

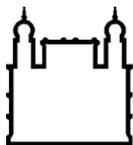
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular

PAPEL DO RECEPTOR ATÍPICO DE QUIMIOCINAS ACKR2 NA
INFLAMAÇÃO CRÔNICA PULMONAR INDUZIDA POR SÍLICA EM
CAMUNDONGOS

DAVIDSON FURTADO DIAS

Rio de Janeiro
Agosto de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DAVIDSON FURTADO DIAS

Papel do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na inflamação crônica pulmonar induzida por sílica em camundongos

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2017

Dias, Davidson Furtado.

PAPEL DO RECEPTOR ATÍPICO DE QUIMIOCINAS ACKR2 NA INFLAMAÇÃO CRÔNICA PULMONAR INDUZIDA POR SÍLICA EM CAMUNDONGOS / Davidson Furtado Dias. - Rio de Janeiro, 2017.

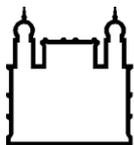
107 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins .

Bibliografia: f. 80-85

1. Pulmão. 2. Função pulmonar. 3. Silicose. 4. Inflamação. 5. ACKR2. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: DAVIDSON FURTADO DIAS

**PAPEL DO RECEPTOR ATÍPICO DE QUIMIOCINAS ACKR2 NA INFLAMAÇÃO
CRÔNICA PULMONAR INDUZIDA POR SÍLICA EM CAMUNDONGOS**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Adriana Ribeiro Silva - Presidente (FIOCRUZ)

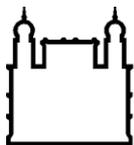
Prof. Dr. Marcelo Marcos Morales (UFRJ)

Prof. Dr. Joao Alfredo de Moraes (UFRJ)

Profa. Dra. Cristiana Couto Garcia (FIOCRUZ)

Profa. Dra. Manuella Lanzetti Daher de Deus (UFRJ)

Rio de Janeiro, 25 de Agosto de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho ao alfa e ômega da vida. Em suma, a todos os eventos e pessoas que contribuíram, de alguma forma, com a minha trajetória nesse mundo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, o criador do universo. “ Pois em ti está a fonte da vida; graças à tua luz, vemos a luz (Salmos 36:9) ”. Sou grato por receber a dádiva da vida, a qual só se torna possível no homem através da respiração pulmonar, que é um dos temas abordados neste trabalho;

À meus pais, Ronaldo Dias e Isabel Dias por todo o amor incondicional deles para comigo. Agradeço todos os momentos pelos os quais nós passamos, pelos sábios conselhos e incentivos nas horas pertinentes. Vocês dignamente me apresentaram à importância da família e do caminho da honestidade e persistência, compondo a base do ser humano que sou hoje;

À minha família, em especial a minha irmã Vanessa Dias pelo apoio e estímulo nos meus momentos mais tempestuosos, além da compreensão da importância dos “tais ratinhos” na minha vida e na ciência, mesmo sem saber exatamente o que eu fazia com eles. Obrigado também a minha prima Inês Garcia pela sua alegria, seu companheirismo e seu carinho para comigo durante esta minha etapa de aprendizado;

Aos amigos, pelo apoio e compreensão, além dos momentos de descontração e confraternização que me proporcionaram. Agradeço, inclusive, os que estão distantes fisicamente, mas que continuam torcendo pelo meu sucesso;

À minha orientadora, Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva. Obrigado pelo seu tempo, paciência e persistência dedicados comigo ao longo desses 11 anos. Através de sua orientação pude reconhecer que sempre podemos ir além. Agradeço a credibilidade e a oportunidade que me foram concedidas para desenvolver essa minha caminhada acadêmica que incluiu a iniciação científica, o mestrado e agora este trabalho de doutoramento sob sua orientação, enriquecendo-me tanto em conhecimento quanto profissionalmente;

Ao Dr. Marco Aurélio Martins, chefe do Laboratório de Inflamação, e ao Dr. Renato Sérgio Balão Cordeiro. Vocês são os precursores de tudo, que exemplificam a ética e competência profissionais, a dedicação e o aprimoramento contínuos. Agradeço pela oportunidade de convívio e por me possibilitarem desenvolver este trabalho no Laboratório de Inflamação;

À Dra. Bianca Torres por todo o auxílio e participação no desenvolvimento inicial do meu projeto. Obrigado pela sua amizade e sua dedicação;

À Dra. Tatiana Paula Teixeira Ferreira por toda sua colaboração. Com certeza você tornou mais descontraídos nossos momentos de experimentos e congressos. Além disto, obrigado pelas dicas no início da escrita da tese;

A todos os membros do Laboratório de Inflamação, obrigado por me ajudarem, de forma direta ou indireta, a executarem este trabalho. Em especial, agradeço ao total apoio da pesquisadora Dra. Magda Fráguas Serra, sua ajuda foi crucial para o desenvolvimento deste projeto. Agradeço também à Fernanda Verdini e ao apoio técnico da Ana Carolina Santos de Arantes, Camila Dantas, Daiana dos Santos, Thais Lima e Thamiris Lima por todos nossos momentos de convívios, pelas nossas conversas e momentos de descontrações e dos períodos de seriedade. Obrigado também aos pesquisadores doutores Vinicius Frias de Carvalho e Andressa Bernardi, por sempre estarem dispostos a me ajudar;

Aos usuários da sala de cultura, em especial ao Yago Amigo e a Natália Barreto por toda ajuda, atenção e suporte durante o desenvolvimento deste projeto. Também agradeço à Carolina Trindade (Carolzinha), por todos os seus apontamentos científicos, conversas e momentos de convivência durante os experimentos;

À Aryella Maryah, por todo o seu auxílio e colaboração durante esses 4 anos de doutorado. Tê-la como minha aluna e orientá-la durante o seu Programa de Vocação Científica e, agora, na sua iniciação científica foi uma experiência riquíssima para mim;

À todos os profissionais envolvidos com os biotérios do Pavilhão Osório de Almeida e do Centro de Criação de Animais de Laboratório, pelos cuidados para com os animais utilizados experimentalmente;

À secretária acadêmica do Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Biologia Celular e Molecular (BCM) Julimar Ferreira por ser sempre solícita a me ajudar nos trâmites burocráticos inerentes à pós-graduação. Agradeço também à Clarissa Lacerda, Eduardo Portugal e demais funcionários da BCM pela solicitude, prontidão e suporte administrativo.

A realização de um projeto de pesquisa como este só foi possível com o apoio de rede de colaboradores. Sendo assim, agradeço a profa. Dra. Eliete Bouskela e o apoio

técnico da Fátima Zely do Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vasculiar da Universidade do Estado do Rio de Janeiro;

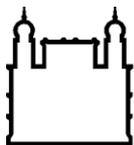
Aos Professores Dr. Mauro Teixeira e Dr. Remo de Castro da Universidade Federal de Minas Gerais que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse projeto, o meu reconhecimento e gratidão;

De antemão, agradeço o entusiasmo, a consideração e a ponderação dos membros da banca avaliadora no que tange a contribuição acadêmica e científica ao presente trabalho;

Às agências de fomento: CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado, CAPES e FAPERJ, pelo apoio financeiro.

“Sábio é aquele que conhece os limites da
própria ignorância”.

Sócrates



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

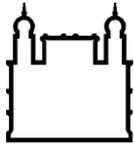
**PAPEL DO RECEPTOR ATÍPICO DE QUIMIOCINAS ACKR2 NA INFLAMAÇÃO CRÔNICA
PULMONAR INDUZIDA POR SÍLICA EM CAMUNDONGOS**

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Davidson Furtado Dias

A silicose é uma doença ocupacional, sem cura ou tratamento eficaz, que se caracteriza por inflamação, fibrose e formação de granulomas, onde as quimiocinas têm papel importante na sua fisiopatologia, atuando através de receptores transmembranares convencionais ou atípicos. Neste estudo investigamos o papel modulador do receptor atípico ACKR2 no modelo de silicose experimental murina. Utilizando camundongos silicóticos selvagens, verificamos que a instilação nasal de partículas de sílica levou a uma resposta fibrótica, com um comprometimento da função pulmonar (aumento de resistência e elastância) e hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina em relação ao controle, todavia todos esses parâmetros foram menores nos animais silicóticos nocauteados para o gene codificante do receptor ACKR2. A quantificação de partículas de sílica presentes no parênquima pulmonar revelou que os camundongos nocautes apresentaram número mais elevado em comparação com os silicóticos selvagens. Em homogenato de pulmão de animais com silicose verificamos que o receptor ACKR2 tem a expressão do seu RNAm diminuída a partir do terceiro dia do estabelecimento da doença quando comparado com animais controle. Uma diminuição dos níveis leucocitários foi evidenciada no sangue periférico e medula óssea na condição da silicose. Ensaio com macrófagos extraídos de animais nocautes e desafiados com sílica e LPS mostrou que essas células produzem níveis menores de citocinas quando comparados com aqueles das células extraídas de animais selvagens. Esses dados tomados em conjunto, sugerem que o ACKR2 atua de forma diferente dependendo do sítio/órgão em questão por mecanismos que precisarão ser esclarecidos futuramente para as doenças inflamatórias pulmonares crônicas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PAPER OF ATYPICAL RECEPTOR OF ACKR2 QUIMIOCINES IN CHRONIC PULMONARY INFLAMMATION INDUCED BY SILICONE IN MICE

ABSTRACT

PHD THESIS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY

Davidson Furtado Dias

Silicosis is an occupational disease with no cure or effective treatment, characterized by inflammation, fibrosis, and formation of granulomas, where chemokines play an important role in its pathophysiology, acting through conventional or atypical transmembrane receptors. In this study, we investigated the modulatory role of the atypical ACKR2 receptor in the murine experimental silicosis model. Using wild-type silicotic mice, we found that nasal instillation of silica particles led to a fibrotic response, with an impairment of lung function (increased resistance and elastance) and airway hyperreactivity to methacholine in relation to the control, but all these parameters were lower in silicotic animals knocked out to the gene encoding the ACKR2 receptor. The quantification of silica particles present in the lung parenchyma revealed that knockout mice had a higher number compared to wild-type silicosis. In lung homogenate of animals with silicosis we verified that the ACKR2 receptor has the expression of its mRNA diminished from the third day of establishment of the disease when compared to control animals. A decrease in the leukocyte levels profile was evidenced in the peripheral blood and bone marrow in the silicosis condition. Assay with macrophages extracted from knockout animals and challenged with silica and LPS showed that these cells produce lower levels of cytokines when compared to cells extracted from wild animals. Taken together, these data suggest that ACKR2 acts differently depending on the site / organ in question by mechanisms that will need to be clarified in the future for chronic pulmonary inflammatory diseases.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO	1
1 SISTEMA RESPIRATÓRIO	2
1.1 Pulmão	3
1.1.1 Função pulmonar	5
1.1.2 Hiper-reatividade pulmonar	7
2 PNEUMOCONIOSES	8
2.1 Sílica e silicose	8
2.2 Epidemiologia	9
2.3 Classificação clínica e diagnóstico	11
2.4 Prevenção e tratamento	12
2.5 Fisiopatologia	14
2.5.1 Quimiocinas e Receptores	16
2.5.2 Receptores Atípicos	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Animais	21
4.2 Indução da silicose	21
4.3 Peso corporal e ingesta de ração	22
4.4 Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas	22
4.5 Contagem total e diferencial de leucócitos	23
4.5.1 Sangue periférico	23
4.5.2 Medula óssea	23
4.6 Citometria de fluxo	24
4.6.1 Obtenção das células	24
4.6.2 Avaliação das células	24
4.7 Histologia	26

4.7.1	Morfometria.....	27
4.7.2	Contagem das partículas de sílica	27
4.8	ELISA	28
4.9	Obtenção e ativação de macrófagos	28
4.9.1	Macrófagos peritoneais.....	28
4.9.2	Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM).....	29
4.10	Adesão e rolamento de leucócitos em sistema de microscopia intravital	29
4.11	PCR em tempo real.....	30
4.12	Análise estatística	31
5	RESULTADOS	32
5.1	Análise da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos Swiss-Webster estimulados com sílica	32
5.2	Análise histológica do tecido pulmonar de camundongos Swiss-Webster estimulados com sílica	32
5.3	Análise de expressão dos receptores ACKR2 no pulmão de camundongos Swiss-Webster estimulados com sílica	36
5.4	Análise de expressão do receptor ACKR2 no pulmão de camundongos C57BL/6 (selvagens) estimulados com sílica.....	37
5.5	Avaliação da variação de peso corporal e ingestão de ração de camundongos nocautes para o receptor ACKR2 e estimulados com sílica.....	38
5.6	Avaliação da função pulmonar de camundongos selvagens e nocautes para o receptor ACKR2 estimulados com sílica	40
5.7	Análise morfológica dos pulmões dos camundongos selvagens e nocautes para o receptor ACKR2 estimulados com sílica	44
5.8	Análise da população leucocitária no sangue periférico e medula óssea de camundongos selvagens e nocautes para o receptor ACKR2 estimulados com sílica	49
5.9	Análise da população de macrófagos no pulmão de camundongos selvagens e nocautes para o receptor ACKR2 estimulados com sílica	52
5.10	Análise <i>in vitro</i> da ativação de macrófagos provenientes de camundongos selvagens e nocautes para o receptor ACKR2 ..	59

5.11	Análise do processo de adesão e rolamento <i>ex vivo</i> de leucócitos de camundongos selvagens e nocautes para os receptores ACKR2.....	63
5.12	Análise das partículas de sílica no pulmão de camundongos selvagens e nocautes para o receptor ACKR2 estimulados com sílica	64
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	79
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
9	ANEXOS	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de indução da silicose e indicação dos tempos de análise.	22
Figura 2 - Análise da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos Swiss-Webster instilados com sílica (10 mg/50 µL).	34
Figura 3 - Análise das alterações morfológicas no pulmão de camundongos Swiss-Webster instilados com sílica (10 mg/50 µL).	35
Figura 4 - Análise da expressão de RNAm para receptores ACKR2 nos pulmões de camundongos Swiss-Webster instilados com sílica (10 mg/50 µL).	36
Figura 5 - Análise da expressão de RNAm para receptores ACKR2 nos pulmões de camundongos C57BL/6 instilados com sílica (10 mg/50 µL).	37
Figura 6 - Análise do peso corporal e da ingesta de ração dos camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	39
Figura 7 - Análise da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	42
Figura 8 - Análise da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com salina e sílica (10 mg/50 µL).	43
Figura 9 - Análise das alterações morfológicas no pulmão de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	45
Figura 10 - Análise morfométrica de pulmões de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	46
Figura 11 - Análise das alterações morfológicas no pulmão de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	47
Figura 12 - Análise indireta de colágeno dos pulmões de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	48
Figura 13 - Análise dos leucócitos no sangue periférico de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	50
Figura 14 - Análise dos leucócitos na medula óssea de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	51
Figura 15 - Análises dos dados de citometria de fluxo dos pulmões de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com salina e sílica (10 mg/50 µL).	54

Figura 16 - Análise dos macrófagos pulmonares de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	55
Figura 17 - Análise do perfil de macrófagos pulmonares de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	56
Figura 18 - Análise dos macrófagos pulmonares M2 de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	57
Figura 19 - Análise dos macrófagos pulmonares M2 de digerido pulmonar de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com salina e sílica (10 mg).	58
Figura 20 - Análise da ativação dos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	60
Figura 21 - Análise da ativação dos macrófagos perfil M1 diferenciados de medula óssea de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	61
Figura 22 - Análise da ativação dos macrófagos perfil M2 diferenciados de medula óssea de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	62
Figura 23 - Análise da adesão e rolamento dos leucócitos sanguíneos de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	63
Figura 24 - Análise da presença de partículas de sílica nos pulmões de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	65
Figura 25 - Quantificação das partículas de sílica nos pulmões de camundongos C57BL/6 e ACKR2 ^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados	26
Tabela 2 – Descrição das estruturas em estudo.....	26

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu\text{L/poço}$	Microlitros por poço
ACKR	"Atypical chemokine receptor" (receptor atípico para quimiocina)
AP-1	"Activator protein 1" (fator de transcrição ativador da proteína 1)
ASC	"Inflammasome Adaptor Protein Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD" (proteína speck-like associada à apoptose com domínio de recrutamento de caspase)
ATP	Trifosfato de adenosina
CARD	"Caspase recruitment domain" (domínio de recrutamento de Caspase)
CCBP2	"Chemokine-binding protein 2" (proteína 2 de ligação à quimiocina)
CIAS1	"Cold induced autoinflammatory syndrome 1" (síndrome autoinflamatória induzida pelo frio 1)
cmH ₂ O/mL	Centrímetro de água por mililitro
cmH ₂ O _s /mL	Centímetro de água versus segundo por mililitro
DARK	"Duffy antigen receptor for chemokines" (receptor de antígeno Duffy para quimiocinas)
DNA	"Deoxyribonucleic acid" (ácido desoxirribonucleico)
DSS	Dextrano sulfato de sódio
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbent assay" (ensaio de imunoabsorção enzimática)
ERK-1	"Extracellular signal-regulated kinases 1" (quinase 1 regulada por sinal extracelular)
ERK-2	"Extracellular signal-regulated kinases 2" (quinase 2 regulada por sinal extracelular)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FITC	"Fluorescein isothiocyanate" (Isotiocianato de fluoresceína)
HE	Hematoxilina-Eosina
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico
HRP	"Horseradish peroxidase" (peroxidase neutravidina-horseradish)
IFN- γ	"Interferon gamma" (interferão-gama)
IL	Interleucina
in	Intranasal
ip	Intraperitoneal

