

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde

RENAN TREVISAN JOST

**USO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO NO TRATAMENTO DA FIBROSE
PULMONAR EXPERIMENTAL**

Porto Alegre
2017

RENAN TREVISAN JOST

**USO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO NO TRATAMENTO DA FIBROSE
PULMONAR EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira
Co-orientador: Dr. Denizar Alberto da Silva Melo

Porto Alegre
2017

RENAN TREVISAN JOST

**USO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO NO TRATAMENTO DA FIBROSE
PULMONAR EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. José Miguel Chatkin

Dra. Dulciane Nunes Paiva

Dr. Adroaldo Lunardelli

Dra. Fernanda Bordignon Nunes (suplente)

Porto Alegre
2017

Ficha Catalográfica

J84 u Jost, Renan Trevisan

Uso da frutose-1,6-bisfosfato no tratamento da fibrose pulmonar experimental / Renan Trevisan Jost . – 2017.

48 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues Oliveira.

Co-orientador: Prof. Dr. Denizar Alberto da Silva Melo.

1. fibrose pulmonar. 2. bleomicina. 3. análise de sobrevivência.
4. fibroblastos. I. Oliveira, Jarbas Rodrigues. II. Melo, Denizar Alberto da Silva. III. Título.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador Prof. Jarbas de Oliveira pelos ensinamentos, dedicação, cobranças necessárias, por acreditar no meu trabalho e, principalmente, por aceitar minha dupla jornada acadêmica e me acolher tão bem. És um exemplo de profissional e de pessoa.

Ao meu colega e parceiro de todas as horas Henrique Bregolin Dias. Um agradecimento especial não apenas por ter me ajudado durante todo o trabalho, mas por se tornar um grande amigo que, certamente, levarei sempre comigo.

A todos os meus amigos/colegas do Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação e Laboratório de Respirologia Pediátrica do IPB, em especial a Gabriele Krause, Gabriela Viegas Haute, Bruno Basso, Carolina Luft, Eduardo Caberlon, Fernanda Mesquita, Leonardo Pedrazza e Rodrigo Godinho. Aprendi muitas coisas que levarei para minha vida profissional e pessoal e que certamente me tornarão um médico e uma pessoa melhor. Esses 2 anos foram sensacionais e vocês estando ao meu lado fizeram eles muito melhores.

Ao Prof. Márcio Donadio, Prof. Vinicius Duval da Silva e Prof. Denizar Melo pela ajuda na construção e desenvolvimento do trabalho e por serem profissionais exemplares que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Escola de Medicina da PUCRS e ao CNPq pela bolsa de estudos que possibilitou a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos/colegas da Escola de Medicina da PUCRS. Obrigado pela ajuda, apoio e preocupação que sempre tiveram comigo. Impossível citar todos os nomes, mas cada um sabe o quão importante é para mim e eu sei que não serão apenas 6 anos de convívio, mas sim uma amizade que começou em 2014 e que durará para sempre.

Aos meus amigos de Faxinal do Soturno, Porto Alegre e Santa Cruz do Sul que sempre me apoiaram nas minhas decisões e me ajudaram a passar por todos os obstáculos até aqui.

Por fim, as pessoas mais importantes da minha vida – minhas famílias. Maria Carmen, Ereneu, Tiago, Daniel, Marielli, Zanita, Janaína e Lucas obrigado pelo amor e apoio incondicional, por me incentivarem nos momentos difíceis e por me darem o suporte necessário para percorrer esse caminho profissional que já dura anos e ainda está começando. Obrigado a minha segunda família (Fernanda, Milton, Andreia, Daniel e Lisboa) que entraram no meu caminho no meio dessa dupla jornada para me ajudar a torná-la ainda melhor; Fe obrigado por toda ajuda, apoio, amor, por ser essa pessoa sensacional e por me tornar uma pessoa melhor.

Muito obrigado!

RESUMO

A fibrose pulmonar é uma forma específica de pneumonia intersticial caracterizada por piora progressiva da dispneia e da função pulmonar e associada a um mau prognóstico. Além da causa idiopática, a fibrose pulmonar pode ser causada por drogas como a bleomicina (BLM) - usada no tratamento de linfomas e tumores germinativos. A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um composto glicolítico endógeno de alta energia que possui efeitos antifibróticos, anti-inflamatórios e imunomodulador. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da FBP sobre um modelo de fibrose pulmonar induzida por BLM em camundongos e investigar seu efeito utilizando um sistema de cultura de fibroblastos de pulmão embrionário humano (MRC-5). Camundongos C57BL/6 foram divididos em grupos Controle, FBP, BLM, BLM + FBP. Foi administrada uma dose única de bleomicina intratraqueal (7,5 U/kg) para avaliar a sobrevivência, o acompanhamento do peso corporal, o escore Ashcroft e a histologia (hematoxilina-eosina, tricrômio de Masson e picosirius). Para avaliar a função pulmonar e o lavado broncoalveolar (LBA) foi administrada uma dose única de bleomicina a 1,2 U/kg por via intratraqueal. O tratamento com FBP (500 mg/kg) foi administrado no dia 0 intraperitonealmente. Fibroblastos (células MRC-5) foram utilizados para acessar o efeito da FBP *in vitro*. *In vivo*, a FBP aumentou a taxa de sobrevivência e reduziu a perda de peso corporal quando BLM e BLM mais FBP foram comparados ($p < 0,05$). FBP também previne a perda de função pulmonar causada por BLM e diminuiu as células inflamatórias no LBA. O grau de fibrose e a densidade superficial de colágeno foi menor nos pulmões de animais que receberam BLM mais FBP comparado com BLM apenas ($p < 0,05$). *In vitro*, a FBP (0,62 e 1,25 mM) apresentou actividade inibidora em células MRC-5 e foi capaz de induzir a senescência em fibroblastos. Estes resultados mostraram que a FBP tem o potencial de reduzir os efeitos tóxicos da bleomicina e pode proporcionar terapia de suporte para métodos convencionais de pacientes que utilizam essa terapia para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: fibrose pulmonar, bleomicina, análise de sobrevivência, fibroblastos.

