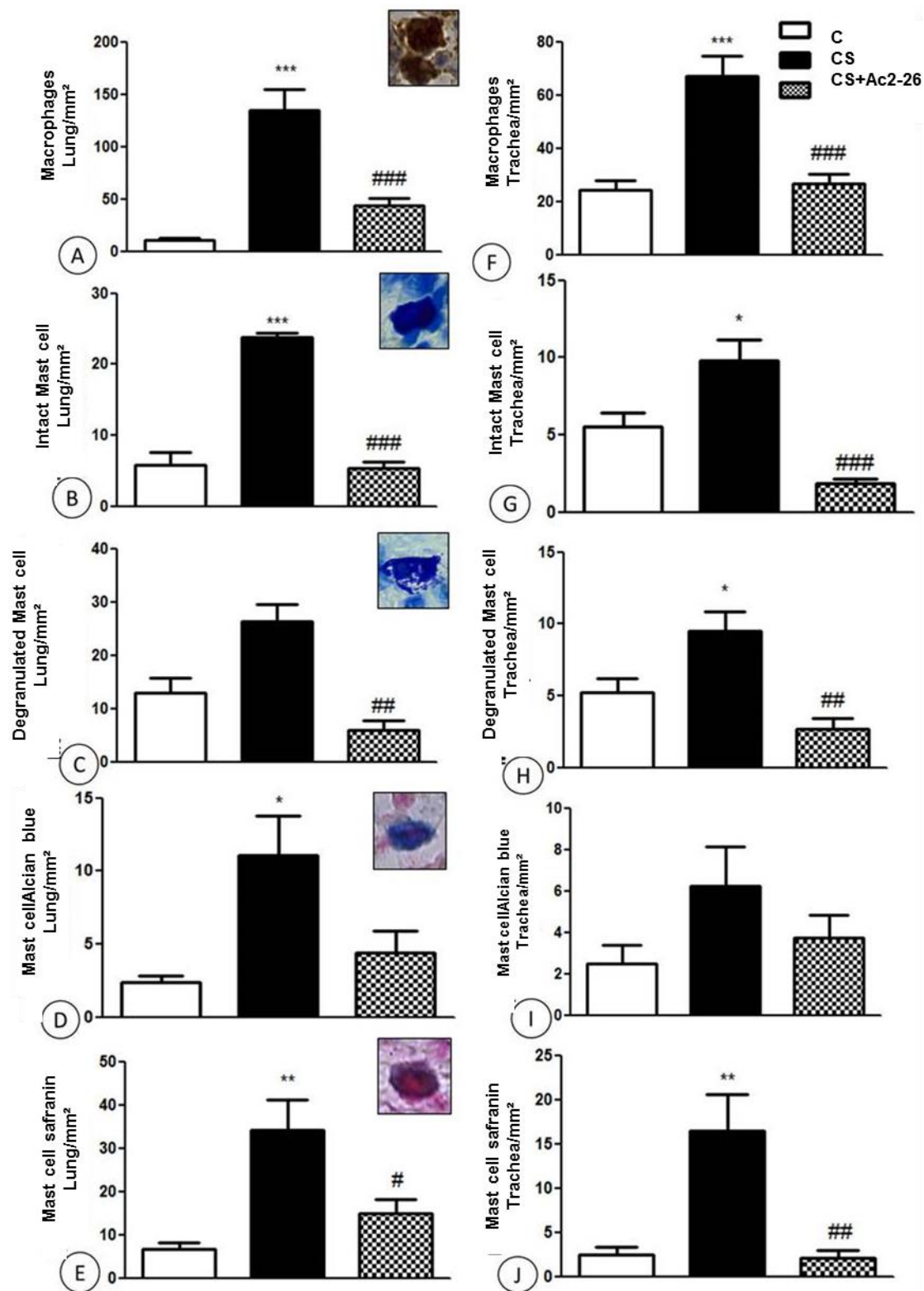


FIGURE V

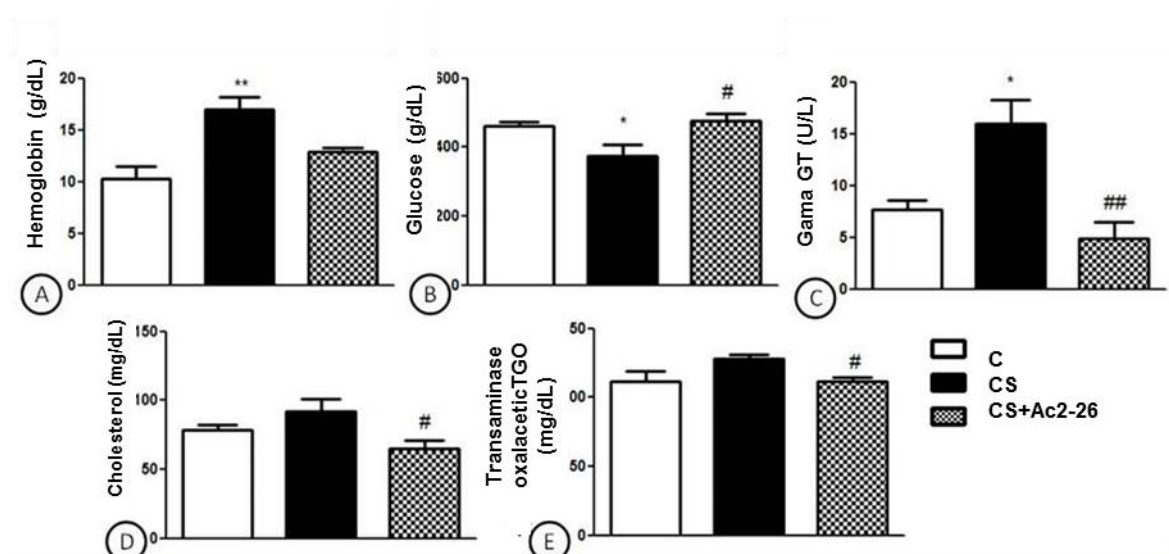
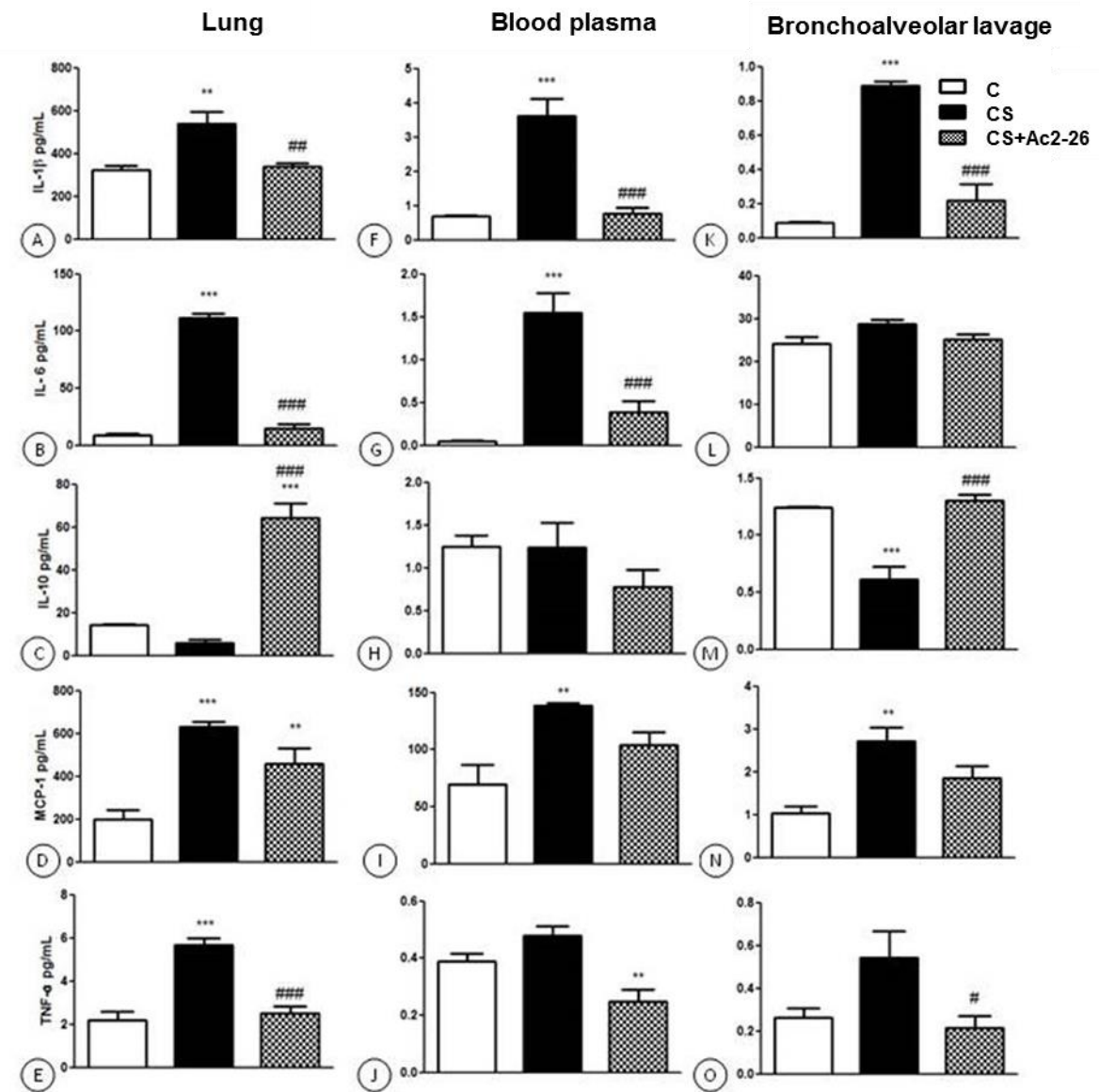
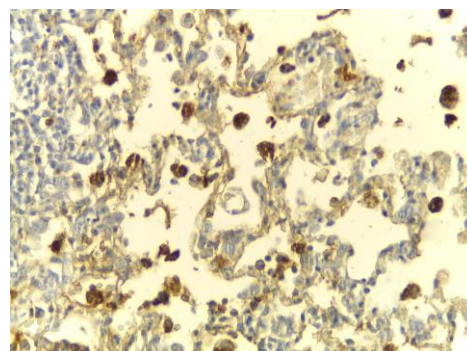