KDa	Quilodalton
LPS	"Lypopolysaccharide" (lipopolissacarídeo)
MAPK	"Mitogen Activated Protein Kinases" (proteína quinase ativadora de mitogênese)
MARCO	"Macrophage receptor with collagenous structure" (receptor de macrófago com estrutura de colágeno)
MCP-1	"Monocyte Chemoattractant Protein-1" (proteína quimioatraente de monócitos-1)
M-CSF	"Macrophage colony-stimulating factor" (fator estimulante das colônias de macrófagos)
MDC	"Macrophage-derived chemokine" (quimiocinas derivadas de macrófagos)
MIP-1 α	"Macrophage inflammatory protein 1 alfa" (proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa)
MMPs	"Matrix metalloproteinases" (metaloproteinases de matriz)
NALP3	"NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3" (domínios NACHT, LRR e PYD contendo proteína 3)
NF-kB	"Nuclear factor kappa B" (fator nuclear kappa B)
NLR	"NOD-like receptors" (receptores do tipo NOD)
NLRP3	"NLR family pyrin domain containing 3" (domínio de pirina 3 contendo família NLR)
PBS	"Phosphate buffered saline" (salina tamponada com fosfato)
PE	"Phycoerythrin" (ficoeritrina)
PE-Cy7	"Phycoerythrin cyanine 7" (ficoeritrina cianina 7)
PITPNM3	"Phosphatidylinositol Transfer Protein, Membrane-Associated 3" (Proteína de transferência de fosfatidilinositol, associada a membrana 3)
próIL	Pró-interleucina
RANTES	"Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted" (regulada sob ativação, expressas e segregadas por células T normais)
RNA	"Ribonucleic acid" (ácido ribonucleico)
SFB	Soro fetal bovino
TGF β	"Transforming growth factor beta" (fator de transformação de crescimento beta)

TIMPs	"Tissue inhibitors of metalloproteinases" (inibidores de tecidos de metalloproteinases)
TNF α	"Tumor necrosis fator alfa" (fator de necrose tumoral alfa)

Introdução

Existem diversos fatores que influenciam a instalação de doenças, e isso também é relevante para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos. A porta de entrada, a sazonalidade, a forma de manifestação, a fonte e o tipo do agente patogênico são alguns desses fatores. Além disso, as enfermidades, em geral, acabam envolvendo algum tipo de inflamação, que ocorre, na maioria das vezes, em paralelo ao remodelamento tecidual de resolução do processo patológico instalado. Atualmente, as doenças respiratórias constituem um problema de saúde pública, ocupando posição de destaque dentre as principais causas de internação no Sistema Único de Saúde (SUS), no Brasil (1). Dentre todas as doenças ocupacionais que causam o afastamento de trabalhadores de suas funções, 60% são atribuídas ao sistema respiratório, sendo a morbidade profissional duas vezes maior em homens do que em mulheres (2). As doenças respiratórias ocupacionais atingem maior proporção na idade acima de 44 anos, e a silicose pode estar envolvida em 85% delas (3). A maioria das doenças pulmonares promovem uma disfunção na fisiologia e mecânica respiratórias, justamente pelas alterações estruturais dos pulmões, o que prejudica a função pulmonar dos pacientes de inúmeras formas. Desta forma, se torna imperativo e relevante o aprofundamento do entendimento da fisiologia geral do sistema respiratório antes de abordarmos as alterações patológicas associadas à silicose, foco de estudo desta tese.

1 SISTEMA RESPIRATÓRIO

O sistema respiratório do ser humano consiste em um complexo conjunto de órgãos responsáveis pela hematose, troca gasosa entre o sangue e o ambiente (4). Com esse processo fica garantida a oxigenação do organismo, além de contribuir para o equilíbrio ácido-base (4). Outro ponto a ser ressaltado é o envolvimento do sistema respiratório na defesa do organismo (4). Através dos reflexos como o espirro e a tosse, ocorrem a expulsão de partículas ou corpos estranhos que atingem a mucosa nasal ou vias respiratórias inferiores. As células pulmonares epiteliais ciliadas e as produtoras de muco também possuem função de defesa, assim como os macrófagos pulmonares residentes, sendo que esse último contribui com a vigilância imunológica dos tecidos pulmonares, a resposta do sistema imune à infecção e a resolução da inflamação (5). Além disso, a microbiota do trato respiratório funciona como uma barreira protetora contra patógenos, corroborando com o desenvolvimento do sistema imunológico e a manutenção da homeostase da fisiologia respiratória (6). Além de todas essas atribuições supracitadas, o sistema respiratório também participa da fonação ao proporcionar a vibração das pregas vocais da laringe, possibilita a fala (4).

O sistema respiratório pode ser dividido em duas zonas, de acordo com suas funções: condutora e respiratória. A zona condutora é responsável pelo deslocamento do ar entre o meio externo e interno realizando, assim o seu aquecimento, filtração, limpeza e umedecimento. Essa zona é composta pelas fossas nasais, seios paranasais, faringe (naso e oro), laringe, traqueia, brônquios (extra e intrapulmonares) e bronquíolos (terminais). A zona respiratória, além de conduzir o ar respirado possui a capacidade de realizar a hematose e é formada pelas seguintes estruturas: bronquíolos (respiratórios), dutos alveolares, sacos alveolares e alvéolos. Por toda a extensão do sistema respiratório ocorre uma progressiva diminuição do diâmetro das suas estruturas condutoras, além de haver uma simplificação de camadas e epitélio, passando do tecido epitelial pseudoestratificado colunar ciliado com células caliciformes nas vias mais proximais para o simples pavimentoso nas distais. Toda essa adequação anatômica facilita o fluxo de ar até às porções distais permitindo as trocas gasosas nos alvéolos (7).

A captação e expulsão do ar só é possível através dos movimentos de inspiração e expiração proporcionados pela ação conjunta da cavidade torácica, músculos e pulmões. Em uma respiração normal, a inspiração é comandada pelos músculos diafragma e intercostais externos. Por outro lado, a expiração está

associada aos músculos abdominais e intercostais internos. Somente em caso de uma inspiração forçada ou sofrimento respiratório, o indivíduo utiliza também os músculos auxiliares da respiração, principalmente o esternocleidomastóideo, os escalenos (anterior, médio e posterior), o peitoral menor e o serrátil anterior. Em suma, os músculos inspiratórios aumentam o volume da caixa torácica, fazendo com que a pressão no seu interior fique inferior à atmosférica promovendo o fluxo de ar para o interior dos pulmões. No sentido oposto, os músculos expiratórios contribuem para a diminuição do volume da caixa torácica, o aumento da sua pressão interna em relação a da atmosfera, promovendo o movimento do ar para fora dos pulmões. Essa dinâmica garante a troca de ar que permite o processo de respiração que é dependente das propriedades intrínsecas do pulmão (4).

1.1 Pulmão

O pulmão é um órgão indispensável para a sobrevivência de várias espécies de animais, sendo ele geralmente encontrado em vertebrados sob diversas formas e tamanhos, dependendo do grau de complexidade do organismo (8). No homem, ele compõe o sistema respiratório, sendo o responsável pelo íntimo contato entre o ar inalado (rico em O_2 e pobre em CO_2) e os capilares pulmonares (pobres em O_2 e ricos em CO_2), permitindo assim a livre passagem dos gases por difusão, o que resulta na oxigenação sanguínea e eliminação do CO_2 do corpo (4). Além dessa função esse órgão participa ativamente da produção de plaquetas sanguíneas, possuindo um considerável potencial hematopoiético (9).

Anatomicamente, o ser humano possui dois pulmões localizados sobre o músculo diafragma, dentro da cavidade torácica. Em média, cada pulmão pesa 700 g, tendo 25 cm de altura e 16 cm de profundidade. Como a grande parte do coração fica acomodada na região esquerda da cavidade torácica, o pulmão esquerdo possui a largura menor. Os pulmões direito e esquerdo possuem morfologias distintas sendo que o primeiro é composto por três lobos separados por duas fissuras: horizontal (separa lobo superior do médio) e oblíqua (separa lobo médio do inferior) enquanto o segundo possui apenas o lobo superior separado do inferior por uma fissura oblíqua, do lobo médio, chamado de língula, considerada um vestígio do desenvolvimento embrionário (10).

A pleura é uma membrana serosa formada por duas camadas: parietal e visceral. A parietal forma uma camada interna, que reveste os pulmões, sendo

intimamente aderida à superfície pulmonar, fissuras e lobos. A visceral está intimamente ligada à parede da cavidade torácica e ao diafragma, formando o revestimento externo dos pulmões, sendo composta do epitélio pavimentoso simples (mesotélio) associado a um tecido conjuntivo frouxo rico em fibras elásticas. Entre as camadas parietal e visceral há um espaço preenchido pelo líquido intrapleural que contribui para a diminuição do atrito entre elas durante os movimentos de inspiração e expiração. Determinadas regiões na pleura parietal recebem uma nomenclatura especial, de acordo com a suas localizações. Sendo elas: costal (porção interior das costelas), diafragmática (diafragma), cervical (adjacente ao pescoço) e a mediastinal (mediastino) (7).

Os pulmões são compostos por sub-ramificações dos brônquios. A partir de uma bifurcação na traqueia, são formados os brônquios principais: direito e esquerdo; que originam, respectivamente um pulmão de cada lado. Conforme ocorre o maior afastamento dos brônquios para a região distal, há uma progressiva diminuição do seu diâmetro. Cada brônquio principal dá origem aos brônquios de segunda ordem (ou lobares), que permitem a formação dos lobos pulmonares. Em sequência, ocorre mais uma divisão bronquiolar, originando os de terceira ordem (ou segmentares) e conseqüentemente os segmentos pulmonares. Dentro de cada segmento broncopulmonar, os brônquios segmentares após várias divisões formam os bronquíolos, que possuem de 0,5 a 1 mm de diâmetro. O estreitamento dos bronquíolos forma o bronquíolo terminal, a região mais distal da porção condutora. Por fim, ocorrem outras ramificações, originando os bronquíolos respiratórios, que iniciam a porção respiratória, ou seja, capaz de realizar a hematose. Os bronquíolos continuam a se segmentar e dão origem a minúsculos túbulos denominados ductos alveolares. Estes ductos terminam em estruturas microscópicas com forma de cachos de uva, chamados de sacos alveolares, que possuem como porção final os alvéolos, formados por uma simples camada de epitélio pavimentoso. Os alvéolos possuem duas células estruturais: os pneumócitos tipo I (formam a arquitetura da parede alveolar) e os pneumócitos tipo II (produzem a substância tensoativa pulmonar). Além destas células, os macrófagos alveolares residentes desempenham um papel importante na resposta imune, pois são responsáveis pela fagocitose e apresentação de diferentes antígenos estranhos ao indivíduo às células T auxiliares, desencadeando uma resposta imune. É importante salientar que macrófagos pulmonares podem ser classificados em diferentes subpopulações: alveolares, intersticiais, endoteliais e os de vias aéreas (11).

O modelo murino tem sido utilizado como excelente forma de compreender a fisiologia humana e fisiopatologia de doenças que nos acomete, pois compartilha mais de 91% do genoma presente no ser humano. Além disso, possui a vantagem ter um pequeno porte, um curto período de gestação (19 a 21 dias), são dóceis e têm baixo custo de manutenção (12). Apesar das vantagens há diferenças entre essas duas espécies. A árvore respiratória do camundongo possui menor número de ramificações (menos 4 a 6), o pulmão direito possui quatro lobos (inferior, médio, superior e pós-cava) e o esquerdo apenas um lobo (13). Além disso, há uma maior área pulmonar ocupada por parênquima nos camundongos (18%) quando comparada com a dos seres humanos (12%). Outra diferença relevante, é a presença de alvéolos com menor diâmetro nos camundongos, fazendo com que possuam uma maior frequência respiratória para satisfazer a necessidade de maiores níveis de oxigenação nestes animais devido ao seu metabolismo (12). Além disso, a capacidade pulmonar vital nos camundongos é de no máximo 1 mL e nos humanos 6.000 mL (12). Comparativamente, os camundongos possuem um maior diâmetro das vias aéreas que os humanos, isso justifica uma menor resistência do fluxo de ar nesses animais, o que eleva as suas frequências respiratórias (entre 90 e 200 incursões por min) (12). Essa anatomia díspar e diferenças na dinâmica da função pulmonar, todavia não invalida o uso do murino como modelo no estudo de doenças (14).

1.1.1 Função pulmonar

Como é composto por uma estrutura bastante elástica, existe naturalmente uma força de retração que atua no pulmão tendendo sempre a colapsá-lo, expelindo todo o ar pelas vias aéreas, quando nenhuma força é aplicada para mantê-lo inflado. Geralmente, há uma interação entre as forças exercidas pelo pulmão e a cavidade torácica, que são denominadas pressões: pleural, alveolar e transpulmonar. O líquido intrapleural é constantemente drenado para o sistema linfático, criando uma pressão ligeiramente negativa no espaço entre os pulmões e a cavidade torácica, a pressão pleural. Em uma respiração normal, a pressão pleural no começo da respiração é - 5 cmH₂O, responsável pela manutenção dos pulmões abertos no estágio de repouso. Porém, durante a expansão da caixa torácica, na inspiração, há um aumento da pressão negativa, alcançando - 7,5 cmH₂O. Já a pressão alveolar é aquela presente dentro dos alvéolos pulmonares. Em determinado momento da respiração normal as pressões atmosférica e interna tornam-se iguais. Em seguida, a entrada de ar ocorre através de uma ligeira queda na pressão alveolar para - 1 cmH₂O, que

permite a entrada de 0,5 L de ar nos pulmões e a conseqüente respiração. Este processo dura aproximadamente 2 segundos. Em contrapartida, na expiração, ocorre uma inversão dos valores de referência, onde a pressão alveolar aumenta para 1 cmH₂O e força a saída de 0,5 L de ar dos alvéolos e pulmões rapidamente (2 a 3 segundos). Outra pressão importante a ser considerada é a transpulmonar, constituída pela diferença entre as pressões alveolar e pleural, que impede o colapso dos alvéolos (15).

Na maioria das doenças respiratórias ocorrem alterações nas pressões interna e externa dos pulmões. Este desequilíbrio geralmente resulta em uma dificuldade respiratória no paciente. Nesse contexto, os testes de função pulmonar são importantes tanto no diagnóstico quanto no acompanhamento da evolução do acometimento do órgão, principalmente se considerarmos o avanço da precisão dos equipamentos (15).

Dentro desse contexto, o teste de broncoprovocação consiste em mensurar a responsividade das vias aéreas por meio de algum estímulo broncoconstritor, geralmente por inalação, dentro de um ambiente controlado. Nesse exame existem duas formas de acessar as vias aéreas: não invasiva e invasiva. Na rotina clínica, geralmente é utilizado o teste não invasivo em pacientes. No entanto, em modelos experimentais com animais, a escolha da forma de aferição dependerá do propósito da pesquisa e da doença analisada. De forma geral, o método invasivo possui uma grande vantagem por ter maior sensibilidade (16). O fundamento do teste de broncoprovocação vem do fato de que o sistema respiratório reage a determinados estímulos, tais como: alérgenos, exercícios, mudanças na temperatura do ambiente, substâncias colinérgicas, entre outros; com o aumento do tônus da musculatura adjacente, ocasionando a broncoconstrição. Sendo assim, durante o teste, o sistema respiratório é aerossolizado com um determinado agente broncoconstritor, geralmente agentes colinérgicos (carbacol e metacolina) ou aminas vasoativas (histamina e serotonina). Através de transdutores, pequenas variações de pressões inerentes da respiração são detectadas e registradas através de um pneumotacógrafo, gerando informações analógicas que são interpretadas e convertidas em dados digitais. Normalmente, nos testes de broncoprovocação são observados os parâmetros de resistência das vias aéreas e elastância pulmonar. A resistência está atrelada ao grau de dificuldade encontrado para a passagem do ar pelas vias aéreas, normalmente sendo expressa em cmH₂O/mL. No entanto, através da elastância (inverso da complacência) é possível avaliar a capacidade dos pulmões de voltarem a

conformação original após o término de uma determinada força de deformação, sendo descrita em cmH₂O/mL (17). Sendo assim, o teste de broncoprovocação tem sido bastante utilizado na avaliação da função, pois é capaz de identificar a alteração dos parâmetros pulmonares fisiológicos em resposta à estímulos que podem estar alterados no estado patológico. Um dos parâmetros mais estudados é a hiper-reatividade pulmonar (18).