ABSTRACT

Pulmonary fibrosis is a specific form of interstitial pneumonia characterized by progressive worsening of dyspnea and lung function and associated with a poor prognosis. In addition to the idiopathic cause, pulmonary fibrosis may be caused by drugs such as bleomycin (BLM) - used in lymphomas and germinative tumors treatments. Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) is a high energy endogenous glycolytic compound that has antifibrotic, anti-inflammatory and immunomodulatory effects. The aim of this study was to assess the effect of FBP on BLM-induced pulmonary fibrosis model in mice and investigate its effect using a human embryonic lung fibroblast (MRC-5) culture system. C57BL/6 were divided into Control, FBP, BLM and BLM plus FBP. A single dose of bleomycin (7.5 U/kg) was administered intratracheally in mice and survival, body weight, Ashcroft Score and histological analysis (hematoxylin-eosin, Masson's trichrome and picrosirius) were performed. Pulmonary function and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were also evaluated after a single dose of bleomycin (1.2 U/kg – intratracheally). Treatment with FBP (500 mg/kg) was given on day 0 intraperitoneally. Fibroblasts (MRC-5 cells) were used to access the effect of FBP *in vitro*. *In vivo*, FBP increased survival rate and reduced the body weight loss when BLM and BLM plus FBP were compared ($p < 0.05$). FBP also prevented the loss of pulmonary function caused by BLM and decreased BALF inflammatory cells. The level of fibrosis and the superficial collagen density were lower in the lungs of animals that received BLM plus FBP as compared to BLM only ($p < 0.05$). *In vitro*, FBP (0.62 and 1.25 mM) had inhibitory activity on MRC-5 cells and was able to induce senescence in fibroblasts. These results showed that FBP has the potential of reducing the toxic effects of BLM and may provide supportive therapy for conventional methods used for the treatment of cancer.

Keywords: pulmonary fibrosis, bleomycin, survival analysis, fibroblasts.

LISTA DE SIGLAS

ATP - Trifosfato de adenosina

BLM – Bleomicina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

FBP – Frutose-1,6-bisfosfato

iNOS – Óxido nítrico sintetase induzível

MEC – Matriz extracelular

NADP - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

PPAR - Peroxisome proliferator-activated receptor

TGF- β 1 – Fator de transformação do crescimento beta

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	10
Figura 2	11

CAPÍTULO 2

Figura 1	25
Figura 2	25
Figura 3	27
Figura 4	28
Figura 5	29
Figura 6	30
Figura 7	31
Figura 8	31
Figura 9	32
Figura 10	33

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	9
1. INTRODUÇÃO	9
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
CAPÍTULO 2	16
4. ARTIGO CIENTÍFICO	16
CAPÍTULO 3	41
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
6. REFERENCIAS	42
7. ANEXO 1	45
8. ANEXO 2	46

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A fibrose pulmonar é uma doença progressiva e fatal que envolve a remodelação do espaço aéreo distal e do parênquima pulmonar, resultando no comprometimento das trocas gasosas (1). Ela é a pneumonia intersticial mais comum, sendo uma doença progressiva que possui um prognóstico variável (2). Os pacientes com fibrose pulmonar têm uma sobrevida média de 2,5 a 3,5 anos após o diagnóstico (3-5), afeta principalmente homens, em sua maioria após os 60 anos, e sua incidência aumenta com o avançar da idade (6-8).

A reparação de tecidos danificados é um mecanismo biológico importante que permite a substituição ordenada de células lesadas em um processo extremamente importante para a sobrevivência (9). No entanto, quando este processo torna-se desregulado levando ao desenvolvimento de fibrose permanente, é caracterizada pelo acúmulo de componentes da matriz extracelular (MEC) no local da lesão (10). A histopatologia da doença também mostra proliferação anormal de células mesenquimais, diferentes graus de fibrose, distorção da arquitetura pulmonar e espaços aéreos císticos subpleural (3 a 10 mm de diâmetro), e focos de fibroblastos e miofibroblastos (1, 11, 12).

Nas primeiras fases após os danos nos tecidos, células epiteliais e endoteliais liberam mediadores inflamatórios que iniciam uma cascata de coagulação-antifibrinolítica provocando a coagulação e o desenvolvimento de uma MEC provisória. A agregação de plaquetas e subsequente desgranulação, por sua vez, promove a dilatação dos vasos sanguíneos e aumento da permeabilidade, o que permite o recrutamento eficiente de células inflamatórias para o local da lesão (9, 13).