FIGURE VI



APÊNDICE B – “AÇÃO PROTETORA DE FITOTERÁPICOS EM MODELO DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA INDUZIDA PELA FUMAÇA DO CIGARRO”.



Article Type: Regular Article

AÇÃO PROTETORA DE FITOTERÁPICOS EM MODELO DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA INDUZIDA PELA FUMAÇA DO CIGARRO

LUCAS POSSEBON¹ (Graduated), MONIELLE SANT'ANA³ (Graduated), ISABELA LEBRON² (Medicine's student), LIGIA FERNANDA DA SILVA² (Medicine's student), JULIA TAGLIAFERRI PALETTA² (Medicine's student), BRUNA G. GLAD³ (Graduated), MELINA M. IYOMASA-PILON² (Graduated), HELENA RIBEIRO SOUZA² (Master degree), SARA DE SOUZA COSTA¹ (Graduated), ANDREIA DE HARO MORENO² (Doctor), GISELDA PEREIRA S. RODRIGUES² (Doctor), ANA PAULA GIROL^{1,2} (Doctor).

1 – São Paulo State University, (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil (Department of Biology, Laboratory of Immunomorphology)

2 – Integrated College Padre Albino Foundation (FIPA), Catanduva, SP, Brazil

3 – Institute Municipal de Ensino Superior (IMES – Catanduva).

ABSTRACT

Smoking is a risk factor for several diseases and even people nonsmokers who live with the smoke produced by smokers suffer the damage caused by this exposure. With that evaluated the effects of associations of different medicinal herbs with anti-inflammatory properties, a model of exposure to cigarette smoke in rats by histopathological analysis, biochemical, bronchoalveolar lavage. Female Wistar rats were divided into chronic smoking groups treated with herbal remedies, chronic untreated smokers, former smokers treated with herbal medicines, ex-smokers and untreated control (n = 5 / each group). To evaluate the effectiveness of medicinal herbs protect against inflammatory processes, the treated chronic smoker and ex-smoker treated groups were administered by gavage with herbal medicines Bardana (*Arctium lappa*) to 4%, Tanchagem (*Plantago major*) at 4%, Guaco (*Mikania glomerata* Spreng) to 4% and Cavalinha (*Equisetum* spp.) at 4%, the chronic smoker and former smoker groups received grain alcohol by gavage as vehicle groups. The blood was collected for biochemical analysis that showed significance in gama GT, indicating no toxicity. In the analysis of bronchoalveolar lavage fluid, we obtained significant increase in macrophages and lymphocytes in smokers untreated group compared to the control and treated smoker. In the histopathological analysis of the lungs in HE got pulmonary congestion and higher interalveolar spaces in chronic smokers without treatment groups compared to the control and treated trachea and the occurrence of metaplasia in chronic smokers group compared to the other groups showed preservation in tissue mast cell measurements indicated an increase in chronic smokers group compared to other groups. Analysis of immunohistochemistry to quantify macrophages, showing a significant increase of these cells in chronic smoking group compared to the control and protein immunoreactivity ANXA A1 and NF- κ B that showed greater immunostaining in chronic smoking group compared to the control and treated. The model of smoking was used effectively to promote important pulmonary changes and the data indicate anti-inflammatory effects of herbal medicines in animals exposed to cigarette smoke, which will allow the follow-up work.

Keywords: Smoking, herbal, anti-inflammatory

INTRODUÇÃO

O hábito tabagista é um importante problema de saúde mundial e mesmo pessoas não tabagistas, que convivem com a fumaça produzida por fumantes, sofrem os danos causados por esta exposição. O tabagismo predispõe a doença aterosclerótica, e, portanto, está relacionado ao desenvolvimento de doenças arteriais periféricas, cardiovasculares e cerebrovasculares [1,2,3,4]. Em especial, o fumo está fortemente associado ao desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), uma grave condição de saúde caracterizada pela limitação progressiva do fluxo de ar e que apresenta estimativa de ser a terceira causa de morte em 2020 [5,6].

A DPOC é causada por processo inflamatório induzido pela inalação de partículas e gases nocivos, o que leva a mudanças estruturais nas vias respiratórias e alvéolos. Diferentes células inflamatórias como macrófagos, mastócitos, neutrófilos e linfócitos participam do processo da doença, sendo responsáveis pela liberação de vários mediadores químicos, que a longo prazo e pelo desequilíbrio da resposta imune, causam danos teciduais e levam ao declínio da função pulmonar [5,7].

Os neutrófilos recrutados produzem proteases, que estimulam a secreção de muco associada à bronquite crônica, uma das principais características da DPOC. Enquanto os linfócitos T recrutados têm a capacidade de causar a citólise e a apoptose de células epiteliais alveolares, contribuindo para o enfisema relacionado à doença [8, 9]. O enfisema também pode ser causado pelos macrófagos, que além de orquestrarem a resposta inflamatória na DPOC, produzem enzimas elastolíticas, como as metaloproteinase de matriz (MMP)- 2 e MMP-9, que destroem as fibras do conjuntivo pulmonar [9].

Ainda, estudos indicam que o receptor para peptídeos formilados-2 (FPR2) está presente nas células epiteliais e inflamatórias ativadas do pulmão e é particularmente importante na resolução da DPOC, podendo ser modulado pela proteína anti-inflamatória anexina A1 (AnxA1) e outros agonistas como amiloide sérica A e lipoxina A4 [10, 11]

A influência da exposição à fumaça do cigarro em ratos é um modelo simples e bastante usado na literatura para estudar os efeitos adversos do tabagismo e possibilidades de tratamento das enfermidades causadas por esse hábito [12,13,14]. Embora difiram no tipo e quantidade de cigarros e tempo de exposição, vários estudos têm sido realizados para induzir a DPOC [13,15,16,17] e alterações na parede da aorta em ratos expostos ao fumo [4].