1.1.2 Hiper-reatividade pulmonar

Algumas doenças respiratórias desencadeiam o fenômeno da hiper-reatividade pulmonar (19, 20). Este termo foi utilizado pela primeira vez por Woolcock and Peat (21) e, se refere à uma condição na qual o aparelho respiratório responde de forma exacerbada, ou seja, ocorre uma intensa broncoconstrição em resposta a um determinado estímulo exógeno. Geralmente, a hiper-reatividade é uma consequência direta da reação inflamatória crônica das vias aéreas. (18). Estímulos, tais como: agentes físicos e químicos, alérgenos, estresse emocional, exercícios físicos, fármacos, mudanças climáticas e viroses respiratórias; ativam os fatores de transcrição e desencadeiam uma alteração das vias de sinalização celular, modulando uma série de genes e induzindo a liberação de mais mediadores químicos da resposta inflamatória, tais como o ácido araquidônico, eicosanóides e radicais livres, levando à modificação do estado fisiológico da célula. Ainda, a inflamação recorrente e as subsequentes anomalias nos processos de reparo levam a alterações estruturais nas vias aéreas devido à injúria epitelial, aumento da produção de muco, hiperplasia de células musculares lisas e fibrose subepitelial. Em conjunto, esses fatores irão contribuir para a obstrução das vias aéreas, através do broncoespasmo (contração da musculatura lisa peribrônquica), do edema e da formação de tampões de muco. Tudo isso ocorre porque o aparelho respiratório está sujeito ao meio externo e consequentemente a diferentes tipos de contaminantes em suspensão no ar atmosférico, tais como bactérias, fungos, vírus, partículas orgânicas e inorgânicas. Essa exposição propicia o surgimento de diversas doenças do trato respiratório e pulmões, que desencadeiam a hiper-reatividade pulmonar, como ocorre nas pneumoconioses (22).

2 PNEUMOCONIOSES

As pneumoconioses são doenças intersticiais pulmonares que geralmente ocorrem devido à inalação de partículas orgânicas e inorgânicas, porém também podem ser desencadeadas por meio de vapores químicos e fumo (23, 24). Apesar dos diferentes causadores, elas possuem uma mesma característica, ou seja, o comprometimento do aparelho respiratório devido aos inúmeros danos teciduais. A princípio, o material inalado alcança os pulmões e promove uma irritação local, gerando inflamação. Sendo assim, dependendo da origem do material, da quantidade, da reatividade físico-química da partícula, da solubilidade e do tamanho; pode ocorrer uma conversão dessas áreas inflamadas em tecido remodelado. O remodelamento é caracterizado por deposição anormal e excessiva de proteínas da matriz extracelular, principalmente colágeno. O controle dinâmico da deposição e degradação do colágeno é regulado pelas metaloproteinases e seus reguladores teciduais (25).

Dentre as pneumoconioses, as doenças mais comuns e os seus respectivos agentes causadores são: a antracose (poeira de carvão mineral), asbestose (poeira de asbesto), beriliose (poeira de berílio), bissinose (poeira de algodão), siderose (poeira de ferro) e a silicose (poeira de sílica). Estima-se que a silicose seja a doença mais antiga e grave dentro das pneumoconioses. Soma-se a isso, o fato que ainda nos dias atuais ela tem sido apontada como a doença mais relevante desse grupo, devido a sua elevada prevalência no mundo (24).

2.1 Sílica e silicose

Para compreender o porquê da grande importância da silicose, é necessário primeiro entender a química das partículas que a desencadeia. A sílica, também denominada como dióxido de silício (SiO_2), é um mineral formado por duas moléculas de oxigênio e uma de silício, resultando na molaridade de total de 60,1 g/mol. A etimologia da palavra sílica nos remete ao termo latino *sílex*, que significa rocha dura, de grão muito fino e cor variável. Sendo assim, as suas propriedades e suas características físico-químicas irão depender da sua formação geológica e da estrutura dos materiais que ela compõe. Na natureza, o SiO_2 é um composto químico bastante comum de ser encontrado, justamente por ser formado por dois dos elementos mais abundantes na crosta terrestre, cuja composição compreende 46,6%

de oxigênio e 27,7% de silício (26). Existem diversos minerais que possuem sílica em sua composição, tais como: cristobalita, opala, quartzo e tridimita; compondo uma importante classe denominada de silicatos. Quando em sua forma pura, a sílica é um sólido branco com uma densidade aproximada de 2,2 g/cm³, em temperatura ambiente, além de possuir alta resistência ao calor, apresenta elevados pontos de fusão e ebulição, cujas temperaturas são respectivamente 1713 °C e 2200 °C. Outra particularidade, é que a sílica possui alta afinidade por moléculas de água, sendo então considerada bastante hidrofílica. Ademais, a sílica pode ser encontrada em duas formas na natureza - amorfa e cristalina, que ao serem inaladas podem desencadear a bronquite, o câncer ou a silicose pulmonar (27, 28).

A silicose é uma disfunção causada pela inalação persistente de partículas de sílica, que devido ao seu tamanho (<10 µm de tamanho) distribuem-se da região nasal até os alvéolos. É classificada como uma doença ocupacional, justamente pelo fato da alta incidência em trabalhadores envolvidos principalmente em atividades de escavação de túneis, esmerilhamento, jateamento de areia, moagem de pedras, perfuração de rochas, polimento em cerâmica, entre outras; que os expõem às tais partículas recém-fraturadas em seus respectivos ambientes laborais. Apesar de ambas os tipos de sílica (amorfa e cristalina) causarem a silicose, a forma cristalina é a habitualmente responsável pelo efeito de dano tecidual e desenvolvimento dessa doença. O fraturamento da sílica possibilita a quebra das ligações Si-O e a formação de radicais de oxigênio na superfície da partícula, como o ânion superóxido (O₂⁻) e radicais hidroxilas (-OH), que são moléculas altamente oxidantes e reativas na presença do cátion ferro bivalente (Fe²⁺) e traços de outros metais (27, 29). Além disso, a sílica cristalina possui forma molecular de tetraedro, facilitando a interação entre seus radicais e as moléculas de nitrogênio e oxigênio presentes na superfície da membrana plasmática da célula. Sendo assim, a partícula promove a ruptura da integridade membranar, colaborando para o processo de injúria tecidual. Dessa maneira, o dano contínuo promovido pela inalação de partículas de sílica cristalina, acumulado ao longo de um determinado período, acarreta no desenvolvimento da silicose (30).

2.2 Epidemiologia

A silicose atinge o homem desde a Antiguidade, sendo considerada uma das doenças ocupacionais mais antigas, principalmente entre os indivíduos envolvidos em

atividades de mineração, construção e produção de peças decorativas (27). Há relatos da exposição à sílica desde o Egito, quando foram encontradas tais partículas dentro dos pulmões de múmias do período de 170 a.C. (31). A primeira descrição da silicose ocorreu na Grécia antiga, quando Hipócrates observou uma condição de falta de ar, mais comum entre os mineradores (32). Assim como ele, Agricola, em 1557, observou que cortadores de pedra desenvolviam uma determinada doença respiratória grave (33). Entretanto, somente em 1690 que Lohneiss fez uma associação inicial entre a poeira e a dificuldade respiratória no homem (34). O termo silicose, foi utilizado pela primeira vez por Achille Visconti em 1870, que a descreveu como uma patologia resultante da deposição de pó de sílica nos pulmões (35). O risco de exposição à sílica aumentou com o advento da industrialização entre os séculos XVIII e XIX. Soma-se a isso, o maior acréscimo no número dos casos de silicose na Europa durante a primeira guerra mundial (1914-1918), devido à intensificação dos trabalhos em estaleiros. No ano de 1917, o governo dos Estados Unidos da América, através do serviço de saúde pública, identificou que trabalhadores de fundições e jateadores de areia apresentavam alto risco de desenvolver a silicose. Todos esses eventos acabaram culminando no aumento da relevância e importância da silicose, principalmente ao longo do século 20 (36).

Apesar de poder ser prevenida, a silicose apresenta altos índices de incidência e prevalência a nível mundial. Nos Estados Unidos, por exemplo, embora haja grande desenvolvimento econômico, existem cerca de 1,7 milhões de trabalhadores potencialmente expostos à sílica (37). Do mesmo modo, estimam-se que existam mais de 2 milhões de trabalhadores europeus sujeitos à tais partículas cristalinas (38). Na Índia e a China, países em desenvolvimento, estima-se que exista cerca de 3 milhões de indivíduos que foram expostos à poeira de sílica, número esse que pode estar subestimado, devido a carência de estudos epidemiológicos e a subnotificação (39). No Brasil não há um estudo epidemiológico conclusivo a respeito da incidência e prevalência da silicose, mas avalia-se que cerca de 6 milhões de trabalhadores brasileiros foram expostos à sílica (40). Dentre as funções laborais, a construção civil é apontada como uma das atividades que oferecem maiores riscos, onde 62% dos indivíduos já tiveram contato com tais partículas. Na extração mineral estima-se que esse percentual é de 61%, na indústria de minerais não metálicos, como cerâmica, vidro e cimento, 55% e na metalúrgica 23% (41). Em 1978, estimou-se que o número de casos de silicose no Brasil seria aproximadamente 30.000, através de uma busca ativa de casos de silicose em pacientes com tuberculose (42). Além disso, foram

descritos inúmeros casos graves de silicose em escavação de poços e jateamento de areia na indústria naval brasileira, afetando aproximadamente 30% desses trabalhadores (43).

A partir do século 20, diversos estudos foram realizados para entendimento da fisiopatologia da silicose, o que permitiu o surgimento de novas informações que levaram à melhora do diagnóstico e o consequente aumento do número de casos. Em 1931, nos Estados Unidos, houve um desastre na ponte de Gauley com 475 mortes imediatas relacionadas à inalação da sílica, direcionando a atenção pública para esta questão. Em paralelo ao advento da Revolução Industrial, houve uma maior preocupação com a saúde dos trabalhadores, resultando na criação de leis regulamentadoras específicas sobre esse tema, tanto na Europa quanto nos Estados Unidos, e posteriormente no restante do mundo (27, 34).

2.3 Classificação clínica e diagnóstico

A silicose possui como característica a ocorrência de inflamação e cicatrização apresentada por lesões nodulares, cuja aparência em exames de imagem lembra uma calcificação com aspecto de casca de ovo. Em geral, o desenvolvimento, a evolução e a severidade da doença dependem de alguns fatores, tais como: a quantidade de partículas inaladas e o tempo de exposição (28, 37). Com base nestes parâmetros, a silicose pode ser classificada em três formas clínicas distintas: acelerada, aguda, e crônica (44). A silicose acelerada ocorre de 5 a 10 anos após uma alta exposição às partículas de sílica cristalina. Nessa forma, existe a lesão dos pneumócitos tipo I, com a presença de lipoproteinose exsudativa na luz dos alvéolos, além de hiperplasia dos pneumócitos tipo II associada a um aumento na produção e liberação dos fosfolípídeos componentes do surfactante pulmonar, como o dipalmitol lecitina (27). Na forma acelerada, ocorre também uma deposição da poeira de sílica dentro dos alvéolos, o que leva ao processo de fagocitose pelos macrófagos alveolares e, conseqüentemente, o disparo de uma resposta de remodelamento que induz a proliferação de fibroblastos e a deposição de fibras colágenas circunscritas às áreas de deposição de sílica. Essas formações podem levar a uma fibrose caracterizada por lesões nodulares, os granulomas (30). Esse tipo é mais propenso a evoluir para formas mais graves e complicadas da doença. Já na forma aguda, ou silicoproteinose, a doença se estabelece após a inalação de elevadas quantidades de sílica recém-fraturada em um curto espaço de tempo (entre alguns meses até 5 anos) e é

caracterizada por uma rápida progressão e gravidade, resultando na maioria das vezes em óbito (25). Apesar de compartilhar semelhança com a silicose acelerada, a aguda é considerada como a forma mais severa de silicose. A forma crônica é a manifestação mais comum clinicamente e se desenvolve no período de 15 a 20 anos após baixa ou moderada exposição à sílica e na grande maioria dos casos se mantém assintomática ao longo dos primeiros anos. Na forma crônica, os primeiros sintomas aparecem quando já existe um processo avançado de fibrose com a presença de granulomas de corpo estranho clássicos. Nesses granulomas é observada a deposição concêntrica de colágeno e uma região central hialinizada, formada por necrose caseosa. Todas as formas descritas manifestam-se através de perda na força da musculatura estriada, dispneia, hipoxemia e perda de peso, podendo o paciente apresentar quadros de tosse intensa, sudorese noturna e febre (27).

Em geral, o diagnóstico da silicose se dá através de um processo de anamnese onde é avaliada a associação com a vida pregressa do indivíduo, sendo considerado o histórico de exposição à sílica, bem como a observação de alterações de exames radiológicos que remetem a modificações morfológicas dos pulmões. Os principais aspectos observados através dos exames (radiografia simples de tórax e tomografia computadorizada) são o infiltrado alveolar bilateral difuso e os nódulos granulomatosos com distribuição randômica, que podem formar massas conglomeradas de granulomas coalescidos, dependendo da gravidade da silicose. Além do mencionado acima, alguns pacientes podem apresentar regiões pulmonares enfisematosas. Em geral essas alterações morfológicas predominam nos terços superiores e na região posterior dos pulmões (27). Adicionalmente, podem ser utilizados também os teste de função pulmonar (espirometria) para auxiliar no diagnóstico, principalmente nas formas mais graves e avançadas da doença (27). Entretanto, mesmo com todo o avanço técnico-científico da medicina, não existe cura ou tratamento eficaz para a silicose, restando a investigação desta problemática como a melhor forma de aquisição de conhecimento que permita o tratamento eficaz.

2.4 Prevenção e tratamento

Nos dias atuais, a melhor maneira para prevenir a silicose ainda é evitar a exposição dos trabalhadores às partículas de sílica. Uma das formas é através do controle da fonte expositora, ou seja, devem ser priorizados métodos de produção que gerem menor quantidade de poeira ou a substituição da sílica por material menos

tóxico ou inerte ao organismo. Os métodos alternativos, tais como a utilização de processos úmidos é preferencial àqueles secos quando a sílica é utilizada. Outra opção seria o isolamento, ou seja, a colocação de barreiras físicas entre a poeira de sílica e o trabalhador como por exemplo o uso de cabines isoladora. A implementação de sistemas de exaustão adjacentes à fonte de geração ou de liberação de sílica também é recomendada, principalmente em locais onde não exista um fluxo de ar suficiente para a renovação do ar ambiente. Adicionalmente, é importante haver uma ampla divulgação e treinamento direcionados aos trabalhadores no que concerne às boas práticas laborais (manipulação de materiais em pó, velocidade de execução de uma determinada tarefa). Sendo assim, após serem esgotadas todas as possibilidades para redução da exposição às partículas de sílica no ambiente de trabalho, devem ser utilizados os equipamentos de proteção individuais (EPIs), como capacetes, máscaras respiratórias e óculos; evitando-se roupas que acumulem poeira, por meio dos bolsos e detalhes nos tecidos (27, 34).

Até o momento, como não existe tratamento específico para a silicose, as terapias de suporte são utilizadas para melhorar a qualidade de vida do indivíduo. Sendo assim, os dois fatores mais importantes para aumentar a chance de um bom prognóstico é o diagnóstico da doença em sua fase inicial e a interrupção da exposição do indivíduo à sílica. Mesmo com a interrupção do contato com a sílica, as partículas presentes no pulmão exercem um efeito residual que mantém presentes os componentes inflamatório e fibrótico pulmonares. Tem sido utilizada a administração de corticoides e imunossupressores, porém seus efeitos são limitados e nem todos os pacientes reagem bem ao tratamento. Em alguns casos, em indivíduos com silicoproteinose há a indicação para o procedimento de lavado broncoalveolar, porém os resultados nem sempre são satisfatórios, já que uma grande parte da sílica é intersticializada nos pulmões. Em casos extremos da doença, devido ao acometimento extenso da função do órgão o transplante pulmonar pode ser indicado, apesar de ser um procedimento bastante invasivo. Mesmo com o transplante a sobrevivência dos pacientes pode estar prejudicada, devido ao efeito residual, ou seja, a inflamação promovida pela presença das partículas anteriormente drenadas para linfonodos e baço. A rejeição do transplante também é um fator a ser considerado. Atualmente, existem estudos buscando novas alternativas de medicamentos (45) ou até mesmo tratamento com terapia celular (46), todos ainda em fase de testes. Entretanto, alguns trabalhos utilizando modelos animais têm sugerido abordagens terapêuticas e de prevenção da doença, como o uso de antioxidantes, inibição da

produção de $\text{TNF}\alpha$ e IL-1, além da inibição de fosfolipases (47). Tendo em vista a ausência de tratamento efetivo e a necessidade de garantir uma melhor qualidade de vida aos indivíduos afetados pela silicose, mais estudos são necessários para entender a fisiopatologia dessa doença, visando a identificação de alvos terapêuticos relevantes.