Lesão epitelial, estresse oxidativo, distúrbios da coagulação e inflamação estão envolvidos em uma interação complexa que conduz à transformação de fibroblastos em miofibroblastos, e prolonga a sobrevivência dessas células produtoras de MEC (12, 14). O excesso de colágeno que é produzido por esses miofibroblastos é depositado de forma desorganizada no interior da MEC. Em pulmões de pacientes com fibrose pulmonar, o excesso de colágeno tipo I predomina nas áreas de fibrose madura, enquanto o colágeno tipo III é o tipo predominante em áreas de fibrose recém estabelecida (15-18) (Figura 1).

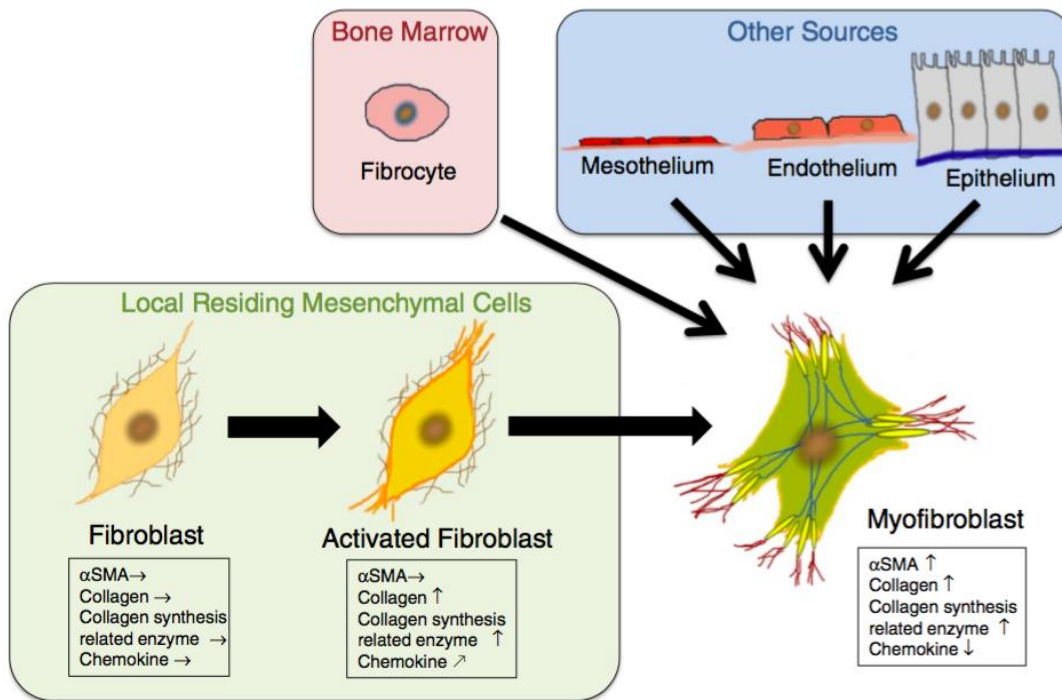


Figura 1. Ativação e diferenciação de fibroblastos. Fibroblastos residentes são ativados quando o tecido sofre uma agressão e, em seguida, começam a produzir mais colágeno e quimiocinas. Após isso, fibroblastos ativados se diferenciam em miofibroblastos, que ainda produzem colágeno, mas não produzem quimiocinas. Outros tipos de células, como as células mesoteliais, as células endoteliais, as células epiteliais e os fibrócitos circulantes também participam no desenvolvimento de miofibroblastos. (18).

Além das causas idiopáticas, a fibrose pulmonar pode ser causada por tratamento radioterápico, fatores ocupacionais e ambientais, condições médicas como sarcoidose e lúpus eritematoso sistêmico e medicamentos (nitrofurantoína ou etambutol, amiodarone, rituximab e quimioterápicos, como methotrexate e a bleomicina) (1, 19, 20).

Bleomicina (BLM) é um agente antitumoral que foi isolado de uma cepa de *Streptomyces verticillus* em 1966 (21) e é utilizada com sucesso para tratar uma variedade de malignidades como tumores de células germinativas, linfoma de Hodgkin, tumores de testículo e câncer de cabeça e pescoço (22, 23). No entanto, a eficácia terapêutica da BLM é limitada por provocar uma pneumonia dose dependente, que pode afetar até 46% dos pacientes, dos quais 3% morrem. Ainda, a fibrose pulmonar intersticial (também chamada alveolite fibrosante) se desenvolve em 10% dos pacientes e acarreta grande morbidade. (22, 24).

O efeito antineoplásico da BLM envolve rupturas simples e duplas no DNA por um complexo de bleomicina, íon ferrosos e oxigênio molecular (20, 25). A redução do oxigênio molecular por íons ferrosos quelados pela BLM leva à subtração de hidrogênio dos carbonos C3 e C4 da desoxirribose, resultando na clivagem da ligação C3-C4 e liberação de uma base

com uma ruptura da cadeia de DNA (Figura 2). Ainda, ela é inativada *in vivo* pela enzima bleomicina hidrolase, uma aminopeptidase citosólica que tem uma atividade mais baixa na pele e nos pulmões, o que pode explicar a toxicidade específica do fármaco nestes órgãos (23, 26).

