Nathalia Montouro Pinheiro

Efeito da redução da função colinérgica na mecânica pulmonar e na histopatologia pulmonar em modelo experimental de inflamação aguda induzida por instilação de LPS em camundongos geneticamente modificados

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título
de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Processos Inflamatórios
e Alérgicos
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Máximo Prado

**São Paulo
2016**

Nathalia Montouro Pinheiro

**Efeito da Redução da Função Colinérgica na Mecânica Pulmonar e na
Histopatologia Pulmonar em Modelo Experimental de Inflamação Aguda
Induzida por Instilação de LPS em Camundongos Geneticamente
Modificados**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título de
Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientadora: Prof^ª. Dr^a. Carla Máximo Prado

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pinheiro, Nathalia Montouro

Efeito da redução da função colinérgica na mecânica pulmonar e na histopatologia pulmonar em modelo experimental de inflamação aguda induzida por instilação de LPS em camundongos geneticamente modificados / Nathalia Montouro Pinheiro. -- São Paulo, 2016.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientadora: Carla Máximo Prado.

Descritores: 1.Proteínas vesiculares de transporte de acetilcolina 2.Lesão pulmonar aguda 3.Acetilcolina 4.Receptor nicotínico de acetilcolina alfa7 5.Modelos animais 6.Camundongos 7.Pneumonia

USP/FM/DBD-092/16

Ninguém poderá jamais aperfeiçoar-se, se não tiver o mundo como mestre.
A experiência se adquire na prática.
(William Shakespeare)

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais,
Ao Renato,
Ao João e
À Júlia**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Carla Máximo Prado pela oportunidade, dedicação e paciência para ensinar quando ainda não tinha experiência e nem conhecimento de laboratório. Sempre muito atenciosa e pronta para ajudar a qualquer hora e qualquer dia. Por ter sido uma de suas primeiras alunas na iniciação científica, e hoje ser sua primeira aluna de doutorado, pude ver a linha de pesquisa que você começou do zero: que com sua orientação e determinação, mesmo com todas as adversidades, está ficando cada vez mais consolidada, sólida e gerando grandes frutos. Todo aprendizado adquirido contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada por toda sua ajuda em todos os momentos, carinho, confiança em mim depositada e pela amizade.

Aos meus pais Nilton dos Santos Pinheiro e Tânia Regina Montouro Pinheiro por todo amor que sempre dedicaram a nossa família, apoio, incentivo, ensinamentos de respeito, integridade. Hoje só estou aqui graças a tudo que vocês me ofereceram durante todos esses anos. Agradeço a deus por ter nascido filha de vocês. Amo vocês.

Ao meu marido Renato Herculano Menegasso por toda dedicação, todo amor, toda paciência e por sempre me apoiar em minhas decisões. E ao pai exemplar que você é para nossa pequena Júlia, sem você seria inviável ter conseguido finalizar minha tese, obrigada por me apoiar e me ajudar em todos momentos de insegurança. Amo muito você.

Ao João meu sobrinho amado e meu primeiro amor de mãe: obrigada por estar sempre ao meu lado com seu jeito meigo e carinhoso com o amor mais puro que existe.

À Júlia minha filha amada, que chegou para fechar minha tese com chave de ouro e tornar minha vida completa. Em tão pouco tempo já me ensinou a ser uma pessoa mais paciente, mais forte e mais determinada. Que encheu minha vida de felicidade e amor, e me motiva a seguir sempre em frente.

Aos meus irmãos Renan Montouro Pinheiro e Guilherme Montouro Pinheiro por estarem sempre presentes em todos os momentos de minha vida, amo muito vocês.

À Adenir Perini, por ter me transmitido muito de sua experiência profissional, muito disposta a ajudar e sempre pronta para todos os experimentos longos, com uma energia super positiva para nos acompanhar.

À Fernanda P.R Santana, obrigada por trazer alegria para os experimentos, fazer com que os dias fiquem mais leves e mais fáceis, trabalhar com você é muito bom e me proporcionou um grande crescimento. Espero que ainda possamos trabalhar muito juntas no futuro. Ao longo desses anos de convivência (e coincidências) se tornou uma grande amiga para mim.

À Claudia J.C.P. Miranda, começamos juntas esse desafio da pesquisa, e caminhamos bem juntas, superamos muitas adversidades, desabafamos muito, compartilhamos alegrias e frustrações. Esta jornada nos rendeu uma grande amizade, muito carinho e admiração.

À Rosana Banzato, sempre muito organizada, dedicada e ética. Uma grande companheira da minha jornada científica. Muito obrigada pela amizade e carinho.

À Marcia I.B. Mernak muito obrigada por estar sempre disposta a ajudar e pela amizade.

À Professora Luciana Caperuto por todos os ensinamentos, sempre muito disposta a ensinar e ajudar. Obrigada por sempre me acolher em seu laboratório.

À Fernanda Lopes pelos ensinamentos nas leituras de lâminas, paciência para me ensinar quando cheguei na iniciação científica, e todo o auxílio e ensinamentos nos dias de mecânica.

À professora Suzete M. Cerutti pela simpatia e paciência nos dias que todos os alunos se juntam no laboratório, sempre com sorriso no rosto e sempre disposta a ajudar.

Ao Professor Milton de Arruda Martins, por disponibilizar o laboratório, nos receber e possibilitar o andamento do meu projeto.

Aos meus amigos do LIM 20: Francine Almeida, Clarice R. Olivo, Edna Leick, Luiz Afonso, Fernanda Arantes, Beatriz Saraiva e Iolanda F.C. Tibério: aprendi muito com vocês.

À Rosana Paz por sempre disposta ajudar.

Ao Davi sempre atencioso e muito prestativo.

Aos alunos do laboratório 22 pelo convívio e troca de experiências.

À Fapesp pelo apoio financeiro – Projeto 2010/13363-6 e 2013/02881-4,
Projeto Jovem Pesquisador n.2008/5539-5
CNPq- Edital universal n. 471224/2009-0

O MEU MUITO OBRIGADA A TODOS !!!

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ªed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. Introdução.....	1
1.1. Síndrome do desconforto respiratório aguda (SDRA) e lesão pulmonar aguda (LPA).....	2
1.1.1. Histórico e definição	2
1.1.2. Epidemiologia.....	4
1.1.3. Fisiopatologia	4
1.2. Acetilcolina	14
1.3. Modelos experimentais de inflamação pulmonar aguda	24
1.4. Justificativa do estudo	25
2. Objetivo	28
3. Material e Métodos	29
3.1. Experimento I – Efeito da redução de VAcHT na função e na histopatologia pulmonar.....	30
3.1.1. Tempo de grade	31
3.1.2. Avaliação da mecânica do sistema respiratório	31
3.1.3. Lavado broncoalveolar (LBA)	32
3.1.4. Estudo morfométrico	33
3.1.4.1. Remodelamento brônquico.....	34
3.1.4.2. Imunohistoquímica para detecção de NF-kB, MMP-9 e TIMP-1	35
3.1.4.3. Avaliação de células inflamatórias ao redor das vias aéreas e do edema peribrônquico	36
3.1.5. Quantificação de proteína total no homogenato de pulmão no LBA	37

3.1.6. Elisa para detecção de IL-6, IL-10, IL-4, IL-13 e TNF- α	37
3.1.7. Western blot para detecção de dos componentes colinérgicos.....	37
3.1.8. Extração de RNA e transcrição reversa e quantitativa em tempo real (real time qRT-PCR)	40
3.2. Experimento II – Efeito da redução de VACHT na lesão pulmonar aguda induzida pela instilação intratraqueal e intraperitoneal de LPS.....	42
3.2.1. Protocolo de instilação de LPS intraqueal	43
3.2.2. Protocolo de instilação de LPS intraperitoneal	43
3.2.3. Tratamento com PNU nos animais VACHT	43
3.2.4. Tratamento com pilocarpina nos animais VACHT	44
3.2.5. Mecânica pulmonar	44
3.2.6. Imunohistoquímica para detecção de macrófagos alveolares MAC-2....	45
3.3. Experimento III – O potencial efeito terapêutico do PNU, $\alpha 7$ em modelo de LPS em C57Bl6.	45
3.3.1. Grupos Experimentais	45
3.3.2. Protocolo de tratamento com PNU	46
3.3.3. Imunohistoquímica para detecção de metaloproteinases e TIMP-1	46
3.3.4. Western blot para detecção NF- κ B	46
3.3.5. Extração de RNA e transcrição reversa e quantitativa em tempo real (real time qRT-PCR)	46
3.4. Análise dos Resultados	47
4. Resultados	48
4.1. Experimento I – Efeito da redução de VACHT na função e na histopatologia pulmonar.....	49
4.1.1. Teste de função motora	49
4.1.2. Quantificação dos níveis VACHT no pulmão e na medula espinal	50

4.1.3. Quantificação da expressão das proteínas AChE, M2, CHT1 e $\alpha 7$ nAChR no homogenato pulmonar pulmão	51
4.1.4. Análise do LBA e de células inflamatórias no tecido pulmonar	52
4.1.5. ELISA para análise de citocinas no tecido pulmonar	54
4.1.6. A deficiência de VACHT modula as vias p65-NF-kB e JAK-2-STAT-3 no pulmão	54
4.1.7. Efeitos da deficiência de VACHT na deposição de MEC nas vias aéreas.....	59
4.1.8. A deficiência de VACHT aumenta a resistência e elastância do sistema respiratório	62
4.2. Experimento II – Efeito da redução de VACHT na lesão pulmonar aguda induzida pela instilação intratraqueal e intraperitoneal de LPS.....	64
4.2.1. Células inflamatórias no LBA ao longo do tempo.....	64
4.2.2. Medidas de mecânica respiratória.....	66
4.2.3. Imunohistoquímica para MAC-2	68
4.2.4. Imunohistoquímica para NF-kB	69
4.2.5. Fibras de colágeno	70
4.2.6. LBA animais que receberam LPS intraperitoneal	71
4.2.7. Lavado broncoalveolar	72
4.3. Experimento III – O potencial efeito terapêutico do PNU, $\alpha 7$ em modelo de LPS em C57Bl/6	74
4.3.1. Curva dose-resposta do PNU em células inflamatórias do LBA.....	74
4.3.2. Efeitos do PNU na proteína total e nas citocinas do BALF	76
4.3.3. Efeitos do PNU no perfil dos macrófagos M1 / M2.....	78
4.3.4. Efeitos de PNU sobre os níveis de NF-kB em pulmão	81

4.3.5. Efeitos do PNU na deposição de fibras de colágeno e na expressão de MMP-9, MMP-2 e TIMP-1 no parênquima pulmonar	82
4.3.6. Efeitos do PNU na função pulmonar e na perda de peso corpóreo	84
5. Discussão	86
6. Conclusão	102
7. Referências	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
$\alpha 7$nAChR	Receptor nicotínico $\alpha 7$
Ch	Colina
ChAT	Acetiltransferase
CHT1	Transportador de colina de alta afinidade
cmH₂O	Centímetros de água
DAB	3,3 Diaminobenzidine
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPOC	Doença obstrutiva crônica
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Ers	Elastância do Sistema Respiratório
f	Frequência
G	Dissipação de energia nos tecidos pulmonares
GM-CSF	Fator estimulador de macrófagos
Gtis	Resistência do Tecido Pulmonar
H	Energia acumulada no tecido do pulmão
HE	Hematoxilina Eosina
Htis	Elastância do Tecido Pulmonar
i	Unidade imaginária
I_{aw}	Inertância
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
I-κB	Inibidor Nuclear kappa B
IFN-γ	Interferon -Gama
IL	Interleucina
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos, keratinocyte-derived chemokine
JAK2	Janus Quinase 2
LBA	Lavado Broncoalveolar
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
M1-M5	Receptores Muscarínicos
M2AChR	Receptor Muscarínico do Tipo 2
M3AChR	Receptor Muscarínico do Tipo 3
MEC	Matriz extracelular

MMP	Metaloproteinase, do inglês metalloproteinase
MPO	Meloperoxidase
MN	Mononucleares
mAChR	Receptores muscarínicos
nAChRs	Receptores nicotínicos
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
NO	Oxido nítrico
O2	Oxigênio
ONOO-	Peroxinitrito
Pao	Pressão de Abertura das Vias Aéreas
PaO2/FiO2	Relação entre pressão parcial de oxigênio arterial e fração inspirada de oxigênio
PBS	Tampão fosfato salina
Pcyl	Pressão Interna do Cilindro
PGF2	Prostaglandina F2
PGP	Peptídeo N-Acetil-Pro-Gly-Pro
PMN	Polimorfonuclear
Ptr	Pressão traqueal
Raw	Resistência de Vias Aéreas
RFO	Resorcina Fucsina
rpm	Rotação por minutos
Rsr	Resistência do Sistema Respiratório
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SOCS3	Proteína Anti-inflamatória
STAT3	Fator de Transcrição
Th1	Células T helper tipo I
Th2	Células T helper tipo II
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TNF-α	Fator de necrose tumoral, do inglês tumor necrosis fator alpha
UTI	Unidade de terapia intensiva
V	Volume
V'	Fluxo
VACHT	Proteína Transportadora Vesicular de Acetilcolina
Vcyl	Posição do Pistão
Zrs	Impedância do Sistema Respiratório

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fisiopatologia da SDRA.....	5
Figura 2.	Representação esquemática das fases da SDRA.....	6
Figura 3.	Síntese da ACh.....	15
Figura 4.	Reflexo inflamatório.....	19
Figura 5.	Efeitos da ACh.....	22
Figura 6.	Mecanismos envolvidos na resposta colinérgica anti-inflamatória	23
Figura 7.	Tempo de Sustentação na grade e peso.....	49
Figura 8.	Expressão Genica e Proteica do VACHT.....	50
Figura 9.	Componentes Colinérgicos no pulmão.....	51
Figura 10.	Edema e inflamação pulmonar.....	53
Figura 11.	Citocinas no homogenato pulmonar.....	56
Figura 12.	Expressão de NF-kB no pulmão.....	57
Figura 13.	Expressão da via JAK/STAT.....	58
Figura 14.	Remodelamento de vias aéreas.....	61
Figura 15.	Mecânica Pulmonar.....	63
Figura 16.	Células inflamatórias no LBA ao longo do tempo.....	65
Figura 17.	Mecânica pulmonar no modelo de LPS.....	67
Figura 18.	Células positivas para MAC-2 no tecido pulmonar.....	68
Figura 19.	Células positivas para NF-kB no tecido pulmonar.....	69
Figura 20.	Fibras de Colágeno no tecido pulmonar	70
Figura 21.	LBA dos animais que receberam LPS intraperitoneal	71
Figura 22.	Efeito do estímulo de mAChR e nAChR no BAL	73
Figura 23.	Células totais do LBA	75
Figura 24.	Quantificação de citocinas e proteína total no BAL.....	77
Figura 25.	Expressão genica de macrófagos do tipo I.....	79
Figura 26.	Expressão genica de macrófagos do tipo II.....	80
Figura 27.	Expressão da proteína NF-kB.....	81
Figura 28.	Fibras de colágeno	82
Figura 29.	Componentes da MEC.....	83
Figura 30.	Mecânica Pulmonar e peso corpóreo.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Citocinas e seus efeitos na SDRA.....	9
Tabela 2.	Primes para qRT-PCR.....	47

RESUMO

Pinheiro NM. *Efeito da redução da função colinérgica na mecânica pulmonar e na histopatologia pulmonar em modelo experimental de inflamação aguda induzida por instilação de LPS em camundongos geneticamente modificados* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A lesão pulmonar aguda (LPA) é caracterizada por inflamação pulmonar de início súbito com recrutamento de polimorfonucleares e liberação de mediadores pró-inflamatórios. É uma condição grave que evolui com óbito em aproximadamente 40% dos casos. Diversos estudos que elucidaram a fisiopatologia da LPA, o tratamento ainda é insatisfatório. O sistema colinérgico anti-inflamatório foi descrito no pulmão e está relacionado a um reflexo via nervo vago que inibe a liberação de citocinas inflamatórias por efeitos relacionados a ação da acetilcolina em receptores nicotínicos. Nossa hipótese é de que a redução de VACHT, que está relacionada ao déficit na liberação de ACh, module a resposta inflamatória pulmonar em modelo de LPS. **Objetivo:** 1. Avaliar se a deficiência de VACHT modula a resposta pulmonar em animais geneticamente modificados; 2. Avaliar se a deficiência colinérgica induzida por redução de VACHT está envolvida na resposta pulmonar ao LPS e elucidar alguns mecanismos envolvidos; 3. Avaliar o potencial terapêutico do PNU, um agonista de $\alpha 7$ nAChR nas alterações funcionais e histopatológicas em modelo de LPA em animais C57Bl6. **Metodologia:** Foram utilizados camundongos machos geneticamente modificados mutante (VACHT KD^{HOM}) ou selvagem (WT) e C57BL/6. Inicialmente avaliamos a função pulmonar e a histopatologia pulmonar em animais VACHT KD^{HOM}. Após, animais WT e VACHT KD^{HOM} receberam instilação intranasal de LPS ou salina e a resposta inflamatória foi avaliada de 1,5h até 72 horas após. Ainda, foi avaliado a resposta pulmonar em VACHT KD^{HOM} e WT após a instilação de LPS intraperitoneal. Por fim, animais C57BL/6 instilados com LPS intranasal, receberam tratamento prévio ou após com PNU, agonista do receptor nicotínico $\alpha 7$. **Resultados:** Animais mutante apresentaram maior quantidade de células recuperadas no lavado bronco alveolar (LBA) e aumento de citocinas pró-inflamatórias, aumento de edema peribronquico e piora da função pulmonar. Ainda, observamos aumento da expressão de NF-kB e redução de JAK2. A deficiência de VACHT induziu aumento de células inflamatórias em animais que receberam LPS somente em 1.5h após a indução, sendo os valores iguais aos dos animais WT em 24 e 72 horas. Nos animais WT, o estímulo do receptor nicotínico melhora a inflamação, enquanto o estímulo de receptores muscarínicos parece contribuir com a piora da resposta da inflamação pulmonar. Os efeitos do PNU parecem que dependem da via colinérgica intacta, uma vez que esta droga não teve o mesmo efeito em animais mutante. Entretanto, o tratamento com PNU em animais C57BL/6 reduziu a inflamação, a produção de citocinas, a deposição de colágeno no tecido pulmonar e os níveis de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1, melhorando a função pulmonar. Estes efeitos parecem estar associados a redução de macrófagos perfil M1, e a inibição de NF-kB.

Conclusão: Estes dados claramente demonstram que o sistema colinérgico anti-inflamatório está envolvido no controle da resposta inflamatória pulmonar, seja na manutenção da homeostasia ou ainda nas fases iniciais do desenvolvimento da LPA. Ainda, está claro que o estímulo de receptores nicotínicos tem grande potencial como alvo terapêutico a ser explorado na SDRA.

DESCRITORES: Proteína vesiculares de transporte de acetilcolina; lesão pulmonar aguda; acetilcolina; receptor nicotínico de acetilcolina alfa7; modelos animais; camundongos; pneumonia.