2.5 Fisiopatologia

As partículas de sílica inaladas, ao atingirem as porções terminais do sistema respiratório, interagem com os receptores do tipo “scavenger”, que estão presentes nos macrófagos alveolares, principalmente os receptores de macrófagos com estrutura de colágeno (MARCO). Dessa maneira, os macrófagos são ativados e os fragmentos de sílica são fagocitados (48). No entanto, tais partículas promovem uma desestabilização das membranas celulares, levando a ruptura lisossômica, que resulta na liberação de catepsina B, acompanhada pelo efluxo de potássio e pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (37, 49). Por sua vez, as ERO produzidas dentro dos macrófagos estimulam as vias de sinalização para a ativação do fator de transcrição NF- κ B, com a consequente indução da síntese de mediadores próinflamatórios, como o $\text{TNF}\alpha$ (50). Além disso, as ERO promovem um aumento da inflamação através da fosforilação da proteína quinase ativadora de mitogênese (MAPK), das proteínas quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK-1 e ERK-2) e do fator de transcrição ativador da proteína 1 (AP-1) (50). Em conjunto, todo esse processo instaurado pela sílica pode resultar na apoptose dos macrófagos presentes no local da lesão, além de ativar a via de sinalização do NF- κ B em outros tipos celulares, como as células epiteliais e os fibroblastos, contribuindo ainda mais para um quadro de lesão, inflamação e fibrose (29, 51). De modo geral, todos esses fenômenos supracitados levam à consequente formação de um complexo proteico oligomérico, denominado inflamassoma NALP3 (52, 53).

Sendo assim, a principal resposta inflamatória decorrente da exposição da partícula de sílica cristalina é mediada pelo inflamassoma NALP3 (54). Esse inflamassoma é composto por uma molécula pertencente à família NLR, também conhecida como criopirina, CIAS1, NLRP3 ou simplesmente NALP3. Após a sua ativação, por diversos tipos de moléculas estimulatórias, tais como: ATP, cristais de urato monossódico, partículas inorgânicas e toxinas bacterianas formadoras de poros (53), o NALP3 recruta a molécula adaptadora ASC, através das suas interações no

domínio pirina-pirina. Assim, essa estrutura gerada sofre um processo de oligomerização com a caspase-1, por meio das interações CARD-CARD, formando o NALP3 inflamassoma. Dessa forma, o NALP3 inflamassoma é capaz de promover a ativação da caspase-1 que desencadeará diversos efeitos biológicos possivelmente prejudiciais, tais como: a clivagem de próIL-1 β e próIL-18 em IL-1 β e IL-18, respectivamente, a clivagem e a inativação da IL-33, a fragmentação do DNA, a formação de poros de membranas celulares, a inibição de enzimas glicolíticas, a biossíntese de lipídeos e a secreção de pro-IL1 α (55).

De certa maneira, o desenvolvimento da inflamação e a consequente fibrose, ao longo das fases aguda e crônica da silicose, ocorre através com a intermediação de moléculas modulatórias, como as citocinas secretadas por diferentes tipos celulares presentes no pulmão. No entanto, a inflamação e a fibrose não parecem depender de linfócitos T, B, NKT ou de células NK para ocorrerem (56). Há estudos que mostraram a redução da gravidade da fibrose quando do tratamento com anticorpos anti-CD4 (57), o que sugere uma possível participação dos linfócitos T regulatórios no componente fibrogênico da silicose (58). Em outro estudo, camundongos deficientes em IL-1 α mostraram uma importante redução na produção de IL-1 β e na presença de neutrófilos no sítio da inflamação, indicando que a IL-1 α liberada pelos macrófagos alveolares pode contribuir para este processo (59). Evidências indicam que citocinas como o IFN- γ pode também participar na silicose, de forma independente de IL-4, IL-12 e IL-13 (60, 61). Nesse contexto, apesar de auxiliar a limitar a inflamação, a IL-10 apresenta um importante papel pró-fibrótico na silicose, justamente por favorecer a resposta Th2 através do estímulo da produção de IL-4 e IL-13, citocinas prófibróticas (62). Apesar dos mecanismos que levam ao acúmulo de colágeno e à produção de outros componentes da matriz extracelular na silicose ainda não serem totalmente conhecidos, existem evidências que há uma menor deposição de colágeno na ausência das moléculas de NALP3 e ASC (53). Outro ponto que ainda é objeto de estudo é a participação da imunidade inata na fibrose. Parece haver um consenso de que a inflamação e a fibrose induzida pela sílica estão dissociadas, como apontam dados na literatura nos quais foram mostrados que o tratamento com anti-inflamatório clássico reduziu significativamente inflamação e expressão de TNF α e IL-1 β (pró-inflamatórias), mas não afetou de forma significativa a liberação de TGF β e IL-10 (pró-fibrogênicas) (63).

Como podemos observar, as citocinas possuem papel relevante na fisiopatologia da silicose e essas produzem seus efeitos através de seus receptores específicos presentes nas membranas das células alvo.

2.5.1 Quimiocinas e Receptores

No contexto da inflamação e fibrose, mediadores como as citocinas desempenham um papel-chave na modulação desses processos fisiopatológicos. As citocinas consistem em um grupo de pequenas proteínas, geralmente entre 5 a 25 kDa, produzidas e secretadas por diversos tipos de células do organismo, em situação de homeostase ou de inflamação. Possuem efeito específico sobre as interações e comunicações entre as células, logo essas proteínas têm como característica uma ação pleiotrópica.

As citocinas são denominadas de acordo com função exercida ou característica em comum, incluindo as linfocinas (citocinas sintetizadas por linfócitos), as monocinas (citocinas sintetizadas por monócitos), as interleucinas (citocinas sintetizadas por um leucócito que atua sobre outro leucócito) e as quimiocinas (citocinas que exercem a quimioatração de leucócitos).

Com destaque para as quimiocinas, estas modulam os mecanismos fisiológicos e patológicos através da habilidade de atrair quimicamente determinadas populações leucocitárias, recrutando e ativando esses tipos celulares. É descrito que a interação entre a quimiocina e a célula leva à polarização de leucócitos, propiciando o processo de migração para o foco da lesão a partir do sangue periférico ou entre os tecidos. Este processo leva produção/liberação de mais quimiocinas, resultando em um processo de retroalimentação positiva que irá garantir a manutenção do processo inflamatório. Em geral, os leucócitos e as células residentes no sítio inflamatório são os responsáveis pela liberação das quimiocinas. Na condição da homeostase, as quimiocinas podem ser produzidas por um amplo espectro de células, ou ainda serem expressas constitutivamente (64).

Foram identificadas aproximadamente 50 quimiocinas, que atuam na mobilidade leucocitária em condições de homeostase ou inflamatória (65). Atualmente, as quimiocinas são subdivididas em quatro subfamílias, a saber, CC, CXC, C e CX3C, cujo elemento de diferenciação é baseado na presença (representada por uma letra X) ou ausência de um resíduo de aminoácido localizado entre os dois primeiros dos quatro resíduos conservados de cisteína (65). No contexto de doença inflamatória, as quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES

e CCL22/MDC possuem destaque por serem as mais atuantes nos processos de natureza fibrótica (66). Na condição de exposição às partículas de sílica foi verificada a produção de quimiocinas, além de fatores de crescimento provenientes de macrófagos alveolares e pneumócitos tipo II, que estão associados tanto ao início como à progressão da doença (67).

Para exercerem suas ações, as quimiocinas se ligam a receptores presentes na membrana celular que possuem 7 domínios transmembranares, conhecidos como receptores metabotrópicos. Até o momento foram descritos aproximadamente 20 tipos de receptores, subdivididos em 4 subgrupos, com base nas quimiocinas que são reconhecidas. São eles: CCR, CXCR, XCR e CX3CR (65). Através da ligação quimiocina-receptor ocorrem modificações estruturais nas porções citoplasmáticas destes receptores, que passam a ter afinidade pela proteína G. Ao se ligar nesta determinada região, a proteína G irá ser ativada transduzindo esse sinal através de uma cascata de sinalização e culminando na modulação do processo de transcrição gênica com consequente produção de mediadores pró-inflamatórios. Apesar das diferenças serem geralmente pequenas, cada receptor poderá ter maior afinidade por uma ou mais quimiocinas, dependendo da sua maior/menor interação química. Esses receptores são caracterizados por grande complexidade, redundância e promiscuidade, revelada pelo fato de que a maioria das quimiocinas pode atuar sobre um único receptor, porém os receptores podem interagir com várias diferentes quimiocinas. Os receptores de quimiocinas têm se mostrado cruciais em processos como angiogênese, remodelamento vascular e tecidual, fibrose, dentre outros. Podem, assim, ser considerados como potenciais alvos na terapia de diferentes doenças, tais como, psoríase, câncer, doenças periodontais, artrites e outras. Todavia, as quimiocinas podem se ligar a receptores que não ativam a proteína G, os receptores atípicos (65, 68). A importância desses receptores se deve ao fato de funcionarem como competidores e classicamente estarem envolvidos na diminuição dos efeitos deletérios das doenças inflamatórias.

2.5.2 Receptores Atípicos

Os receptores atípicos para quimiocinas (ACKR) são aqueles que funcionam como “decoy”, ou seja, possuem uma estrutura física semelhante aos receptores convencionais, porém têm uma modificação na segunda porção intracelular, num domínio conhecido como DRYLAIV. Desta forma, apesar de ligarem as quimiocinas com a mesma afinidade que os convencionais, os receptores atípicos são incapazes

de ativar a proteína G, portanto são conseqüentemente impossibilitados de realizar a transdução de um sinal positivo na célula. Nesse contexto, após a ligação quimiocina-receptor atípico ocorre a internalização destas duas estruturas, o que leva à degradação dos mesmos, sendo esse processo considerado uma estratégia primária de regulação negativa sobre quimiocinas inflamatórias. Atualmente, são conhecidos quatro receptores atípicos. São eles: ACKR1 (também conhecido como DARK do inglês “Duffy antigen receptor for chemokines”), ACKR2 (antigamente denominado de D6 ou CCBP2), ACKR3 (CXCR7) e ACKR4 (CCX-CKR) (69). Todavia, existem outros dois novos receptores que são apontados como atípicos, que se forem confirmados irão ser denominados ACKR5 (CCRL2) e ACKR6 (PITPNM3), porém mais estudos ainda são necessários para essa confirmação (69). Dentre essas estruturas, os dois receptores melhores descritos são o ACKR1 e o ACKR2. O ACKR1 está expresso em eritrócitos e é promíscuo pelo fato de interagir tanto com as quimiocinas fisiológicas (envolvidas na manutenção da homeostase) quanto com as inflamatórias do tipo CXC e CC (70, 71). Já o ACKR2 está expresso em endotélio de vasos linfáticos e em tecidos como pele, intestino e pulmão, sendo seletivo para quimiocinas inflamatórias da sub-família CC (72). O ACKR2 também foi encontrado em macrófagos, neutrófilos, mastócitos e linfócitos (70, 73, 74). Tomando por base estas observações, há um esforço atual para compreender o envolvimento destes receptores no contexto das doenças inflamatórias, com especial ênfase sendo destinada ao receptor ACKR2. Evidências mostram um papel supressor para este receptor no contexto da inflamação já que sua ausência em animais nocautes foi encontrada a exacerbação da resposta inflamatória da pele em modelo de psoríase. Ainda em animais nocautes para o ACKR2, a infecção pulmonar causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* levou a um aumento tanto do recrutamento de macrófagos/linfócitos quanto dos danos teciduais, além da alta taxa de mortalidade (75).

Desta forma, a compreensão do papel do ACKR2 na silicose pulmonar poderá trazer informações relevantes, contribuir para o entendimento dos seus mecanismos fisiopatológicos e apontar novos rumos terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Neste estudo tivemos como principal objetivo, investigar o papel do receptor ACKR2 na resposta inflamatória/fibrótica no contexto da silicose experimental murina, com vista à identificação de alvo terapêutico que possibilite o desenvolvimento de tratamentos eficazes a serem aplicados para o controle desta doença. Para tanto, foram utilizados como ferramenta biológica animais deficientes para o receptor ACKR2 de quimiocinas (ACKR2^{-/-}) e sistemas de análise *in vivo* e *in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos

De forma específica avaliamos:

- i) a adesão e rolamento leucocitário de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-};
- ii) a caracterização imunofenotípica *in vitro* de macrófagos (M1/M2) pulmonares de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-}, 3 e 28 dias após a estimulação com as partículas de sílica;
- iii) a cinética da expressão do receptor ACKR2 no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} silicóticos;
- iv) a cinética da variação de peso corporal e ingesta de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} silicóticos;
- v) a função pulmonar (resistência e elastância) e a hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-}, 3 e 28 dias após a estimulação com as partículas de sílica;
- vi) a morfologia e morfometria do tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-}, 3 e 28 dias após a estimulação com as partículas de sílica;
- vii) a reatividade de macrófagos peritoneais e derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} *in vitro*;
- viii) as alterações na população leucocitária no sangue periférico e medula óssea de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-}, 3 e 28 dias após a estimulação com as partículas de sílica;
- ix) o conteúdo de colágeno presente no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-}, 3 e 28 dias após a estimulação com as partículas de sílica;

- x) o conteúdo de partículas de sílica presentes no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-}, 3 e 28 dias após a estimulação com as partículas de sílica;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos das cepas Swiss-Webster, C57BL/6 e nocautes para o receptor ACKR2 (ACKR2^{-/-}) (74), com idades entre 6 a 8 semanas. A confirmação da deleção genética dos animais nocautes foi feita através da genotipagem pela técnica de PCR. Os animais foram provenientes do Centro de Criação de Animais (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Todos os procedimentos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) sob a Licença de número LW-57/14 (Anexos). Em todas as etapas experimentais, os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de 22 ± 2 °C, ciclos de luminosidade controlada (12 h claro/12 h escuro) e umidade a 60 ± 10 %. Além disso, foram fornecidas água e ração comercial *ad libitum*.

4.2 Indução da silicose

Os camundongos foram anestesiados por via inalatória, com isoflurano (Cristália, Itapira, SP) na concentração de 4%, sob um fluxo de O₂ a 0,5 L/min, e então instilados por via intranasal (in) com 50 µL de uma suspensão de sílica cristalina (10 mg) (0,5 - 10 µm, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) em salina estéril (0,9% de NaCl). Os animais do grupo controle foram instilados apenas com salina estéril, no mesmo volume e via de administração. As análises foram realizadas nos tempos escolhidos de 3 e 28 dias após a estimulação com sílica, correspondendo respectivamente às fases aguda e crônica da silicose (Figura 1). Os animais foram aleatoriamente distribuídos nos respectivos grupos experimentais com n de no mínimo 6 camundongos por grupo.

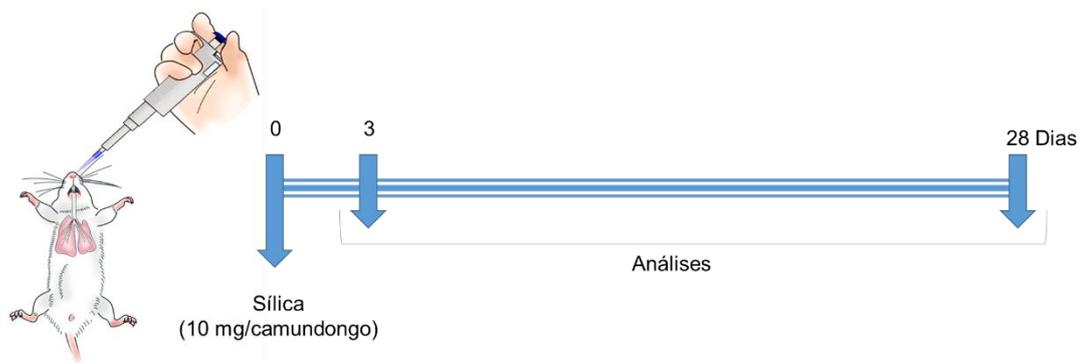


Figura 1 - Esquema de indução da silicose e indicação dos tempos de análise.

4.3 Peso corporal e ingesta de ração

Os camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} foram colocados conscientes em um recipiente e pesados em balança analítica (BG 1000, Gehaka) em diferentes dias após a instilação de sílica (1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias). Em paralelo, foi avaliada a ingesta dos animais através da comparação entre o peso da ração colocada sobre a grade no dia 0 e o que sobrou dela, em cada tempo de análise (1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias). A ingesta foi determinada através da média do consumo de ração em cada gaiola, contendo cinco animais.

4.4 Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas

Neste estudo, a mecânica respiratória foi avaliada através de um pletismógrafo de corpo inteiro invasivo (Data Sciences International, EUA). Os camundongos foram anestesiados com nembutal (60 mg/kg) e curarizados através de injeção intravenosa de brometo de pancurônio (1 mg/kg, Pavulon®). Em seguida, os animais foram traqueostomizados para a inserção de uma cânula de aço (18-gauge), e acondicionados na posição de decúbito dorsal em uma plataforma aquecida ($\cong 37$ °C). Foram, então, acoplados ao pneumotacógrafo e ventilados a uma taxa de 160 incursões/min em volume corrente de 0,25 mL. Todo esse sistema foi mantido dentro uma câmara fechada, onde o fluxo de ar e a pressão transpulmonar foram detectados através de transdutores, que possibilitou a conversão analógico-digital e o cálculo dos parâmetros de resistência das vias aéreas (cmH₂O.s/mL) e elastância pulmonar (cmH₂O/mL) de cada ciclo respiratório através “software” Buxco FinePointe versão

2.4.6 (Buxco Electronics/DSI, UK). Após um período de 5 min para a estabilização, os parâmetros basais de função pulmonar foram obtidos através de aerossolização de PBS. Em seguida, os animais foram estimulados com concentrações crescentes e cumulativas do agente broncoconstritor metacolina (3, 9, 27 e 81 mg/mL) durante 5 min cada, possibilitando averiguar a reatividade das vias aéreas e eventual fenômeno da hiper-reatividade.