A resposta fibrótica à lesão induzida por BLM tem sido associada a uma perda adquirida da atividade da bleomicina hidrolase (27) e é mediada por mecanismos imunológicos, caracterizados pela migração de células efectoras ativadas no pulmão e a liberação de mediadores pró-inflamatórios que acabam resultando no desenvolvimento de fibrose pulmonar (9, 13, 23). Sua ação pró-fibrótica foi primeiramente observada em cães e é o principal e mais bem caracterizado agente utilizado em modelos animais de indução de fibrose, mas atualmente os animais mais utilizados para estudos são camundongos da linhagem C57BL/6. Esse modelo tem sido utilizado para o estudo de diversos fatores inerentes à fibrose, como o mecanismo de ação de fatores de crescimento e agentes fibróticos como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β 1), controle de apoptose e sua inibição e analisar alterações de células epiteliais, de miofibroblastos, estresse oxidativo e alterações da MEC (28-30).

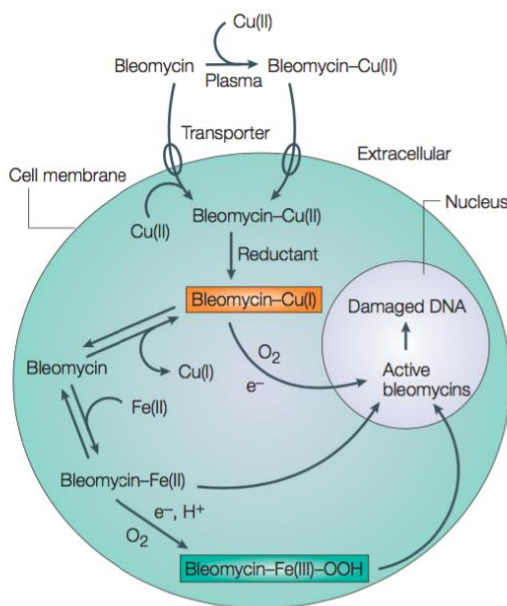


Figura 2. Mecanismos propostos para geração de “bleomicina ativada” *in vivo*. Bleomicina liga-se a Cu(II) de forma intensa. Intracelularmente, a bleomicina-Cu(II) pode ser reduzida a bleomicina-Cu(I), que reage com O_2 para iniciar transformações radicais e clivagem de DNA. Além disso, os ligantes do complexo bleomicina-Cu(I) são capazes de trocar e apenas esta forma pode perder metal e ligar Fe(II). Portanto, para que a bleomicina ativada (bleomicina-Fe(III)-OOH) seja gerada, a bleomicina-Cu(II) deve ser reduzida a bleomicina-Cu(I) intracelularmente. O Cu(I) deve então dissociar da bleomicina e um Fe(II) deve ligar. Uma vez ligado Fe(II), ocorre a química para formar a bleomicina ativada (23).

Modelos experimentais *in vitro* também são uma excelente alternativa para testar os efeitos de componentes sobre tecidos e células pulmonares. A cultura de células, obtidas a partir de modelos animais ou humanos, permite a análise do crescimento, fenótipo, expressão de receptores, juntamente com os produtos que sintetizam. Em placas de cultura de tecidos, os fibroblastos crescem e se aderem, permitindo o tratamento com diferentes compostos (28). Os fibroblastos de tecido de granulação (miofibroblastos) desenvolvem várias características

ultraestruturais e bioquímicas que têm sido sugeridas por desempenhar um papel importante na fisiopatologia das doenças fibróticas (31). Portanto, diferentes linhagens celulares são usadas para estudar o processo fibrótico e testar medicamentos para seu tratamento. As células MRC-5 são derivadas de fibroblastos de pulmão fetal humano e foram caracterizadas por Jacobs, Jones e Baille (1970) (32). Estas células expressam características importantes dos miofibroblastos e, por conseguinte, são consideradas como uma linha de células de miofibroblastos (33). São também úteis para demonstrar o efeito de vários compostos numa cultura experimental isolada e para explorar a fisiopatologia da fibrose básica (34).

Apesar do aspecto clínico da fibrose pulmonar apresentar diferentes graus de fibrose intersticial e inflamação do parênquima, os achados de diagnóstico adicionais relevantes permanecem em grande parte indescritível. Além disso, não há terapias substanciais desenvolvidas para reverter a fibrose pulmonar já estabelecida e há poucas terapias que retardem a progressão crônica da doença (5, 35).

Historicamente, a terapia padrão para fibrose pulmonar foi uma combinação de prednisona, N-acetilcisteína e azatioprina, porém esse regime não é efetivo. Dessa forma, uma enorme gama de trabalho nos últimos anos alterou radicalmente a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes com o intuito de possibilitar uma terapêutica direcionada ao mecanismo de ação da doença (36, 37) Apesar de nenhuma medicação ter sido encontrada para curar pacientes com fibrose pulmonar, o nintedanibe e pirfenidona são atualmente as drogas mais indicadas para o tratamento da fibrose pulmonar, pois parecem retardar a progressão da doença. Além disso, a pirfenidona parece ter um benefício na mortalidade dos pacientes (38, 39). Contudo, pesquisas por drogas mais eficazes e com menores efeitos adversos são de grande valia e têm sido desenvolvidas com o intuito de avançar na descoberta de uma terapia promissora prevenção da fibrose pulmonar.

O frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um intermediário glicolítico endógeno de alta energia produzido pela atividade da fosfofructoquinase-1 através da fosforilação da frutose 6-fosfato (40), que demonstra vários efeitos terapêuticos benéficos, como na nefrotoxicidade (41), na função contrátil do coração (42), nos parâmetros hemodinâmicos (43), no fígado (44), no intestino (45), no cérebro (46), na sepse (47) e na lesão aguda de pulmão (48, 49). Fisiologicamente, foi constatada que a FBP tem a capacidade de diminuir a quantidade de cálcio extracelular, melhorando o rendimento mecânico cardíaco e atenuando os comprometimentos respiratórios (48-50) e mediando a ativação de fosfoquinase-C, que modula a atividade intracelular do cálcio (51). A FBP, ainda, é capaz de aumentar a captação celular de potássio

que resulta em uma diminuição intracelular da concentração de sódio e reduz, assim, o edema celular citotóxico (52).

Esse composto também inibe a formação de radicais livres, a ativação de neutrófilos (53) e a proliferação de linfócitos T (47), tendo, portanto, efeitos antiinflamatório e imunomodulador importantes. Não obstante, o mecanismo pelo qual a FBP reduz a formação de radicais livres está envolvido com o aumento nos níveis de ATP, tendo em vista de que este pode ser o regulador fisiológico da atividade catalítica da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) oxidase, que é uma das enzimas responsáveis pela produção desses radicais (54). Ainda, estudos demonstraram que a FBP apresenta efeitos sobre a fibrogênese, modulando a ação dos fibroblastos, alterando a liberação de TGF- β 1 e diminuindo a secreção de colágeno (44, 55, 56). De Mesquita et al. (2013) (44) avaliou os efeitos da FBP em células estreladas hepáticas e evidenciou uma diminuição significativa na expressão de mRNA de colágeno tipo I e redução dos níveis de TGF- β 1 e de colágeno total secretados. Além disso, a FBP promoveu a reversão fenotípica dessas células de miofibroblastos a fibroblastos, o que foi evidenciado por alterações morfológicas, capacidade de armazenar gotículas de lipídeos reestabelecida e aumento dos níveis de expressão do PPAR- γ , mostrando, assim, um grande potencial antifibrótico. Santos et al. (2012) (49) avaliou o efeito protetor da FBP na lesão pulmonar aguda induzida por Zymosan em camundongos e concluiu que o composto promoveu efeitos antiinflamatórios por meio da atenuação do edema pulmonar, óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), o que diminuiu os níveis de óxido nítrico.

Entretanto, esses possíveis efeitos benéficos ainda não foram avaliados em modelos experimentais de fibrose pulmonar. Dessa forma, o presente projeto se propõe a avaliar o efeito da frutose-1,6-bisfosfato em modelos experimentais de fibrose pulmonar *in vivo*, por meio de duas linhagens de camundongos, e *in vitro*, por meio da cultura de células pulmonares.

2. JUSTIFICATIVA

A bleomicina é um agente antitumoral muito utilizado na prática clínica para o tratamento de tumores de células germinativas, linfoma de Hodgkin, tumores de testículo e câncer de cabeça e pescoço, porém a toxicidade pulmonar por esse medicamento é alta e a fibrose pulmonar se desenvolve em muitos pacientes. Um dos maiores desafios frente a este efeito colateral é o controle da resposta imune e da deposição de colágeno no tecido pulmonar, visto que são mecanismos importantes, contribuindo para a instalação do processo patológico.

O uso da frutose-1,6-bisfosfato tem sido benéfico quando empregado em diversos modelos experimentais, atuando na redução de radicais livres, retardando o dano celular, modulação e liberação de TGF- β e na síntese de colágeno. Para tanto, devido a sua ação anti-inflamatória e influência na deposição e síntese de colágeno torna-se útil o estudo desse composto em modelos experimentais de fibrose pulmonar e sua ação em fibroblastos pulmonares isolados.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da frutose-1,6-bisfosfato em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos e também investigar seu efeito na cultura de fibroblastos de pulmão.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da FBP na sobrevivência de um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina.

Avaliar os efeitos na FBP sobre a morfologia pulmonar de camundongos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina.

Avaliar os efeitos na FBP sobre a perda de peso de camundongos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina.

Avaliar os efeitos da FBP nas células do lavado broncoalveolar de camundongos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina.

Avaliar os efeitos da FBP sobre a proliferação de fibroblastos pulmonares *in vitro*.

Avaliar a citotoxicidade da FBP em fibroblastos pulmonares *in vitro*.

Avaliar os efeitos da FBP sobre a formação de espécies reativas de oxigênio em fibroblastos pulmonares *in vitro*.

Avaliar a ação da FBP sobre a apoptose e/ou senescência celular em fibroblastos pulmonares *in vitro*.

CAPÍTULO 2

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados do presente estudo foram submetidos ao periódico **Journal of Breath Research**.