SUMMARY

Pinheiro NM. Cholinergic function reduction effect of pulmonary mechanics and pulmonary histopathology acute inflammation model of experimental induced by LPS in mice genetically modified [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Acute lung injury (ALI) is characterized by acute lung inflammation with recruitment of polymorphonuclear and release of proinflammatory mediators. It is a severe condition since leads to death 40% of the cases. Several studies have elucidated the pathophysiology of ALI, however the treatment is still unsatisfactory. The anti-inflammatory cholinergic system was described in the lung and is related to a vagal nerve reflex that inhibits the release of inflammatory cytokines by the action of ACh on nicotinic receptors. Our hypothesis is that the VACHT reduction, which is related to the deficit in the release of ACh, modulates the pulmonary inflammatory response in a model of LPS. Aim: 1. To assess whether VACHT deficiency modulates the pulmonary response in genetically modified animals; 2. Assess whether cholinergic deficiency induced reduction VACHT is involved in pulmonary response to LPS and elucidate some mechanisms involved; 3. To evaluate the therapeutic potential of PNU, an agonist $\alpha 7$ nAChR, in functional and histological changes in C57BL6 mice with LPA. Methods: Mutant genetically modified male mice (VACHT KD^{HOM}) or wild (WT) and C57BL/6 were used. First, we evaluated lung function and lung histopathology in VACHT KD^{HOM} animals. After, WT animals and VACHT KD^{HOM} received intranasal instillation of LPS or saline and the inflammatory response was assessed 1.5 hours to 72 hours. Moreover, the pulmonary response was evaluated in WT and VACHT KD^{HOM} after instillation of LPS intraperitoneally. Finally, C57BL6 instilled with intranasal LPS received prior or post-treatment with PNU, an $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist. **Results:** Mutant animals had higher number of cells recovered in bronchoalveolar lavage (BAL) and increased pro-inflammatory cytokines, peribronchial edema and worsening of lung function. Still, there was an increase of NF- κ B expression and reduction of JAK2. The VACHT deficiency induced increase in inflammatory cells in animals receiving LPS only 1.5h after the LPS instillation, and the values were similar to WT in 24 and 72 hours. In WT mice, the stimulation of the nicotinic receptor improves inflammation, while the stimulation of muscarinic receptors appears to contribute to the worsening of the pulmonary inflammatory response. The effects of PNU seem to depend on the intact cholinergic pathway, since this drug had no effects on mutant animals. However, treatment with PNU in C57BL6 reduced pulmonary inflammation, cytokine production, collagen deposition in lung tissue and the levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1, improving pulmonary function. These effects appear to be associated with reduced profile M1 macrophages and the inhibition of NF- κ B. **Conclusion:** These data clearly demonstrate that the anti-inflammatory cholinergic system is involved in the control of lung inflammatory response, both to maintain the lung homeostasis or in the early

stages of the development of ALI. Finally, it is clear that the stimulation of nicotinic receptors has great potential as a therapeutic target to be explored in ARDS.

DESCRIPTORS: vesicular acetylcholine transport proteins; acute lung injury; acetylcholine; alpha7 nicotinic acetylcholine receptor; models, animal; mice; pneumonia.

1.INTRODUÇÃO

1.1. Síndrome do desconforto respiratório aguda (SDRA) e lesão pulmonar aguda (LPA)

1.1.1. Histórico e definição

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) foi descrita pela primeira vez em 1967, quando 272 pacientes que apresentavam uma forma particular de insuficiência respiratória e que foram submetidos a ventilação mecânica foram avaliados. Destes pacientes, 12 apresentaram dispneia grave, cianose, redução significativa da complacência pulmonar e infiltrados difusos na radiografia do tórax, além da hipoxemia refratária ao aumento da fração inspirada de oxigênio (FiO₂). Sete (7) pacientes evoluíram para óbito, e a avaliação histopatológica do pulmão mostrou pequenas atelectasias, congestão vascular, hemorragia, edema pulmonar e formação de membranas hialinas revestindo a superfície alveolar [1].

Desde 1971, esta doença passou a ser denominada síndrome do desconforto respiratório do adulto, com a finalidade de distinguir da síndrome da membrana hialina do recém-nascido, que tem como principal fator etiológico a falta de surfactante pulmonar [2]. No início da década de oitenta, surgiram as primeiras publicações clínicas que descrevem alguns fatores que predispõe o desenvolvimento da síndrome [3, 4]. Em 1988, foi definido por Murray et al. [5] um escore de lesão pulmonar que permitia melhorar a definição e principalmente quantificar as alterações pulmonares que ocorriam na SDRA. Em 1992, foi realizada na Espanha uma conferência denominada *The American-European Consensus Conference on ARDS (AECC)* [6] que buscava obter informações

epidemiológicas e uniformizar a definição da SDRA. O consenso foi de que o termo a ser utilizado deveria ser o proposto inicialmente por Ashbaugh et al. [1]. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo, retirando apenas o adulto, uma vez que esta síndrome não se limitava a indivíduos adultos.

Nesta conferência definiu-se os critérios de diagnósticos para lesão pulmonar aguda (LPA) e para a SDRA que são caracterizadas por falência respiratória aguda, infiltrado pulmonar difuso e bilateral evidente na radiografia de tórax, complacência pulmonar reduzida e relação entre pressão parcial de oxigênio arterial e fração inspirada de oxigênio ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) < 300 mmHg para lesão pulmonar aguda (LPA), sua forma mais branda e $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ < 200 mmHg para SDRA [6], forma mais grave.

Mais recentemente, em conferência realizada em 2011 em Berlim, a definição da SDRA foi revista com o intuito de otimizar o diagnóstico da doença e assim facilitar o tratamento, e uma unificação da SDRA e LPA foi estabelecida. Assim, a SDRA é atualmente definida como uma lesão inflamatória difusa pulmonar, com lesão da barreira alvéolo-capilar e aumento da permeabilidade capilar que leva ao edema. Ocorre ainda aumento do peso do pulmão e redução de tecido pulmonar. Esta doença pode ocorrer nas formas leve, moderada ou grave, que são definidas baseado no critério da relação de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, que deve ser $200 \leq 300$, $100 \leq 200$ ou ≤ 100 mmHg, respectivamente [7]. Embora esta seja a definição mais recente, a mesma ainda é alvo de críticas e gera controvérsias entre a comunidade científica.

1.1.2. Epidemiologia

Diversos estudos têm se empenhado em demonstrar índices fidedignos de incidência, de mortalidade e de morbidade da SDRA tanto de origem pulmonar quanto extrapulmonar. Apesar deste empenho todo, os resultados ainda são bastante conflitantes [8]. Dos pacientes que são admitidos na unidade de terapia intensiva (UTI), cerca de 7% desenvolvem SDRA, taxa que não seria de extrema preocupação se não fosse a elevada mortalidade que ocorre nestes pacientes. Segundo alguns estudos, a taxa de mortalidade varia entre 30 - 50% [9, 10]. Observou-se ainda que a incidência aumenta com a idade, chegando a 306 casos por 100 mil habitantes/ano, na faixa etária dos 75 aos 84 [10]. É importante ressaltar que a taxa de mortalidade foi reduzida consideravelmente nos últimos vinte anos devido basicamente a implementação de estratégias ventilatórias mais modernas e que visam a proteção pulmonar [11, 12]. Das causas pulmonar e extrapulmonar, a pneumonia e a sepse tem sido reconhecidas como as de maior relevância [13].

1.1.3. Fisiopatologia

O evento inicial e de extrema relevância que ocorre na fisiopatologia da SDRA é o recrutamento e ativação de polimorfonucleares, particularmente neutrófilos, e consequente liberação de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, e também espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (Figura 1).

A agressão pulmonar pode ser oriunda de causas pulmonares ou não, e se destacam entre os principais causadores, pneumonias severas, sepsis, peritonite

e politraumas. É importante ressaltar que na SDRA de origem pulmonar, o epitélio alveolar é a primeira estrutura lesada que acarreta em edema alveolar e também redução da depuração do edema, diminuição da produção e do *turnover* de surfactante e consequente fibrose [14-17] (Figura 1).

Por outro lado, são os mediadores inflamatórios oriundos do foco extrapulmonar que lesam o endotélio na SDRA induzida por causas extrapulmonares [8]. A resposta inflamatória induz alteração de permeabilidade vascular que associada a lesão da barreira alvéolo-capilar, ocasiona edema pulmonar, que tem grande relevância na função pulmonar (Figura 1).

Figura 1. Fisiopatologia da SDRA. A esquerda alvéolo normal e a direita um alvéolo durante a fase aguda da SDRA. Após um estímulo inflamatório ocorre ativação de células endoteliais, epiteliais e de macrófagos alveolares, que secretam diversos mediadores pró-inflamatórios que por sua vez recrutam leucócitos para o local da lesão. A ativação de neutrófilos associado ao aumento de espécies reativas de oxigênio produzidas por estas células, induzem a ruptura da membrana alvéolo capilar, causando edema intersticial e alveolar, infiltrado inflamatório e depósito de fibrose, como pode ser observado (Fonte: painel A: modificado Ware e Matthay, 2000).

A SDRA pode ser dividida em duas fases: a. fase exsudativa: a principal característica desta fase é a invasão dos alvéolos por fluido altamente protéico, hemácias, neutrófilos e macrófagos, que levam ao edema. B. fase proliferativa que é caracterizada por proliferação de células epiteliais (tipo II), acúmulo de fibroblastos que induzem uma alteração da histoarquitetura pulmonar [18] (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática das fases da SDRA. A fase exsudativa tem como principal característica o edema intersticial e alveolar e tem o pico de resposta em 24 horas após a agressão. A fase proliferativa que tem predomínio de proliferação de pneumócitos do tipo II e de fibroblastos é a fase final da doença, caracterizada por fibrose pulmonar decorrente de uma deposição anormal e excessiva de proteínas da matriz extracelular, principalmente colágeno, que pode iniciar já no terceiro dia após a agressão. A inflamação exacerbada, a presença de edema alveolar e o acúmulo de fibroblastos levam a alteração da histoarquitetura pulmonar e comprometem significativamente a função pulmonar (Tomashefski, 2000).

Os macrófagos, células residentes do epitélio alveolar, são de grande relevância na fisiopatologia da SDRA. Inicialmente, quando ativados, induzem a

liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas (IL-1 β e IL-6) e fatores inflamatórios como óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (PGE2), que ativam toda uma resposta imunológica no sentido de recrutar ainda mais células para o local da lesão [19].

Sabe-se que existem dois perfis de macrófagos: do tipo I (M1) e do tipo II (M2). Os M1 produzem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como: IL-1 β , TNF- α , IL-12 e iNOS, sendo esta uma resposta que acaba por sinalizar uma resposta linfocitária de perfil Th1. A ativação de M1 induz a destruição do tecido com a liberação de NO, aniôn superóxido e também de metaloproteinases, além de estimular o recrutamento de neutrófilos que irá liberar elastase corroborando a destruição tecidual [20, 21]. Por outro lado, os macrófagos do tipo II produzem citocinas anti-inflamatórias na tentativa de resolver a inflamação pré-estabelecida, como IL-10 e IL-1ra e também sinaliza uma resposta para o perfil linfocitário Th2, inversamente aos macrófagos do tipo I que recrutam neutrófilos, os M2 induzem a remoção destas células [22].

Na SDRA, inicialmente há um aumento de M1 que libera quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias induzindo assim o recrutamento de neutrófilos. Ao liberarem algumas proteases como a elastase neutrofílica e a mieloperoxidase (MPO), os neutrófilos não só aumentam a resposta inflamatória como alteram a estrutura e a função do tecido na SDRA. O aumento de neutrófilos está envolvido na fisiopatologia de diversas doenças pulmonares, mas tem um papel de fundamental importância na SDRA [23, 24].

O aumento de outras citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β e IL-6 contribui também com a persistência do processo inflamatório no parênquima pulmonar e com consequente destruição do tecido pulmonar [25].

TNF- α e IL-1 β também foram quantificadas em níveis elevados no LBA de pacientes com SDRA e também em pacientes com chances elevadas de desenvolver SDRA [26, 27]. Em modelos experimentais de LPA induzida por LPS os níveis de TNF- α e IL-1 β no LBA estão aumentados [28, 29].

A IL-6 tem seus níveis altos detectados no LBA logo na fase inicial do processo inflamatório em pacientes com SDRA [29]. Foi demonstrado que sua síntese é também estimulada pelo LPS em modelos experimentais de LPA [28].

No lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com SDRA são encontrados elevados níveis de IL-8, sendo esta citocina um importante mediador da patogênese dessa doença [30]. É a principal citocina envolvida no recrutamento de neutrófilos. A IL -8 apresenta uma homóloga funcional em camundongos que é a KC (CXCL1) (keratinocyte-derived chemokine), usualmente dosada em modelos experimentais [31].

As principais funções das citocinas que mais estão envolvidas na SDRA estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1: Citocinas e seus efeitos na SDRA

Classe	Mediadores	Fonte	Papel na Seps
Citocina pró-inflamatória	TNF- α	Macrófagos ativados	Ativação de neutrófilos e células endoteliais
Citocina pró-inflamatória	IL-1 β	Monócitos, Macrófagos ativados, células endoteliais	Ativação de macrófagos e células T.
Citocina pró-inflamatória	IL-6	Macrófagos ativados, células endoteliais, células B e T	Proliferação de linfócitos e regulação de moléculas de adesão.
Citocina anti-inflamatória	IL-10	Monócitos e Macrófagos	Redução da ativação de macrófagos e redução na produção de TNF- α
Quimiocinas	IL-8	Monócitos e Macrófagos	Quimiotaxia de neutrófilos e células T

TNF- α , Fator de necrose tumoral α . IL-1 β , Interleucina-1 β . IL-6, Interleucina-6, IL-10, Interleucina-10, IL-8, Interleucina-8.

O fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) é uma família de fatores de transcrição que está bastante envolvido na inflamação e na resposta imune inata. Sabe-se que a instilação de LPS induz a ativação de NF- κ B, que transloca para o núcleo e transcreve diversos genes pró-inflamatórios [32]. As subunidades p 65, c-REL e REL-B, são necessárias para a ativação e transcrição do NF- κ B [33, 34]. A inibição de NF- κ B bloqueia a expressão de genes pró-inflamatórios para produção de: TNF- α , IL-1 β e IL-6 e assim contribui para a resolução da sepse [32, 35], sugerindo que o NF- κ B tem um importante papel no controle da resposta inflamatória na SDRA.

A Janus quinase (JAK) é uma tirosina quinase acoplada a um receptor de membrana, que tem como função básica providenciar instruções para a formação de uma proteína que promova o crescimento e divisão celular [36]. JAK 2 é crucial no controle da produção das células sanguíneas a partir das *stem cells* hematopoiéticas que estão localizadas na medula óssea e têm potencial para se diferenciarem em eritrócitos, leucócitos ou plaquetas. A hiperativação da JAK pode levar a destruição tecidual [37]. Esta proteína é parte de uma via de sinalização e de divisão celular, sendo a via de sinalização denominada de JAK/STAT, que transmite sinais do exterior da célula para o núcleo celular.

Por outro lado, a redução da fosforilação de JAK também pode ter um efeito deletério no organismo uma vez que esta via também está envolvida no controle da homeostasia [36].

O Transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT) está associado às duas vias principais de ativação, a via do JAK, acima citada, e a da Src quinase

[38]. Já foi descrito que o STAT aumenta a expressão de genes inibitórios da resposta inflamatória e diminui a expressão de genes pró-inflamatórios, o que pode levar a uma redução da inflamação [39]. Entretanto uma ativação descontrolada desta via favorece o crescimento de um tumor, a angiogênese, metástase e bloqueio da imunovigilância [36]. Além disso, o aumento de transcrição de STAT leva a um aumento dos níveis do supressor de sinalização de citocina (SOCS) que por sua vez inibe a atividade da JAK [36, 40]

A ativação da via JAK/STAT na SDRA ainda é pouca estudada, mas alguns autores já demonstraram que sua ativação está envolvida na fisiopatologia desta doença, particularmente em modelos experimentais [41, 42].

Avaliações histopatológicas do pulmão de pacientes com SDRA mostraram que além da intensa resposta inflamatória e do colapso alveolar, exsudato fibrinoso e edema alveolar, foi observado um aumento na deposição de fibras colágenas nas paredes alveolares, sugerindo alterações estruturais da matriz extracelular (MEC) condizentes com o processo de remodelamento pulmonar [43-45]. Sabe-se que a resposta inflamatória persistente leva ao desequilíbrio na relação protease/antiprotease que prevalece a destruição de tecido pulmonar com consequente tentativa de regeneração.

A MEC contém uma família de proteínas enzimáticas dentre elas as metaloproteinase de matriz (MMP) que devido a presença do íon de zinco no centro ativo da proteína, são capazes de decompor ou degradar constituintes da MEC. Cada MMP é especializada em degradar um componente da MEC e estas são classificadas de acordo com o tipo de componente que degradam em collagenases,

gelatinases, estromelisinases, matrilisinas e MMP ligadas a membrana (MT-MMP) [46, 47].

Os macrófagos e os neutrófilos são os principais produtores de MMPs e sabe-se que o LPS também pode induzir a secreção de algumas collagenases [48]. As MMPs são controladas e inibidas pelo inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMPs) que possuem alta afinidade com seus o sítio catalítico ativo e são produzidas por vários tipos de células [49, 50].

Em tecidos normais e íntegros, os níveis de MMPs são baixos e a manutenção de um equilíbrio saudável entre as metaloproteinases e seus inibidores mantém a integridade do tecido [51, 52]. No entanto, em processos inflamatórios ou lesão tecidual há alteração no nível de expressão de MMPs e também um desequilíbrio da relação entre as MMPs/TIMP, que contribui para a degradação seguida de um processo de reparo [52] que contribui para as alterações funcionais do órgão lesado.

O desequilíbrio das MMPs, principalmente MMP-9 e MMP-2, e seus inibidores TIMPs foi demonstrado em pacientes com SDRA [44, 45] e o aumento da MMP no plasma está correlacionado com a piora da função pulmonar e da oxigenação. Os níveis de metaloproteinase (MMP) do tipo 9 estão aumentados nos pacientes com SDRA o que estimula por sua vez um aumento na produção de colágeno do tipo I pelos fibroblastos [53]. Em modelo experimental de LPA foi observado um aumento da deposição de fibras colágenas nos animais que receberam instilação de LPS e um desequilíbrio na relação das MMPs/TIMPs também foi observado [54, 55].

O estresse oxidativo na SDRA é resultante de dois processos: neutrófilos ativados que são os principais produtores de EROs e a utilização de terapêutica de suporte ventilatório com altos níveis de oxigênio. O desequilíbrio entre a quantidade de oxidantes e de antioxidantes leva a uma situação de estresse oxidativo [56], que está envolvido em diversas doenças, entre elas a SDRA.

Todas as alterações pulmonares supracitadas repercutem com um quadro clínico grave observado na SDRA, onde a hipoxemia refratária e a opacidade bilateral presente na radiografia pulmonar são as primeiras características clínicas e estão associadas ao aumento da mistura venosa, desequilíbrio ventilação/perfusão e diminuição da complacência pulmonar.

Embora não exista terapêutica específica para o tratamento da SDRA, as medidas utilizadas atualmente baseiam-se no suporte ventilatório protetor, uso de corticosteroides e no tratamento da condição desencadeadora. Um número expressivo de doentes com quadro de remodelamento e proliferação fibrótica pulmonar podem beneficiar-se do uso de esteróides em altas doses [57].

O estudo de novas vias envolvidas na fisiopatologia da SDRA pode corroborar com o surgimento de novos alvos terapêuticos e com o desenvolvimento de novos medicamentos e estratégias de tratamento, que se fazem necessários para a melhora do prognóstico e redução das taxas morbidade e mortalidade por SDRA.

1.2. Acetilcolina

A acetilcolina (ACh) é um acetil éster de colina sintetizado a partir de colina e acetil-CoA via ação enzimática da colina acetiltransferase (ChAT) e atua como um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). A ACh é estocada e liberada pelos terminais nervosos colinérgicos [58] e é transportada e liberada para dentro das vesículas sinápticas por meio do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) [59, 60] (Figura 3).

Uma vez liberada, a ACh estimula receptores muscarínicos (mAChR) e nicotínicos (nAChR) tanto em órgãos alvos quanto em neurônios. Por fim, é metabolizada em colina e acetato via ação da acetilcolinesterase (AChE) e a colina é recaptada pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1). Estes receptores são encontrados em neurônios e em diferentes células efectoras inervadas pelos neurônios colinérgicos. Já foi detectada a presença destes receptores em tecidos independentes das estruturas neuronais, como células epiteliais, endoteliais, placenta, entre outros [61].

O sistema nervoso colinérgico está envolvido em diversas funções fisiológicas do organismo. No sistema respiratório, a via descendente vagal inerva a laringe, traquéia e porção condutora dos brônquios e fibras não mielinizadas inervam também glândulas e a musculatura lisa das vias aéreas [62, 63]. A estimulação nervosa parassimpática induz a liberação de ACh que induz a contração da musculatura lisa traqueobrônquica e aumento da secreção de muco [64, 65]. Por outro lado, a via simpática que também libera ACh pelas

fibras pré-ganglionares, tem como neurotransmissor pós-ganglionar a noradrenalina, que atua no pulmão relaxando a musculatura lisa [66].