Como os mecanismos inflamatórios induzidos pelo fumo estão relacionados ao desenvolvimento de diferentes condições clínicas, uma das possibilidades de tratamento é a terapia anti-inflamatória, que pode ser realizada por meio de ervas medicinais [18, 19]. A utilização de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos é uma prática comum, sendo o resultado do acúmulo secular de conhecimentos empíricos sobre a ação das ervas medicinais por diferentes grupos étnicos [20,21]. Nas últimas décadas, têm-se demonstrado um crescente interesse pelos produtos naturais [19,22] e estudos mostram que os medicamentos fitoterápicos são amplamente comercializados em muitos países da Europa, nos EUA e Brasil [18,20,23,24].

Os fitoterápicos são considerados medicamentos obtidos diretamente das matérias-primas ativas dos vegetais, levando a efeitos positivos para o tratamento de inflamações, lesões, ou danos teciduais. Mas os medicamentos fitoterápicos devem ser avaliados assim como qualquer outro medicamento [19].

Entre as plantas relacionadas ao trato respiratório estão a *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata* que além de reduzirem a infiltração inflamatória podem ser candidatos para a prevenção do dano oxidativo pulmonar causada pela exposição ao pó de carvão [25]. Estudos indicam também que a *Plantago major* tem mostrado resultados eficientes no tratamento de inflamação no trato respiratório e controle dos mastócitos em ratos asmáticos [26]. Outros estudos mostraram que os extratos de *Camelia sinensis* Kuntze, *Inonotus obliquus*, e uma mistura *Inula helenium* L., *Chelidonium majus* L. e *Equisetum arvense* L. tiveram efeitos protetores sobre as atividades proliferativas e crescimento de células tumorais de ovário. Por sua vez, a *Berberis vulgaris*, *Taraxacum officinale* e *Arctium lappa*, foram avaliadas por suas propriedades antimutagênicas em diversos tecidos, como pulmão, rim, cérebro e testículos e mostraram resultados eficientes quando administrados em conjunto [27].

Diante dos impactos da DPOC e da potencialidade terapêutica de ervas medicinais, avaliamos os efeitos dos extratos de *A. lappa*, *M. glomerata* spreng., *P. major* e *E. spp*, em modelo de DPOC em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos Animais

Ratas da linhagem Wistar, com 6 semanas de idade, foram obtidas da Unidade Didática e de Pesquisa Experimental (UDPE) das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA) de Catanduva-SP. Os animais foram divididos em 5 grupos (n=5/grupo), mantidos em gaiolas em um ambiente controlado (24 a 25 °C, 12h ciclo luz/escuro) com água e comida ad libitum. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA-FIPA nº05/14).

Preparo e padronização dos extratos alcoólicos dos fitoterápicos

Para a preparação dos extratos alcoólicos, 40 g de cada uma das seguintes ervas secas trituradas, *A. lappa*, *M. glomerata spreng*, *P. major* e *E. spp.* foram colocados no extrator Soxhlet (Prolab) com 160 mL de etanol.

Na padronização dos extratos foram utilizadas análises de identificação de componentes químicos de taninos, flavonóides, saponinas e alcalóides por meio de reações com Cloreto Férrico, Acetato de Chumbo, Acetato de cobre, Cloreto de alumínio, Hidróxido de sódio [28]. Além disso, os extratos foram avaliados quanto a citotoxicidade [29], em diferentes concentrações in vitro de células sanguíneas seguido de leitura por absorbância em 540nm em espectrofotômetro. Essas análises indicaram a presença de taninos e flavonóides, e também baixa citotoxicidade nos extratos indicados

Exposição à fumaça do cigarro e protocolo de tratamento

Os animais foram expostos à fumaça da queima de 10 cigarros comerciais (contendo 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono), um após o outro, duas vezes ao dia (total de 20 cigarros/dia), por 8 semanas, em aparato próprio para exposição ao fumo da UDPE, FIPA. O aparelho consiste em um sistema de contenção de animais e um sistema de liberação da fumaça do cigarro com um suporte externo para o cigarro, conectado a uma bomba de sucção dinâmica. A bomba pode ser programada de modo que períodos de sucção do cigarro se alternem com períodos de sucção de ar limpo, para prevenir a asfixia [14]. As exposições foram padronizadas e realizadas aproximadamente na mesma hora do dia.

Após as 8 semanas de exposição, dois grupos de animais foram mantidos no mesmo ambiente e período, mas sem a exposição à fumaça do cigarro, sendo considerados ex-fumantes. O grupo controle não foi exposto à fumaça, mas somente ao ar comprimido.

A eficácia dos fitoterápicos na proteção contra os processos inflamatórios causados pela exposição ao fumo foi testada em um grupo de animais fumantes e em um grupo de ex-fumantes. Os animais de ambos os grupos foram administrados por gavagem com 1 mL de solução contendo extratos de *E. spp.* a 4%, *P. major* a 4%, *A. lappa* a 4% e *M. glomerata spreng* a 4%, 2x/dia, antes das exposições à fumaça do cigarro. Os grupos fumantes e ex-fumantes não tratados receberam por gavagem apenas o veículo.

Análises quantitativas do lavado broncoalveolar

Para coleta do lavado broncoalveolar, os animais tiveram a traqueia canulada e o pulmão direito clampado. O pulmão esquerdo foi lavado 3 vezes com PBS e o líquido obtido foi centrifugado por 10 minutos a 1.500 rpm. O pellet foi ressuspensão em 500 µl de PBS e alíquotas de 10 µl foram coradas em Turk (1:10) para contagem de células inflamatórias em câmara de Neubauer. Os valores foram expressos como número de células x 10³/ml.

Análises bioquímicas do plasma sanguíneo

O sangue foi coletado por punção cardíaca em seringas heparinizadas, colocado em ependorffs, centrifugado por 15 minutos a 3.000 rpm e o plasma obtido foi usado para dosagens de glicose, colesterol e gama GT com kits comercialmente disponíveis e de acordo com as instruções do fabricante.

Análises histopatológicas e quantificações de mastócitos

O pulmão direito e a traqueia, após a obtenção do lavado broncoalveolar, foram coletados fixados em formol a 4%, desidratados em ordem crescente de álcool e incluídos em parafina para as análises histopatológicas. Para essas análises, secções de 5 mm, foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). Nas análises morfométricas, as medidas dos espaços alveolares foram quantificadas pela média de 10 áreas de cada imagem obtida pela objectiva de 40X no microscópio Leica (DM500).

Para análises dos mastócitos, as secções de pulmão foram coradas com 0,1 % azul de toluidina e avaliadas de acordo com suas características morfológicas em intactos ou degranulados. A quantificação dos mastócitos foi realizada em 10 imagens por lâmina obtidas pela objectiva de 40X no microscópio Leica (DM500). As áreas foram obtidas utilizando o Software Leica Image Analysis.

Análises imuno-histoquímicas

Os estudos imuno-histoquímicos foram usados para avaliar as expressões da proteína da anexina A1 (ANXA1) e do NFκ-β e para a quantificação de macrófagos nos pulmões. As secções foram processadas para recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 e bloqueio da atividade da peroxidase endógena e incubadas com os anticorpos primários policlonais rabbit: anti AnxA1 (1:1000), NFκ-β (1:200) e ED-1 (1:150) (*Zymed Laboratories, Cambridge, UK*) por 12 horas. A seguir, incubadas com o anticorpo secundário biotilado (*Kit Histostain, Invitrogen*) e imersas em complexo estreptavidina peroxidase conjugada. O substrato diaminobenzidina (DAB) (*Kit DAB, Invitrogen*) foi usado para revelação e, após, as secções foram contra coradas com Hematoxilina. As proteínas foram quantificadas por densitometria como unidades arbitrárias de 0 a 255 no analisador de imagens *software Leica Image Analysis*. Os macrófagos foram quantificados como descrito anteriormente para os mastócitos.