Fator de impacto: **4.177**

CAPÍTULO 3

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A BLM é utilizada em diversos protocolos para tratamento do câncer, sendo graves os efeitos adversos, como a fibrose pulmonar, que levam a uma grande morbidade e mortalidade. Para tanto, o teste de drogas que possam servir tanto para a prevenção quanto para o tratamento de seus efeitos adversos são extremamente importantes.

Como descrevemos ao longo do estudo, a FBP demonstrou ser um composto eficaz no que tange a prevenção da instalação de uma fibrose pulmonar intensa, diminuindo a destruição da arquitetura pulmonar e a deposição de colágeno. Mostrou-se, ainda, eficaz ao aumentar a sobrevivência de animais quando utilizada uma dose de BLM com alta mortalidade. Quando a FBP foi adicionada à cultura de fibroblastos pulmonares *in vitro*, foi observado um efeito inibitório no crescimento celular. Esse resultado demonstra um possível benefício quando se avalia a fisiopatologia da fibrose pulmonar, em que a agressão causada pela BLM provoca uma resposta inflamatória que ativa fibroblastos e faz com que se transformem em miofibroblastos, aumentando sua proliferação para secretar uma quantidade maior de colágeno. Por fim, a senescência celular causada pela FBP na cultura de fibroblastos, apesar de contraditória na literatura, pode ser benéfica para a fibrose pulmonar, pois não está associada ao aumento da geração de ROS e possivelmente pode estar relacionada à redução do tamanho dos telômeros.

Dentre as limitações do trabalho, podemos citar a falta da dosagem de substâncias importantes na fisiopatologia da fibrose pulmonar, como TGF- β , hidroxiprolina, interleucinas, substâncias relacionadas ao estresse oxidativo e o tamanho dos telômeros dos fibroblastos. Porém, podemos mostrar por meio de outros métodos, como a histologia e análise morfométrica, que a FBP possui um efeito sobre a fibrogênese, diminuindo a deposição do colágeno.

Portanto, sugere-se que estudos investiguem o mecanismo de ação da FBP na fibrose pulmonar induzida por BLM para que futuramente essa substância possa ser associada a formulações farmacêuticas no tratamento de pacientes com câncer.

6. REFERENCIAS

1. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(6):788-824.
2. Rosas IO, Kaminski N. Update in diffuse parenchymal lung disease 2013. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191(3):270-4.
3. King TE, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet.* 2011;378(9807):1949-61.
4. Behr J, Günther A, Ammenwerth W, Bittmann I, Bonnet R, Buhl R, et al. [German guideline for diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis]. *Pneumologie.* 2013;67(2):81-111.
5. Schwartz DA, Helmers RA, Galvin JR, Van Fossen DS, Frees KL, Dayton CS, et al. Determinants of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149(2 Pt 1):450-4.
6. Fernandez Perez ER, Daniels CE, Schroeder DR, St Sauver J, Hartman TE, Bartholmai BJ, et al. Incidence, prevalence, and clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis: a population-based study. *Chest.* 2010;137(1):129-37.
7. Navaratnam V, Fleming KM, West J, Smith CJ, Jenkins RG, Fogarty A, et al. The rising incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in the U.K. *Thorax.* 2011;66(6):462-7.
8. Nathan SD, Shlobin OA, Weir N, Ahmad S, Kaldjob JM, Battle E, et al. Long-term course and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis in the new millennium. *Chest.* 2011;140(1):221-9.
9. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest.* 2007;117(3):524-9.
10. Kristensen JH, Karsdal MA, Genovese F, Johnson S, Svensson B, Jacobsen S, et al. The role of extracellular matrix quality in pulmonary fibrosis. *Respiration.* 2014;88(6):487-99.
11. Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2001;345(7):517-25.
12. Homer RJ, Elias JA, Lee CG, Herzog E. Modern concepts on the role of inflammation in pulmonary fibrosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(6):780-8.
13. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med.* 2011;208(7):1339-50.
14. Luzina IG, Todd NW, Sundararajan S, Atamas SP. The cytokines of pulmonary fibrosis: Much learned, much more to learn. *Cytokine.* 2015;74(1):88-100.
15. Kaarteenaho-Wiik R, Paakko P, Herva R, Risteli J, Soini Y. Type I and III collagen protein precursors and mRNA in the developing human lung. *The Journal of pathology.* 2004;203(1):567-74.
16. Raghu G, Striker LJ, Hudson LD, Striker GE. Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis.* 1985;131(2):281-9.
17. Bateman ED, Turner-Warwick M, Adelman-Grill BC. Immunohistochemical study of collagen types in human foetal lung and fibrotic lung disease. *Thorax.* 1981;36(9):645-53.
18. Akamatsu T, Arai Y, Kosugi I, Kawasaki H, Meguro S, Sakao M, et al. Direct isolation of myofibroblasts and fibroblasts from bleomycin-injured lungs reveals their functional similarities and differences. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2013;6(1):15.
19. Tobin MJ. Tuberculosis, lung infections, interstitial lung disease, social issues and journalology in AJRCCM 2003. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169(2):288-300.
20. Jules-Elysee K, White DA. Bleomycin-induced pulmonary toxicity. *Clin Chest Med.* 1990;11(1):1-20.