Figura 3. Síntese da ACh. (1) A colina sendo recaptada pelo CHT1. (2) A ACh sendo sintetizada pela enzima ChAT, e logo após é carregada para VACHT (3). (4) Com a chegada do impulso nervoso, as vesículas liberam o neurotransmissor na fenda sináptica, que pode se ligar aos receptores nicotínicos (N) e/ou muscarínicos (M) (5). E por fim a ACh que resta na fenda sináptica é degradada pela AChE em colina e acetato (6). (Adaptado de Prado et al. 2013)

A detecção de componentes do sistema colinérgico, tais como a ACh, ChT1, AChE, VACHT, ChAT e receptores de acetilcolina em células epiteliais e inflamatórias, como mastócitos, monócitos, neutrófilos e linfócitos, presentes nas vias aéreas sugere uma importante participação do sistema colinérgico na fisiopatologia das doenças pulmonares [61, 67, 68].

Em células T foi mostrado a regulação e a expressão da ChAT, o aumento intracelular e a liberação de ACh [69, 70], evidenciando que além da produção

de ACh nos terminais nervosos, há também a produção de ACh não neuronal. Como citado acima para a liberação de ACh nas fendas sinápticas é necessária VACHT que armazena, transporta e libera a ACh. Entretanto, nos linfócitos T não está bem estabelecido ainda a maneira em que a ACh é estocada e liberada, uma possibilidade é que a ACh seja produzida de acordo com a necessidade e liberada imediatamente sem a necessidade de estocar [71].

1.2.1 Sistema Colinérgico na Resposta Inflamatória:

Nos últimos quinze anos diversos estudos focaram em demonstrar a expressão e a função do sistema colinérgico anti-inflamatório (SCAI) [72]. Resumidamente, o SCAI é um mecanismo neural que suprime a resposta inflamatória inata e controla a inflamação por inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α [73] (Figura 4).

O principal mediador endógeno do SCAI é a ACh, que atua principalmente via nervo vago, e que interage especificamente com os $\alpha 7$ nAChR que são expressos em macrófagos e outros tipos celulares [74]. A interação do sistema nervoso e imunológico na tentativa de regular a inflamação pode ser ativada via transmissão colinérgica central (cérebro), via estimulação direta do nervo vago ou por meio de agonistas específicos na ativação da $\alpha 7$ nAChR em macrófagos [75-77].

Martelli et al. [78] descreveram um histórico das evidências relacionadas ao sistema colinérgico anti-inflamatório. Primeiramente em 2002, acreditava-se que o efeito era direto entre o estímulo vagal e a atuação da ACh nos receptores de células imunes, principalmente macrófagos, e a resposta inflamatória seria

suprimida principalmente pela redução de citocinas pró-inflamatórias [79]. Em 2008, foi então demonstrada a importância da presença do baço e dos nervos esplênicos nesta via anti-inflamatória, onde em resposta a uma injúria, ocorre a liberação de ACh via nervo vago que no gânglio celíaco estimula a liberação de ACh pelo nervo esplênico e está ACh então ativa $\alpha 7$ nAChR e suprime as citocinas pró-inflamatórias [80, 81]. Posteriormente em 2011 foi incorporado a descrição da via colinérgica anti-inflamatória, que após o estímulo do nervo esplênico, havia produção de ACh não neuronal pelos linfócitos B presentes no baço e a partir dessa ACh os $\alpha 7$ nAChR eram estimulados para o papel anti-inflamatório [82]. E por fim em 2013 o modelo proposto foi que o nervo vago, após estimulado, mobilizaria células T a migrarem para o baço e produzirem ACh, que por sua vez estimula o nervo esplênico a liberar noradrenalina que age nos receptores β adrenérgicos presentes em macrófagos do baço e suprime a produção de TNF- α [83].

Entretanto, diversos estudos já demonstraram que a presença dos $\alpha 7$ nAChR é essencial para o efeito anti-inflamatório da ACh em diversos órgãos [77, 84, 85]. Assim, a via colinérgica anti-inflamatória tem sido estudada em diversos modelos de inflamação animal, com diferentes estratégias para mostrar o efeito dessa via, como estimulação vagal, vagotomia, uso de inibidores da AChE, agonistas e/ou antagonistas de nAChR e mAChR e os exatos mecanismos envolvidos ainda precisam ser totalmente esclarecidos.

Neste sentido avaliando o SCAI, o estímulo do nervo vago reduziu níveis

da produção de citocinas pró-inflamatória em modelo de endotoxemia letal [75], diminuiu a inflamação intestinal induzida no íleo em modelo experimental de animais [36]. Corroborando com estes achados, a inibição da AChE com fisostigmina ou neostigmina aumentou a sobrevivência de camundongos com sepse experimental [86]. A vagotomia elevou a expressão de TNF- α , IL-6 e a proteína do grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1) detectados por ELISA ou por imunohistoquímica em modelo de artrite em camundongos [87], e em modelo de peritonite séptica aumentou citocinas pró-inflamatórias e o influxo de células inflamatórias no local [88].

Os efeitos do SCAI na inflamação pulmonar foram poucos estudados até o momento, e os efeitos da ACh nas doenças pulmonares ainda são controversos, podendo contribuir ou suprimir a resposta inflamatória, dependendo do tipo de receptor em que atue. Neste sentido, Wessler et al. (2007) [89] observaram uma redução significativa do conteúdo de acetilcolina tanto em vias aéreas quanto em parênquima pulmonar de pacientes portadores de fibrose cística comparativamente aos controles. Por outro lado, o aumento dos níveis teciduais de ACh pode induzir a vasodilatação com aumento da secreção mucosa e constrição das fibras musculares lisas das vias aéreas, além de ativar as células do sistema imunológico [90].

Figura 4. Reflexo inflamatório. Patógenos, isquemia e outras formas de lesão que induzem a resposta inflamatória resultam na liberação de citocinas pelas células do sistema imunológico que são detectadas pelo nervo vago aferente. Estas informações são transmitidas ao núcleo do trato solitário (NTS) e subsequentemente ao núcleo motor dorsal (DMN), resultando em ativação do nervo vago eferente – denominado via colinérgica anti-inflamatória. A atividade do nervo vago eferente estimula a liberação de acetilcolina que inibe a produção de citocinas por células do sistema imunológico, provavelmente via ativação $\alpha 7$ nAChR localizado principalmente em macrófagos, mas também em outras células do sistema imunológico (Retirado do Johnston and Webster, 2009).

No pulmão, os receptores colinérgicos quando ativado pela ACh apresentam efeitos antagônicos podendo ser observados na (Figura 5). A ACh ao se ligar a mAChR que é encontrado na musculatura lisa de vias aéreas age como um potente broncoconstritor, [91], justificando o grande uso dos antagonista de mAChR como broncodilatadores no tratamento de doenças respiratórias como a asma e o enfisema pulmonar [92].

Os mAChR são acoplados a proteína G, e são cinco os subtipos de receptores muscarínicos (M1 - M5). Os subtipos M1, M2 e M3 são os de maior papel fisiológico no pulmão e os subtipos M2 e o M3 estão mais presentes na musculatura lisa da via aérea na proporção de 4:1. O M3 é o mais envolvido na contração da via aérea, células inflamatórias e secreção brônquica [91].

A ACh que é produzida por células epiteliais das vias aéreas pode atuar em mAChR [93-95] regulando a proliferação e estimulando a secreção de cloreto, a liberação de citocinas e a frequência do batimento ciliar [96]. A interação da ACh com M2 mAChR localizados nos nervos colinérgicos pós-ganglionares inibe a liberação da ACh em um mecanismo de retroalimentação negativa para então diminuir a broncoconstrição [97]. Em doenças pulmonares como a asma, ocorre uma redução na expressão de M2 mAChR, o que pode levar a intensa hiperresponsividade brônquica [97].

Xu et al. [98] mostraram que o estímulo com antagonista de M3 mAChR em modelo de inflamação induzida por LPS reduziu células totais e neutrófilos do BAL, aumentou a expressão de iκB, corroborando com esses achados o uso de antagonista M3 mAChR em modelo experimental de asma, reduz hiperresponsividade, células totais e eosinófilos no LBA e a quantificação das citocinas (IL-5 e IL-4 e MMP-9). Do mesmo modo, na histopatologia foi observada redução do infiltrado dos eosinófilos no tecido, na produção de muco nas vias aéreas e da deposição do colágeno nos tecidos pulmonares [99], confirmando que os mAChR estão envolvidos na resposta inflamatória.

A estimulação dos M1 e M3 mAChR induz a síntese de NO nas células CEM (linhagem de célula T leucêmica humana) [100], sugerindo que a ACh possa interferir com a liberação de outros mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da inflamação pulmonar, como por exemplo, o óxido nítrico [101, 102].

O papel dos receptores nicotínicos como anti-inflamatório já está bem descrito em alguns sistemas. Cinco subunidades arranjadas de α homéricas ou α/β heteroméricas formam canais iônicos de nAChR que modula neurotransmissão em junções musculares, gânglios autônomos e em algumas regiões do SNC, e sua ativação, gera abertura do canal permitindo a entrada de sódio e cálcio e saída de potássio [103, 104]. Estão presentes no epitélio das vias aéreas, células nervosas, células epiteliais, macrófagos e linfócito [105].

Wang et al. [106] demonstraram que animais com deleção do gene para $\alpha 7$ nAChR apresentam um aumento da liberação de TNF- α induzida por LPS, e esta resposta não era revertida quando da estimulação vagal, sugerindo assim um papel importante deste receptor no controle da resposta inflamatória. No pulmão, Giebelen et al. [74] observaram que administração local de GTS-21, um agonista seletivo do $\alpha 7$ nAChR, inibiu a liberação pulmonar de TNF- α em camundongos com inflamação pulmonar induzida por instilação de LPS, sugerindo que o sistema colinérgico exerce um efeito anti-inflamatório no pulmão. Corroborando com a ideia do $\alpha 7$ nAChR desenvolver um papel anti-inflamatório, o pré-tratamento com o PNU que é um agonista seletivo do $\alpha 7$ nAChR reduziu células inflamatórias e a liberação de citocinas pulmonares [107]

em modelo de LPA. Xu et al. (2012) mostraram que o pré-tratamento com PNU reduziu edema, neutrófilos e liberação de citocinas em lesão pulmonar induzida por LPS.

Figura 5: Efeitos da ACh no sistema pulmonar de acordo com o subtipo do receptor envolvido na resposta. (modificada de KUMMER et al., 2008). PKC: proteína quinase C; MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno; P38: Proteína 38; MMP-2: Metaloproteinase de matriz tipo 2; LTB4: Leucotrieno; CNS, do inglês central nervous system=sistema nervoso central.

Sabe-se que o $\alpha 7$ nAChR está envolvido no controle da inflamação, e como ele atua é alvo de algumas pesquisas, tem sido descrita duas principais vias : Frente a uma injuria ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias que ativam NF-kB que será translocado, onde aumentara a transcrição de citocinas

pró-inflamatórias como TNF- α [72], esse aumento de citocinas estimulam via nervo vago a liberação de ACh que quando interage com $\alpha 7$ nAChR inibe a translocação do NF- κ B e portanto inibe a cascata inflamatória. A segunda hipótese que pode ocorrer ainda em conjunto com a primeira é que com o estímulo em $\alpha 7$ nAChR a JAK-2 fosforile a STAT-3 que será por sua vez translocada para o núcleo e fará transcrição de genes anti-inflamatórios induzindo também um aumento de SOCS-3 que fará retroalimentação negativa na via JAK/STAT [108] (Figura 6). O efeito da SOCS inibindo citocinas pró-inflamatórias foi demonstrado em diversos modelos.

Figura 6. Mecanismos envolvidos na resposta colinérgica anti-inflamatória (Adaptado de Gallowitsch-Puerta, Tracey, 2005).

Em síntese, todos os resultados acima descritos, sugerem que o SCAI, que atua principalmente via liberação de ACh e ativação do nervo vago, tem um efeito importante no controle de situações inflamatórias podendo assim ser

considerado como uma nova estratégia terapêutica a ser estudada nos diferentes sistemas do organismo como, por exemplo, o respiratório.

1.3. Modelos experimentais de inflamação pulmonar aguda

Os modelos experimentais utilizados para se estudar SDRA são muito diversos. Há modelos de SDRA induzido por ventilação mecânica, por LPS por vias: intranasal, intratraqueal, intraperitoneal e intravenoso, ligadura cecal, aspiração de ácido e lavagem com salina. Alguns simulam a SDRA extrapulmonar e outros SDRA pulmonar. E a escolha do melhor modelo depende muito da pergunta a ser respondida.

Na literatura é bem descrito e utilizado a instilação de LPS para induzir a SDRA [28, 29, 98, 107]. O LPS está presente na constituição da membrana exterior de bactérias gram-negativas [28]. Consiste no lipídio A (endotoxina), que é um glicofosfolípídeo, que tem o papel biológico de participar dos mecanismos de patogenicidade da célula bacteriana, é o maior fator de virulência, resultando na amplificação das reações inflamatórias. O LPS previne e dificulta a perda de proteínas periplasmáticas e o acesso de enzimas hidrolíticas e de alguns antibióticos ao peptidoglicano [109]. A instilação de LPS induz a produção de interleucinas como: IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , principalmente por ativação de macrófagos, que favorece a migração e a infiltração neutrofílica no pulmão produzindo radicais livres e elastases que levam a que a lesão tecidual. O processo inflamatório induzido por LPS pode ainda induzir um processo de

reparo no pulmão de forma desorganizada e um prejuízo da função pulmonar [28, 29, 54, 55, 98, 107].

No presente estudo foram utilizados os modelos de LPA pulmonar com a instilação intratraqueal de LPS e os parâmetros foram avaliados em diferentes tempos: 1h30min, 6h, 24 e 72h após a instilação. Ainda se utilizou o modelo de LPA extrapulmonar com instilação de LPS intraperitoneal onde os animais foram avaliados 24h após a instilação. A dose de LPS utilizada foi de 5mg/kg [110], que é uma dose que induz inflamação pulmonar significativa, mas que não induz nenhum animal a morte.

1.4. Justificativa do estudo

A SDRA foi descrita há mais de trinta anos, mesmo assim ainda gera muitas dúvidas e controvérsias quanto à sua definição, fisiopatologia e tratamento, devido a complexidade e variedade dos fatores envolvidos. Atualmente existem muitos estudos em mecanismos e em novas estratégias terapêuticas, que contribuíram para a redução da mortalidade, porém ainda é bastante significativa. Estima-se que 7% dos pacientes admitidos nas unidades de terapia intensiva (UTI) desenvolvem SDRA, sendo que a taxa de mortalidade varia entre 30-50%. [9, 10].

A importância fisiopatológica do sistema colinérgico anti-inflamatório foi recentemente descrita em outros modelos experimentais de doenças cerebrovasculares e musculares, entre outras [111]. Trabalhos recentes sugerem que o estímulo vagal e a liberação de ACh protejam o pulmão da lesão

induzida por LPS [28]. No entanto, a participação de VACHT, uma proteína de extrema relevância na liberação de ACh, na lesão pulmonar aguda não foi elucidada. Além disso, embora seja conhecido a importância $\alpha 7$ nAChR no desenvolvimento da LPA, nenhum estudo avaliou o efeito do tratamento com agonistas deste receptor. Todos os trabalhos de nosso conhecimento administram a droga previamente a indução da LPA, o que tem menor relevância clínica. Estes esclarecimentos podem contribuir futuramente com novos protocolos terapêuticos relacionados a inflamação pulmonar aguda.

Nossa hipótese é de que os animais com redução da VACHT apresentem piora na inflamação no modelo de LPA induzida por instilação de LPS, e a segunda hipótese é que os animais sem modificação genética tratados com o agonista de $\alpha 7$ nAChR reduzam a inflamação pulmonar.

2.OBJETIVO

1. Avaliar se a deficiência colinérgica induzida por redução de VAC_hT modula o sistema respiratório.
2. Avaliar se a deficiência colinérgica induzida por redução de VAC_hT está envolvida na resposta pulmonar ao LPS intratraqueal e intraperitoneal e elucidar alguns mecanismos envolvidos nas respostas encontradas;
3. Avaliar o potencial efeito terapêutico do PNU, agonista de $\alpha 7$ nAChR, nas alterações funcionais e histopatológicas em modelo de LPS em animais C57BL/6.

3.MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa e de Biossegurança da FMUSP do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o protocolo número 029/11. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Terapêutica Experimental I (LIM-20) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM20-HC-FMUSP) e no Laboratório de Estudo em Inflamação Pulmonar, Lab.22, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Campus Diadema.

3.1. Experimento I – Efeito da redução de VACHT na função e na histopatologia pulmonar

A linhagem de camundongos geneticamente modificados para uma menor expressão (Knockdown) da proteína transportadora vesicular de acetilcolina KD-(VACHT), utilizada foi desenvolvida pelo grupo dos Prof. Marco Antônio M. Prado na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esta linhagem foi retrocruzada por três gerações, a linhagem C57BL/6 foi a base genética utilizada e foram gerados pela segmentação 5 UTR do gene VACHT por recombinação homóloga em fundo misto.

Estes animais foram mantidos em heterozigose e acasalados quando necessário para gerar animais homozigotos e selvagem. Sequencialmente todos os animais foram submetidos à genotipagem para identificação, de acordo com a descrição feita por Prado et al., 2006a. Os animais VACHT

KD^{HOM} apresentam redução da proteína VACHT de aproximadamente 70%, o que leva a redução da liberação de acetilcolina na mesma proporção.

Estes animais foram adquiridos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com peso médio de 20g, com idade aproximada de 6-8 semanas, onde são procriados. Os animais já foram entregues separados pela genotipagem.

Foram utilizados de 8-14 animais WT e VACHT sem indução de lesão pulmonar para avaliação.

3.1.1. Tempo de grade

Com o objetivo de confirmar o fenótipo dos animais geneticamente modificados, foi realizado o teste de tempo de grade, uma vez que estes animais VACHT KD^{HOM} sabidamente têm redução da força motora e que, portanto, conseguem se sustentar um menor tempo. Para tanto, os animais foram colocados na grade da parte superior de suas gaiolas que foi invertida lentamente. Assim foi possível avaliar a função motora dos camundongos por meio da medição do tempo que cada um deles consegue se sustentar na grade [112].

3.1.2. Avaliação da mecânica do sistema respiratório

A avaliação da mecânica pulmonar foi realizada nos grupos WT, VACHT KD^{HOM}. Os animais foram anestesiados com tiopental na dose de 70mg/kg intraperitoneal. Os animais foram traqueostomizados, introduzido uma cânula de aço de calibre 40x0,12mm (BD Plastipak) na traquéia e esta foi conectada a um respirador para pequenos animais (FlexiVent, SCIREQ,

Montreal, Canadá), com volume corrente de 10mL/kg e a frequência respiratória de 150ipm.

Após a conexão dos animais traqueostomizados ao ventilador, foi calculada a impedância do sistema respiratório (Z_{rs}) dos animais de cada grupo utilizado um volume de perturbação de 16 segundos. A fim de descartando a possibilidade de haver interferência do animal, todos os animais receberam 0,02 mL de pancurônio intramuscular 2 minutos antes da coleta dos dados.

Por meio da derivação no tempo de V , obtivemos o fluxo (V'). V_{cyl} foi corrigido a fim de obter o volume que efetivamente chegou ao animal (V) e P_{cyl} foi corrigido, nos dando o valor de P_{ao} , pressão de abertura das vias aéreas.

Para o cálculo da elastância total do sistema respiratório (E_{rs}) e da resistência do sistema respiratório (R_{rs}) foi utilizada a equação do movimento do sistema respiratório:

$P_{tr}(t) = E_{rs}.V(t) + R_{rs}.V'(t)$, onde: P_{tr} é a pressão traqueal, V é o volume, V' é o fluxo e t corresponde ao tempo.