Dosagem de citocinas pelo MAGPIX

As citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α e a quimiocina MCP-1 foram quantificadas no plasma sanguíneo e no lavado broncoalveolar, utilizando o Kit *MILLIPLEX MAP* de citocinas de rato (RECYTMAG-65K; *Millipore Corporation, EUA*) conforme as instruções do fabricante e analisadas no equipamento *LUMINEX xMAP MAGPIX* (*Millipore Corporation, EUA*).

Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos previamente à análise descritiva e determinação da normalidade. Em seguida, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de *Bonferroni*. Todos os valores obtidos foram expressos como média ± S.E.M. e os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Controle de influxo de células inflamatórias, no lavado bronco alveolar e de gama GT nos animais tratados com fitoterápicos

Na análise do lavado bronco alveolar (figura 1), foi observado aumento significativo de Macrófagos (A) e linfócitos (B) ($p < 0,001$) no grupo fumante sem tratamento comparado ao controle e redução dessas células no grupo ex-fumante tratado ($p < 0,01$).

Nas análises bioquímicas de colesterol e glicose não foram observadas diferenças significantes entre os grupos estudados (Figura 1C e D). Diferentemente os níveis de Gama GT foram aumentados nos animais fumantes não tratados ($p < 0,001$) comparado ao controle (Figura 1E) e reduzidos ($p < 0,001$) nos grupos tratados com fitoterápicos e ex-fumante não tratados.

Efeitos protetores dos fitoterápicos contra danos teciduais causados pela exposição ao fumo no pulmão e na traqueia

Os estudos histopatológicos do pulmão (figura 1A-J) mostraram influxo de células inflamatórias nos grupos fumantes, especialmente nos animais não tratados com fitoterápicos (Figura 2C e D). A análise morfométrica dos espaços intra-alveolares evidenciou aumento dos espaços nos grupos fumantes e ex-fumantes sem tratamento comparado ao grupo controle e redução desses espaços nos animais fumantes e ex-fumantes tratados com fitoterápicos (Figura 2K).

Nas análises histopatológicas da traquéia (figura 2L-P), no grupo fumante não tratado, foi observada metaplasia (Figura 2M) com transição do epitélio respiratório para epitélio estratificado pavimentoso. O início de metaplasia, com ausência de cílios e desorganização das células epiteliais foi observada nos animais ex-fumantes não tratados (Figura 2O). Nos grupos fumantes e ex-fumantes tratados com fitoterápicos houve preservação significativa do tecido epitelial que se manteve organizado e com cílios (Figura 2N e P).

Os fitoterápicos induzem a redução de mastócitos e macrófagos no modelo de DPOC

Grande número de mastócitos, na maioria desgranulados foi observado no grupo fumante (Figura 3B e L), comparado ao grupo controle (figura 3A e L). Contudo, ocorreu redução significativa de mastócitos nos grupos fumante tratado (Figura 3C e L) e ex-fumantes tratados ou não com a solução de extratos (Figura 3D, E e L), comparado ao grupo fumante.

As quantificações de macrófagos mostraram maior quantidade dessas células, nos espaços intra-alveolares e nos septos teciduais do grupo fumante (Figura 3G, M e N) comparado ao grupo controle (Figura 3F, M e N) e também redução significativa dos macrófagos, nos grupos fumante tratado e ex-fumantes tratados ou não (Figura 3H, I, J, M e N) comparados ao grupo fumante.

A administração dos fitoterápicos modula a expressão da Anxa1 e do NFκβ

Nas análises de imuno-histoquímica do pulmão, foi observado maior expressão das proteínas AnxA1 (figura 4B, D e L) e NFκβ (figura 4G, I e M) nos grupos fumante e ex-fumante comparado ao tecido normal (figura 4A, F, L e M) e menor imunorreatividade nos grupos fumante e ex-fumante tratados (figura 4C, E, H, J, L e M). O controle de reação (figura 4K) indicou a especificidade da reação.

Redução de mediadores inflamatórios com administração dos extratos de ervas medicinais

A quantificação da citocina IL-1β (Figura 5A) e da quimiocina MCP-1 (Figura 5D) no plasma sanguíneo mostraram aumento significativo desses mediadores no grupo fumante, comparado ao grupo controle e redução significativa nos grupos fumante tratado e ex-fumantes tratados ou não, comparado ao grupo fumante. Similarmente foram observados níveis reduzidos de IL-6 (Figura 5B) nos grupos fumantes e ex-fumantes tratados ou não e de IL-10 (Figura 5C) nos grupos fumantes e ex-fumantes tratados, comparados ao grupo fumante sem tratamento. As dosagens de TNF-α (Figura 5E) mostraram níveis reduzidos nos animais fumantes e ex-fumantes tratados com fitoterápicos.

DISCUSSÃO

O tabagismo pode resultar em inflamação crônica, como a DPOC, com grande morbidade e mortalidade [30]. Nesse cenário, a busca por tratamentos alternativos anti-inflamatórios por meio de plantas medicinais é importante e pode ser bastante eficaz na prevenção e recuperação de tabagistas [1819]. Diante disso desenvolvemos protocolos de exposição ao fumo em ratos e tratamento com ervas medicinais com propriedades anti-inflamatórias e tópicos pela árvore respiratória.

Nas análises do lavado broncoalveolar, foram observados aumentos de células mononucleares como os macrófagos e linfócitos no grupo fumante não tratado, relacionados à destruição dos tecidos, provavelmente, na tentativa de reparar o dano causado pela fumaça do cigarro. Os macrófagos ativados secretam vários mediadores da inflamação, os quais, se não controlados, podem levar a destruição tecidual e fibrose características desse tipo de inflamação [31].

As análises histopatológicas do pulmão mostraram aumento dos espaços intra-alveolares, influxo de células inflamatórias e congestão pulmonar causadas pela exposição à fumaça do cigarro. Semelhante às alterações encontradas por outro pesquisador no mesmo modelo e que indicam tendência de agravamento dos parâmetros de função pulmonar no grupo fumante [14].

Os resultados das análises histopatológicas da traquéia indicaram importante modificação no grupo de fumantes não tratados, com ocorrência da metaplasia do tecido epitelial pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células caliciformes, para o tecido epitelial estratificado pavimentoso. Essa condição compromete a morfofisiologia do órgão e propicia o desenvolvimento de tumores [32].

Contudo, nossos resultados indicaram que o tratamento com fitoterápicos mostrou efeitos protetores, reduzindo o influxo de células inflamatórias no LBA e pulmão e preservando a arquitetura pulmonar e o epitélio da traquéia. O uso dos fitoterápicos *A. lappa*, *M. glomerata spreng.*, *P. major* e *E. spp* aceleraram o processo anti-inflamatório, como demonstrado em outros estudos de lesão pulmonar [33].

Nas quantificações dos mastócitos, foi observada maior quantidade dessas células no grupo fumante comparado aos grupos controle, fumante tratado e ex-fumante. Estudos

indicam a participação dos mastócitos nas resposta à lesões e remodelação estrutural do tecido [34]. Porém, os mastócitos relacionados à exposição da fumaça do cigarro, podem alterar o ambiente celular e auxiliar na progressão da DPOC [35].

Desse modo, a redução no número de mastócitos causada pelo tratamento com os fitoterápicos exerce papel protetor. Após as avaliações histopatológicas e de células inflamatórias, procedemos os estudos imuno-histoquímicos para verificar os perfis de expressão da proteína AnxA1 e do NF κ B. A maior expressão da AnxA1 foi observada nos grupos fumantes e ex-fumantes, comparados ao controle, fumante tratado e ex-fumante tratado. O aumento da proteína durante o processo inflamatório também foi observada em diferentes pesquisas [36] e está relacionada com a ação anti-inflamatória da AnxA1 [37].