4.5 Contagem total e diferencial de leucócitos

O número de leucócitos totais foi determinado após a contagem das amostras em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio de luz (BX40, Olympus) em campo claro, em cada ensaio experimental de sangue periférico, medula óssea e pulmão. A partir dessas amostras, foram realizados os esfregaços de sangue periférico, além de serem preparadas lâminas de citocentrifugados de medula óssea e de pulmão, utilizando 1×10^5 células em um volume de 100 μ L, centrifugadas (Cytospin3, Shandon) a 400 rpm por 4 minutos. Essas lâminas foram utilizadas para a contagem diferencial de leucócitos, onde foram identificadas 100 células, em campos aleatórios, por meio da morfologia do núcleo, da proporção entre o núcleo e o citoplasma e das características tintoriais de cada célula.

4.5.1 Sangue periférico

As alíquotas de sangue foram coletadas através de um corte na região distal da cauda dos camundongos e retiradas com auxílio de uma micropipeta. O sangramento foi estancado através da aplicação de uma pressão com uma gaze limpa sobre a parte cortada da cauda, durante dois minutos. O esfregaço sanguíneo foi realizado através da dispersão de uma gota de sangue ao longo de uma lâmina de vidro, onde as células foram fixadas e coradas pela técnica clássica de May-Grünwald-Giemsa.

4.5.2 Medula óssea

Após a dose letal de anestésico tiopental, os animais foram submetidos a dissecação e tiveram o fêmur e a tíbia do lado direito removidos cirurgicamente. O músculo e tecido conjuntivo foram retirados com auxílio de gaze e tesoura. Após, o fêmur foi separado e teve as suas epífises cortadas para a exposição do canal

medular. Com o auxílio de uma seringa e uma agulha (24-gauge), foram injetados 5 mL de meio RPMI 1640 contendo heparina (20 UI/mL), em uma das extremidades do fêmur para retirada da medula, que foi homogeneizada e mantida em gelo. Uma alíquota foi separada e diluída em solução de Türk (100 x) para contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer. Outra alíquota foi utilizada para a confecção de lâminas de citocentrifugados utilizando 1×10^5 células em um volume de 100 μ L, centrifugadas (Cytospin3, Shandon) a 400 rpm por 4 minutos e coradas com May-Grünwald-Giemsa. Foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos, através da identificação das particularidades morfológicas intrínsecas de cada célula, tais como tamanho, coloração e relação núcleo-citoplasma. As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz (BX50, Olympus) em objetiva de imersão em óleo (aumento de 100x).

4.6 Citometria de fluxo

4.6.1 Obtenção das células

Os animais foram mortos com o anestésico tiopental de sódio (500 mg/kg, ip) (Thiopentax, Cristália, SP), e em seguida perfundidos através do coração (incisão no ventrículo direito), com uma solução contendo PBS e EDTA (10 mM). Os pulmões foram retirados, cortados em fragmentos bem pequenos e, em seguida, imersos em solução de digestão contendo colagenase 1 (0,45 mg/mL), DNase (0,025 mg/mL) em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) sob agitação constante, em banho-maria a 37 °C por 1 h. As amostras foram passadas em peneiras com poros de 40 μ m e colocadas em meio RPMI com 10% de SFB. Foram submetidas à centrifugação a 1900 rpm a 4 °C por 10 min. Após descartar do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI-1640 com 10% de SFB, feita contagem do número total em câmara de Neubauer e mantidas a 4 °C até a marcação para análise por citometria de fluxo.

4.6.2 Avaliação das células

As células (1×10^6 células/poço) foram adicionadas às placas de 96 poços com fundo em U e, posteriormente, incubadas com soro de carneiro para realização de bloqueio dos sítios inespecíficos. As placas foram centrifugadas à 1400 rpm à 4 °C por 10 min, em seguida, o sobrenadante foi descartado e os anticorpos específicos

com seus respectivos controles com isotipos adicionados (Tabela1). Após incubação à 4 °C por 30 min, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS e transferidas para tubos de leitura de citometria de fluxo. Todas as amostras foram mantidas em banho de gelo e protegidas da luz durante o período do ensaio. As células marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSCallibur, Becton-Dickinson). O FACSCallibur possui duas fontes luminosas (feixe de luz), um laser de argônio (488 nm de excitação) e um de diodo (633 nm de excitação). A transmissão ou a refração da luz pelas células é detectada por meio de seis detectores: “Forward Scatter” (FSC) que avalia a dispersão frontal da luz (referente ao tamanho da célula); “Side Scatter” (SSC) que é sensível à dispersão lateral da luz (referente à complexidade interna ou granulosidade da célula), bem como por quatro detectores de fluorescência. Os detectores FSC e SSC foram ajustados para acomodar populações heterogêneas de células presentes nas amostras e os dados foram coletados em escala linear. Dados de fluorescência foram coletados em escala logarítmica. A fluorescência do FITC, PE, PE-Cy7, AlexaFluor647 foi captada pelos filtros de 530/30 (530 ± 15) nm (FL1), 585/42 (585 ± 21) nm (FL2), 670/LP (>670) nm (FL3) e 660/20 (660 ± 10) nm (FL4), respectivamente. Para identificação de macrófagos foram utilizados anticorpos monoclonais comerciais (BD Biosciences) capazes de identificar os marcadores CD11b, F4/80 e CD206. Através do marcador CD45 foram, então, excluídos tipos celulares potencialmente contaminantes, principalmente células epiteliais e endoteliais. As listagens dos anticorpos e fluorocromos utilizados estão apresentadas nas Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente. Em todos os ensaios de citometria de fluxo, as células foram observadas através da contagem do número de eventos fluorescentes detectados pelo aparelho. Eles foram representados através de gráficos de pontos (“dot plots”) com duas dimensões em escala linear (FSC e SSC), para delimitação e exclusão das populações em estudo. Além disso, foram utilizados histogramas e “dot plots”, em escala logarítmica, para cada marcador fluorescente utilizado. Foram adquiridos 20.000 eventos em cada amostra, utilizando o programa BD CellQuest versão 5.1 (BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados utilizando o “software” FlowJo versão 10.0.7 (Tree Star, Inc.).

Tabela 1 - Anticorpos utilizados

Molécula	Clone	Isótipo	Fluorocromo	Fabricante
CD11b	M1/70	IgG2b, k	PE-Cy7	eBioscience
CD206	MR5D3	IgG2a	AlexaFluor647	Bio-Rad
CD45	30-F11	IgG _{2b} , k	PE	eBioscience
F4/80	BM8	IgG2a, k	FITC	eBioscience

Tabela de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem de macrófagos, indicando a especificidade do anticorpo (molécula), o clone, o isótipo e o fluorocromo,.

Tabela 2 – Descrição das estruturas em estudo

Moléculas	Expressão Celular Principal	Principais funções atribuídas
CD45	Células hematopoiéticas	Tirosina fosfatase que desempenha função crítica e sinalização de receptor de antígeno.
CD11b	Granulócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células NK	Fagocitose de partículas revestidas com iC3b; adesão de neutrófilo e monócito ao endotélio e proteínas de matriz extracelular.
F4/80	Macrófagos	Estímulo à produção de citocinas e indução de tolerância periférica em células T CD8+.
CD206	Macrófagos	Liga estruturas com alta manose em patógenos; medeia endocitose de glicoproteínas em macrófagos e fagocitose de bactérias, fungos e outros patógenos.

Fonte: Adaptado do Abbas (76)

4.7 Histologia

Os camundongos foram submetidos à eutanásia com tiopental sódico (500 mg/kg, ip). Após a exposição da caixa torácica, os pulmões foram perfundidos com solução de salina (0,9%) + EDTA (10 mM) por meio de uma cânula intracardíaca para a remoção do sangue. Em seguida, o pulmão direito foi retirado, congelado e armazenado em freezer - 80 °C para análises bioquímicas. O pulmão esquerdo foi

imerso em solução Millonig (formalina tamponada a 10%) e fixado por no mínimo 7 dias. Após, o pulmão foi submetido ao processo de desidratação, utilizando soluções de etanol em concentrações crescentes (70, 80, 90 e 100%), clarificação em xilol e inclusão numa mistura proporcional (1:2) de parafina e Paraplast Plus® (P3683, Sigma-Aldrich). Posteriormente, foram realizados cortes histológicos dos pulmões (com 4 µm de espessura) em micrótomo (RM2235, Leica) e submetidos à coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) para análise das estruturas do tecido pulmonar e Picro-Sirius (PS) para avaliação da deposição de colágeno (77). Os cortes histológicos foram analisados de forma qualitativa a fim de avaliar comparativamente a estrutura do tecido epitelial no grupo controle e experimental, utilizando microscópio de luz (BX51, Olympus) e fotografados com auxílio de uma câmera digital (UC30, Olympus). De modo quantitativo, foi possível identificar o colágeno (cor vermelha) e realizar a contagem dos pixels com a tonalidade vermelha (77), através do programa Image-Pro versão 4.5 (Media Cybernetics). Em alguns grupos de experimentos, os cortes de tecido pulmonar foram submetidos ao processo de escaneamento de lâminas (Panoramic Desk, 3D Histech) e analisados através do programa Panorammic Midi versão 1.16 (3D Histech).

4.7.1 Morfometria

A análise morfométrica foi realizada através da técnica convencional de “point-counting” (contagem de linhas e pontos) (78, 79), onde utilizamos uma ocular acoplada ao microscópio, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo. Em um aumento de 200x, foram avaliados vinte campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. Foi quantificada então, a fração de área ocupada por granulomas. O número de pontos na área de granuloma foi dividido pelo total de pontos contados em cada campo analisado e expresso sob a forma de percentual.

4.7.2 Contagem das partículas de sílica

Os cortes histológicos foram analisados utilizando microscópio de luz (BX51, Olympus) e fotografados com auxílio de uma câmera digital (UC30, Olympus), utilizando um sistema polarizador de luz. Sendo assim, foi possível identificar a refringência das partículas de sílica (cor branca) e realizar a contagem dos pixels com a tonalidade branca (77), através do programa Image-Pro versão 4.5 (Media Cybernetics).

4.8 ELISA

Foram realizadas as dosagens de citocinas utilizando-se kits comerciais de ELISA (DuoSet, Estados Unidos), sendo seguidas as recomendações do fabricante. Neste método, foram adicionados à placa de fundo chato 100 µL do anticorpo de captura diluído em tampão carbonato-bicarbonato (NaCl 1,5 M, H₃BO₄ 0,5 M e NaOH 1 N) em pH = 9,5, e incubadas por uma noite. Após 3 lavagens com 200 µL/poço de tampão 1 (timerosal, KPO₄ 1 M e Tween 20 0,005%), as placas foram bloqueadas com 250 µL/poço de tampão 2 (PBS 1x com 1% de albumina sérica bovina) por 1 h, a temperatura ambiente. Após 3 lavagens com tampão 1 (200 µL/poço), as amostras e os padrões foram diluídos em PBS com 2% de SFB, adicionados aos poços (100 µL/poço) e incubados por um período de 2 h em temperatura ambiente. Para a curva-padrão das citocinas, foram feitas duplicatas de 50 µL/poço das diluições seriadas (1:2) das citocinas recombinantes, conforme recomendações do fabricante. Posteriormente, foram realizadas lavagens com tampão 1 e foram adicionados os anticorpos de detecção (50 µg/mL), com incubação de 2 h à temperatura ambiente. Novamente, a placa foi lavada com o tampão 1, seguindo-se a etapa de incubação por 1 h a 20 °C (50 µL/poço) com a enzima peroxidase neutraavidina-horseradish (HRP) diluída em tampão 2. Por fim, foi realizada uma última lavagem com tampão e foi adicionado o substrato (K-Blue®) (50 µL/poço) nas placas, resultando após 5 a 30 min em uma reação colorimétrica, que foi interrompida após o acréscimo de 50 µL/poço de H₂SO₄ (0,19 M). As placas foram lidas em espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 450 nm e os resultados foram expressos em pg/mL.

4.9 Obtenção e ativação de macrófagos

4.9.1 *Macrófagos peritoneais*

Os animais C57BL/6 e ACKR2^{-/-} foram submetidos a eutanásia em câmara de CO₂. Em seguida, foram colocados dentro de cabines de segurança biológica, na posição de decúbito dorsal e submetidos à dissecação da pele abdominal, expondo o peritônio. Através de uma incisão com agulha (18-gauge), foram injetados 3 mL de PBS e EDTA (10 mM) dentro da cavidade peritoneal. Após gentis movimentos de massagem no abdômen do animal, foi aberto um orifício através do peritônio, onde foi recolhido esse lavado com uma pipeta Pasteur e depositado em tubos de 15 mL estéreis, mantidos a 4 °C. Estes, por sua vez, foram centrifugados em 1900 rpm por

10 minutos a 4 °C. Após descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI-1640 sem SFB e contadas em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram adicionadas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço), em triplicata, e as amostras incubadas por um período de 1 h em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C com os estímulos LPS (0,5 µg/mL) e sílica (12,5 µg/mL). Após 6 h, o sobrenadante foi recolhido e armazenado em freezer - 80 °C para a subsequente quantificação de citocinas (IL-6 e TNF- α) por método de ELISA.

4.9.2 Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM)

As células foram obtidas a partir dos dois fêmures provenientes de camundongos, e em seguida colocadas em placas de Petri, e incubadas com 20% do sobrenadante da linhagem celular L929 (fonte de M-CSF) + 10 mL de meio RPMI (20 % SFB), mantidas a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂. Após 3 dias, foram adicionados 10 mL de meio RPMI (20 % SFB) às placas e feita incubação por mais 7 dias. Ao final deste período, foram adicionados 5 mL de PBS gelado e as células recuperadas com o auxílio de um “cell scraper”.

Para indução do processo de polarização, as células recuperadas (supracitadas) foram adicionadas às placas de 96 poços de fundo chato, contendo meio RPMI (10 % SFB), na densidade de 3×10^5 células por poço, em triplicata. Uma hora após, as células foram incubadas com LPS (100 ng/mL) para polarização de perfil M1, ou com IL-4 (10 ng/ml), para polarização de perfil M2. Após 48 h, o sobrenadante foi recolhido e armazenado a - 20 °C para posterior análise. Em um segundo protocolo, as células foram polarizadas para M1 mediante incubação com IFN- γ (1 ng/mL) ou IL-4 (10 ng/mL) para M2 por 24 h, a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂. Em seguida, as células foram estimuladas com LPS (100 µg/mL) ou sílica (125 µg/mL) e 48 h após, o sobrenadante foi recolhido e armazenado para posteriores análises.

4.10 Adesão e rolamento de leucócitos em sistema de microscopia intravital

Os animais foram anestesiados com uma injeção de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal. Para facilitar a respiração espontânea, foi inserida uma cânula na traqueia dos animais (PE 190, Becton Dickinson Company, EUA). A temperatura corporal foi monitorada e mantida a 37 °C com uma superfície de aquecimento. Através de uma incisão no escroto, o

músculo cremaster foi localizado e uma área de 1 cm² foi exposta numa plataforma de microscopia intravital (Leitz, Wetzlar, Hessen, Alemanha), para serem identificadas as regiões da microcirculação do músculo. Foi utilizada uma solução de salina tamponada com bicarbonato de HEPES, com 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ para manter um pH de 7,4 e baixa tensão de oxigênio. Ao final de 30 min após a conclusão da fase de preparação, cada camundongo recebeu uma injeção intravenosa (7,5 mg / 30 g de peso corporal) de dextrano marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (TdB Consultancy, Uppsala, Suécia) como um marcador macromolecular. A permeabilidade microvascular para grandes moléculas foi quantificada através da contagem do número de locais de extravasamento de plasma fluorescente (vazamentos), visualizados pela fluorescência traçadora em vênulas pós-capilares. As preparações com menos de 10 locais de vazamento 30 min após a injeção de dextrano marcada com FITC foram aceitas para experiências. Os leucócitos foram marcados com a rodamina G (3 mg / 30 g de peso corporal) imediatamente antes da observação e as imagens foram gravadas em fitas VHS para posterior análise. Em cada campo foram contabilizadas as células que efetuaram o rolamento e aquelas que ficaram aderidas no vaso sanguíneo por pelo menos 30 seg.