Ainda sob efeito da anestesia, os animais foram submetidos à laparotomia e foram exsangüinados.[113]

3.1.3. Lavado broncoalveolar (LBA)

Para a coleta do LBA, foi infundido 0,5 mL de salina por 3 vezes consecutivas (total volume 1,5mL), pela cânula traqueal, com o uso de uma

seringa. O volume recuperado foi centrifugado a 1000 rpm, a 5°C, por 10 min. O botão celular foi ressuspendido em 200 µL de salina. A contagem total de células foi realizada por microscopia óptica comum (Olympus CH30) com o auxílio de um hemocitômetro de Neubauer (400x). O sobrenadante foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para dosagem posterior de proteínas totais.

Para a contagem diferencial, 100 µL do LBA foram citocentrifugados (Cytospin 3, Shandon Instruments, Sewickley, USA) a 450 rpm por 6 minutos e após seca a lâmina foi corada pela técnica de Diff-Quick (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ). A contagem diferencial das células foi determinada a partir do achado de pelo menos 300 leucócitos/lâmina e a diferenciação seguiu os critérios hemocitológicos para diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos com o auxílio de um microscópio ótico Olympus CH30) com objetiva de imersão (1000X) [112].

3.1.4. Estudo morfométrico

Os pulmões foram retirados em monobloco coração-pulmão. O pulmão direito foi amarrado com o auxílio de uma linha e congelado em nitrogênio líquido e transferido para freezer -80°C. O pulmão esquerdo foi inflado com 0,1mL de formaldeído a 10% e fixado na mesma solução por 24 horas, após foi transferido para uma solução de etanol 70%. Após este período, os pulmões foram transferidos para o aparelho TP1020 da (Leica Wetzlar, Alemanha) onde realizou o processo de clareamento e desidratação do tecido. Após, o tecido foi transferido para o EG1150 (Leica Wetzlar, Alemanha) para a inclusão da

parafina e em seguida colocado em uma placa de gelo (EG1150 H Leica Wetzlar, Alemanha) para resfriamento rápido. E para obtenção de cortes de 4 µm de espessura foi realizado com o auxílio de um micrótomo (RM 2245 Leica Wetzlar, Alemanha).

3.1.4.1. Remodelamento brônquico

A coloração de Sirius-Red (Direct Red 80, CI 35780, Aldrich, EUA) foi utilizada para a contagem das fibras colágenas na parede das vias aéreas. Os cortes foram desparafinados. Além disso foram corados por 1 hora no Picro-Sírius Red (Direct Red 80, C. I. 35780, Aldrich, Milwaukee, WI, EUA) à temperatura ambiente e posteriormente lavados em água corrente por 5 minutos. Após esta etapa, os cortes foram corados pela Hematoxilina de Harris por 6 minutos e posteriormente lavados em água corrente por 10 minutos [114].

A coloração de Resorcina-Fucsina Oxidada foi utilizada para avaliação das fibras elásticas (eulanínicas e oxitalânicas) ao redor das vias aéreas. Sobre os cortes, foi gotejada uma solução aquosa de OXONA 10% e ficaram oxidando por 40 minutos. Foram então lavados em água corrente por 5 minutos e após serão submersos no álcool 70° e 95°. Após as lâminas foram coradas com Resorcina-Fucsina [115]. A quantificação de fibras colágenas e elásticas no pulmão foi realizada no analisador de imagens (Image ProPlus 4.5.029), a detecção das fibras é devido a densidade óptica. As imagens foram capturadas (aumento de 400x) por uma câmera modelo DFC420 (Leica, Wetzlar, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico trinocular DM2500 (Leica), e enviadas ao computador onde foram processadas pelo programa Qwin Plus

(Leica). Após a captura das imagens, para cada coloração, um filtro de cores que foi aplicado em todas as leituras de todos os grupos experimentais. A área da parede das vias aéreas foi determinada e os resultados foram expressos em porcentagem de área de fibras positivas (Colágenas ou Elásticas) em relação à área total da parede da via aérea [114]. As análises foram realizadas por meio do Software Image Pró-Plus (Image Pro Plus, 4.5.0.29, Cibernética Media, Inc., Bethesda, MD).

3.1.4.2. Imunohistoquímica para detecção de NF-kB, MMP-9 e TIMP-1

A imunohistoquímica para NF-kB, MMP-9 e TIMP-1 foi realizada pelo método Biotina-estreptavidina peroxidase. Para tanto, cortes histológicos de 3 µm de espessura foram realizados em lâminas silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano-Sigma, Aldrich, St. Louis, MO, USA). As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas (Xilol 1, 2 e 3; Etanol Absoluto 1 e 2, Etanol 96% e Etanol 70). Após foi realizada a recuperação antigênica pela exposição de 1 minuto a temperatura de 125°C ao vapor de uma panela de pressão (Decloaking Chamber, Bio-core medical, Califórnia, EUA) onde as lâminas estavam imersas em solução tampão (Target Retrieval Solution, DAKO, Califórnia, EUA). Foi então realizado o bloqueio das peroxidases endógena por meio de 7 lavagens de 5 minutos com água oxigenada (H₂O₂) volume 10. Após, foi realizado o bloqueio para ligações inespecíficas em solução de caseína (5 min). Foi então realizada a incubação com Anticorpo Primário NF-kB (1:400 Santa Cruz Biotechnonology, Inc., Texas, EUA), anti-MMP-9 (1:500, Santa Cruz Biotechnonology, Inc., Texas, EUA); e anti-TIMP1 (1:100, Santa Cruz

Biotechnonology., Texas, EUA) diluído em solução de BSA 5% (do inglês bovine serum albumin) e deixado *overnight* em uma câmara úmida em geladeira à 4°C. Após 18 horas da incubação com o anticorpo primário, foram incubadas por 1 hora em estufa à 37° com o anticorpo secundário. A revelação foi realizada com o cromógeno 3,3 Diaminobenzidine (DAB, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e as lâminas foram então contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Para a detecção da expressão de células positivas para NF-kB, MMP-9 e TIMP-1 ao redor das vias aéreas foi utilizada a metodologia de pontos e retas que consiste na leitura de células positivas ao redor das vias aéreas com o auxílio de um retículo de 50 retas e 100 pontos que foi acoplado a uma ocular do microscópio óptico comum e que possui uma área conhecida (10.000 μm^2 no aumento de 1000x). A razão do número de células positivas e dos pontos que coincidiam com o tecido pulmonar resultam em um número de células positivas por área $104\mu\text{m}^2$ [112]

3.1.4.3. Avaliação de células inflamatórias ao redor das vias aéreas e do edema peribrônquico

A avaliação do edema peribroncovascular e para quantificação das células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares) foi realizada na coloração de Hematoxilina e Eosina. As quantificações foram realizadas pela técnica de contagem de pontos e retas [116], por meio de um microscópio óptico (CH30, Olympus, Japão) e com o auxílio de um retículo de 100 pontos e 50 retas com área conhecida em um aumento de 1000x

O retículo foi fixado na base do epitélio, e foram quantificadas as células positivas foi dada pela razão entre o número de células em determinada área

e o número de pontos que coincide com a área peribrônquica, entre o epitélio e a adventícia. Os resultados do edema peribrônquico foram expressos em área de edema (μm^2) e os resultados das células foram expressas em célula por unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$) [114]. Para todas as análises foram avaliados de 3 a 5 vias aéreas randomicamente selecionados por corte.

3.1.5. Quantificação de proteína total no homogenato de pulmão no LBA

A determinação do conteúdo proteico no LBA foi realizada utilizando o Método de Bradford (Biorad, CA, USA). Foi realizada uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 mg/mL. Após a pipetagem, as placas foram mantidas no escuro por 10 minutos, e a leitura foi realizada por um espectrofotômetro (Epoch R BioTek) por meio do programa GEN 5.1.1.1 com leitura em densidade óptica de 595nm.

3.1.6. Elisa para detecção de IL-6, IL-10, IL-4, IL-13 e TNF- α

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado no homogenato pulmonar para as citocinas: IL-6, IL-10, IL-4, IL-13 e TNF- α utilizando o Kit Duo-Set da R&D Research and Development (San Diego, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação das citocinas foi realizada por um espectrofotômetro de placa (Epoch - Biotek, Vermont, EUA) e pelo programa GEN 5.1.1.1 utilizando um comprimento de onda de 450 nm. [112]

3.1.7. Western blot para detecção de dos componentes colinérgicos

O pulmão esquerdo congelado foi homogeneizado com o auxílio de um polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments modelo PT 10/35) em 1,5 mL de tampão a 100°C (1% g/mL SDS, 100 mM Trisma (pH 7,5), 10 mM EDTA, 100

mM pirofosfato de sódio tetra hidratado, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM ortovanadato de sódio). Após a homogenização, uma fração das amostras foi colocada em um tubo para microcentrífuga e mantida em banho seco por aproximadamente 10 min a 96° C, e subsequentemente mantidas em gelo. Os extratos desses tecidos foram centrifugados a 12.000 rpm a 4°C por 40 min para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, parte do sobrenadante foi utilizada para determinação do conteúdo proteico por espectrofotometria com reagente Bradford (Biorad, CA, USA). O sobrenadante das amostras foi tratado com tampão de Laemmli (1970) contendo DTT 200 mM e aquecido em banho seco a 96°C por 5 minutos. Estas amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) no aparelho para minigel (Mini-Protean). Em cada gel foi utilizado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos (Thermo Scientific Massachusetts, EUA)

A transferência das proteínas separadas no gel foi realizada eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de transferência semi-seca (Transblot SD Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad) por 90 minutos a 15 volts. Porém, no tampão, foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação desta com uma solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) a 4°C *overnight*. As membranas foram lavadas com solução basal por 30 min, e então, incubadas com anticorpo primário diluído em solução basal. Os

anticorpos utilizados foram: anti-VACHT (Abcam, Cambridge, Massachusetts, 1:1,000), anti-M2 mAChR (Abcam, Cambridge, Massachusetts, 1:10,000), anti- $\alpha 7$ nAChR (Abcam, Cambridge, Massachusetts, 1:500), anti-CHT1 (Abcam, Cambridge, Massachusetts, 1:1,000) , anti-AChE (Abcam, Cambridge, Massachusetts, 1:1,000), anti-JAK-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA 1:1,000) , anti-SOCS-3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA 1:1,000), anti-STAT-3 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA 1:1,000), anti-pSTAT-3 (1:1,000) (Cells Signaling, Danver, Massachusetts), anti-p65NF-kB Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA 1:400) e anti- β -actina (1:1,000) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). As membranas foram mantidas assim a 4°C *overnight* ou 4 horas à temperatura ambiente e foram novamente lavadas, com solução basal, por 30 min. As membranas foram então, incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado à peroxidase. Para a revelação e posterior quantificação das proteínas, a membrana foi incubada por 1 minuto em uma solução contendo: luminol (2,5 mM), ácido p-cumárico (450 uM); Tris pH 8,5 (100 uM), H₂O₂ (5,4 mM). A intensidade das bandas foi quantificada pelo programa Uviband (Uvitec, Cambridge, EUA) e corrigidas pela proteína constitutiva β -actina (1:1000, Cell, Massachusetts, EUA). Os resultados estão expressos como porcentagem em relação ao controle (Grupo WT).

3.1.8. Extração de RNA e transcrição reversa e quantitativa em tempo real (real time qRT-PCR)

A reação de transcriptase reversa e seguida da reação de cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), foi realizada para mensurar mRNA de VACHT no pulmão e na medula dos animais geneticamente modificados. Foram utilizados pulmão e medula espinhal congelados em freezer -80 °C. O RNA total foi extraído utilizando 1 mL para o pulmão e 500 uL para medula de Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). As amostras foram homogeneizadas em um polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, modelo PT 10/35) e transferidas para tubos eppendorf deixando em incubação em temperatura ambiente por 5 minutos no gelo. Em seguida, os tubos são centrifugados por 10 minutos a 12000 g a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo eppendorf e adicionado 200 µL de clorofórmio (Merck); os tubos foram vertidos fortemente, e deixados em repouso por 3 minutos em seguida foram centrifugados por 15 minutos a 12000g a 4 °C. Após a centrifugação é possível observar 3 diferentes fases: a fase aquosa onde está o RNA de interesse, a interface que contém proteínas e DNA e por último a fase com o clorofórmio e restos de tecido. A fase aquosa que contém o RNA é transferida para um novo tubo e a ela é adicionado 500 µL de isopropanol e incubado por 10 minutos após agitação rigorosa, centrifugado (10 min – 4 °C., 12000g) e retirado o e descartado seu sobrenadante e o pellet resuspendido com água Milli que (30 µL). A quantificação do RNA total foi determinada por um nanoespectrofotometro de comprimento de onda (260/280 nm) onde o comprimento de 260 nm refere-se à quantidade de ácido nucleico e

o 280 nm refere-se à quantidade de proteína. A relação entre essas absorvâncias foi considerada boa quando estas se encontravam dentro dos valores 1,8 a 2,0.

A expressão gênica foi avaliada em tempo real qRT-PCR usando o Rotor Gene (Qiagen, Roermond, Netherlands) and SYBR Green como corante fluorescente (Qiagen) com GAPDH como um gene constitutivo. A condições da reação foram: 95°C por 5 minutos, então 40 ciclos de 95°C por 5 segundos e 60°C por 10 segundos. Os produtos do PCR foram então submetidos a corrida em um gel de agarose para confirmar o tamanho do fragmento e a especificidade da amplificação. Os primers usados e a temperatura de recozimento foram para o GAPDH (5'-3' sense: CCACCACCCTGTTGCTGTAG; 5'-3' antisense: CTTGGGCTACACTGAGGACC; 60°C; NM_008084) e VACHT (5'-3' sense: CCCTTTTGATGGCTGTG; 5'-3' antisense: GGGCTAGGGTACTCATTAGA; 60°C; NM_10167164). Os dados foram obtidos como valores do número de ciclos [117] (ct = número de ciclos como um logaritmos das barras de PCR calculados em cada linha) e utilizadas para determinar os valores de Δct values (Δct = (ct do gene de ineteresse) - (ct do gene constitutivo). Os valores são expressos em porcentagem do controle WT.

3.2. Experimento II – Efeito da redução de VACHT na lesão pulmonar aguda induzida pela instilação intratraqueal e intraperitoneal de LPS

Outro grupo de animais da linhagem VACHT foram então separados nos seguintes grupos experimentais. O número de animais utilizados foi de 8 a 10 por grupo.

- **A.** Animais geneticamente modificados com redução de VACHT que receberam instilação com salina intratraqueal ou intraperitoneal (KD^{HOM})
- **B.** Animais controles sem modificação genética que receberam instilação com salina intratraqueal ou intraperitoneal (WT)
- **C.** Animais geneticamente modificados com redução de VACHT que receberam instilação de LPS intratraqueal ou intraperitoneal (KD^{HOM} + LPS)
- **D.** Animais controles sem modificação genética que receberam instilação de LPS intratraqueal ou intraperitoneal (WT+LPS)

Adicionalmente, foram ainda formados mais quatro grupos experimentais:

- **E.** Animais controles sem modificação genética que receberam instilação de LPS intratraqueal e PNU intraperitoneal. (WT+PNU)
- **F.** Animais controles sem modificação genética que receberam instilação de LPS intratraqueal e Pilocarpina intraperitoneal. (WT+PILO)
- **G.** Animais geneticamente modificados com redução de VACHT que receberam instilação de LPS intratraqueal e PNU intraperitoneal. (KD+PNU)
- H.** Animais geneticamente modificados com redução de VACHT que receberam instilação de LPS intratraqueal e Pilocarpina intraperitoneal. (KD+PILO)

3.2.1. Protocolo de instilação de LPS intraqueal

Os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório (1ml/3LO2/5%). Foi então realizado uma abertura para exposição da traqueia, e instilado LPS intraqueal (Serotype 026:B6/ L3755, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído em salina na dose de 5mg/kg [110] ou salina utilizando uma agulha (calibre 0,38x13mm /BD Plastipak). Ainda sob efeito da anestesia, os animais foram suturados com linha cirúrgica (nylon 4.0, NPA373, Brasuture) e avaliados após 1h30min, 6h, 24h e 72h a inflamação pulmonar por LBA. Além disso no grupo 24 horas foi realizada a mecânica Pulmonar, citocinas e imunohistoquímica para macrófagos.

3.2.2. Protocolo de instilação de LPS intraperitoneal

Os animais receberam LPS intraperitoneal (Serotype 026:B6/ L3755, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído em salina na dose de 5mg/kg [110] ou salina utilizando uma agulha (calibre 0,38x13mm /BD Plastipak) e após 24h foi avaliado o LBA.

3.2.3. Tratamento com PNU nos animais VACHT

Parte dos animais receberam PNU 282987 (Tocris, Bristol, United Kingdom), intraperitoneal, um agonista do $\alpha 7$ nAChR, na dose de 10 mg/kg de animal, trinta minutos antes da instilação do LPS, de acordo com protocolo descrito previamente por Kawahara et al. (2011) [118]. Este tratamento foi realizado somente nos grupos LPS intratraqueal.

3.2.4. Tratamento com pilocarpina nos animais VACHT

Os animais receberam pilocarpina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) intraperitoneal, agonista de M3 mAChR, na dose de 200mg/kg do animal, trinta minutos antes da instilação de LPS [119]. Este tratamento foi realizado somente nos grupos LPS intratraqueal .

Nestes grupos foi realizado lavado broncoalveolar, no momento de 24 horas após o LPS, conforme descrito acima.

3.2.5. Mecânica pulmonar

As medidas de mecânica pulmonar do Sistema Respiratório foram realizadas exatamente da mesma maneira do experimento I

Além disso, foram realizados cálculos dos dados de oscilação forçada e foram feitas correções, considerando as perdas devido à compressibilidade dos gases. A ventilação mecânica foi parada somente para a aplicação das perturbações. Para análise das impedâncias obtidas, foi utilizado o modelo de fase constante, descrito por Hantos et al.(1992)[113]:

$$Z(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}$$

Onde R_{aw} é a resistência de vias aéreas, I_{aw} é a inertância, G caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares, H caracteriza a energia acumulada no tecido do pulmão, i é a unidade imaginária, f é a frequência e

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan\left(\frac{H}{G}\right)$$

3.2.6. Imunohistoquímica para detecção de macrófagos alveolares MAC-2

A imunohistoquímica foi realizada no grupo 24 horas como descrito no Experimento I, apenas com a diferença que nesta etapa utilizamos o anticorpo para marcação de anti-MAC-2 (1:40.000, CL8942AP, Cedarline Labs.)

A avaliação da mecânica pulmonar, LBA, ELISA, cortes histológicos para colorações foi realizada da mesma forma descrita acima.

3.3. Experimento III – O potencial efeito terapêutico do PNU, $\alpha 7$ em modelo de LPS em C57Bl6.

3.3.1. Grupos Experimentais

Foram utilizados animais C57Bl6 vindos do Biotério Central da FMUSP.

Os animais foram então separados nos seguintes grupos experimentais:

- **A** Animais que receberão salina intratraqueal. (Controle)
- **B** Animais que receberão LPS intratraqueal. (LPS)
- **C** Animais que receberão LPS intratraqueal e PNU intraperitoneal na dose de 10 mg/kg antes da instilação de LPS. (Pré 10)
- **D.** Animais que receberão LPS intratraqueal e PNU intraperitoneal na dose de 2,5 mg/kg. (Pós 2,5)
- **E** Animais que receberão LPS intratraqueal e PNU intraperitoneal na dose de 5 mg/kg. (Pós 5)
- **F** Animais que receberão LPS intratraqueal e PNU intraperitoneal na dose de 10 mg/kg. (Pós 10)

Os animais foram pesados antes da instilação de LPS e após

3.3.2. Protocolo de tratamento com PNU

Os animais receberam instilação intratraqueal de LPS como descrito no Experimento II e após 6 horas foram tratados com diferentes doses de PNU-282987: 2,5 mg/kg, 5 mg/kg e 10 mg/kg. E o grupo experimental C recebeu 30 minutos antes da instilação de LPS a dose de 10 mg/kg de PNU.

3.3.3. Imunohistoquímica para detecção de metaloproteinases e TIMP-1

A imunohistoquímica foi realizada como descrito no Experimento I para MMP-9 e TIMP-1, apenas com a diferença que nesta etapa utilizamos também anticorpo para marcação de MMP-2: anti-MMP-2 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, EUA).