21. Meadors M, Floyd J, Perry MC. Pulmonary toxicity of chemotherapy. *Semin Oncol.* 2006;33(1):98-105.
22. Reinert T, Baldotto CSdR, Nunes FAP, Scheliga AAdS. Bleomycin-Induced Lung Injury. *Journal of Cancer Research*2013.
23. Chen J, Stubbe J. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(2):102-12.
24. Sleijfer S. Bleomycin-induced pneumonitis. *Chest.* 2001;120(2):617-24.
25. Sikic BI. Biochemical and cellular determinants of bleomycin cytotoxicity. *Cancer Surv.* 1986;5(1):81-91.
26. Chandler DB. Possible mechanisms of bleomycin-induced fibrosis. *Clin Chest Med.* 1990;11(1):21-30.
27. Filderman AE, Genovese LA, Lazo JS. Alterations in pulmonary protective enzymes following systemic bleomycin treatment in mice. *Biochem Pharmacol.* 1988;37(6):1111-6.
28. Molina-Molina M, Pereda J, Xaubet A. [Experimental models for the study of pulmonary fibrosis: current usefulness and future promise]. *Arch Bronconeumol.* 2007;43(9):501-7.
29. Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;294(2):L152-60.
30. Limjunyawong N, Mitzner W, Horton MR. A mouse model of chronic idiopathic pulmonary fibrosis. *Physiol Rep.* 2014;2(2):e00249.
31. Desmoulière A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int.* 1995;19(5):471-6.
32. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature.* 1970;227(5254):168-70.
33. Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest.* 2002;122(6 Suppl):286S-9S.
34. Honda E, Munakata H. Purification and characterization of decorin from the culture media of MRC-5 cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(8):1635-44.
35. Behr J. Evidence-based treatment strategies in idiopathic pulmonary fibrosis. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society.* 2013;22(128):163-8.
36. Staitieh BS, Renzoni EA, Veeraraghavan S. Pharmacologic therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, past and future. *Ann Med.* 2015;47(2):100-5.
37. Kristensen JH, Karsdal MA, Genovese F, Johnson S, Svensson B, Jacobsen S, et al. The role of extracellular matrix quality in pulmonary fibrosis. *Respiration.* 2014;88(6):487-99.
38. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2014;370(22):2071-82.
39. King TE, Jr., Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2014;370(22):2083-92.
40. Kirtley ME, McKay M. Fructose-1,6-bisphosphate, a regulator of metabolism. *Mol Cell Biochem.* 1977;18(2-3):141-9.
41. Azambuja AA, Lunardelli A, Nunes FB, Gaspareto PB, Donadio MV, Poli de Figueiredo CE, et al. Effect of fructose-1,6-bisphosphate on the nephrotoxicity induced by cisplatin in rats. *Inflammation.* 2011;34(1):67-71.
42. Takeuchi K, Cao-Danh H, Friehs I, Glynn P, D'Agostino D, Simplaceanu E, et al. Administration of fructose 1,6-diphosphate during early reperfusion significantly improves recovery of contractile function in the postischemic heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998;116(2):335-43.

43. Kalam Y, Graudins A. The effects of fructose-1,6-diphosphate on haemodynamic parameters and survival in a rodent model of propranolol and verapamil poisoning. *Clinical toxicology*. 2012;50(7):546-54.
44. de Mesquita FC, Bitencourt S, Caberlon E, da Silva GV, Basso BS, Schmid J, et al. Fructose-1,6-bisphosphate induces phenotypic reversion of activated hepatic stellate cell. *Eur J Pharmacol*. 2013;720(1-3):320-5.
45. Genesca M, Sola A, Azuara D, De Oca J, Hotter G. Apoptosis inhibition during preservation by fructose-1,6-diphosphate and theophylline in rat intestinal transplantation. *Critical care medicine*. 2005;33(4):827-34.
46. Zhou J, Wang F, Zhang J, Gao H, Yang Y, Fu R. Repeated febrile convulsions impair hippocampal neurons and cause synaptic damage in immature rats: neuroprotective effect of fructose-1,6-diphosphate. *Neural regeneration research*. 2014;9(9):937-42.
47. Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JC, Lunardelli A, Pires MG, Wachter PH, et al. An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res*. 2003;47(1):35-41.
48. Du S, Guan Z, Hao L, Song Y, Wang L, Gong L, et al. Fructose-bisphosphate aldolase a is a potential metastasis-associated marker of lung squamous cell carcinoma and promotes lung cell tumorigenesis and migration. *PLoS One*. 2014;9(1):e85804.
49. Santos RC, Moresco RN, Pena Rico MA, Susperregui AR, Rosa JL, Bartrons R, et al. Fructose-1,6-bisphosphate protects against Zymosan-induced acute lung injury in mice. *Inflammation*. 2012;35(3):1198-203.
50. Hassinen IE, Nuutinen EM, Ito K, Nioka S, Lazzarino G, Giardina B, et al. Mechanism of the effect of exogenous fructose 1,6-bisphosphate on myocardial energy metabolism. *Circulation*. 1991;83(2):584-93.
51. Donohoe PH, Fahlman CS, Bickler PE, Vexler ZS, Gregory GA. Neuroprotection and intracellular Ca²⁺ modulation with fructose-1,6-bisphosphate during in vitro hypoxia-ischemia involves phospholipase C-dependent signaling. *Brain Res*. 2001;917(2):158-66.
52. Cattani L, Costrini R, Cerilli C, Rigobello MP, Bianchi M, Galzigna L. Fructose-1, 6-diphosphate dependence on the toxicity and uptake of potassium ions. *Agressologie: revue internationale de physio-biologie et de pharmacologie appliquees aux effets de l'agression*. 1980;21(5):263-4.
53. Sola A, Panes J, Xaus C, Hotter G. Fructose-1,6-bisphosphate and nucleoside pool modifications prevent neutrophil accumulation in the reperfused intestine. *J Leukoc Biol*. 2003;73(1):74-81.
54. Babior BM, Peters WA. The O₂⁻-producing enzyme of human neutrophils. Further properties. *J Biol Chem*. 1981;256(5):2321-3.
55. Tucci M, Perrett W, Scott V, Wilson G, Black D, Benghuzzi H. The effects of sugar phosphates in reducing hif-1? Under hypoxic conditions. *Biomedical sciences instrumentation*. 2012;48:431-8.
56. Camacho VR, de Fraga RS, Cerski CT, de Oliveira JR, Alvares-da-Silva MR. Relationship between ischemia/reperfusion injury and the stimulus of fibrogenesis in an experimental model: comparison among different preservation solutions. *Transplant Proc*. 2011;43(10):3634-7.