A super expressão da proteína AnxA1 foi ainda associada a estudos como a diminuição da expressão de NF κ B, e dos níveis de IL-6 [38]. A contribuição da AnxA1 e do receptor FPR2, foi investigada na regulação de respostas inflamatórias em fibroblastos pulmonares humanos normais. O silenciamento da expressão da AnxA1 nos fibroblastos pelo pequeno RNA de interferência (siRNA) e o bloqueio do FPR2 foram associados a aumentos significantes de TNF- α e IL-6, acompanhados da redução da atividade de quimase reguladoras de sinal extracelular (ERK) e fator de transcrição nuclear KB (NF- κ B). Estes resultados sugerem que a AnxA1 possui potencial terapêutico em doenças pulmonares inflamatórias crônicas [39]

O NF κ B, também foi expresso com maior intensidade nos grupos fumantes e ex-fumantes, comparados aos demais, o que mostra a eficiência da ação anti-inflamatória dos fitoterápicos no modelo estudado. A eficiência na redução do NF κ B pelo tratamento com chá verde, foi observada na uveíte experimental e reforça os efeitos terapêuticos dos fitoterápicos [40].

Na continuidade do trabalho avaliamos os níveis de mediadores inflamatórios no plasma sanguíneo. Níveis elevados das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e da quimiocina MCP-1 foram observados no grupo fumante não tratado o que pode estar associado à contínua inflamação nos tecidos pulmonares, promovidas por células inflamatórias [41,42]. Reduções das dosagens de TNF- α também foram observadas nos grupos ex-fumantes que recebem medicamentos anticolinérgicos [43]. Contudo, nos grupos tratados e ex-fumantes ocorreu redução desses mediadores inflamatórios. Curiosamente a IL-10 que também mostrou aumento no grupo fumante, e redução nos tratados e ex-fumantes, indica um mecanismo de defesa do próprio organismo contra o processo inflamatório do pulmão [44].

Finalmente, as análises bioquímicas mostraram níveis elevados de gama GT no grupo fumante não tratado, em comparação ao grupo fumante tratado com fitoterápicos, indicando que o uso dos fitoterápicos não apresentou toxicidade [29]. Em conjunto nossos resultados indicam os potenciais efeitos anti-inflamatórios e protetores dos extratos de *A. lappa*, *M. glomerata spreng.*, *P. major* e *E. spp.* Administrados em conjunto em modelo de DPOC e apontam esses fitoterápicos como alternativa no combate aos danos causados pela exposição da fumaça do cigarro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLANCHARD JF, ARMENIAN HK, FRISEN PP. Risk factors for abdominal aortic aneurysm: results of a case-control study. *Am J Epidemiology* 2000;151:575e83
2. NELSON E. The miseries of passive smoking. *Hum Exp Toxicol.* 2001;20(2):61-83.
3. SODE BF, NORDESTGAARD BG, GRØNBÆK M, DAHL M. Tobacco smoking and aortic aneurysm: two population-based studies. *Int J Cardiol* 2012 Jun 20
4. RODRIGO GIBIN JALDIN, EDSON CASTARDELLI, JULIANA ELAINE PEROBELLI, WINSTON BONETTI YOSHIDA, ANTONIO DE CASTRO RODRIGUES, JULIO LOPES SEQUEIRA, AND SERGIO ALBERTO RUPP PAIVA. Morphologic and Biomechanical Changes of Thoracic and Abdominal Aorta in a Rat Model of Cigarette Smoke Exposure. *Ann Vasc Surg* 2013; 27: 791–800
5. RABEL KF, HURD S, ANZUETO A, BARNES PJ, BUIST SA, CALVERLEY P, FUKUCHI Y, JENKINS C, RODRIGUEZ-ROISIN R, VAN WEEL C, ZIELINSKI J; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176(6): 532-555.
6. BURKHARDT R, PANKOW W. Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) - Rational Diagnostics and Therapy. *Pneumologie.* 2016 Aug;70(8):533-45. doi: 10.1055/s-0042-109997. Epub 2016 Aug 11.
7. SARIR H, HENRICKS PA, VAN HOUWELINGEN AH, NIJKAMP FP, FOLKERTS G. Cells, mediators and Toll-like receptors in COPD. *Eur J Pharmacol.* 2008; 585(2-3): 346-353.
8. COMPTON C, *et al* The Novartis view on emerging drugs and novel targets for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 26 (2013) 562e57.
9. CARAMORI, G. *et al.* Cytokine inhibition in the treatment of COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 9, p. 397-412, 2014. ISSN 1178-2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24812504> >.

10. BOZINOVSKI S., ANTHONY D., VLAHOS R., Targeting pro-resolution pathways to combat chronic inflammation in COPD *J Thorac Dis* 2014;6(11):1548-1556.
11. CORMINBOEUF O, LEROY X. FPR2/ALXR. Agonists and the resolution of inflammation. *J Med Chem.* 2015 Jan 22;58(2):537-59.
12. JEFFERSON BRAGA SILVA; ANAJARA GAZZALLE; LUCAS FERNANDO MATTOS MANO; FERNANDA COCOLICHIO; JULIANA TONIETTO ZAMPIERI; ALICE CARDOSO PELLIZZARI É possível validar estatisticamente um dispositivo experimental com 10 ratos, de baixo custo, para pesquisa em tabagismo passivo? *Rev. Bras. Cir. Plást.* 2011; 26(2): 194-7
13. GENG WY, LIU ZB, SONG NN, ZHANG GH, JIN WZ, ZHOU W, LI L, CAO YX, ZHU DN, SHEN LL. Effects of electroacupuncture at Zusanli (ST36) on inflammatory cytokines in a rat model of smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *J Integr Med.* 2013; 11(3): 213-219.
14. RODRIGO DE LAS HERAS KOZMA, EDSON MARCELINO ALVES, VALTER ABRAÃO BARBOSA-DE-OLIVEIRA, FERNANDA DEGOBBI TENORIO QUIRINO DOS SANTOS LOPES, RENAN CENIZE GUARDIA, HENRIQUE VIVI BUZO, CAROLINA ARRUDA DE FARIA, CAMILA YAMASHITA, MANZELIO CAVAZZANA JÚNIOR, FERNANDO FREI, MARIA JOSÉ DE OLIVEIRA RIBEIRO-PAES, JOÃO TADEU RIBEIRO-PAES. Um novo modelo experimental murino de enfisema: enfisema induzido pela fumaça do cigarro em ratos Wistar* *J Bras Pneumol.* 2014;40(1):46-54.
15. WRIGHT JL, CHURG A. Animal models of COPD: Barriers, successes, and challenges. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008; 21(5): 696-698.
16. ZHENG H, LIU Y, HUANG T, FANG Z, LI G, HE S. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke. *Toxicol Lett.* 2009; 189(3): 225-234.
17. ZHOU S, WRIGHT JL, LIU J, SIN DD, CHURG A (2013) Aging does not Enhance Experimental Cigarette Smoke-Induced COPD in the Mouse. *PLoS ONE* 8(8): e71410. 2013
18. HÄRTEL U, VOLGER E: use and acceptance of classical natural and alternative medicine in germany--findings of a representative population-based survey. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd* 2004, 11(6):327-334.