4.11 PCR em tempo real

Os pulmões foram perfundidos com solução salina 0,9%. Em seguida, o pulmão esquerdo foi retirado e colocado em microtubo de 2 mL com 0,5 mL da solução TRIzol[®] (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), o qual foi acoplado à um triturador de tecidos (MA102, Marconi) onde foi realizada a maceração do pulmão para extração do RNA. Para análise quantitativa foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop[™] 1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific), onde foi colocado 1 µL da amostra. Em seguida, 2 µg de RNA extraído foi incubado com 1 µL de oligo dT (50 µM) (ThermoFisher Scientific) à 70 °C por 5 min. O RNA foi então incubado com uma solução Mastermix (ThermoFisher Scientific) contendo: dNTP (10 mM), DTT (0,1 M), RNaseOUT, SuperScript[®] First-Strand Buffer (5x) e SuperScript[™] III, à 42 °C por 2h e 30 min e posteriormente à 70 °C por 15 min. Por fim, foi utilizado o sistema de PCR em tempo real TaqMan "Gene Expression Assays" (ThermoFisher Scientific) no cDNA resultante, juntamente com os pares de oligonucleotídeos iniciadores exônicos (F5' – TCAGCCACCGTCTGGACTAT – 3' e R5' – GATTGGTAAGACTCTCGTCGTC – 3'), para determinar os níveis dos receptores ACKR2 nos pulmões. As condições

para a reação foram: 95 °C por 10 min para a ativação da enzima polimerase, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg e anelamento e extensão a 60 °C por 1 min, seguido da curva de dissociação (95 °C por 1 min, 60 °C por 30 seg e 95 °C por 30 seg). A reação de PCR foi realizada no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System e aquisição dos resultados pelo software 7500 versão 2.0 (ThermoFisher Scientific). O aumento na expressão gênica foi calculado através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT = (\text{animal silicótico} - \text{animal salina})^{\text{gene alvo}} - (\text{animal silicótico} - \text{animal salina})^{\text{gene constitutivo}}$.

4.12 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente através de análise de variância (“One-Way” ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de Newman-Keuls-Student. Cada experimento foi realizado no mínimo três vezes de forma independente. Para comparação entre dois grupos experimentais, foi utilizado o teste t de “Student” para amostras não-pareadas. No caso da análise da área de granuloma os parâmetros apresentados em forma percentual foram submetidos à transformação arcoseno, a fim de tornar sua distribuição próxima ao normal, permitindo, assim, a realização dos testes de variância descritos acima. A análise de variância (“Two-Way” ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla de Bonferroni foi utilizado para análise da função pulmonar. Foram considerados, nos testes acima citados, valores de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados apresentados nesta sessão estarão divididos para aqueles obtidos para os animais: a) Swiss-Webster (subitens 5.1; 5.2 e 5.3); b) C57BL/6 selvagens (subitem 5.4); c) C57BL/6 selvagens comparados com os nocautes para o receptor ACKR2 (subitens 5.5 a 5.12).

5.1 Análise da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos Swiss-Webster estimulados com sílica

Como em diversas pneumoconioses, na silicose ocorre uma alteração da mecânica respiratória nos portadores desta doença. Nesse contexto, buscamos investigar as possíveis mudanças na função pulmonar, tendo como base o modelo experimental em camundongos. Foram avaliados os parâmetros de resistência das vias aéreas e elastância pulmonar (Figura 2), com ênfase na fase inicial (3 dias) (Painéis superiores) e tardia (28 dias) (Painéis inferiores). Constatamos que a instilação intranasal de sílica (na dose de 10 mg/animal) levou a um aumento nos níveis basais de resistência e elastância pulmonares, em comparação ao verificado nos animais controles, que foram instilados com salina (Figura 2), conforme verificado em publicações anteriores (77, 80). Mediante a aerossolização do agente colinérgico metacolina (3 - 27 mg/mL), observamos que todos os grupos foram sensíveis a ação broncoconstritora do composto, sendo que os animais silicóticos apresentaram uma resposta mais expressiva (Figura 2), o que caracterizou um quadro de hiper-reatividade pulmonar associada à silicose.

5.2 Análise histológica do tecido pulmonar de camundongos Swiss-Webster estimulados com sílica

Nesta etapa investigamos parâmetros morfofisiológicos da silicose de forma a estabelecer uma correlação entre a diminuição verificada na função pulmonar e o comprometimento tecidual. Para tanto foi utilizada técnica de histologia clássica e coloração com HE. Como ilustrado na Figura 3, observamos que os camundongos controles, instilados com salina, mantém a arquitetura pulmonar normal, conforme atestado pelas vias aéreas e parênquima pulmonar bem preservados. Não foi

observado sinal de processo inflamatório ou modificação das células estruturais e residentes nos pulmões (Figuras 3 A, C). No caso dos animais silicóticos (Figuras 3 B, D), notamos na fase inicial (3 dias) a presença de inflamação caracterizada por edema e infiltrado leucocitário difuso, acompanhada por uma resposta fibrogênica bastante discreta (Figura 3 B). Além disso, áreas de fibrose frouxa e sem delineamento de bordos também foram evidenciadas nesse grupo (Figura 3 B). Com a evolução do processo silicótico, foi identificada a presença de espessamento dos septos alveolares, marcada área de formação de granulomas exibindo aspecto denso e bordos bem definidos e coalescentes (Figuras 3 D). A análise morfométrica comparando os grupos com silicose inicial (3 dias) e tardia (28 dias), mostra o aumento da área pulmonar ocupada por granulomas nesse último (Figura 3 E).

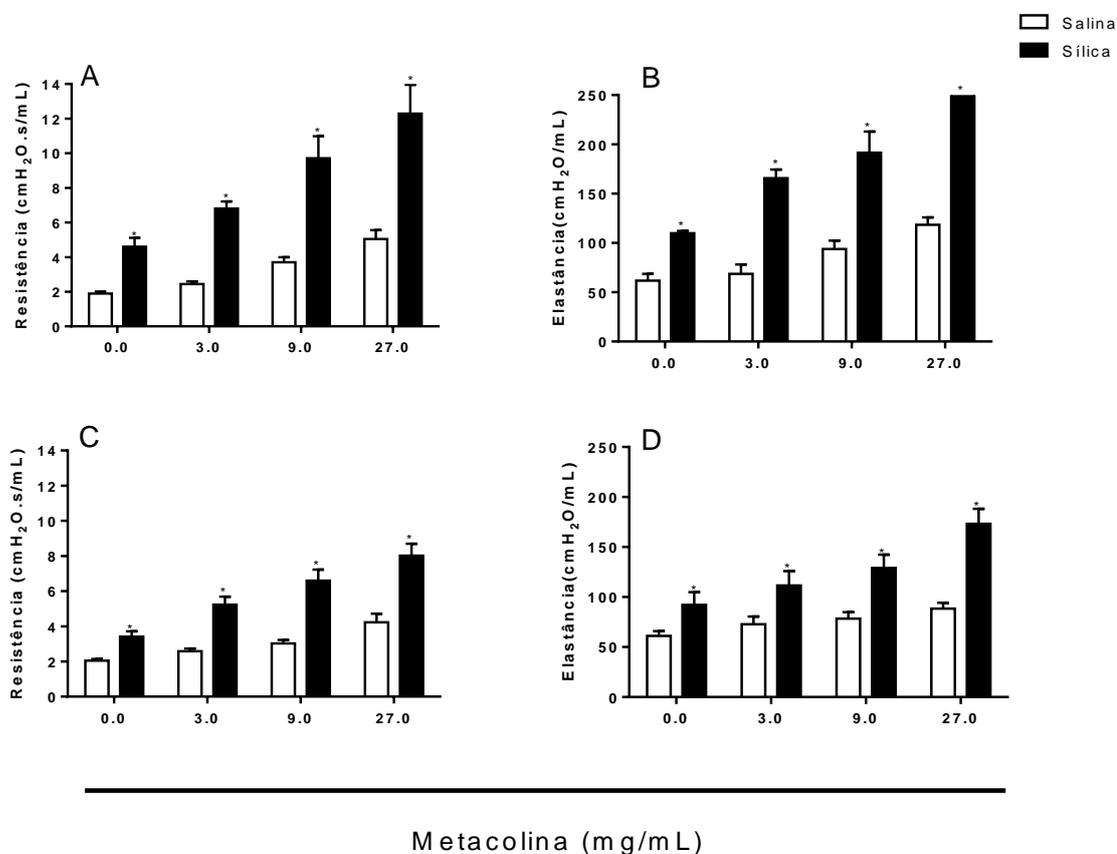


Figura 2 - Análise da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos Swiss-Webster instilados com sílica (10 mg/50 µL).

Foram avaliados os parâmetros de resistência das vias aéreas (A, C) e elastância pulmonar (B, D) na condição de aerossolização de PBS e metacolina (3 - 27 mg/mL). A análise foi realizada em 3 (A, B) e 28 (C, D) dias pós-sílica. As colunas representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo * indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina.

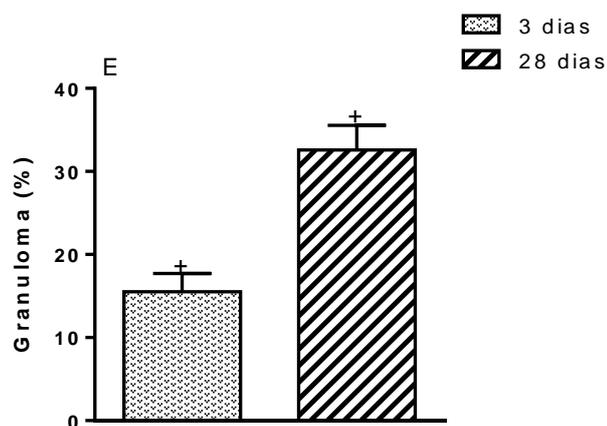
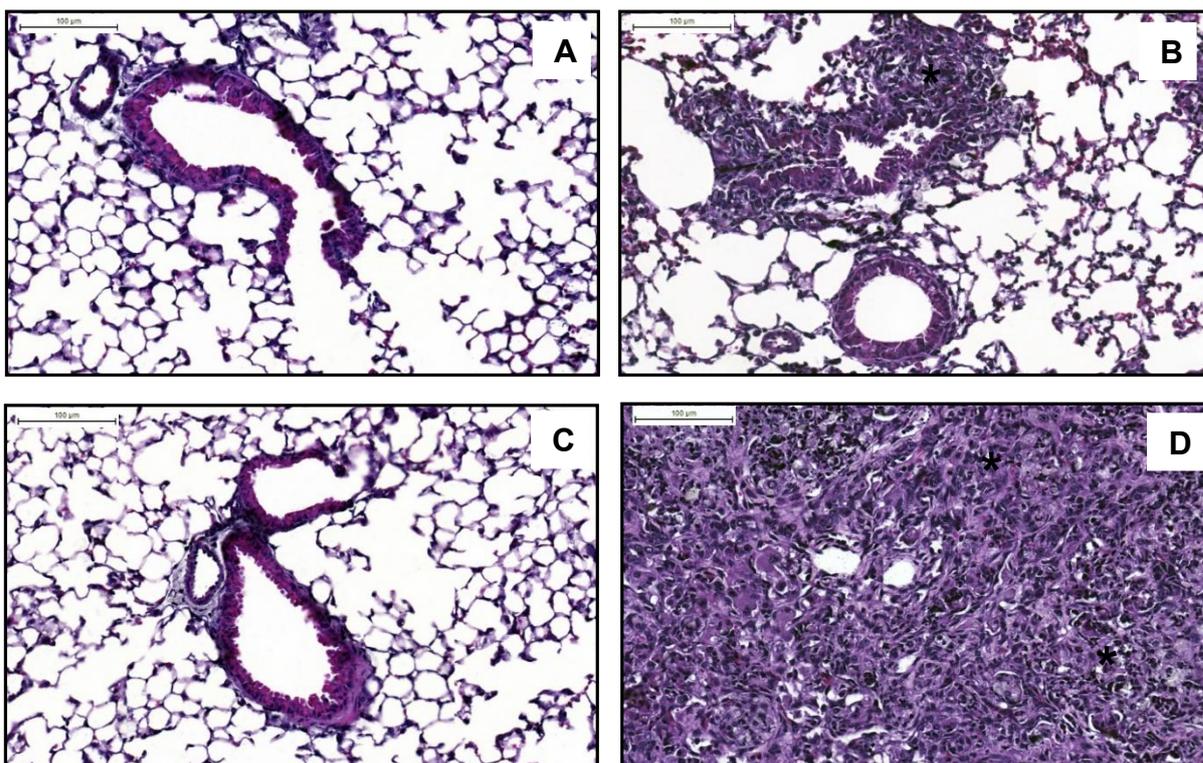


Figura 3 - Análise das alterações morfológicas no pulmão de camundongos Swiss-Webster instilados com sílica (10 mg/50 μ L).

Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (painéis esquerdos) e sílica (painéis direitos), coradas com HE e analisadas em microscópio de luz. As análises foram realizadas em 3 (B) e 28 (D) dias pós-sílica. Morfometria do parênquima pulmonar (E). As colunas representam a média \pm erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo + indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina. O * indica o granuloma. Aumento de 200 x.

5.3 Análise de expressão dos receptores ACKR2 no pulmão de camundongos Swiss-Webster estimulados com sílica

Considerando que o papel do receptor atípico para quimiocinas ACKR2 era nosso propósito de investigação na silicose, foi analisada a expressão deste receptor no processo de silicose experimental. Para tanto fizemos uso da técnica de PCR em tempo real para análise da expressão do RNA mensageiro (RNAm) do receptor ACKR2 em diferentes tempos após a instilação de partículas de sílica. Verificamos que os níveis de RNAm para o receptor após 1 dia a provocação com a sílica, estavam diminuídos no tempo de 3 dias e permaneceram reduzidos nos mesmos patamares até 28 dias (Figura 4). Vale ressaltar que por não existir anticorpo para reconhecimento do receptor ACKR2 em roedores, não foi possível a análise da expressão da proteína.

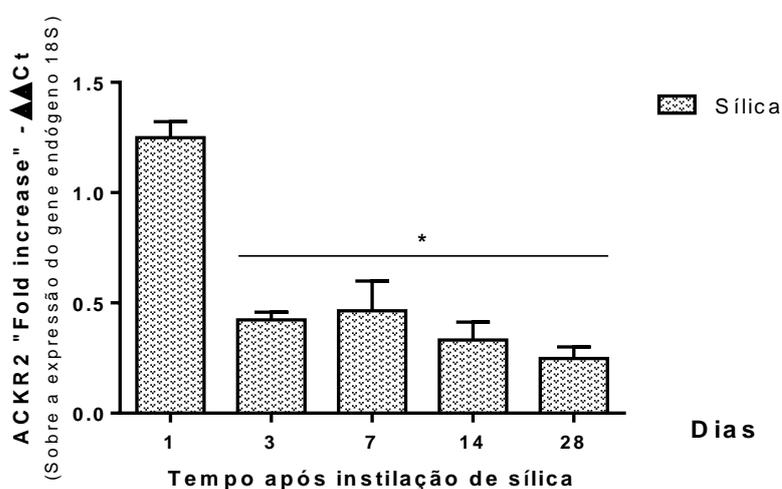


Figura 4 - Análise da expressão de RNAm para receptores ACKR2 nos pulmões de camundongos Swiss-Webster instilados com sílica (10 mg/50 µL).

A análise foi realizada em 1 - 28 dias pós-sílica. As colunas representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo * indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo sílica 1 dia.

5.4 Análise de expressão do receptor ACKR2 no pulmão de camundongos C57BL/6 (selvagens) estimulados com sílica

Considerando que os camundongos nocautes para ACKR2 foram criados a partir de selvagens isogênicos e conseqüentemente diferentes da cepa analisada inicialmente (Swiss-Webster) para a expressão do receptor ACKR2, optamos por avaliar a expressão deste receptor nos camundongos C57BL/6. Os resultados mostraram que a análise da cinética de expressão do receptor no grupo de animais selvagens induzidos à silicose revelou que, de forma semelhante ao observado com os camundongos Swiss-Webster, o nível do RNAm para o receptor ACKR2 após 1 dia do desafio com sílica diminuiu durante os demais tempos analisados (3 - 28 dias pós-sílica) (Figura 5).

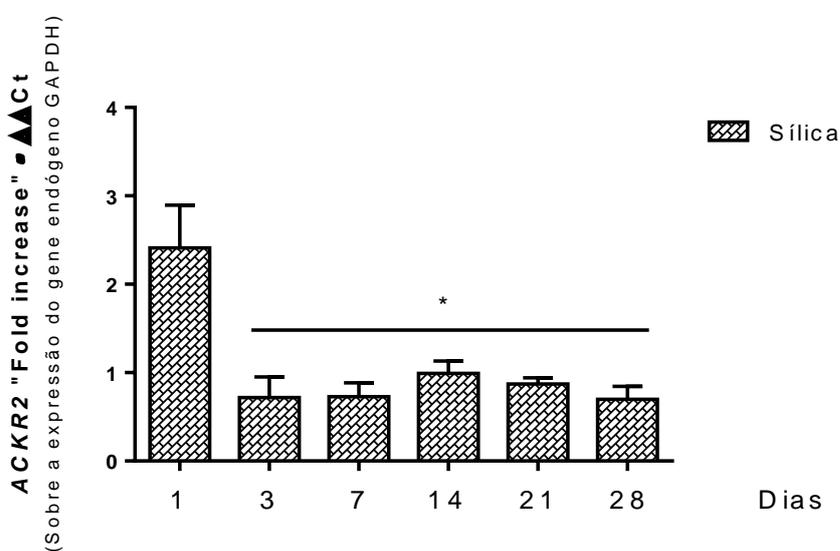


Figura 5 - Análise da expressão de RNAm para receptores ACKR2 nos pulmões de camundongos C57BL/6 instilados com sílica (10 mg/50 µL).