7. ANEXO 1



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 53/2015 - CEUA

Porto Alegre, 14 de agosto de 2015.

Prezado Sr.(a) Pesquisador(a),

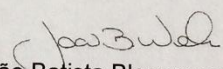
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e **aprovou** seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00457, intitulado "**Uso da frutose-1,6-bisfosfato no tratamento da fibrose pulmonar experimental**". Contudo, faz-se as seguintes recomendações:

- 1) Enviar o resultado do cálculo de projeção amostral, após a obtenção dos dados preliminares, para a definição final do N amostral necessário.
- 2) Para futuras submissões de protocolos de pesquisa, a informação concernente ao procedimento de recálculo da projeção amostral deve constar no formulário da CEUA. No corrente processo, tal informação se encontra descrita apenas no documento unificado do SIPESQ (projeto).

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
192	Mus musculus - 57/BL6 e CF-1	08/2015 – 07/2016

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Imo. Sr.
Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira
FABIO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS
Fone: (51) 3353-6365
E-mail: ceua@pucrs.br

8. ANEXO 2

25/01/2017

Gmail - Your submission to J. Breath Res.: JBR-100552



Renan Jost <rtjost@gmail.com>

Your submission to J. Breath Res.: JBR-100552

Journal of Breath Research <onbehalfof+jbr+iop.org@manuscriptcentral.com>

25 de janeiro de 2017 10:08

Responder a: jbr@iop.org

Para: rtjost@gmail.com, henrique.bdias@hotmail.com, gabic_krause@yahoo.com.br, rodrigo.godinho@puccs.br, nknunez@hotmail.com, tassia.souza@acad.puccs.br, dmelo@puccs.br, pmpitrez@puccs.br, vinids@gmail.com, mdonadio@puccs.br, jarbas@puccs.br

Dear Dr Jost,

Re: "Fructose-1,6-bisphosphate prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice and inhibits the proliferation of lung fibroblasts" by Jost, Renan; Dias, Henrique; Krause, Gabriele; de Souza, Rodrigo; Nuñez, Nailê; de Souza, Tássia Thais; Melo, Denizar Alberto; Pitrez, Paulo; da Silva, Vinicius; Donadio, Márcio Vinicius; de Oliveira, Jarbas
Article reference: JBR-100552

Thank you for your submission, which will be considered for publication in Journal of Breath Research, as a Paper. The reference number for your article is JBR-100552. Please quote this number in all future correspondence regarding this manuscript.

As the submitting author, you can follow the progress of your article by checking your Author Centre after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/jbr-iop> Once you are signed in you will be able to track the progress of your article, read the referee reports and send us your electronic files.

This journal makes manuscripts available to readers on the journal website within 24 hours of acceptance. Please be aware that if you did not tick the relevant opt-out box on the submission form, the accepted version of your manuscript will be visible on the journal's website before it is proof-read and formatted to our house style.

If you are planning any press activity for your article, or are currently engaging in an IP or patent application, you may wish to opt-out of making your accepted manuscript immediately available online. If you do not wish to make the accepted version of your manuscript immediately visible to readers, and have not ticked the opt-out box during submission, please let us know as soon as possible.

Please do not hesitate to contact us if we can be of assistance to you.

Yours sincerely

James Dimond
Editorial Assistant

On behalf of
Joachim Pleil - Editor-in-Chief
Jonathan Beauchamp - Associate Editor
Raed Dweik - Associate Editor
Terence Risby - Associate Editor

IOP Journal team
Marric Stephens - Editor
Adam Gough - Associate Editor
James Dimond - Editorial Assistant
Antigoni Messaritaki - Publisher
jbr@iop.org

IOP Publishing
Temple Circus, Temple Way, Bristol
BS1 6HG, UK

www.iopscience.org/jbr

2015 Impact Factor = 4.177

Letter reference: SAu05