19. BRUNNING, M, C. R.; MOSEQUI, G. B., G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, 17(10):2675-2685, 2012
20. HOLETZ FB, PESSINI GL, SANCHES NR, CORTEZ DA, NAKAMURA CV, FILHO BP: Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2002, 97(7):1027-1031.
21. RASCHETTI R, MENNITI-IPPOLITO F, FORCELLA E, BIANCHI C: Complementary and alternative medicine in the scientific literature. **J Altern Complement Med** 2005, 11(1):209-212.
22. GUIZARDI FL, PINHEIRO R. Novas práticas sociais na constituição do direito à saúde: a experiência de um movimento fitoterápico comunitário. **Interface Comun Saúde Educ** 2008; 12(24):109-122.
23. MENNITI-IPPOLITO F, FORCELLA E, BOLOGNA E, GARGIULO L, TRAVERSA G, RASCHETTI R: Use of unconventional medicine in children in Italy. **Eur J Pediatr** 2002, 161(12):690.
24. MENNITI-IPPOLITO F, MAZZANTI G, SANTUCCIO C, MORO PA, CALAPAI G, FIRENZUOLI F, VALERI A, RASCHETTI R: Surveillance of suspected adverse reactions to natural health products in Italy. **Pharmacoepidemiol Drug Saf** 2008, 17(6):626-635.
25. FREITAS TP, SILVEIRA PC, ROCHA LG, REZIN GT, ROCHA J, CITADINI-ZANETTE V, ROMÃO PT, DAL-PIZZOL F, PINHO RA, ANDRADE VM, STRECK EL. Effects of *Mikania glomerata* Spreng. and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) extracts on pulmonary inflammation and oxidative stress caused by acute coal dust exposure. **J Med Food**. 2008 Dec;11(4):761-6. doi: 10.1089/jmf.2008.0051.
26. FAROKHI F, KHANESHI F. Histopathologic changes of lung in asthmatic male rats treated with hydro-alcoholic extract of *Plantago major* and theophylline. **Avicenna J Phytomed**. 2013 Spring;3(2):143-51.
27. DI GIORGIO C., BOYER L., DE MEO M., LAURANT C., ELIAS R., OLLIVIER E. In vitro and in vivo antimutagenic effects of DIG, a herbal preparation of *Berberis vulgaris*, *Taraxacum officinale* and *Arctium lappa*, against mitomycin C. **J Nat Med**. 2015 Jul;69(3):267-77. doi: 10.1007/s11418-015-0886-8. Epub 2015 Feb 10.

28. MOUCO G., BERNARDINO M.J., CORNÉLIO M.L. Controle de qualidade de ervas medicinais. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. Ed. Nº31. Julho 2003.
29. DESOTI V.C., MALDANER C.L., CARLETTO M.S., HEINZ A.A., COELHO M.S., PIATI D., TIUMAN T.S., Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobianas e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. *Arq. Ciên. Saúde UNIPAR, Umuarama*, v.15, n.1, p. 3-13, jan/abril 2011.
30. LEUNG JM, CHEN V, HOLLANDER Z, DAI D, TEBBUTT SJ, AARON SD, VANDEMHEEN KL, RENNARD SI, FITZGERALD JM, WOODRUFF PG, LAZARUS SC, CONNETT JE, COXSON HO, MILLER B, BORCHERS C, MCMANUS BM, NG RT, SIN DD. COPD Exacerbation Biomarkers Validated Using Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry. **PLoS One**. 2016 Aug 15;11(8):e0161129. doi: 10.1371/journal.pone.0161129.
31. SUNDBLAD BM, JI J, LEVÄNEN B, MIDANDER K, JULANDER A, LARSSON K, PALMBERG L, LINDÉN A. Extracellular cadmium in the bronchoalveolar space of long-term tobacco smokers with and without COPD and its association with inflammation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016 May 11;11:1005-13. doi: 10.2147/COPD.S105234. eCollection 2016.
32. RIGDEN HM, ALIAS A, HAVELOCK T, O'DONNELL R, DJUKANOVIC R, DAVIES DE, WILSON SJ. Squamous Metaplasia Is Increased in the Bronchial Epithelium of Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS One*. 2016 May 26;11(5):e0156009. doi: 10.1371/journal.pone.0156009. eCollection 2016.
33. XU NY, CHU CJ, XIA L, ZHANG J, CHEN DF. Protective effects of *Rabdosia japonica* var. *glaucocalyx* extract on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Chin J Nat Med*. 2015 Oct;13(10):767-75. doi: 10.1016/S1875-5364(15)30077-7.
34. VIRK H, ARTHUR G, BRADDING P. Mast cells and their activation in lung disease. *Transl Res*. 2016 Aug;174:60-76. doi: 10.1016/j.trsl.2016.01.005. Epub 2016 Jan 20.
35. LI H, YANG T, NING Q, LI F, CHEN T, YAO Y, SUN Z. Cigarette smoke extract-treated mast cells promote alveolar macrophage infiltration and polarization in experimental chronic obstructive pulmonary disease. *Inhal Toxicol*. 2015;27(14):822-31. doi: 10.3109/08958378.2015.1116644.

36. HE XD, WANG Y, WU Q, WANG HX, CHEN ZD, ZHENG RS, WANG ZS, WANG JB, YANG AY. Xuebijing Protects Rats from Sepsis Challenged with *Acinetobacter baumannii* by Promoting Annexin A1 Expression and Inhibiting Proinflammatory Cytokines Secretion. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2013, Article ID 804940, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/804940>.
37. GIROL, A. P. et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. **J Immunol**, v. 190, n. 11, p. 5689-701, Jun 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23645879> >.
38. KIANI-ESFAHANI A, KAZEMI SHEYKSHABANI S, PEYMANI M, HASHEMI MS, GHAEDI K, NASR-ESFAHANI MH. Overexpression of Annexin A1 Suppresses Pro-Inflammatory Factors in PC12 Cells Induced by 1-Methyl-4-Phenylpyridinium. *Cell J*. 2016 Jul-Sep;18(2):197-204. Epub 2016 May 30.
39. JIA Y, MORAND EF, SONG W, CHENG Q, STEWART A, YANG YH. Regulation of lung fibroblast activation by annexin A1. *J Cell Physiol*. 2013 Feb;228(2):476-84. doi: 10.1002/jcp.24156.
40. QIN YJ , CHU KO, YIP YWY, LI WY , YANG YP, CHAN KP, REN JL, CHAN SO, PANG CP. Green Tea Extract Treatment Alleviates Ocular Inflammation in a Rat Model of Endotoxin-Induced Uveitis. *PLOS ONE*. August 5, 2014.
41. CROTTY ALEXANDER LE, SHIN S, HWANG JH. Inflammatory Diseases of the Lung Induced by Conventional Cigarette Smoke: A Review. *Chest*. 2015 Nov;148(5):1307-22. doi: 10.1378/chest.15-0409.
42. KASTELEIN TE, DUFFIELD R, MARINO FE. Acute Immune-Inflammatory Responses to a Single Bout of Aerobic Exercise in Smokers; The Effect of Smoking History and Status. *Front Immunol*. 2015 Dec 23;6:634. doi: 10.3389/fimmu.2015.00634. eCollection 2015.
43. BERENSON CS, KRUZEL RL, SETHI S. The Impact of Exogenous Factors on Respiratory Pathogen-Induced Innate Alveolar Macrophage Responses in COPD. *Immunol Invest*. 2016;45(2):130-47. doi: 10.3109/08820139.2015.1113427. Epub 2016 Feb 6.

44. J.Y. WU, Z.H. XIONG, G.Z. XIONG, F.Q. DING, J. LEI, S. LU, Y. LI, G.M. HE, L.L. ZHAO AND Z.J. LIU. Protective effect of interleukin-10 and recombinant human keratinocyte growth factor-2 on ventilation-induced lung injury in rats. Genet. Mol. Res. 14 (4): 15642-15651 (2015).

Acknowledgments: To FIPA.

Correspondence:

Ana Paula Girol

Department of Physical and Biological Sciences, Integrated College Padre Albino Foundation (FIPA), Rua dos Estudantes, 225, Catanduva, SP, Brazil, 15.809-144

Tel.: +55-17-3311-3340/3361

e-mail: anapaulagirol@hotmail.com

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Figura 1- Análise quantitativa do lavado bronco alveolar – Macrófagos (A) e linfócitos (B). Resultados apresentados como média \pm S.E.M. (n=10), *** $p < 0,001$ vs controle; ## $p < 0,01$ vs fumante sem tratamento. **Análises Bioquímicas do plasma sanguíneo.** Colesterol total (C), Glicose (D), Gama GT. Dados como Média \pm SEM. *** $p < 0,001$ vs controle; ### $p < 0,001$ vs fumante não tratado.