3.3.4. Western blot para detecção NF- κ B

O Western Blot foi realizado como descrito no Experimento I.

3.3.5. Extração de RNA e transcrição reversa e quantitativa em tempo real (real time qRT-PCR)

O qRT-PCR foi realizado como descrito no experimento I. Entretanto nesta etapa, analisamos o perfil de macrófagos e para esta análise utilizamos os seguintes primers:

<i>Nome</i>	<i>Forward sequence (5'-3')</i>	<i>Reverse sequence (5'-3')</i>
<i>CD68</i>	TTCTGCTGTGGAAATGCAAG	AGAGGGGCTGGTAGGTTGAT
<i>M1 markes</i>	AATACCCACCCACCTTTTGA	TTGAGATCCGGGTTTGAGAT
<i>IFR5</i>	AATACCCACCCACCTTTTGA	TTGAGATCCGGGTTTGAGAT
<i>IL-12</i>	CGCAAGAAAGAAAAGATGAAGGAG	TTGCATTGGACTTCGGTAGATG
<i>CXCL-9</i>	TGCACGATGCTCCTGCA	AGGTCTTTGAGGGATTTGTAGTGG-3'
<i>CXCL- 10</i>	GACGGTCCGCTGCAACTG	GCTTCCCTATGGCCCTCATT
<i>iNOS</i>	ACCCGTCCACAGTATGTGAGGA	GACCCCAAGCAAGACTTGGACT
<i>M2 markes</i>		
<i>IFR4</i>	CAAAGCACAGAGTCACCTGG	TGCAAGCTCTTTGACACACA
<i>FIZZ 1</i>	TCCCAGTGAATACTGATGAGA	CCACTCTGGATCTCCCAAGA
<i>YM 1</i>	GGGCATACCTTTATCCTGAG '	CCACTGAAGTCATCCATGT
<i>ARG 1</i>	GCACTCATGGAAGTACACGAGGAC	CCAACCCAGTGATCTTGACTGA

PCR: reação em cadeia da polimerase, M1: macrófago tipo 1, M2: macrófago tipo 2.; ARG 1: arginase 1

A avaliação da mecânica pulmonar, LBA, ELISA, cortes histológicos para colorações foi realizada da mesma forma descrita acima.

3.4. Análise dos Resultados

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o programa Sigma Stat (Jandel Scientific, San Rafael, CA) e foi utilizado T-test para o experimento 1, análise de variância um fator (experimento 2 e 3) ou dois fatores (ANOVA) (experimento 2). As comparações múltiplas foram feitas pelo Holm-Sidak. Os dados foram apresentados em forma de média $\pm$ erro padrão. Foi considerado estatisticamente significativo o $P \leq 0,05$.

4.RESULTADOS

4.1. Experimento I – Efeito da redução de VAcHT na função e na histopatologia pulmonar

4.1.1. Teste de função motora

Esta análise foi realizada no início do protocolo a fim de confirmar o fenótipo do animal com deficiência de ACh. Os animais VAcHT KD^{HOM} permaneceram um menor tempo que os animais selvagens (WT) ($p < 0,001$) (Figura 7A). Além disso o peso dos animais VAcHT KD^{HOM} foi menor que o do grupo selvagem (WT) ($p < 0,05$) (Figura 7B).

Figura 7. Tempo de sustentação na grade e peso. (A) Sustentação dos animais na grade podemos observar que os animais VAcHT KD^{HOM} se mantem por menor tempo em relação aos (WT). ($*p < 0,001$) comparado ao grupo selvagem. **(B)** O peso dos animais mutantes é menor quando comprado aos animais selvagens ($*p < 0,05$). Tempo representado sem segundos e o Peso em gramas. Os dados foram apresentados em média $\pm$ SE.

4.1.2. Quantificação dos níveis VACHT no pulmão e na medula espinal

Para confirmar o fenótipo dos animais mutantes, quantificamos o mRNA VACHT e os níveis da proteína VACHT na medula espinal (8A e 8B) e no pulmão (8C e 8D). Foi observado que os mutantes apresentam aproximadamente 70% menos de VACHT que os animais WT tanto no pulmão quanto na medula espinal (Figura 8A-D) ($p < 0.05$).

Figure 8. Expressão genica e proteica VACHT. Expressão do mRNA de VACHT (A) quantificado por qRTPCR e o conteúdo proteico de VACHT (B) quantificado por Western Blot na medula espinal e do pulmão de animais WT e VACHT KD^{HOM}. Expressão do mRNA de VACHT (C) quantificado por qRTPCR e conteúdo proteico de VACHT (D) quantificado por Western na medula espinal e pulmão de animais WT e VACHT KD^{HOM}. Ambos foram apresentados com a porcentagem pelo controle WT. Os géis (B e D) são representações dos resultados (* $p < 0.05$). Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM.

4.1.3. Quantificação da expressão das proteínas AChE, M2, CHT1 e $\alpha 7$ nAChR no homogenato pulmonar pulmão

Para entender se a redução de VACHT induziu qualquer alteração em outros compostos colinérgicos no pulmão, foram quantificadas as proteínas de M2, AChE, M2, CHT1 e $\alpha 7$ nAChR. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos.

Figura 9: Componentes colinérgicos no pulmão. Receptor muscarínico 2 (M2), transportador de colina de alta afinidade (CHT1), $\alpha 7$ receptor nicotínico ($\alpha 7$ nAChR) e a expressão da proteína acetilcolinesterase (AChE) foram analisados por Western Blot. O gel representativo dos resultados que foram obtidos numa experiência que foi repetida por duas vezes. Os gráficos representam os valores normalizados por β -actina.

4.1.4. Análise do LBA e de células inflamatórias no tecido pulmonar

Observamos que a deficiência VACHT induziu um edema intenso peribroncovascular nos camundongos geneticamente modificados em comparação com WT ($P < 0,001$) (Figura 10). Fotomicrografias representativas de lâminas de tecido pulmonar coradas com H & E estão representadas nos painéis 10 B, C e D. As fotos do grupo WT mostrou escasso infiltrado peribrônquico (Fig. 10B), enquanto as do grupo VACHT KD^{HOM} demonstraram edema peribroncovascular com células inflamatórias (Figura 10 C e D).

Também foi avaliada a quantidade de proteína total no LBA, uma medida indireta de edema pulmonar. Os camundongos mutantes apresentaram níveis elevados de proteínas totais na LBA em comparação com animais WT ($P < 0,01$, Figura 10 E).

Em seguida, observamos o infiltrado celular, tanto no LBA (Figura 10F) como nas paredes das vias aéreas (10 G e H). Camundongos mutantes apresentaram aumento nos macrófagos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos recuperado no LBA (F) em comparação com WT ($P < 0,05$). Ao redor das vias aéreas, observamos um aumento de células mononucleares (G) em comparação com WT ($P < 0,05$). Embora tenha uma tendência para um aumento no número de células polimorfonucleares (H) nas vias aéreas dos VACHT KD^{HOM}, este não foi estatisticamente significativa.

Figura 10: Edema peribrônquico e inflamação pulmonar. VACHT KD^{HOM} apresentou aumento no edema peribroncovasculares (* $P < 0,001$ comparado ao grupo WT). Fotomicrografias representativas que ilustram o edema e o infiltrado celular peribrônquico em torno das vias aéreas obtidas dos VACHT KD^{HOM} (C e D) comparadas aos selvagens (B). (E). Proteína total avaliada no LBA (n = 7-8 por grupo, * $P < 0,01$ comparado aos WT). F. Macrófagos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos encontrados no LBA (n = 7-8 por grupo, * $P < 0,05$ vs WT). G e H representam, células mononuclear peribroncovasculares (* $p < 0,05$ vs WT) e células polimorfonucleares, respectivamente, avaliadas em torno das vias aéreas. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM.

4.1.5. ELISA para análise de citocinas no tecido pulmonar

Avaliamos se a deficiência colinérgica interfere com a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-4 e IL-13) e de citocina reguladora de IL-10 (Figura 11A a E, respectivamente). Curiosamente, o TNF- α e IL-4 apresentaram valores maiores em animais VAcHT KD^{HOM} comparados ao grupo WT ($P < 0,05$). No entanto, IL-6, IL-13 e IL-10 apresentaram valores semelhantes nos dois grupos estudados.

4.1.6. A deficiência de VAcHT modula as vias p65-NF-kB e JAK-2-STAT-3 no pulmão

Foi avaliada a expressão da proteica de p-65-NF-kB no homogenato pulmonar. Observamos aumento na expressão de NF-kB no pulmão em camundongos mutantes em comparação ao grupo WT ($P < 0,05$) (Figura 12A). A fim de observar se as células positivas para p-65-NF-kB nas vias aéreas foram também alteradas foi realizada a imunohistoquímica no tecido pulmonar (Figura 12B). Os camundongos VAcHT KD^{HOM} apresentaram aumento do número de células positivas de NF-kB em torno das vias aéreas em comparação com WT ($P < 0,001$). Nas fotomicrografias podemos observar células positivas e negativas para o NF-kB em torno das vias aéreas, grupo WT (C e D) e VAcHT KD^{HOM} (E e F).

Também foram avaliados em homogeneizado pulmonar a expressão das proteínas: JAK-2, STAT-3, pSTAT-3 e SOCS-3. Encontrou-se uma redução na expressão de JAK-2 no pulmão em camundongos mutantes em comparação ao grupo WT ($P < 0,05$) (Figura 13A). Não houve diferença

significativa no conteúdo de STAT-3, pstat-3 e SOCS-3 (Figuras 13B, 13C e 13D). Embora uma tendência a uma redução de expressão de STAT-3 pode ser observada, a relação de p-STAT3 / STAT3 não foi diferente entre os grupos, sugerindo que o STAT-3 não foi ativado neste modelo.

Figura 11. Citocinas no homogenato pulmonar. As citocinas foram quantificadas por ELISA no homogenato pulmonar. VACHT KD^{HOM} apresentou aumento nos níveis de TNF- α e IL-4 comparado aos animais wild-type. * $p < 0.05$. (n=5, Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM.)

Figura 12: Expressão da proteína 65-NF-kB no pulmão. A expressão da proteína da p65-NF-kB foi mensurada por western blot (A). O gel é representativo dos resultados obtidos no experimento que foi repetido duas vezes. O resultado foi normalizado por β -actina. * $P < 0.05$ comparado ao grupo WT (n=5 por grupo). O número de células positivas para p65-NF-kB (B) foi analisado por imunohistoquímica de tecido parafinado. Fotomicrografias representativas das células positivas para NF-kB (C- F) mostram um aumento na marcação dos VACHT KD^{HOM} (E e F) comparado ao grupo wild-type (C e D). As setas indicam as células positivas ao redor da via aérea. * $P < 0.001$. (n=6-8 animais).

Figura 13: Expressão da via JAK/STAT no pulmão. Janus Quinase 2 (JAK-2) (A), Transdutores de sinal e ativadores de transcrição3 (STAT3) (B) e o fosforilado STAT3 (C) e o supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS-3) (D) A expressão proteica foi mensurada por Western Blot. O gel é representativo do resultado obtido de dois experimentos independentes. Os dados representados nos gráficos foram normalizados por β -actina. * $p < 0.05$.

4.1.7. Efeitos da deficiência de VACHT na deposição de MEC nas vias aéreas

Os animais VACHT KD^{HOM} apresentam maior resposta inflamatória, mesmo na ausência de qualquer lesão, e por isso nos perguntamos se esta resposta inflamatória levaria a um remodelamento das vias respiratórias. Na Figura 14A e 14B, verificou-se que a deficiência de VACHT induziu um aumento no conteúdo de fibras colágenas e de fibras elásticas em torno das vias aéreas em relação ao grupo WT ($P < 0,001$ e $P < 0,05$, respectivamente). Um desequilíbrio na expressão de MMP-9, e o TIMP-1 está relacionado a deposição de matriz MEC [120]. Por isso, utilizamos a análise imuno-histoquímica para investigar as células positivas para MMP-9 e TIMP-1 expressão em vias aéreas. VACHT KD^{HOM} mostraram um aumento da quantidade de células positivas MMP-9 (14C) e TIMP-1 (14D). Em comparação com WT, $P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente]. A MMP-9 foi aproximadamente duas vezes maior nos VACHT KD^{HOM}, enquanto o aumento do TIMP-1 foi aproximadamente três vezes maior do que o observado no grupo WT, sugerindo uma diminuição na proteólise e um *turn-over* das fibras da matriz extracelular e o remodelamento [120].

Fotomicrográfas representativas coradas com Picro-Sirius para detectar fibras de colágeno estão apresentadas nas Figuras 14E e 14H. Notamos que as vias aéreas obtidas dos animais do grupo WT apresentam uma coloração mais amena de fibras de colágeno ao redor das vias aéreas (Figura 14E), coincidente com a manutenção da histoarquitetura dos ECM (setas). Em contraste, o corte obtido de pulmão de um animal VACHT KD^{HOM}

apresenta maior deposição de fibras de colágeno ao redor das vias aéreas (Figura 14H). Painéis F, I, G, J e mostraram células positivas para a MMP-9, e o TIMP-1, respectivamente, nos dois grupos estudados. VChT-KD^{HOM} apresentou um aumento de células positivas para a MMP-9 e TIMP-1 (setas) em torno de vias aéreas em comparação com WT.

Figura 14: Remodelamento de vias aéreas. Fibras de colágenos (A) e fibras elásticas (B). Foi avaliado tecido pulmonar armazenado em parafina corado com Picro-Sirius e Resorcin-Fuchsin respectivamente, e foi analisado ao redor das vias aéreas utilizando um sistema de Análises de imagem. Número de células positivas para MMP-9 (C) e TIMP-1 (D) foi quantificado por imunohistoquímica. O conteúdo de colágeno aumentou no grupo VACHT KD^{HOM} como podemos observar na figura E (WT) E H (VACHT KD^{HOM}). Fotomicrografia representativa para detectar MMP-9 (F e I) e TIMP-1 (G e J) apresentam um aumento nos camundongos geneticamente modificados. A e D *P<0.001, B e C *P<0.05.

4.1.8. A deficiência de VACHT aumenta a resistência e elastância do sistema respiratório

Avaliamos se há alteração da função pulmonar por meio da análise da resistência do sistema respiratório (Rrs) e elastância (Ers) basal e após a curva dose-resposta à metacolina no grupo selvagem e nos camundongos mutantes. Os valores absolutos de Rrs e Ers obtidos na curva de dose-resposta de metacolina são mostrados nas Figuras 15A e 15B, respectivamente. Os valores basais não foram significativamente diferentes entre os grupos (15-A e B). Para avaliar hiperresponsividade das vias aéreas, comparou-se a percentagem máxima de Rrs e ERS (C e D), e verificou-se que os camundongos mutantes apresentaram um aumento na porcentagem de resposta máxima da Rrs (15C), em relação ao grupo selvagem ($P < 0,05$), o que pode ser evidenciado na resposta a dose máxima de metacolina na Rrs ($P < 0,05$).

Figura 15: Mecânica Pulmonar. Elastância do Sistema Respiratório (Ers) (A e B) e resistência (Rrs) (C e D) analisadas nos grupos WT e VACHT KD^{HOM}. Foi realizada curva dose resposta a metacolina e os valores foram obtidos 30 segundos após a infusão (B e D). Também analisamos a porcentagem da resposta a maior dose de metacolina (A e C). Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM foram utilizados de 6-8 animais por grupo. *P<0.05 comparado ao wild-type.

4.2. Experimento II – Efeito da redução de VACHT na lesão pulmonar aguda induzida pela instilação intratraqueal e intraperitoneal de LPS

4.2.1. Células inflamatórias no LBA ao longo do tempo

O grupo VACHT KD^{HOM} que recebeu apenas salina apresenta aumento na quantidade de células totais comparada ao WT salina e macrófagos comparado ao VACHT KD^{HOM} salina ($P<0,05$). O grupo WT LPS que foi avaliado 1h30 depois da instilação de LPS apresentou aumento em células totais e macrófagos quando comparado ao seu controle WT salina ($P<0,05$). O VACHT KD^{HOM} 1h30 apresentou aumento de neutrófilos quando comparado ao seu controle ($P<0,05$). Os animais WT e VACHT KD^{HOM} que foram avaliados 6h após a instilação de LPS tiveram a quantidade de células totais e neutrófilos aumentados quando comparados ao grupo controle WT salina e VACHT KD^{HOM} salina respectivamente ($P<0,05$), e ainda o grupo WT apresentou aumento no número de macrófagos quando comparado ao WT SAL ($P<0,05$). Os grupos WT e VACHT KD^{HOM} foram avaliados 24h após a instilação de LPS não apresentaram diferença entre eles, mas apresentaram um aumento em células totais, macrófagos e neutrófilos em relação ao grupo Salina ($P<0,05$). E os animais avaliados 72h após a instilação de LPS apresentaram um aumento em relação ao seu controle e ao demais grupo em células totais neutrófilos e macrófagos ($P<0,05$) ($P<0,05$), e não apresentaram diferença entre WT e o KD^{HOM} LPS. (Figura 16).

Figure 16. Células inflamatórias no LBA. Células totais **(A)** Macrófagos **(B)** neutrófilos **(C)**. (* $p < 0,05$ comparado ao controle), (** $p < 0,05$ comparado aos demais grupos) (# $p < 0,001$ e comparado ao grupo LPS 1h30). Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM.

4.2.2. Medidas de mecânica respiratória

Avaliando os efeitos da deficiência colinérgica na função pulmonar 24h depois da instalação com LPS ou salina, observa-se (figura 17) que animais que receberam LPS apresentaram um aumento de Rrs, Ers, Htis e Gtis comparados aos grupos salinas. Comparando os grupos VACHT KD^{HOM}-LPS e WT-LPS não apresentaram diferença. ($P < 0,05$ para todas as comparações). Considerando o Raw, não observamos diferença entre os grupos: VACHT KD^{HOM}-LPS e WT-LPS.

Figura 17 - Mecânica Pulmonar: **A.** Resistência do sistema respiratório (Rrs), **B.** Elastância do sistema respiratório (Ers), **C.** Resistência de tecido (Gtis) e **D.** elastância de tecido pulmonar (Htis). Nota-se que houve aumento dos parâmetros da mecânica pulmonar nos animais que receberam LPS em relação aos grupos salinas. * $p < 0,05$ comparado aos grupos Salina. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM.

4.2.3. Imunohistoquímica para MAC-2

Para confirmar que a deficiência colinérgica sistêmica não afetou a inflamação pulmonar avaliamos também macrófagos alveolares por imunohistoquímica com anticorpo para MAC-2. A quantificação de células positivas para macrófagos está na figura 10. Corroborando com os dados do LBA, observamos que os grupos WT-LPS e KD^{HOM}-LPS apresentaram um aumento de células positivas para MAC-2-quando comparado aos animais que receberam salina ($P < 0,05$). Não houve diferença entre animais WT e

Figura 18 – Células positivas MAC-2. Nota-se que houve aumento das células positivas para MAC-2 nos animais que receberam LPS quando comparados aos salinas. * $p < 0,05$ comparado aos grupos Salina. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM.

4.2.4. Imunohistoquímica para NF-kB

Avaliamos então a ativação de NF-kB por imunohistoquímica com anticorpo anti-p65-NF-kB. A quantificação de células positivas para NF-kB está apresentada na figura 19. O grupo WT- LPS apresentou um aumento de células positivas para NF-kB quando comparado aos animais que receberam salina ($p < 0.05$). E não apresentou diferença quando comparado ao grupo KD^{HOM} -LPS.

Figura 19 – Células positivas NF-kB. Nota-se que houve aumento das células positivas para NF-kB quando comparados aos salinas. * $p < 0,05$ comparado aos grupos Salina. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM.

4.2.5. Fibras de colágeno

Remodelamento pulmonar é uma etapa secundária da inflamação importante. Então avaliamos um dos parâmetros de remodelamento que é a deposição de colágeno. O grupo que selvagem que recebeu LPS apresentou um aumento de fibras de colágeno quando comparado aos animais que receberam salina ($p < 0.05$). (Figura 20)

E não apresentou diferença quando comparado ao KD^{HOM} -LPS.