A análise foi realizada em 1 - 28 dias pós-sílica. As colunas representam a média \pm erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo * indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo silicótico 1 dia.

5.5 Avaliação da variação de peso corporal e ingestão de ração de camundongos nocautes para o receptor ACKR2 e estimulados com sílica

De posse dos achados descritos acima, partimos para a análise dos animais nocautes para o gene do receptor ACKR2 submetidos à estimulação com sílica, sendo assim possível observar o que a falta desse gene poderia causar no organismo. Iniciamos pela análise da variação de peso corporal, uma vez que na clínica a perda de peso é um dos sinais característicos de pacientes silicóticos (37). Conforme ilustrado na Figura 6, os animais selvagens (C57BL/6) e os nocautes para o receptor ACKR2 controles (instilados com salina), apresentaram perfil de ganho de massa corporal, aumentando o peso durante o período analisado (1 – 28 dias). Ao contrário, animais silicóticos, tanto do grupo selvagem como nocaute para o receptor ACKR2 apresentaram redução significativa do peso corporal entre os dias 1 e 3 pós-sílica, com clara recuperação nos tempos subsequentes da análise e apresentando, portanto, o mesmo perfil (Figura 6 A).

De forma complementar, evidências na literatura indicam que indivíduos silicóticos podem apresentar um quadro de disfagia, geralmente pela compressão esofagiana, consequência da doença, o que acarreta dificuldade na alimentação (37). Nossa análise seguinte incluiu o acompanhamento da média de ingestão de ração por gaiola durante 28 dias. Nossos dados mostraram que, apesar de haver uma tendência à redução de ingestão de ração entre 1 - 3 dias após a sílica, níveis semelhantes de alimentação foram observados entre os grupos experimentais analisados (Figura 6 B).

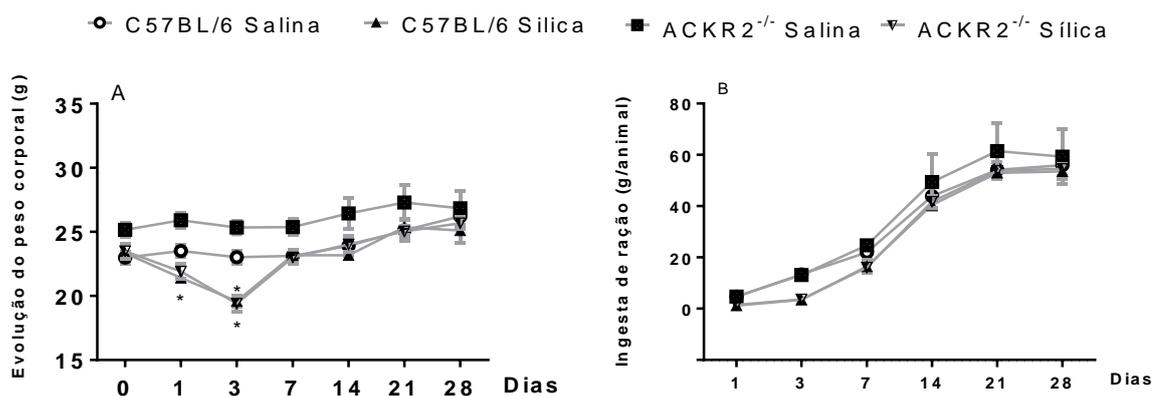


Figura 6 - Análise do peso corporal e da ingesta de ração dos camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).

Foram avaliados os parâmetros do peso corporal (A) e acompanhamento cumulativo dos valores de ingesta de ração (B). As análises foram realizadas 1 - 28 dias pós-sílica. Os valores representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo * indica $p < 0,05$ em comparação ao respectivo controle negativo.

5.6 Avaliação da função pulmonar de camundongos selvagens e nocautes para o receptor ACKR2 estimulados com sílica

Foram analisados resistência das vias aéreas e elastância pulmonar em camundongos nocautes para o receptor ACKR2 e selvagens 3 e 28 dias após a estimulação com sílica.

Para a fase aguda da silicose (3 dias): Os animais selvagens com silicose apresentaram níveis basais de resistência (Figura 7 A) e elastância (Figura 7 B) aumentados em relação aos animais selvagens controles instilados com salina. Na condição de aerossolização com diferentes doses de metacolina, a resposta mostrou-se exacerbada nos animais silicóticos em todas as doses utilizadas, confirmando também a presença de um quadro de hiper-reatividade das vias aéreas na cepa de camundongos selvagens (Figuras 7 A, B).

Para os camundongos nocautes para ACKR2 a mesma análise revelou que somente os níveis basais de resistência estão aumentados em relação aos animais nocautes controles instilados com salina. Na condição de aerossolização com diferentes doses de metacolina os animais silicóticos não são diferentes dos seus controles instilados com salina (Figuras 7 A, B).

Ao compararmos os dados dos animais silicóticos selvagens e nocautes pudemos observar que as resistências basais das vias aéreas são iguais, todavia quando os grupos são desafiados com metacolina os animais nocautes respondem de forma menos pronunciada a partir da dose de 27 mg/mL (7 A). Quanto aos valores comparados entre os mesmos grupos para elastância pulmonar os animais nocautes apresentam níveis basais menores e também resposta diminuída com todas as diferentes doses utilizadas nos desafios com metacolina, não havendo aquela resposta de hiper-reatividade observada nos selvagens (7 B).

Para a fase crônica da silicose (28 dias): os animais selvagens silicóticos apresentaram níveis basais de resistência (Figura 8 A) e elastância (Figura 8 B) iguais em relação aos animais selvagens controles instilados com salina. Na condição de aerossolização com diferentes doses de metacolina, a resposta mostrou-se aumentada nos animais silicóticos em todas as doses utilizadas, confirmando o quadro de hiper-reatividade (Figuras 8 A, B).

Para os camundongos nocautes para ACKR2 a mesma análise mostrou que os níveis basais de resistência e elastância são iguais aos dos animais nocautes controles instilados com salina. Na condição de aerossolização com diferentes doses

de metacolina os animais silicóticos não são diferentes dos seus controles instilados com salina tanto para resistência quanto para a elastância (Figuras 8 A, B).

Ao compararmos os dados dos animais silicóticos selvagens e nocautes pudemos observar que as resistências basais das vias aéreas são iguais, todavia quando os grupos são desafiados com metacolina os animais nocautes respondem de forma menos pronunciada com todas as doses utilizadas (8 A).

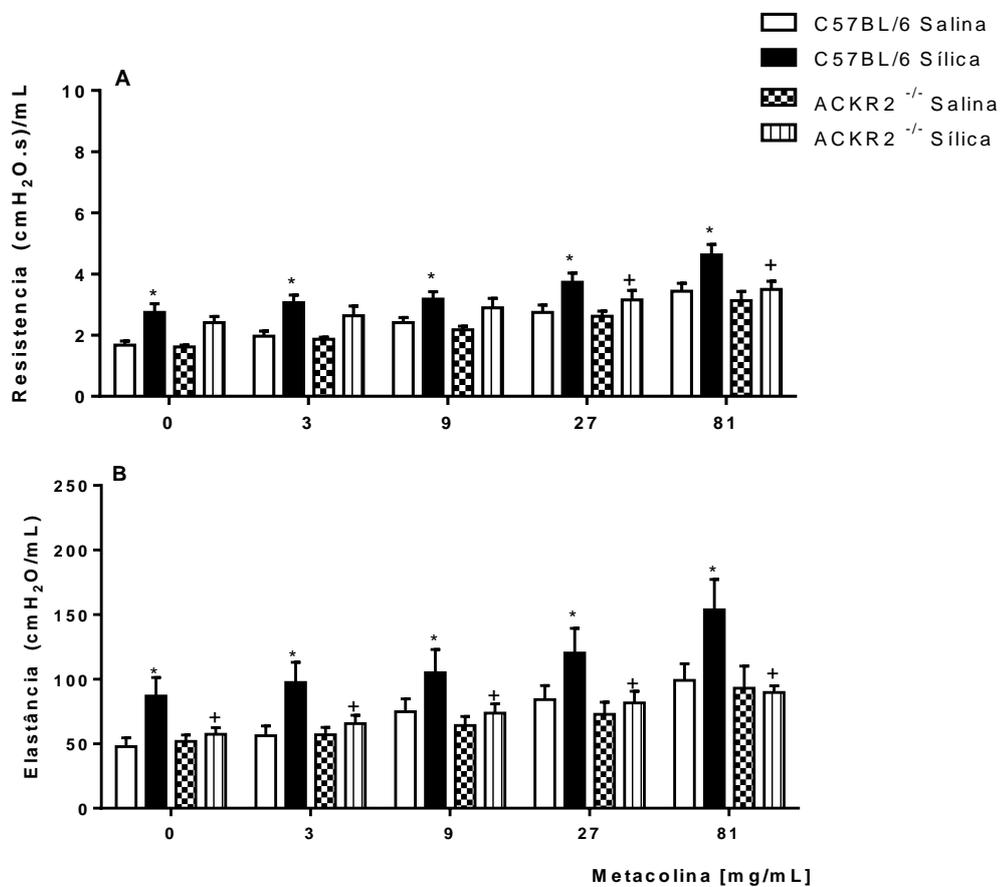


Figura 7 - Análise da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).

Foram avaliados os parâmetros de resistência das vias aéreas (A) e elastância pulmonar (B) na condição de aerossolização de PBS e metacolina (3 - 27 mg/mL). A análise foi realizada em 3 dias pós-sílica. As colunas representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo * e + indicam respectivamente p < 0,05 em comparação ao grupo salina C57BL/6 e entre os grupos sílica (C57BL/6 ou ACKR2^{-/-}).

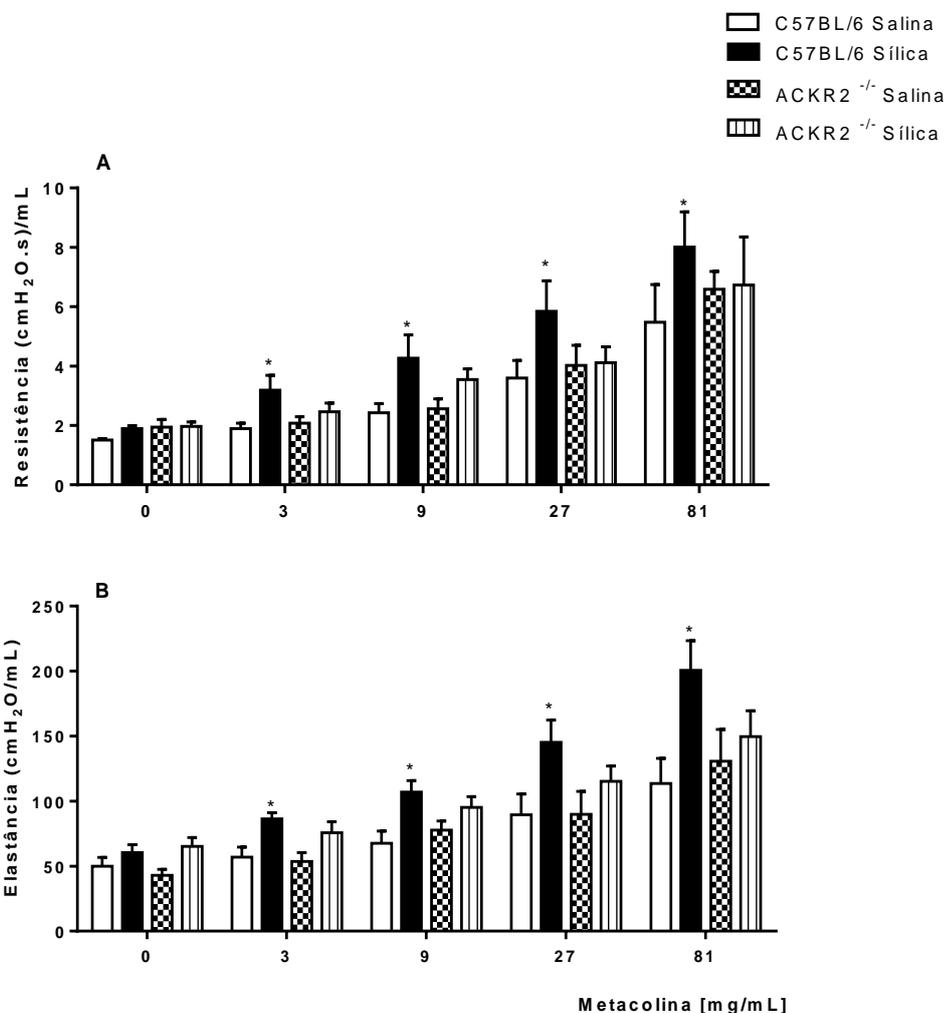


Figura 8 - Análise da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com salina e sílica (10 mg/50 µL).

Foram avaliados os parâmetros de resistência das vias aéreas (A) e elastância pulmonar (B) na condição de aerossolização de PBS e metacolina (3 - 27 mg/mL). A análise foi realizada em 28 dias pós-sílica. As colunas representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo * e + indicam respectivamente $p < 0,05$ em comparação ao grupo C57BL/6 salina e entre os grupos sílica (C57BL/6 ou ACKR2^{-/-}).

5.7 Análise morfológica dos pulmões dos camundongos selvagens e nocautes para o receptor ACKR2 estimulados com sílica

Utilizando cortes de tecido pulmonar corados com HE, verificamos que camundongos selvagens instilados com salina exibiram parênquima pulmonar normal e arquitetura alveolar bem definida, sem espessamento de septo ou presença de inflamação (Figura 9 A). Os animais selvagens silicóticos exibiram marcada resposta fibrogênica e extensa formação de granuloma, com presença de edema, infiltrado inflamatório em áreas compatíveis com as verificadas nos camundongos Swiss-Webster (Figura 9 C, E). Na condição dos animais nocautes para o receptor ACKR2, os controles (salina) mostraram parênquima pulmonar com arquitetura preservada (Figura 9 B), semelhante ao observado no grupo selvagem, enquanto que os nocautes silicóticos (Figura 9 D, F) apresentaram uma menor resposta granulomatosa no tempo de 28 dias (Figura 9 F) quando comparados com os silicóticos selvagens. Na Figura 10 estão representados os valores da análise morfométrica que confirmaram as observações prévias, indicando um aumento significativo de área pulmonar ocupada por granulomas nos animais silicóticos normal e selvagem, porém em menor nível nos silicóticos nocautes crônicos (28 dias).

No contexto de doenças fibróticas, é conhecido o fato de haver aumento na produção de elementos de matriz extracelular, com destaque para o colágeno. Sendo assim, avaliamos a presença de colágeno nos tecidos pulmonares utilizando cortes de tecido pulmonar submetidos à coloração com Picro-Sirius. De forma coerente, não foi evidenciada alteração no conteúdo de fibras colágenas nos pulmões de camundongos selvagens quando comparados com os nocautes controles (Figuras 11. A, B, respectivamente). Quanto aos animais silicóticos selvagens e nocautes, foi verificado um aumento no conteúdo de colágeno no tecido pulmonar, na fase inicial (3 dias), quando comparados aos seus respectivos controles salinas, o que é compatível com a condição de estabelecimento da doença (Figura 11 C, D). Na fase crônica da doença (28 dias), observamos o aumento expressivo de fibras colágenas no parênquima pulmonar, de forma co-localizadas com a região da fibrose granulomatosa, todavia menos intensa nos animais nocaute (Figura 11 E, F). Dados referentes à quantificação de pixels confirmaram as observações morfológicas (Figura 12).