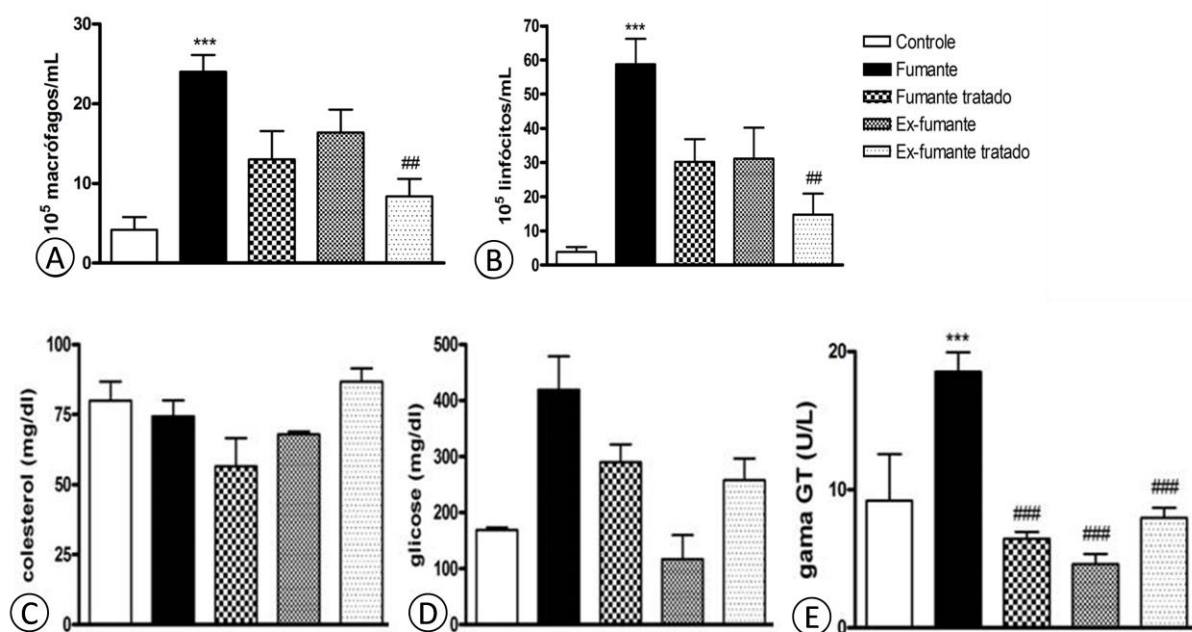


Figura 2. Análises Histopatológicas dos pulmões. Pulmão controle com aspecto normal (A e B) pulmões das ratas fumantes não tratadas (C e D). Redução da inflamação e congestão nos pulmões dos animais fumantes tratados com fitoterápicos (E e F). Ex-fumantes não tratadas (G e H) e ex-fumantes tratadas com fitoterápicos (I e J). Coloração: HE. Barras: 10 μ m.

Medida dos espaços intra-alveolares. Aumento significativo nos grupos fumante e ex-fumante, comparado ao grupo controle, e redução significativa nos grupos tratados, comparados ao sem tratamento (K). Dados como Média \pm SEM. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ vs controle; ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ vs fumante não tratado; &&& $p < 0,001$ vs fumante tratado e $\alpha\alpha\alpha$ $p < 0,001$ vs ex-fumante.

Análises Histopatológicas das traquéias. Controle com epitélio respiratório normal (L). Metaplasia nos animais expostos ao fumo e não tratados (M) Epitélio respiratório conservado, com presença de cílios nos fumantes tratados (N), início de metaplasia, com ausência de cílios no grupo ex-fumante não tratado (O), Grupo ex-fumante tratado com uma recuperação do tecido e preservação dos cílios (P). Os detalhes representam ampliações das áreas tracejadas. Coloração: HE. Barras: 10 μ m.

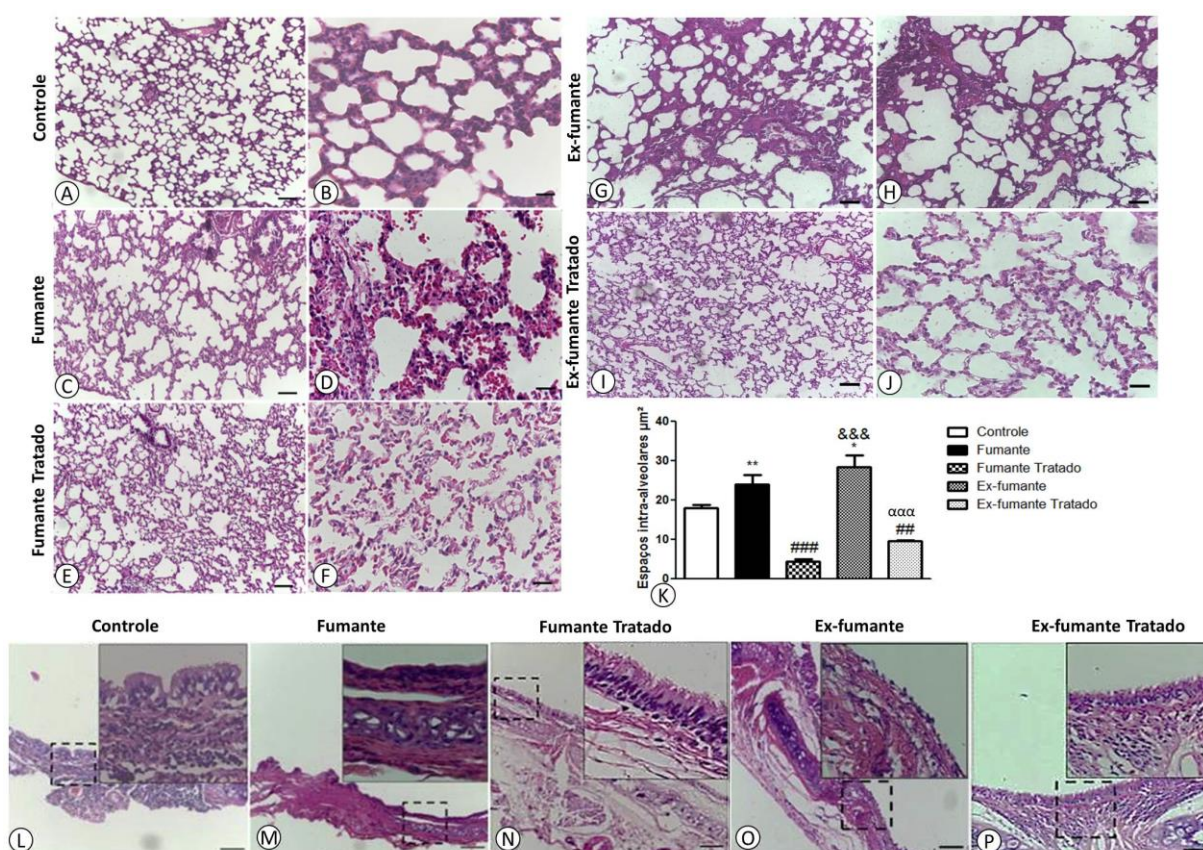


Figura 3 – Mastócitos nos grupos controle (A), Fumante (B), Fumante Tratado (C), Ex-fumante (D) e Ex-fumante Tratado (E). Macrófagos por imuno-histoquímica nos grupos controle (F), fumante (G), fumante tratado (H), ex-fumante (I), ex-fumante tratado (J) e ausência de reatividade no controle da reação (K). Contra-coloração: Hematoxilina. Barras: 50µm. Quantificações dos mastócitos (L) e macrófagos intra-alveolares e presentes nos septos teciduais (M e N). Valores obtidos expressos como média \pm S.E.M. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs controle; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs fumante.