Figura 20 – Fibras de Colágeno: Nota-se que houve aumento das Fibras de Colágeno quando comparados aos salinas. * $p < 0,05$ comparado aos grupos Salina. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM.

4.2.6. LBA animais que receberam LPS intraperitoneal

No modelo em que os animais receberam LPS ip, observamos um aumento de células totais (A) e macrófagos (B) no LBA em 24 horas quando comparado aqueles grupos que receberam salina ($p < 0,05$). Novamente, não houve diferença significativa entre os animais dos grupos KD^{HOM} e WT (Figura 21). Diferentemente do observado nos modelos com LPS intratraqueal, o modelo sistêmico não induziu e 24 horas aumento de neutrófilos.

Figura 21 – Lavado Broncoalveolar de animais que receberam LPS intraperitoneal avaliados em 24 horas. Células Totais (A), Macrófagos (B). Nota-se que houve aumento das Células Totais e Macrófagos quando comparados aos salinas. * $p < 0,05$ comparado aos grupos Salina. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM.

4.2.7. Lavado broncoalveolar

Avaliamos células inflamatórias no lavado broncoalveolar dos animais que receberam LPS ou salina e foram estimulados farmacologicamente com agonista dos receptores $\alpha 7$ nAChR (PNU) e agonista do M3 mAChR (Pilocarpina). Na Figura 14, O número de células totais aumentou nos animais selvagens que receberam LPS quando comparados aos animais controle que receberam apenas salina. (Linha controle, $p < 0,001$).

Notamos que os animais mutantes tratados com pilocarpina e com PNU não apresentam alteração nas células totais, macrófagos e neutrófilos, o selvagem que foi tratado com PNU reduziu células totais, macrófagos e neutrófilos quando comparado do grupo WT LPS e os WT tratados com pilocarpina apresentou aumento somente quando comparado ao grupo que recebeu PNU. ($P < 0,05$ WT comparado ao grupo PNU) e ($P < 0,05$ PILO comparado ao PNU)

Figura 22- BAL de animais que receberam instilação de LPS. Os dados mostram que os tratamentos não surtiram efeito nos animais KD^{HOM} , enquanto que nos selvagens o número de células totais, macrófagos e neutrófilos aumentaram nos animais tratados com pilocarpina e diminuiu nos animais tratados com PNU. * $p < 0,05$ comparado aos grupos selvagens e PILO; ** $p < 0,01$ comparado aos grupos selvagens veículo e PNU. Os dados foram expressos em média $\pm$ SEM.

4.3. Experimento III – O potencial efeito terapêutico do PNU, $\alpha 7$ em modelo de LPS em C57Bl/6

4.3.1. Curva dose-resposta do PNU em células inflamatórias do LBA

O tratamento com PNU que um agonista de alta seletividade do $\alpha 7$ nAChR, ocorreu após 6 horas da instilação de LPS, momento em que os animais já tinham inflamação pulmonar neutrofílica [101]. A fim de determinar uma dose eficaz de PNU in vivo com três doses diferentes no recrutamento de neutrófilos, uma característica da SDRA. O grupo LPS apresentou um aumento em células totais (Figura 23 A) e de neutrófilos (Figura 23 B) quando comparado com o grupo de solução salina ($P < 0,01$). O pré-tratamento PNU reduziu células totais, macrófagos (Figura 23C) e neutrófilos ($P < 0,01$ para todas as comparações). Considerando o efeito terapêutico de PNU, verificou-se que apenas a dose de 10 mg / kg reduziu o número de células totais e os neutrófilos em relação ao LPS, LPS 2,5 e 5,0 ($P < 0,01$ para todas as comparações). Além disso, não houve diferença entre os animais tratados com PNU 10, os animais pré-tratados e o grupo de controle. Além disso, o grupo PNU 2,5 e PNU 5,0 apresentaram um aumento de células totais e neutrófilos, quando em comparação com o grupo salina ($P \leq 0.01$ para todas as comparações).

A fim de determinar se o PNU se a dose de 10 mg / kg influenciaria no grupo salina, avaliou-se recuperado de neutrófilos no LBA. Não houve diferença entre o número de neutrófilos no LBA dos grupos tratados com veículo de solução salina ou com PNU (t-teste, $P = 0,28$). Por esta razão, foi utilizado para os outros parâmetros apenas o grupo salinas e animais tratados com o veículo como um grupo de controle.

Figura 23- Células totais do BAL: As células totais (A), (B) de neutrófilos e macrófagos (C) recuperados no LBA. De animais LPA induzida por LPS que foram pré e pós-tratadas com um agonista de $\alpha 7$ nAChR, PNU- 282987. * $p < 0,01$ comparado com o controle; ** $P < 0,05$ comparado com o grupo de LPS. Os gráficos representam a média $\pm$ EP de 7-8 animais por grupo.

4.3.2. Efeitos do PNU na proteína total e nas citocinas do BALF

Para investigar se a estimulação do $\alpha 7$ nAChR controlar as citocinas pró-inflamatórias quantificamos no LBA: IL-1 β (Figura 16 A), TNF- α (Figura 24 B), a IL-6 (Figura 24 C), KC (Figura 24 D) e também a citocina reguladora IL-10 (Figura 24 E). Os animais tratados com LPS apresentaram um aumento em IL-1 β , TNF- α , IL-6, KC e também na produção de IL-10 em comparação com o grupo de controle ($P < 0,01$). Tanto no pré-tratamento quanto no pós-tratamento com PNU houve redução destas citocinas ($P < 0,05$). Embora reduzida em comparação com o LPS, os níveis de TNF- α em animais tratados com PNU foi aumentada em comparação com o controle ($P < 0,01$). Além disso, os níveis de IL-6 foram também mais elevados nos animais pós-tratados comparado ao grupo controle ($P < 0,01$).

A proteína total é uma medida indireta de edema alveolar que é uma característica importante da SDRA. Animais tratados com LPS veículo mostraram um aumento na proteína LBA em relação ao grupo de controle ($P < 0,01$) e ambos os tratamentos com PNU reduziram esta resposta ($P < 0,05$) (Figura 24F)

Figura 24- Quantificação de citocinas e proteína total no BAL: IL-1 β (A), o TNF- α (B), IL-6 (C), KC (D), IL-10 (E) os níveis quantificados de citocinas no BAL por meio de ELISA e de proteínas totais na LBA (F). Os animais tratados com PNU mostraram níveis de citocinas reduzido quando comparado com o grupo de LPS que foi tratado com veículo. O teor de proteína no LBA infere edema alveolar na LPA e todos estes dados foram medidos 24 horas após a LPS. * $p < 0,01$ comparado com o controle; ** $P < 0,05$ comparado com o grupo de LPS. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM de animais por grupo (5-7)

4.3.3. Efeitos do PNU no perfil dos macrófagos M1 / M2

Utilizou qPCR para avaliar infiltração de macrófagos no pulmão através da expressão CD68, e para determinar as suas populações através da expressão de marcadores de perfil M1 (IRF5, IL-12, CXCL-9, CXCL-10 e iNOS) e perfil M2 (IRF4, FIZZ1 YM1 e ARG1). Apenas em animais pré-tratados PNU encontramos um aumento em CD68 níveis de mRNA (Figura 26 E), em comparação ao controle ($P < 0,05$). Observou-se uma tendência de aumento na expressão de IL-12 (Figura 25 B) e um aumento significativo nos níveis de CXCL9, CXCL10 e iNOS mRNA (Figuras 25 C, D e E) no grupo LPS em comparação com o controle ($P < 0,05$). Ambos os tratamentos com PNU reduziram significativamente esta resposta ($P < 0,05$). Os animais pós-tratados com PNU apresentaram um aumento na IFR5 (Figura 25 A) comparado ao grupo controle ($P < 0,05$). Considerando os marcadores M2, descobrimos que apenas IRF4 expressão foi alterada de forma significativa no grupo de LPS ($P < 0,05$) em comparação ao controle (Figura 26 A). Houve uma tendência de aumento na expressão de Fizz1, ARG1 e YM1 no grupo LPS (Figuras 26 B,C e D). O tratamento PNU teve uma tendência em induzir uma redução na expressão ARG1 comparado ao grupo LPS, porém não foi significativa. Estes dados sugerem claramente que, neste modelo LPA houve predomínio de macrófagos do perfil M1 que foi inibida pelos tratamentos PNU.

Figura 25- A expressão gênica de macrófagos do tipo: IRF5, IL-12, CXCL-9, CXCL-10 e iNOS) no homogenato pulmonar foi avaliada por qPCR. * $P < 0,01$ comparado com o controle; ** $p < 0,05$ comparado com o grupo de LPS. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM de 4-5 animais por grupo.

Figura 26- A expressão gênica de macrófagos do tipo II: IRF4, FIZZ1 YM1 Arg1 no homogenato pulmonar foi avaliada por qPCR. Os níveis de mRNA de CD68 representam macrófagos total no pulmão. * P<0,01 comparado com o controle. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM de 4-5 animais por grupo.

4.3.4. Efeitos de PNU sobre os níveis de NF-kB em pulmão

A subunidade p-65-NF-kB é necessária para ativar o gene NF-KB, e esta subunidade foi detectado no homogenato pulmonar o por Western Blot (Figura 27). Observou-se que a expressão da p-65-NF-kB foi maior no grupo de LPS em comparação com o grupo de controle ($P < 0,05$) e foi significativamente reduzida em ambos os tratamentos PNU ($P < 0,01$).

Figura 27- Western Blot para p65-NF-kB: A expressão de p65 de NF-kB no homogenato pulmonar foi reduzida pelo pré e pós-tratamento com PNU. β -actina foi utilizado como controle. Os dados foram apresentados em média $\pm$ SEM de animais 5-6 por grupo. * $p < 0,01$ comparado com o controle; ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo de LPS.

4.3.5. Efeitos do PNU na deposição de fibras de colágeno e na expressão de MMP-9, MMP-2 e TIMP-1 no parênquima pulmonar

O desequilíbrio entre as metaloproteases e seus inibidores leva a fibrose pulmonar em pacientes com SDRA e também em modelos experimentais em animais. A instilação de LPS levou a um aumento das fibras de colágeno no conteúdo de septos alveolares em comparação com os animais que receberam solução salina ($P < 0,01$) (Figura 28 A), que pode ser observada nos painéis representativos 28 B para E. Esta resposta foi associada com um aumento no número de células positivas para MMMP-2, MMMP-9 e TIMP-1 (Figuras 29 A, B e C). Ambos os tratamentos com PNU reduziram a deposição de colágeno ($P < 0,05$), que está associado a uma redução do número de células positivas para a MMP-2 e MMP-9 e aumentado o número de células positivas para o TIMP-1 ($P < 0,05$).

Figura 28- Fibras de Colágeno: A quantificação de fibras de colágeno no parênquima pulmonar (A) fotomicrografias representativas (B-E) mostraram que há aumento das fibras colágenos nos animais com LPA, e os tratamentos de PNU atenuaram esta alteração. * $p < 0,01$ comparado com o controle; ** $p < 0,05$ comparado com o grupo de LPS. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM de animais 5-6 por grupo.

Figura 29-Componentes da MEC: A MMP-2 (A), MMP-9 (B) e TIMP-1 (C) e os painéis mostram fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar MMP-2 (D-G), MMP 9 (H-K) e TIMP-1 (L-O). Estes dados mostram que tratamentos PNU reduziu as células positivas para a MMP-2 e MMP-9, ao passo que houve um aumento nas células positivas para o TIMP-1. * $p < 0,01$ comparado com o controle; ** $p < 0,05$ comparado com o grupo de LPS. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM de animais 5-6 por grupo.

4.3.6. Efeitos do PNU na função pulmonar e na perda de peso corpóreo

As medidas de mecânica pulmonar foram representadas na Figura 28 (A a D). A instilação de LPS induziu um aumento de Rrs, Ers, Gtis e Htis em relação ao grupo controle ($P < 0,001$). Ambos os tratamentos de PNU atenuaram esta resposta, levando a uma melhora da função pulmonar ($P < 0,05$). Todos os grupos experimentais mostraram peso semelhante antes da instilação de LPS (dados não mostrados) e, após 24 horas, a instilação de LPS induziu uma redução do peso corpóreo em comparação ao controle ($P < 0,001$). Ambos os tratamentos de PNU evitaram a redução do peso observado em animais LPS tratados com veículo ($P < 0,05$).

Figura 30 -Mecânica pulmonar e peso corpóreo. Resistência do sistema respiratório Sistema (Rrs) (A), elastância do sistema respiratório (Ers) (B), resistência tecidual (Gtis) (C), e elastância tecidual (Htis) (D) foram aumentadas nos animais que receberam LPS. Além disso LPS induziu uma Redução do peso corporal em 24 horas (E). O tratamento com PNU atenuou como alterações pulmonares melhorando a complacência pulmonar e evitou uma redução do peso corporal pelo LPS induzido. * P <0,001 comparado ao Controle; ** P <0,05 comparado ao grupo LPS.

5.DISSCUSSÃO

O presente estudo demonstrou, primeiramente, que a deficiência de VACHT induz um ambiente pró-inflamatório em animais sem doença prévia pulmonar, sugerindo uma importância da ACh no controle da homeostase do sistema respiratório. A redução de VACHT induziu um aumento do infiltrado de células inflamatórias, de edema e do número de células que expressam o NF- κ B associado a uma redução nos níveis de JAK-2 no pulmão. Na sequência, observamos que a deficiência de VACHT interfere no curso da inflamação em modelo de lesão pulmonar aguda apenas no período inicial, sendo

Os valores semelhantes a animais sem alteração genética em 24 horas. Entretanto, o estímulo farmacológico do $\alpha 7$ nAChR previne e reduz todas as alterações pulmonares observadas no modelo de LPA. Em conjunto estes dados sugerem claramente que o sistema colinérgico anti-inflamatório está envolvido na modulação da inflamação pulmonar e que o estímulo de receptores nicotínicos pode ser um interessante alvo terapêutico a ser explorado na LPA e em outras doenças inflamatórias pulmonares.

No pulmão, ACh é liberada principalmente pelos neurônios parassimpáticos por um mecanismo dependente de VACHT [121, 122]. Diversas células que não fazem parte do sistema nervoso também produzem ACh. Os cardiomiócitos e as células β -pancreáticas precisam de VACHT para produzir ACh não neuronal [111]. No pulmão, há controvérsias neste sentido. Enquanto alguns autores mostraram a presença de VACHT nas vias aéreas [93, 99], outros sugerem que a ACh produzida por células epiteliais de vias

aéreas seja dependente de outros componentes como CHT1, OCT1 e OCT2, não armazenando a ACh em vesículas [95, 123, 124]. Além disso, sabe-se que as células do sistema imune também produzem ACh [67, 89, 125] não neuronal, e os mecanismos ainda não estão totalmente estabelecidos e portanto podem ou não depender de VACHT [123].

Uma importante participação do sistema colinérgico anti-inflamatório tem sido descrita em modelos de inflamação sistêmica aguda [88, 126, 127]. A resposta do SCAI parece depender da estimulação do nervo vago e também da liberação de ACh de uma fonte adicional não-neuronal, tal como uma população de linfócitos T presente no baço [82]. Estes linfócitos produzem ACh que pode atuar como um mediador autócrino e/ou parácrino reduzindo a liberação de citocinas por macrófagos [67, 77, 82]. Está bem estabelecido que esta resposta depende do efeito da ACh em receptores nicotínicos do tipo $\alpha 7$ [85]. Considerando o papel antagônico da ACh em receptores muscarínicos e nicotínicos, avaliar o papel da ACh endógena e de VACHT é de extrema importância na modulação da resposta inflamatória pulmonar.

Animais VACHT KD^{HOM} tem uma redução de aproximadamente 70% nos níveis de VACHT e conseqüentemente da liberação de ACh [121, 128]. No presente estudo avaliamos a expressão gênica e proteica de VACHT na medula espinhal e no pulmão e confirmamos uma redução de VACHT em torno de 80 e 60%, respectivamente, nos animais VACHT KD^{HOM} . Além disso, a redução da liberação de ACh induz uma redução no peso corporal e no tempo de manutenção dos animais na grade (Wire-hang test). Esses dados

corroboram aos resultados prévios de que animais VACHT KD^{HOM} apresentam miastenia e prejuízo na função neuromuscular [128, 129].

A inflamação é caracterizada por alteração da permeabilidade endotelial e no recrutamento de células inflamatórias. Nos animais mutantes foi observado um aumento do número de células mononucleares, de edema peribrônquico e também na quantidade de proteína total no LBA quando comparado com camundongos selvagens. Ainda no LBA, observou-se um número aumentado de macrófagos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos.

Foram avaliadas as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-4 e IL-13) e a citocina reguladora de IL-10. Animais mutantes apresentaram maiores níveis de TNF- α e IL-4 no homogenato pulmonar quando comparado com animais selvagem. E não foram observadas diferenças nos níveis de IL-6, IL-13 e IL-10. A IL-6 é uma citocina importante envolvida em processos infecciosos e é liberada por células T e macrófagos [41, 130]. Já a IL-13 e a IL-4 estão mais envolvidas na inflamação desencadeada por processos alérgicos e estão aumentadas em modelos experimentais de asma [131], sendo que a IL-13 está fortemente associada à produção de muco por células epiteliais. O aumento dos níveis de TNF- α e IL-4 poderiam explicar a inflamação e edema peribronquiolar observado no pulmão de animais mutantes.

O extravasamento do plasma, uma das primeiras características da resposta inflamatória, está classicamente associado com os níveis de TNF- α , um mediador de inflamação aguda [132]. Neste sentido, Mazzon et al. [133]

mostraram que os animais depletados de TNF- α apresentar uma redução na inflamação pulmonar e no edema da pata induzido por carragenina. A IL-10 é uma citocina pró-inflamatória, no entanto, outros autores não foram capazes de mostrar que o efeito do sistema anti-inflamatórios colinérgico depende de IL-10 [130], corroborando nosso achado.

Vários trabalhos já demonstraram a importância do SCAI em diferentes modelos experimentais. Animais vagotomizados apresentaram um aumento de células inflamatórias no fluido peritoneal após peritonite séptica [88]. É importante ressaltar que a vagotomia não interfere somente com a liberação da ACh, mas também a secreção de peptídeos e outros neurotransmissores [134]. Hofer et al. [86] avaliaram o efeito da fisostigmina, um inibidor da AChE, e observaram que o tratamento com esta droga reduziu a mortalidade e as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 em modelo de sepse. No pulmão, Kox et al. [46] demonstraram que a vagotomia reduziu a inflamação pulmonar induzida por LPS, entretanto estes autores não observaram nenhum efeito da estimulação do nervo vago na melhora da inflamação pulmonar.

A persistência de inflamação crônica induz reparação tecidual [114, 120, 135]. O remodelamento pulmonar tem um significado clínico importante em doenças respiratórias, uma vez que contribui para a piora da função pulmonar ao longo dos anos, em pacientes asmáticos e com DPOC [136]. Demonstramos que animais mutantes apresentaram aumento do conteúdo de fibras colágenas e elásticas quando comparado aos selvagens.

A inflamação crônica induzida por deficiência de VACHT poderia explicar *per se* o processo de remodelamento da MEC, uma vez que macrófagos e outras células liberam diferentes tipos de mediadores pró-fibróticos [137]. Um desequilíbrio entre MMP e de TIMP tem um papel importante nos mecanismos que regulam a composição da MEC. As MMPs estão envolvidas também no recrutamento de células inflamatórias e no reparo dos tecidos [138]. Observamos que animais mutantes apresentam número maior de células inflamatórias positivas para a MMP-9 e para TIMP-1 em vias respiratórias, sendo que o aumento de TIMP foi predominante em relação ao de MMP-9. Enquanto a MMP-9 degrada MEC aumentou menos de duas vezes no grupo VACHT KD^{HOM}, a expressão de TIMP- 1 aumentou mais de três vezes, ocorrendo assim um desequilíbrio no processo de injúria e reparo [139].