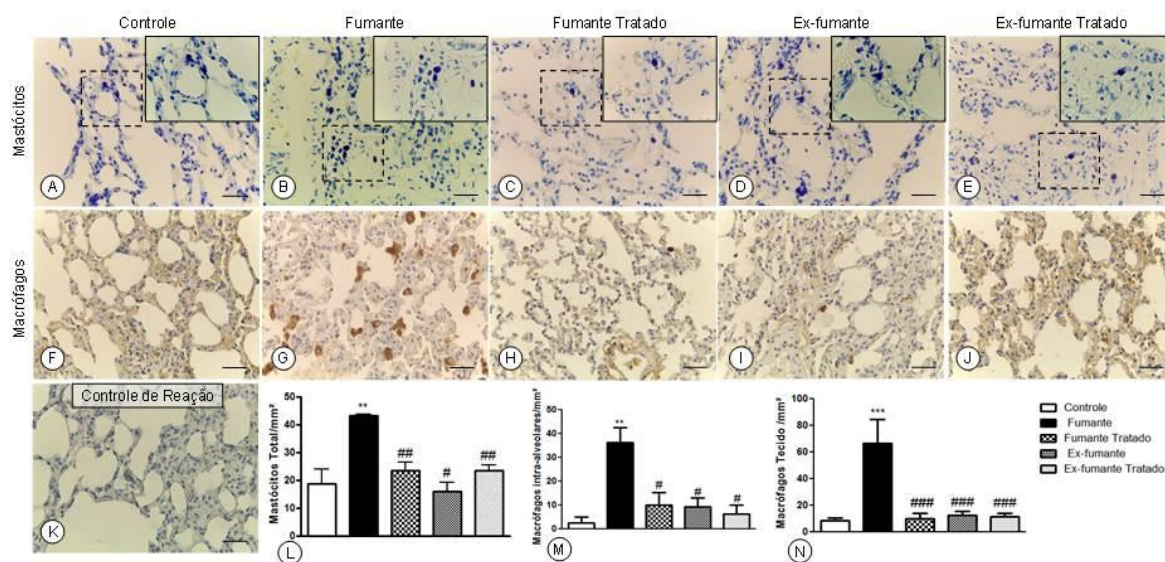


Figura 4 – Análise da expressão da AnxA1 e NFκ-β, respectivamente, nos grupos controle (A e F), grupo fumante (B e G), grupo fumante tratado (C e H), grupo ex-fumante (D e I), grupo ex-fumante tratado (E e J). Ausência de marcação no controle de reação (K). Contra-coloração: Hematoxilina. Barras: 50µm. Análises densitométricas de AnxA1 (L) e NFκ-β (M). Valores obtidos expressos como média ± S.E.M. * p<0,05; ** p<0,01 vs controle; # p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001 vs fumante α p<0,05 vs ex-fumante e &&& p<0,001 vs fumante tratado.

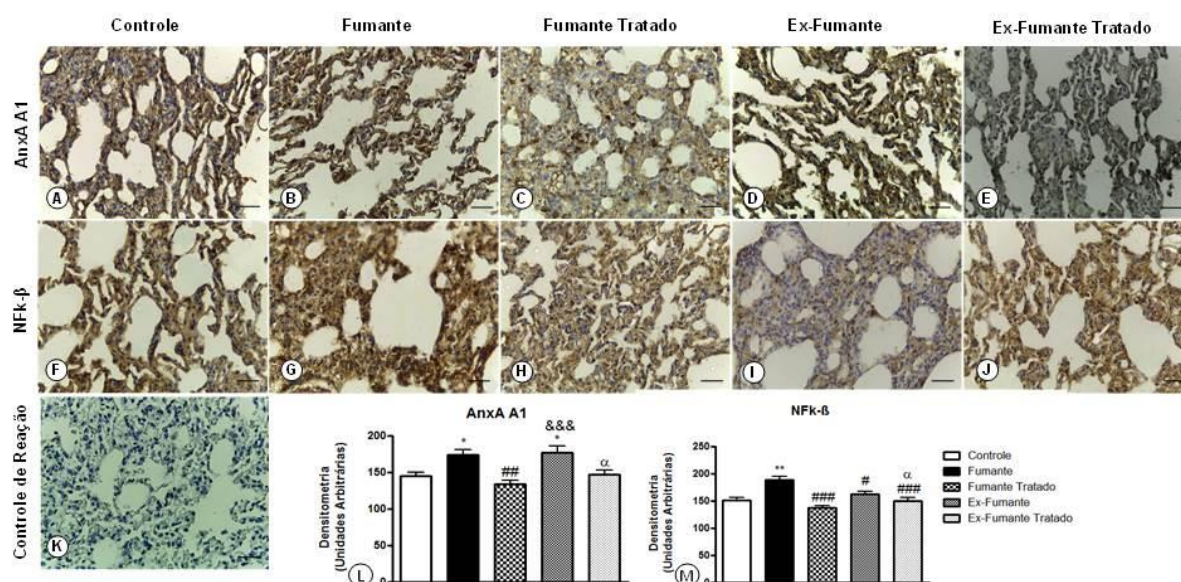
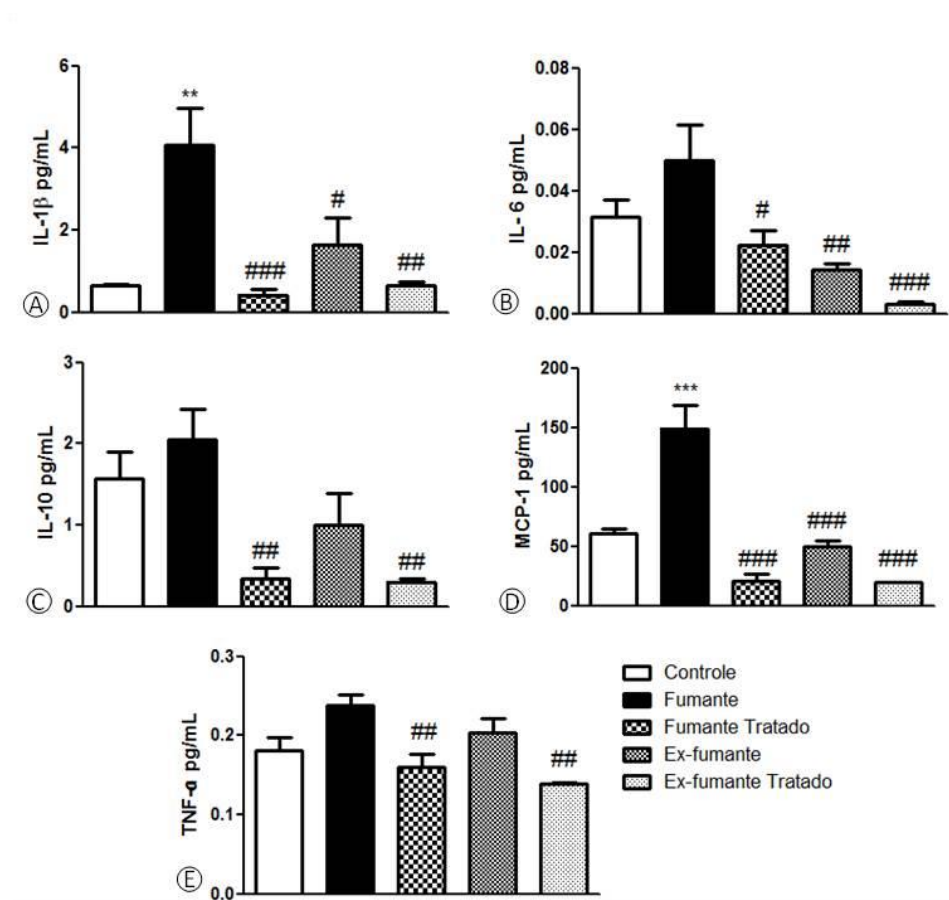


Figura 5 – Análise de citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C) e TNF- α (E), e Quimiocina MCP-1 (D) pelo MAGPIX nos grupos controle, fumante, fumante tratado, ex-fumante, ex-fumante tratado. Valores obtidos expressos como média \pm S.E.M. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs fumante.





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 06/03/2017

Assinatura do autor