Não há alteração na função pulmonar basal dos animais mutantes. Por outro lado, estes apresentaram aumento da resposta de Rrs em resposta ao agonista broncoconstritor. A constrição do músculo liso é um fator determinante na resposta broncoconstritora que interfere com a resistência do sistema pulmonar. Mas, outros fatores que alterem o raio da luz das vias aéreas, também podem interferir com estes parâmetros, como inflamação, edema e o próprio remodelamento que reduzem o lúmen da via aéreas.

Os animais mutantes poderiam apresentar alterações nos receptores muscarínicos, a fim de compensar a deficiência de VACHT e assim levar ao aumento da Rrs. Para elucidar se havia esta alteração quantificamos a

expressão proteica de M2 no tecido pulmonar e não foi encontrada nenhuma diferença, descartando essa possibilidade. Verbout et al. [140] mostraram que o tratamento de atropina aumentou a hiperreatividade de vias aéreas induzida e este efeito foi dependente de inflamação, especialmente de eosinófilos, o que corrobora com os nossos achados.

Dentre os componentes envolvidos na resposta colinérgica anti-inflamatória, a participação do receptor nicotínico é estabelecida. Embora não tenham tantos trabalhos em inflamação pulmonar, sabe-se que em outros modelos a presença deste receptor é fundamental. Neste sentido, alguns autores identificaram a presença de $\alpha 7$ nAChR em superfície de células do sistema imunológico que, após ativação, regula a inflamação de um modo dependente colinérgica [84].

O estímulo de $\alpha 7$ nAChR ativa a via de JAK-2-STAT-3 que por sua vez parece inibir a translocação nuclear de NF-kB [141]. Demonstramos que houve um aumento da expressão de p65-NF-kB no pulmão, assim como o número de células que expressam esse fator de transcrição, sugerindo uma ativação desta via. A expressão de JAK-2 no pulmão de animais mutantes foi reduzida. As Janus quinases (JAKs) são reguladores de sinalização através de receptores de citocinas, o papel da via de JAK2-STAT3 na inflamação ainda não está totalmente elucidado. Particularmente no pulmão, esta via foi pouco investigada.

A inibição de JAK-2 evita a fosforilação da tirosina de STAT-3 induzida por LPS [142]. Por sua vez, a ativação de STAT-3, induz o aumento da SOCS-

3 que está relacionada com uma ação anti-inflamatória, uma vez que neutraliza macrófagos (M1) pró-inflamatórios [143], e inibe a translocação de NF- κ B [144]. Curiosamente, observamos que a expressão total e fosforilada de STAT-3 e de SOCS-3 não foi diferente entre WT e animais mutantes, embora tenha sido observada uma tendência na redução de STAT-3. Estes resultados sugerem que, no pulmão, a redução VAcHT com consequente inibição do tônus colinérgico impede a ativação de JAK-2, o que pode impedir a fosforilação de STAT-3, o qual por sua vez não estimula um aumento na SOCS-3 de modo a ter um efeito anti-inflamatório no pulmão.

Corroborando parte desta ideia, de Jonge et al. [36] demonstraram que a estimulação do nervo vago em modelo de cirurgia intestinal melhora a inflamação através da ativação da STAT3 em macrófagos intestinais, e os autores concluíram que os efeitos anti-inflamatórios da estimulação vagal é mediada pela ativação de estimulação α 7nAChR completa JAK2-STAT3.

Considerando-se que ambos os nervos parassimpáticos neuronais e epiteliais (células imunes) e não neuronais fontes de ACh co-existem no pulmão, a limitação do presente estudo realizado *in vivo*, é a difícil distinguir o efeito de cada via. É importante notar que avaliamos CHT1, AChE, M2 e α 7nAChR e nenhum dos componentes está alterado nos camundongos mutantes e, portanto, os efeitos observados no pulmão de animais com deficiência colinérgica são atribuídos a redução de VAcHT.

Em segundo momento, nossa pergunta consistiu em avaliar se o VAcHT modularia também a inflamação pulmonar em situações patológicas,

como por exemplo quando induzida por fatores exógenos. Considerando que a SDRA é uma doença de extrema relevância e que tem alta mortalidade, julgamos que avaliar o modelo de LPA seria de grande valia. Neste sentido, Lips et al. [124] demonstraram uma redução de componentes colinérgicos, incluindo VACHT, num modelo de inflamação aguda das vias aéreas. Ainda, Wessler et al. [89] observaram uma redução significativa do conteúdo de ACh tanto em vias aéreas quanto em parênquima pulmonar de pacientes portadores de fibrose cística comparativamente aos controles.

A LPA ocorre devido a uma infecção sistêmica e é caracterizada pela produção de mediadores inflamatórios pelas células do sistema imune, citocinas, aumento do estresse oxidativo e alteração na matriz extracelular culminando em uma alteração na função pulmonar [145]. A SDRA pode ter origem pulmonar ou extrapulmonar, sendo a sepse a principal causa da extrapulmonar, o que é mimetizado pela injeção de LPS que sabidamente estimula a liberação de citocinas [146]. A condição mais comum induzir LPA é por LPS que são liberados durante a sepse, e é um grande estímulo para a liberação de citocinas.

Surpreendente ao avaliarmos a deficiência de VACHT, que está associado diretamente a deficiência endógena na transmissão colinérgica, observamos poucas alterações além daquelas já causadas pelo LPS no animal selvagem em 24 horas, que é o período em que a lesão já está instalada.

Neste momento, os animais KD^{HOM} e WT com LPS apresentaram aumento em células totais, macrófagos e aqueles positivos para MAC-2, neutrófilos, e células positivas para NF- κ B no pulmão, além de aumento na deposição de fibras colágenas no parênquima pulmonar.

Assim demonstramos que a redução de VACHT não interfere com as alterações pulmonares 24 horas, sendo estes resultados aparentemente conflitantes com os da literatura [87], entretanto estes estudos não avaliaram VACHT como mecanismo de inibir a via colinérgica e também nem todos avaliaram o pulmão, e sim a resposta inflamatória sistêmica. Frente a isso, algumas hipóteses foram aventadas: 1. Seria o tempo de 24 horas curto para ocorrer alteração da inflamação devido a deficiência colinérgica? 2. Seria necessária uma indução sistêmica da lesão para esta depender da via colinérgica anti-inflamatória, uma vez que não se sabe se a produção de ACh ocorre no pulmão? 3. Ocorreria no pulmão um balanço dos receptores muscarínicos e nicotínicos, onde a falta da acetilcolina teria tanto efeitos pró quanto anti-inflamatórios.

Optamos então por avaliar o curso da resposta inflamatória de 1,5h até 72 horas após a instilação de LPS em animais mutantes para VACHT. Observamos que logo após a instilação de LPS, a redução de VACHT aumenta o número de neutrófilos no LBA, fato que não é observado nos WT, sugerindo assim que a acetilcolina e a SCAI possa estar envolvido nas fases mais iniciais da LPA. Entretanto, a partir de 6 horas, a inflamação pulmonar se manteve semelhante, independente da redução da liberação de ACh.

Provavelmente algum mecanismo de compensação possa ocorrer e outras vias precisam ser melhor investigadas.

Avaliamos ainda um modelo experimental onde a LPA foi induzida de forma sistêmica. Corroborando os achados iniciais em 24 horas no modelo intratraqueal, não foi observado diferença entre o animal KD^{HOM} e WT quanto a inflamação pulmonar no modelo intraperitoneal. Embora seja claro o envolvimento do sistema colinérgico inflamatório na resposta inflamatória da sepse, por ativação $\alpha 7$ nAChR [98], é importante lembrar que a ACh atua via diversos receptores, provavelmente com ação antagônica no que se refere ao controle da resposta inflamatória. Por um lado, a falta de acetilcolina para receptores $\alpha 7$ nAChR pode induzir um aumento na inflamação pulmonar e inibição da via anti-inflamatória colinérgica. Por outro lado, a falta de acetilcolina para os receptores muscarínicos pode reduzir a inflamação, uma vez que estes receptores tem um efeito pró-inflamatório [82, 98].

Desta forma, com o intuito de testar se há um equilíbrio na ação de receptores muscarínicos e nicotínicos, utilizamos agonistas farmacológicos para estimulação do receptor $\alpha 7$ nAChR e m3AChR, uma vez que o M3 é o mais envolvido no curso da SDRA [98]. Observamos que a pilocarpina tende a aumentar o número de macrófagos e neutrófilos nos animais LPS, entretanto, o PNU reduziu significativamente a inflamação pulmonar nos animais WT. Interessante é que estes efeitos não foram observados em animais VACHT KD^{HOM} , sugerindo que o estímulo de $\alpha 7$ nAChR, depende de certa forma da via colinérgica íntegra, pelo menos no sentido de conter a

inflamação pulmonar. Entretanto, estes resultados não permitem concluir esta hipótese.

Considerando a melhora da inflamação pulmonar em animais WT com o estímulo de $\alpha 7$ nAChR resolvemos avaliar o potencial do PNU como tratamento em animais com LPA [88, 126, 130, 141], elucidando se o efeito anti-inflamatório preventivo desta droga já previamente demonstrado, interfere com outros aspectos como a função pulmonar.

PNU-282987 é um agonista potente e seletivo de $\alpha 7$ nAChR [147]. Com o intuito de avaliar uma estratégia terapêutica, o tratamento PNU foi realizada pela primeira vez em três doses diferentes começando 6 horas após a instilação de LPS, momento em que os animais já têm a infiltração de neutrófilos no pulmão [148]. A dose escolhida foi a de 10 mg/Kg, pois foi a que melhor reduziu células totais e neutrófilos no BAL.

Uma vez que o perfil de macrófagos está envolvidos no desenvolvimento e na resolução da SDRA, utilizou-se marcadores de genes, a fim de avaliar os efeitos da ativação $\alpha 7$ nAChR em perfis M1 / M2. Neste modelo, o LPS induziu um aumento na maioria dos marcadores M1, o que sugere que, neste ponto (24 horas), o desequilíbrio entre M1 e M2 é devido a uma ativação de macrófagos pró-inflamatórias M1, reduziu a IRF4 níveis, um gene marcador M2. Os macrófagos ativados são capazes de liberar várias citocinas, tais como TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β que são importantes na fisiopatologia da SDRA [7, 149]. Verificou-se que o LPS induziu um aumento nos níveis destas citocinas e em KC, uma citocina homóloga à IL-8 humana

em, no LBA. A ativação de $\alpha 7$ nAChR reduziu os níveis de TNF- α , IL-6, KC e IL-1 β . É importante notar que todas estas citocinas estão envolvidas no recrutamento dos neutrófilos e em respostas imediatas. IL-10 é uma citocina reguladora, mas é encontrada em níveis elevados em doentes com SDRA [27]. Embora alguns autores demonstraram que o efeito anti-inflamatório da via colinérgica não depende de IL-10 [141], foram medidos os níveis desta citocina presente em LBA. Os tratamentos com PNU reduziram os níveis de IL-10, induzidos por LPS sugerindo que o aumento nos níveis de IL-10 está relacionado com os níveis de inflamação pulmonar.

A perturbação induzida por LPS as células endoteliais e alveolares levaram a um extravasamento de plasma, rico em proteínas, para os espaços alveolares que leva a uma redução da complacência observada em pacientes de SDRA [7, 150]. O tratamento PNU reduziu o aumento na proteína total BAL, sugerindo que este tratamento reduziu o edema alveolar. Corroborando nossos dados, Su et al. (2010) observaram que o pré-tratamento PNU reduziu as células inflamatórias e a liberação de citocinas. Xu et al. (2012) mostraram que o pré-tratamento PNU reduziu edema alveolar, o número de neutrófilos e a liberação de citocinas em pulmonar induzida por LPS.

Um mecanismo possível para os efeitos PNU pode ser atribuído à inibição da ativação de NF- κ B, como discutido acima. A expressão do NF- κ B modula a respostas inflamatórias e imunes [151] e as evidências sugerem que a estimulação $\alpha 7$ nAChR reduz a translocação de NF- κ B para o núcleo, e leva ao controle da inflamação [141, 145]. Assim, foi avaliada a subunidade p-65

de NF- κ B, que em conjunto com c-rel e subunidades RER-B possuem um domínio de transativação do terminal C que são necessários para ativar o NF- κ B de genes de transcrição [33, 34]. Os efeitos anti-inflamatórios de PNU podem ser atribuídos à redução na expressão de p-65-NF- κ B no presente estudo.

Considerando a possibilidade de que a modulação farmacológica do $\alpha 7$ nAChR para tratar pacientes com SDRA, o efeito destes medicamentos em outras características da SDRA é relevante. A deposição de colágeno tem sido observada em pulmões de pacientes com SDRA e o aumento destas fibras foi observado em modelos animais já na fase inicial da lesão [43-45, 54, 152]. Os animais tratados com PNU apresentaram uma redução no conteúdo de fibras de colágenas em septos alveolares sugerindo que a redução na inflamação pulmonar observada nestes animais, evitou as alterações estruturais na matriz extracelular. Outros autores demonstraram que, 24 horas após a instilação de LPS, alguns componentes da MEC aumentaram [54, 55].

Ambos MMP-9 e MMP-2 estão aumentadas na SDRA e poderiam estar envolvidos na regulação das alterações nos componentes da matriz extracelular [44, 45]. Observamos que o PNU reduziu o aumento das células positivas que expressam MMP-2 e MMP-9 e ocorreu provavelmente porque a expressão de TIMP-1 está aumentada nestes animais. Não há outros estudos que avaliaram os efeitos da estimulação $\alpha 7$ nAChR em metaloproteases e seus inibidores. Pelo menos em modelos experimentais, as alterações da

matriz extracelular têm sido associadas à diminuição da função pulmonar [54, 55].

O modelo de LPA induzida por LPS utilizado no presente estudo induziu um aumento na Ers, Rrs, Gtis e do Htis, que refletem alterações tanto de vias aéreas distais quanto de parênquima pulmonar. Verificou-se que tratamentos PNU reduziram todos estes parâmetros aumentando a complacência pulmonar e reduzindo a resistência levando a uma melhora na função pulmonar, o que sugere que o controle da inflamação e da lesão pulmonar foi devido a ativação $\alpha 7$ nAChR. Poucos estudos avaliaram os efeitos do PNU na função pulmonar. Brégeon et al. [153] mostraram que a estimulação vagal e PNU pré-tratamento atenuou a lesão pulmonar induzida pela ventilação. A sepse induzida por LPS causou uma perda de peso significativa nos animais, em 24 horas, e claramente ambos os tratamentos PNU evitaram a perda de peso corporal observada em animais tratados com veículo.

A evidência para a importância da via anti-inflamatória colinérgica e principalmente para a manipulação de $\alpha 7$ nAChR como uma ferramenta farmacológica para o tratamento de doenças inflamatórias está aumentando [98]. Neste sentido nossos dados acrescentam aqueles da literatura, mostrando efeito do PNU administrado quando a lesão pulmonar já estava instalada no controle de diversas alterações observadas em modelo de LPA. Ainda, em nosso conhecimento é o primeiro estudo que demonstra que os efeitos do PNU são em macrófagos do tipo M1 e não em M2.

Nosso estudo possui algumas limitações que devem ser consideradas. Como falado anteriormente, não podemos afirmar se a falta de liberação de ACh é pulmonar ou sistêmica no controle da inflamação pulmonar. Ainda, seria interessante ter o perfil de citocinas ao longo da resposta inflamatória no modelo de VACHT com LPS, a fim de entender se ocorrer algum mecanismo compensatório que controla a inflamação pulmonar em 24 horas.

Em conjunto, os resultados do nosso estudo demonstram claramente que a SCAI está envolvido no controle da inflamação pulmonar, seja para manter a homeostasia, ou na fase inicial da LPA. Ainda está claro que o estímulo de receptores nicotínicos tem grande potencial como alvo terapêutico na SDRA.

6. CONCLUSÃO

1. Mostramos pela primeira vez que a deficiência VAC_hT a longo prazo induz hiper-reatividade das vias respiratórias, inflamação e remodelamento da MEC em camundongos geneticamente modificados. O ambiente pró-inflamatório observado foi associado a um aumento da p65-NF- κ B e inibição de JAK-2 expressão. Estes dados sugerem que a via colinérgica intacta é um mecanismo importante para controlar a resposta inflamatória, a fim de manter a homeostase do pulmão. Considerando que os pulmões estão constantemente expostos a compostos a partir do ambiente que podem induzir respostas inflamatórias, este mecanismo anti-inflamatório pode ser relevante para evitar reações em resposta a estímulos irrelevantes.
2. A deficiência VAC_hT modula a inflamação pulmonar na fase inicial da lesão pulmonar aguda (90 minutos até 6 horas). No entanto, após este período, a redução VAC_hT não afetou a inflamação pulmonar induzida por LPS. Estes dados sugerindo que a deficiência colinérgica pode ser importante na fase precoce do desenvolvimento de LPA, e que posteriormente algum mecanismo compensatório possa ocorrer.
3. A estimulação de α 7 nAChR impede e reduz a inflamação do pulmão, evita a deposição de colágeno da matriz extracelular por controle e equilíbrio entre MMP-9, MMP-2 e TIMP-1 e melhorar a função pulmonar. Os efeitos anti-inflamatórios de PNU é devido a inibição da p-65-NF- κ B e a redução em macrófagos pró-inflamatórias M1. A principal contribuição científica destes achados é que o tratamento PNU foi administrado após a inflamação induzida

por LPS, o que tem uma grande relevância clínica a fim de que esta via seja uma estratégia terapêutica futuras para o tratamento de pacientes com SDRA

7.REFERÊNCIAS

1. Ashbaugh, D.G., et al., *Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. The Lancet, Saturday 12 August 1967. Crit Care Resusc*, 2005. **7**(1): p. 60-1.
2. Petty, T.L. and D.G. Ashbaugh, *The adult respiratory distress syndrome. Clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. Chest*, 1971. **60**(3): p. 233-9.
3. Fowler, A.A., et al., *Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions. Ann Intern Med*, 1983. **98**(5 Pt 1): p. 593-7.
4. Pepe, P.E., et al., *Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. Am J Surg*, 1982. **144**(1): p. 124-30.
5. Murray, J.F., et al., *An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis*, 1988. **138**(3): p. 720-3.
6. Bernard, G.R., et al., *The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Am J Respir Crit Care Med*, 1994. **149**(3 Pt 1): p. 818-24.
7. Ferguson, N.D., et al., *The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. Intensive Care Med*, 2012. **38**(10): p. 1573-82.
8. Maniatis, N.A., et al., *Endothelial pathomechanisms in acute lung injury. Vascuol Pharmacol*, 2008. **49**(4-6): p. 119-33.
9. Avecillas, J.F., A.X. Freire, and A.C. Arroliga, *Clinical epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: incidence, diagnosis, and outcomes. Clin Chest Med*, 2006. **27**(4): p. 549-57; abstract vii.
10. Rubenfeld, G.D., et al., *Incidence and outcomes of acute lung injury. N Engl J Med*, 2005. **353**(16): p. 1685-93.
11. Amato, M.B., et al., *Beneficial effects of the "open lung approach" with low distending pressures in acute respiratory distress syndrome. A prospective randomized study on mechanical ventilation. Am J Respir Crit Care Med*, 1995. **152**(6 Pt 1): p. 1835-46.
12. Amato, M.B., et al., *Driving pressure and survival in the acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med*, 2015. **372**(8): p. 747-55.
13. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med*, 2000. **342**(18): p. 1334-49.
14. Bitterman, P.B., *Pathogenesis of fibrosis in acute lung injury. Am J Med*, 1992. **92**(6a): p. 39s-43s.
15. Greene, K.E., et al., *Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. Am J Respir Crit Care Med*, 1999. **160**(6): p. 1843-50.
16. Modelska, K., et al., *Acid-induced lung injury. Protective effect of anti-interleukin-8 pretreatment on alveolar epithelial barrier function in rabbits. Am J Respir Crit Care Med*, 1999. **160**(5 Pt 1): p. 1450-6.
17. Wiener-Kronish, J.P., K.H. Albertine, and M.A. Matthay, *Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to Escherichia coli endotoxin. J Clin Invest*, 1991. **88**(3): p. 864-75.
18. Tomashefski, J.F., Jr., *Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. Clin Chest Med*, 2000. **21**(3): p. 435-66.
19. Bosca, L., et al., *Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. Toxicology*, 2005. **208**(2): p. 249-58.
20. Aggarwal, N.R., L.S. King, and F.R. D'Alessio, *Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014. **306**(8): p. L709-25.
21. Sindrilaru, A., et al., *An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. J Clin Invest*, 2011. **121**(3): p. 985-97.
22. Herold, S., et al., *Exudate macrophages attenuate lung injury by the release of IL-1 receptor antagonist in gram-negative pneumonia. Am J Respir Crit Care Med*, 2011. **183**(10): p. 1380-90.
23. Johansson, M.W., et al., *Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha M beta 2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18). J Cell Sci*, 1997. **110** (Pt 9): p. 1133-9.

-
24. Venaille, T.J., G. Ryan, and B.W. Robinson, *Epithelial cell damage is induced by neutrophil-derived, not pseudomonas-derived, proteases in cystic fibrosis sputum*. *Respir Med*, 1998. **92**(2): p. 233-40.
 25. Matthay, M.A. and G.A. Zimmerman, *Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005. **33**(4): p. 319-27.
 26. Jacobs, R.F., et al., *Elevated interleukin-1 release by human alveolar macrophages during the adult respiratory distress syndrome*. *Am Rev Respir Dis*, 1989. **140**(6): p. 1686-92.
 27. Park, W.Y., et al., *Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **164**(10 Pt 1): p. 1896-903.
 28. Mabley, J., S. Gordon, and P. Pacher, *Nicotine exerts an anti-inflammatory effect in a murine model of acute lung injury*. *Inflammation*, 2011. **34**(4): p. 231-7.
 29. Su, X., M.A. Matthay, and A.B. Malik, *Requisite role of the cholinergic alpha7 nicotinic acetylcholine receptor pathway in suppressing Gram-negative sepsis-induced acute lung inflammatory injury*. *J Immunol*, 2010. **184**(1): p. 401-10.
 30. Mukaida, N., *Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. **284**(4): p. L566-77.
 31. Call, D.R., et al., *Differential local and systemic regulation of the murine chemokines KC and MIP2*. *Shock*, 2001. **15**(4): p. 278-84.
 32. Yun, K.J., et al., *Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF-kappa B inactivation in RAW 264.7 macrophages: possible involvement of the IKK and MAPK pathways*. *Int Immunopharmacol*, 2008. **8**(3): p. 431-41.
 33. Gasparini, C. and M. Feldmann, *NF-kappaB as a target for modulating inflammatory responses*. *Curr Pharm Des*, 2012. **18**(35): p. 5735-45.
 34. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 225-60.
 35. Liu, S.F. and A.B. Malik, *NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006. **290**(4): p. L622-L645.
 36. de Jonge, W.J., et al., *Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(8): p. 844-51.
 37. Lv, X., et al., *Inhibition of microRNA155 relieves sepsis-induced liver injury through inactivating the JAK/STAT pathway*. *Mol Med Rep*, 2015. **12**(4): p. 6013-8.
 38. Halamkova, J., et al., *[Significance of urokinase and its inhibitors in the invasiveness and metastasing of malignant tumors]*. *Vnitř Lek*, 2012. **58**(2): p. 129-34.
 39. Welte, T., et al., *STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(4): p. 1879-84.
 40. Murray, P.J., *The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration*. *J Immunol*, 2007. **178**(5): p. 2623-9.
 41. Severgnini, M., et al., *Activation of the STAT pathway in acute lung injury*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. **286**(6): p. L1282-92.
 42. Severgnini, M., et al., *Inhibition of the Src and Jak kinases protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. **171**(8): p. 858-67.
 43. Burnham, E.L., et al., *Detection of fibroproliferation by chest high-resolution CT scan in resolving ARDS*. *Chest*, 2014. **146**(5): p. 1196-204.
 44. Fligiel, S.E., et al., *Matrix metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitors in acute lung injury*. *Hum Pathol*, 2006. **37**(4): p. 422-30.
 45. Hsu, A.T., et al., *Kinetics and Role of Plasma Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome*. *Shock*, 2015.
 46. Ohbayashi, H., *Matrix metalloproteinases in lung diseases*. *Curr Protein Pept Sci*, 2002. **3**(4): p. 409-21.
 47. Woessner, J.F., Jr., *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling*. *Faseb j*, 1991. **5**(8): p. 2145-54.

-
48. Ma, B., et al., *Inhibition of activin receptor-like kinase 5 induces matrix metalloproteinase 9 expression and aggravates lipopolysaccharide-induced pulmonary injury in mice*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013. **17**(8): p. 1051-9.
 49. Murphy, G. and A.J. Docherty, *The matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1992. **7**(2): p. 120-5.
 50. Matrisian, L.M., *The matrix-degrading metalloproteinases*. Bioessays, 1992. **14**(7): p. 455-63.
 51. Parks, W.C., *Matrix metalloproteinases in repair*. Wound Repair Regen, 1999. **7**(6): p. 423-32.
 52. Parks, W.C. and S.D. Shapiro, *Matrix metalloproteinases in lung biology*. Respir Res, 2001. **2**(1): p. 10-9.
 53. Morales, M.M., et al., *Small airway remodeling in acute respiratory distress syndrome: a study in autopsy lung tissue*. Crit Care, 2011. **15**(1): p. R4.
 54. Rocco, P.R., C. Dos Santos, and P. Pelosi, *Lung parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome*. Minerva Anestesiol, 2009. **75**(12): p. 730-40.
 55. Santos, F.B., et al., *Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury*. J Appl Physiol (1985), 2006. **100**(1): p. 98-106.
 56. Demedts, I.K., et al., *Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema*. Respir Res, 2006. **7**: p. 53.
 57. Tang, B.M., et al., *Use of corticosteroids in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis*. Crit Care Med, 2009. **37**(5): p. 1594-603.
 58. Prado, M.A., et al., *Regulation of acetylcholine synthesis and storage*. Neurochem Int, 2002. **41**(5): p. 291-9.
 59. Anderson, D.C., S.C. King, and S.M. Parsons, *Pharmacological characterization of the acetylcholine transport system in purified Torpedo electric organ synaptic vesicles*. Mol Pharmacol, 1983. **24**(1): p. 48-54.
 60. Erickson, J.D., et al., *Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus*. J Biol Chem, 1994. **269**(35): p. 21929-32.
 61. Wessler, I., C.J. Kirkpatrick, and K. Racke, *Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans*. Pharmacol Ther, 1998. **77**(1): p. 59-79.
 62. Daniel, E.E., et al., *Ultrastructural studies on the neuromuscular control of human tracheal and bronchial muscle*. Respir Physiol, 1986. **63**(1): p. 109-28.
 63. Jeffery, P. and L. Reid, *Intra-epithelial nerves in normal rat airways: a quantitative electron microscopic study*. J Anat, 1973. **114**(Pt 1): p. 35-45.
 64. Canning, B.J., *Reflex regulation of airway smooth muscle tone*. J Appl Physiol (1985), 2006. **101**(3): p. 971-85.
 65. Rogers, D.F., *Motor control of airway goblet cells and glands*. Respir Physiol, 2001. **125**(1-2): p. 129-44.
 66. Belmonte, K.E., *Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(4): p. 297-304; discussion 311-2.
 67. Kawashima, K. and T. Fujii, *Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 2063-85.
 68. Wessler, I., et al., *The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology*. Life Sci, 2003. **72**(18-19): p. 2055-61.
 69. Fujii, T., Y. Takada-Takatori, and K. Kawashima, *Regulatory mechanisms of acetylcholine synthesis and release by T cells*. Life Sci, 2012. **91**(21-22): p. 981-5.
 70. Fujii, T., et al., *Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines*. J Neurosci Res, 1996. **44**(1): p. 66-72.
 71. Fujii, T., et al., *Mediator regulates acetylcholine release from T cells*. J Neuroimmunol, 2012. **244**(1-2): p. 16-22.
 72. Tracey, K.J., *Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway*. J Clin Invest, 2007. **117**(2): p. 289-96.

-
73. Fodale, V. and L.B. Santamaria, *Cholinesterase inhibitors improve survival in experimental sepsis: a new way to activate the cholinergic anti-inflammatory pathway*. Crit Care Med, 2008. **36**(2): p. 622-3.
 74. Giebelen, I.A., et al., *Stimulation of alpha 7 cholinergic receptors inhibits lipopolysaccharide-induced neutrophil recruitment by a tumor necrosis factor alpha-independent mechanism*. Shock, 2007. **27**(4): p. 443-7.
 75. Huston, J.M., et al., *Transcutaneous vagus nerve stimulation reduces serum high mobility group box 1 levels and improves survival in murine sepsis*. Crit Care Med, 2007. **35**(12): p. 2762-8.
 76. Czura, C.J. and K.J. Tracey, *Autonomic neural regulation of immunity*. J Intern Med, 2005. **257**(2): p. 156-66.
 77. Pavlov, V.A. and K.J. Tracey, *Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 6): p. 1037-40.
 78. Martelli, D., M.J. McKinley, and R.M. McAllen, *The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review*. Auton Neurosci, 2014. **182**: p. 65-9.
 79. Tracey, K.J., *The inflammatory reflex*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 853-9.
 80. Rosas-Ballina, M., et al., *Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): p. 11008-13.
 81. Huston, J.M., et al., *Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1623-8.
 82. Rosas-Ballina, M., et al., *Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit*. Science, 2011. **334**(6052): p. 98-101.
 83. Vida, G., et al., *alpha7-cholinergic receptor mediates vagal induction of splenic norepinephrine*. J Immunol, 2011. **186**(7): p. 4340-6.
 84. Parrish, W.R., et al., *Modulation of TNF release by choline requires alpha7 subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling*. Mol Med, 2008. **14**(9-10): p. 567-74.
 85. Zdanowski, R., et al., *Role of alpha7 nicotinic receptor in the immune system and intracellular signaling pathways*. Cent Eur J Immunol, 2015. **40**(3): p. 373-9.
 86. Hofer, S., et al., *Pharmacologic cholinesterase inhibition improves survival in experimental sepsis*. Crit Care Med, 2008. **36**(2): p. 404-8.
 87. Li, T., et al., *The vagus nerve and nicotinic receptors involve inhibition of HMGB1 release and early pro-inflammatory cytokines function in collagen-induced arthritis*. J Clin Immunol, 2010. **30**(2): p. 213-20.
 88. van Westerloo, D.J., et al., *The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis*. J Infect Dis, 2005. **191**(12): p. 2138-48.
 89. Wessler, I., et al., *Dysfunction of the non-neuronal cholinergic system in the airways and blood cells of patients with cystic fibrosis*. Life Sci, 2007. **80**(24-25): p. 2253-8.
 90. Wessler, I.K. and C.J. Kirkpatrick, *The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways*. Pulm Pharmacol Ther, 2001. **14**(6): p. 423-34.
 91. Gosens, R., et al., *Pharmacology of airway smooth muscle proliferation*. Eur J Pharmacol, 2008. **585**(2-3): p. 385-97.
 92. Jones, P.W., *Clinical potential of aclidinium bromide in chronic obstructive pulmonary disease*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2015. **10**: p. 677-87.
 93. Kummer, W., K.S. Lips, and U. Pfeil, *The epithelial cholinergic system of the airways*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(2): p. 219-34.
 94. Kummer, W., et al., *Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse*. Respir Res, 2006. **7**: p. 65.
 95. Proskocil, B.J., et al., *Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells*. Endocrinology, 2004. **145**(5): p. 2498-506.
 96. Metzen, J., et al., *Proliferative effect of acetylcholine on rat trachea epithelial cells is mediated by nicotinic receptors and muscarinic receptors of the M1-subtype*. Life Sci, 2003. **72**(18-19): p. 2075-80.
 97. Fryer, A.D. and D.B. Jacoby, *Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(5 Pt 3): p. S154-60.

98. Xu, Z.P., et al., *Role of M3 mAChR in in vivo and in vitro models of LPS-induced inflammatory response*. Int Immunopharmacol, 2012. **14**(3): p. 320-7.
99. Cao, R., et al., *M(3) muscarinic receptor antagonist bencycloquidinium bromide attenuates allergic airway inflammation, hyperresponsiveness and remodeling in mice*. Eur J Pharmacol, 2011. **655**(1-3): p. 83-90.
100. Kamimura, Y., et al., *Nitric oxide (NO) synthase mRNA expression and NO production via muscarinic acetylcholine receptor-mediated pathways in the CEM, human leukemic T-cell line*. Life Sci, 2003. **72**(18-19): p. 2151-4.
101. Fernandes, L.B., J.W. Paterson, and R.G. Goldie, *Co-axial bioassay of a smooth muscle relaxant factor released from guinea-pig tracheal epithelium*. Br J Pharmacol, 1989. **96**(1): p. 117-24.
102. Goldie, R.G., et al., *Airway epithelium-derived inhibitory factor*. Trends Pharmacol Sci, 1990. **11**(2): p. 67-70.
103. Romanelli, M.N. and F. Gualtieri, *Cholinergic nicotinic receptors: competitive ligands, allosteric modulators, and their potential applications*. Med Res Rev, 2003. **23**(4): p. 393-426.
104. Vaupel, D.B., E.A. Stein, and A.G. Mukhin, *Quantification of alpha4beta2* nicotinic receptors in the rat brain with microPET and 2-[18F]F-A-85380*. Neuroimage, 2007. **34**(4): p. 1352-62.
105. Maus, A.D., et al., *Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(5): p. 779-88.
106. Wang, H., et al., *Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 384-8.
107. Su, X., et al., *Activation of the alpha7 nAChR reduces acid-induced acute lung injury in mice and rats*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **37**(2): p. 186-92.
108. Gallowitsch-Puerta, M. and K.J. Tracey, *Immunologic role of the cholinergic anti-inflammatory pathway and the nicotinic acetylcholine alpha 7 receptor*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1062**: p. 209-19.
109. Faffe, D.S., et al., *Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice*. Eur Respir J, 2000. **15**(1): p. 85-91.
110. Feng, X. and A. Jia, *Protective effect of carvacrol on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice*. Inflammation, 2014. **37**(4): p. 1091-101.
111. Lara, A., et al., *Dysautonomia due to reduced cholinergic neurotransmission causes cardiac remodeling and heart failure*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(7): p. 1746-56.
112. Pinheiro, N.M., et al., *Pulmonary inflammation is regulated by the levels of the vesicular acetylcholine transporter*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0120441.
113. Hantos, Z., et al., *Mechanical impedances of lungs and chest wall in the cat*. J Appl Physiol (1985), 1992. **73**(2): p. 427-33.
114. Prado, C.M., et al., *Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **35**(4): p. 457-65.
115. Angeli, P., et al., *Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **294**(6): p. L1197-205.
116. Weibel, E.R., *Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs*. Lab Invest, 1963. **12**: p. 131-55.
117. EPA, U.S.E.P.A., *The particle pollution report: Current understanding of air quality and emissions through 2003*. 2004, U.S. Environmental Protection Agency
Office of Air Quality Planning and Standards
Emissions, Monitoring, and Analysis Division
Research Triangle Park, North Carolina. p. 1-32.
118. Kawahara, R., et al., *Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors ameliorates indomethacin-induced small intestinal ulceration in mice*. Eur J Pharmacol, 2011. **650**(1): p. 411-7.
119. Baldelli, E., et al., *Homocysteine potentiates seizures and cell loss induced by pilocarpine treatment*. Neuromolecular Med, 2010. **12**(3): p. 248-59.

-
120. Postma, D.S. and W. Timens, *Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(5): p. 434-9.
 121. Lima Rde, F., et al., *Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter*. J Neurochem, 2010. **113**(4): p. 943-51.
 122. Guzman, M.S., et al., *Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the striatum reveals regulation of behaviour by cholinergic-glutamatergic co-transmission*. PLoS Biol, 2011. **9**(11): p. e1001194.
 123. Kummer, W. and G. Krasteva-Christ, *Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology*. Curr Opin Pharmacol, 2014. **16**: p. 43-9.
 124. Lips, K.S., et al., *Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse*. Life Sci, 2007. **80**(24-25): p. 2263-9.
 125. Lips, K.S., et al., *Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(1): p. 79-88.
 126. Wang, H., et al., *Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis*. Nat Med, 2004. **10**(11): p. 1216-21.
 127. Song, X.M., et al., *The protective effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway against septic shock in rats*. Shock, 2008. **30**(4): p. 468-72.
 128. Prado, V.F., et al., *Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition*. Neuron, 2006. **51**(5): p. 601-12.
 129. de Castro, B.M., et al., *The vesicular acetylcholine transporter is required for neuromuscular development and function*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(19): p. 5238-50.
 130. Borovikova, L.V., et al., *Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 458-62.
 131. Toledo, A.C., et al., *Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model*. Br J Pharmacol, 2013. **168**(7): p. 1736-49.
 132. Catal, F., et al., *A human monoclonal anti-TNF alpha antibody (adalimumab) reduces airway inflammation and ameliorates lung histology in a murine model of acute asthma*. Allergol Immunopathol (Madr), 2015. **43**(1): p. 14-8.
 133. Mazzon, E., et al., *Effect of tumour necrosis factor-alpha receptor 1 genetic deletion on carrageenan-induced acute inflammation: a comparison with etanercept*. Clin Exp Immunol, 2008. **153**(1): p. 136-49.
 134. Schelegle, E.S. and W.F. Walby, *Vagal afferents contribute to exacerbated airway responses following ozone and allergen challenge*. Respir Physiol Neurobiol, 2012. **181**(3): p. 277-85.
 135. Vieira, R.P., et al., *Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(9): p. 871-7.
 136. Phipps, S., et al., *Acute allergen-induced airway remodeling in atopic asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(6): p. 626-32.
 137. Chetta, A., et al., *Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease*. Chest, 1997. **111**(4): p. 852-7.
 138. Greenlee, K.J., Z. Werb, and F. Kheradmand, *Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 69-98.
 139. Araujo, B.B., et al., *Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma*. Eur Respir J, 2008. **32**(1): p. 61-9.
 140. Verbout, N.G., et al., *Atropine pretreatment enhances airway hyperreactivity in antigen-challenged guinea pigs through an eosinophil-dependent mechanism*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **292**(5): p. L1126-35.
 141. Rosas-Ballina, M. and K.J. Tracey, *Cholinergic control of inflammation*. J Intern Med, 2009. **265**(6): p. 663-79.
 142. Pena, G., et al., *JAK2 inhibition prevents innate immune responses and rescues animals from sepsis*. J Mol Med (Berl), 2010. **88**(8): p. 851-9.
 143. Qin, H., et al., *SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation*. J Immunol, 2012. **189**(7): p. 3439-48.

-
144. Karlsen, A.E., et al., *Suppressor of cytokine signalling (SOCS)-3 protects beta cells against IL-1beta-mediated toxicity through inhibition of multiple nuclear factor-kappaB-regulated proapoptotic pathways*. Diabetologia, 2004. **47**(11): p. 1998-2011.
145. Shen, W., et al., *Penahyclidine hydrochloride attenuates LPS-induced acute lung injury involvement of NF-kappaB pathway*. Pharmacol Res, 2009. **60**(4): p. 296-302.
146. Steinberg, K.P., et al., *Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **150**(1): p. 113-22.
147. Walker, D.P., et al., *Design, synthesis, structure-activity relationship, and in vivo activity of azabicyclic aryl amides as alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonists*. Bioorg Med Chem, 2006. **14**(24): p. 8219-48.
148. Campanholle, G., et al., *Bradykinin inducible receptor is essential to lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice*. Eur J Pharmacol, 2010. **634**(1-3): p. 132-7.
149. Johnston, L.K., et al., *Pulmonary macrophage subpopulations in the induction and resolution of acute lung injury*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012. **47**(4): p. 417-26.
150. Ranieri, V.M., et al., *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition*. Jama, 2012. **307**(23): p. 2526-33.
151. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, *NF-kappa B: ten years after*. Cell, 1996. **87**(1): p. 13-20.
152. Okawa, S., et al., *Lipopolysaccharide induces expression of collagen VI in the rat lung*. J Toxicol Pathol, 2015. **28**(1): p. 37-41.
153. Bregeon, F., et al., *Activation of nicotinic cholinergic receptors prevents ventilator-induced lung injury in rats*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e22386.