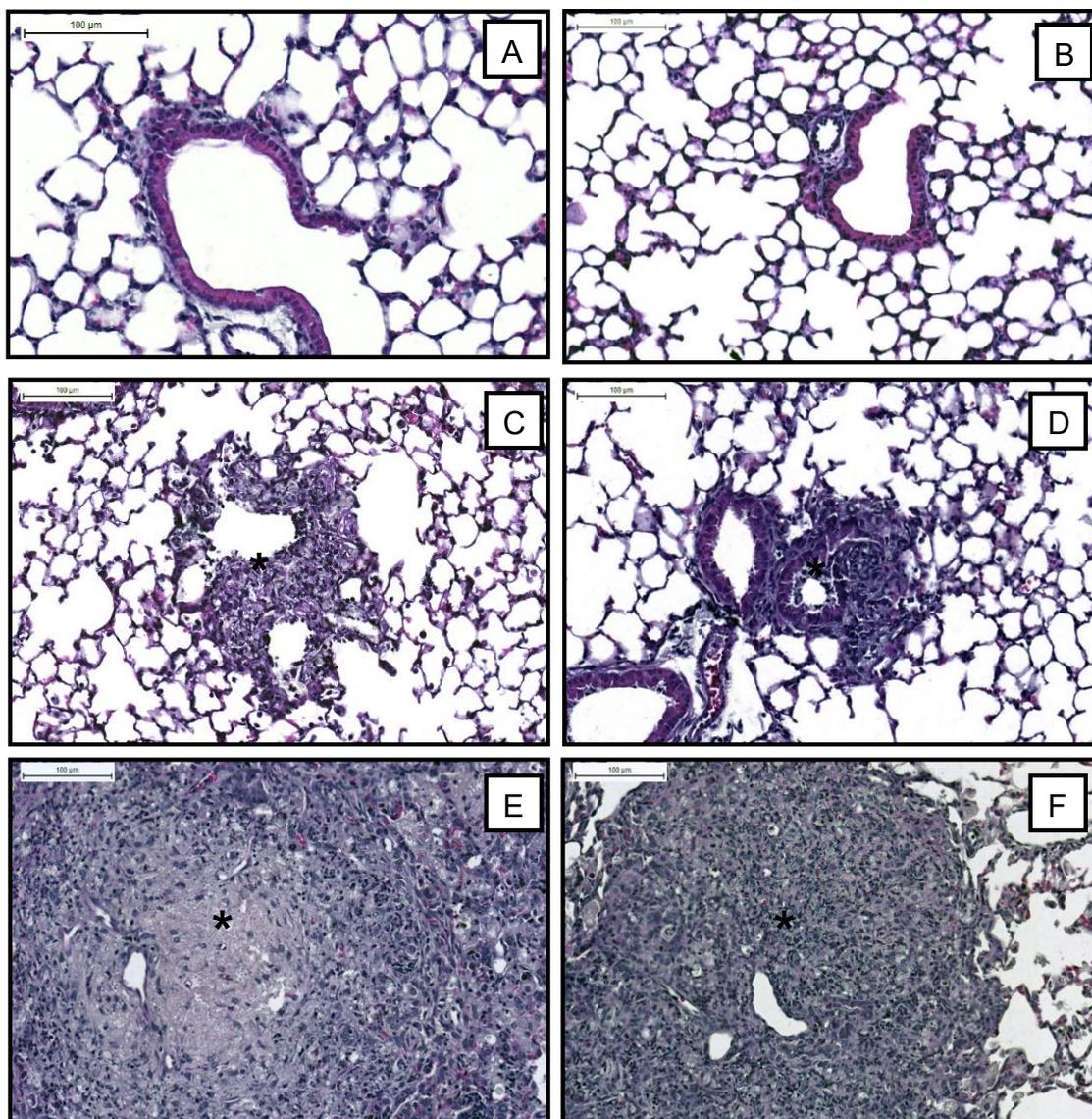


Figura 9 - Análise das alterações morfológicas no pulmão de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).

Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A, B) e sílica (C - F), coradas com HE e analisadas em microscópio de luz. Os grupos incluem os animais C57BL/6 (painéis esquerdos) e ACKR2^{-/-} (painéis direitos). As análises foram realizadas em 3 (C, D) e 28 (E, F) dias pós-sílica. As fotomicrografias representam no mínimo 6 animais por grupo. O * indica o granuloma. Aumento de 200 x.

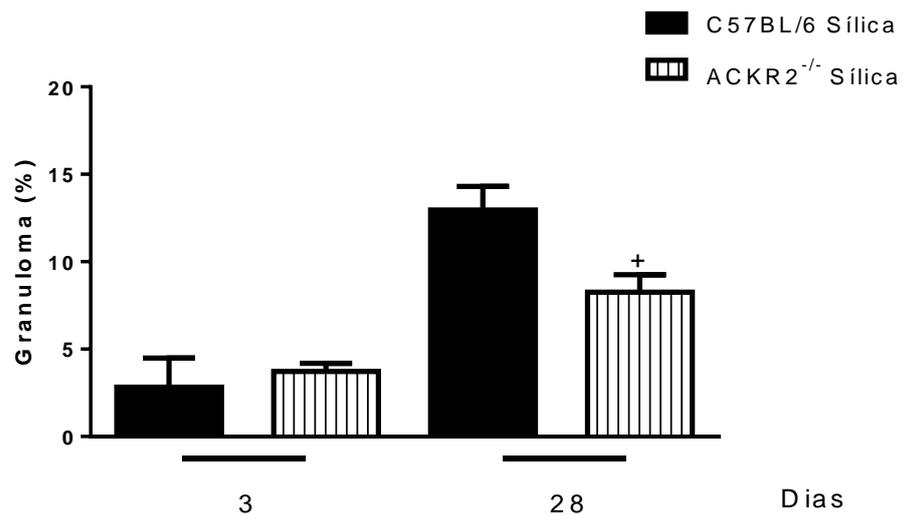


Figura 10 - Análise morfométrica de pulmões de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).

Morfometria do parênquima pulmonar de animais instilados com sílica, corados com HE e analisados em microscópio de luz no aumento de 200 x. A análise foi realizada em 3 e 28 dias pós-sílica. As colunas representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo + indica $p < 0,05$ em comparação ao respectivo grupo controle grupo C57BL/6.

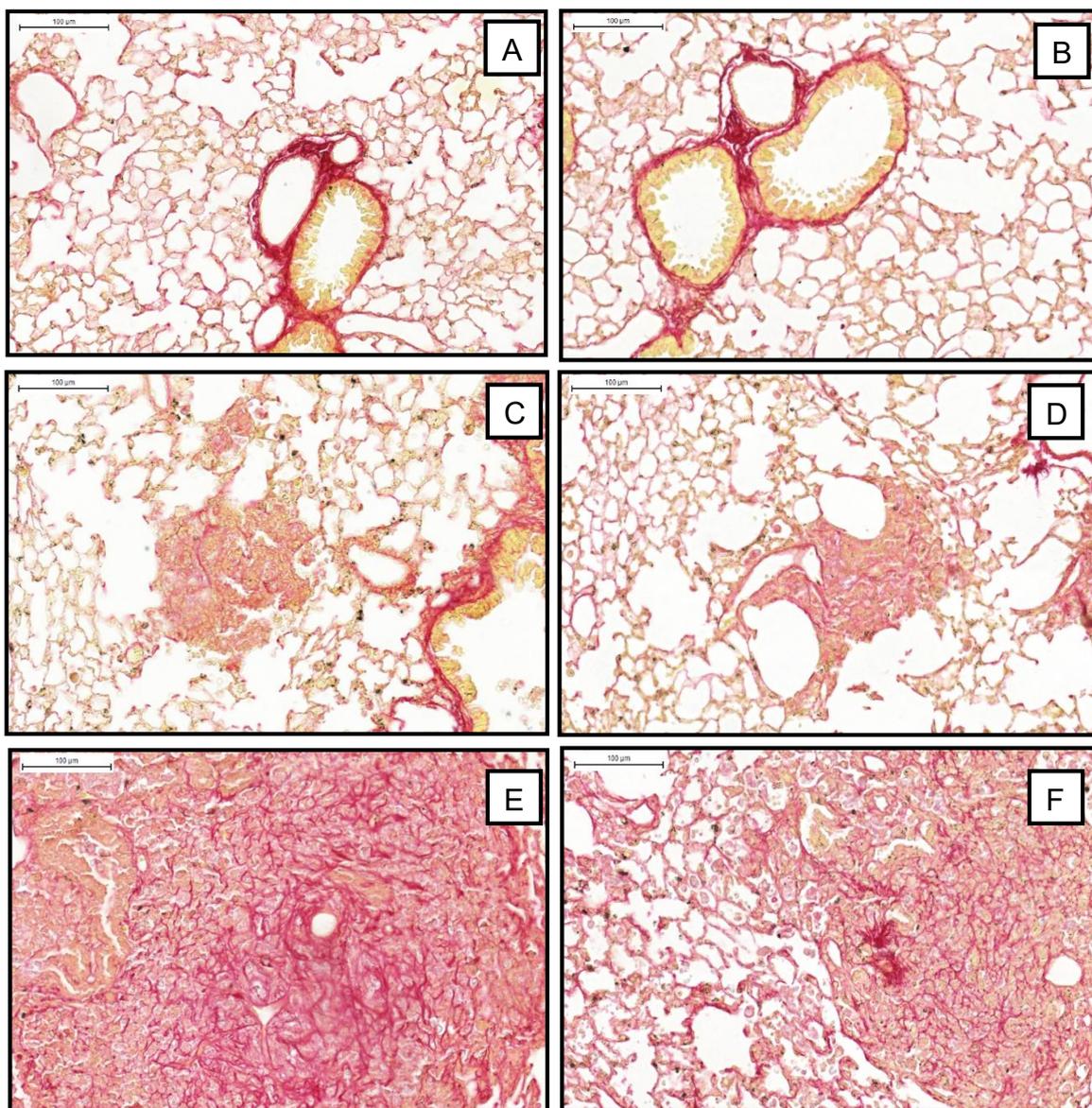


Figura 11 - Análise das alterações morfológicas no pulmão de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).

Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A, B) e sílica (C - F), coradas com PS e capturadas em microscópio de luz. Os grupos incluem os animais C57BL/6 (painéis esquerdos) e ACKR2^{-/-} (painéis direitos). As análises foram realizadas em 3 (C, D) e 28 (E, F) dias pós-sílica. As fotomicrografias representam no mínimo 6 animais por grupo. Aumento de 200 x.

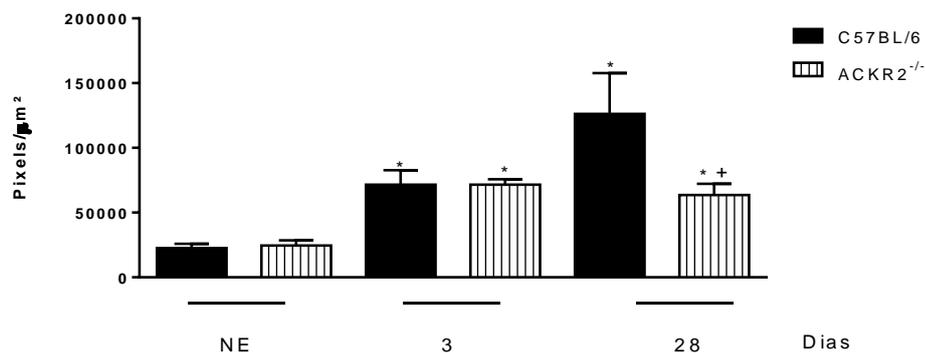


Figura 12 - Análise indireta de colágeno dos pulmões de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 μL).

Quantificação de pixels dos pulmões de animais instilados com salina (NE) ou sílica, corados com PS. Aumento de 200 x. A análise foi realizada em 3 e 28 dias pós-sílica. As colunas representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. Os símbolos * e + indicam $p < 0,05$ em comparação aos respectivos grupos NE e sílica C57BL/6.

5.8 Análise da população leucocitária no sangue periférico e medula óssea de camundongos selvagens e nocautes para o receptor ACKR2 estimulados com sílica

Tomando por base o infiltrado leucocitário difuso presente no parênquima pulmonar dos camundongos estimulados com sílica, consideramos ser relevante a análise do perfil de celularidade em outros dois compartimentos integrados à mobilização de leucócitos no organismo – sangue periférico (passagem) e a medula óssea (produção/armazenamento). Vale ressaltar que a análise revelou que camundongos selvagens e nocautes para o receptor ACKR2 apresentaram níveis similares de leucócitos totais e diferenciais tanto no sangue periférico como na medula óssea (Figuras 13 e 14).

Analisando a fase inicial da silicose, observamos uma queda nos níveis de leucócitos totais no sangue periférico, refletindo a diminuição no número de linfócitos e o aumento em neutrófilos (Figura 13 A). Em tempo mais tardio, 28 dias, vimos que ocorreu uma reversão do quadro de leucopenia, quando os camundongos silicóticos tiveram aumento no número de leucócitos totais e de neutrófilos, quando comparados aos controles. Animais selvagens mostraram também aumento no número de linfócitos no sangue (Figura 13 B).

No caso da medula óssea a análise considerou alguns tipos celulares pertencentes à linhagem linfoide incluindo os linfócitos, e a mielóide, incluindo os neutrófilos polimorfonucleares (maduros com núcleo segmentado e imaturos com núcleo em anel), eosinófilos totais e outros (demais tipos celulares como progenitores e precursores). De forma similar ao observado no sangue periférico, vimos que na fase inicial ocorreu uma diminuição no total e diferencial das células analisadas (Figura 14 A), para ambos os grupos de camundongos selvagem e nocaute. Na fase tardia, não foi verificada diferença entre os níveis de leucócitos totais, eosinófilos e de outros tipos celulares nos animais silicóticos e seus respectivos controles (Figura 14 B). Vimos redução número de linfócitos e de neutrófilos maduros e, aumento no número de neutrófilos imaturos tanto nos selvagens como nos nocautes (Figura 14 B).

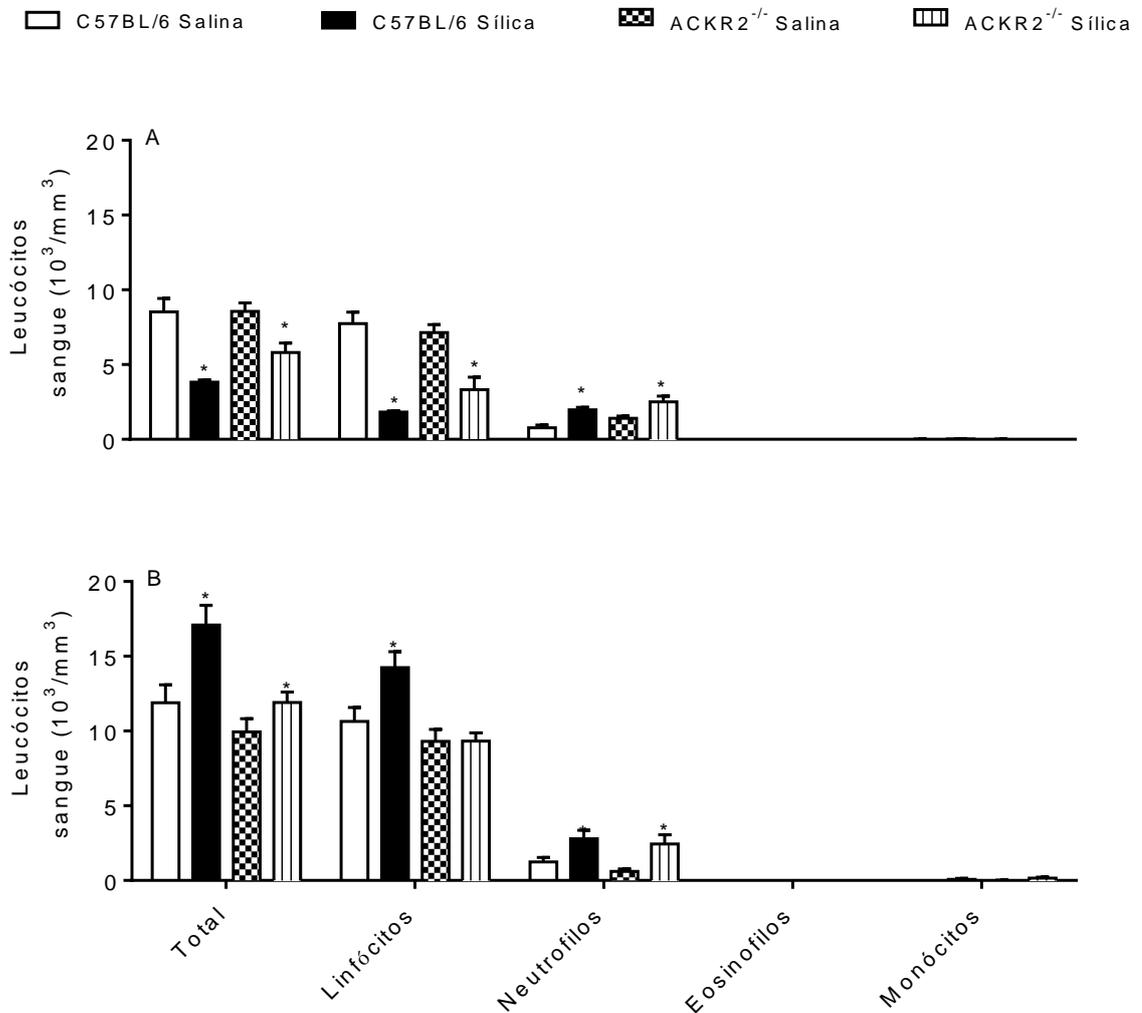


Figura 13 - Análise dos leucócitos no sangue periférico de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).

Os parâmetros de leucócitos totais e diferenciais do sangue foram avaliados no tempo de 3 (A) e 28 dias (B) pós-sílica. As colunas representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo * indica $p < 0,05$ em comparação aos respectivos animais salina (dentro do mesmo grupo, ou seja, C57BL/6 ou ACKR2^{-/-}).

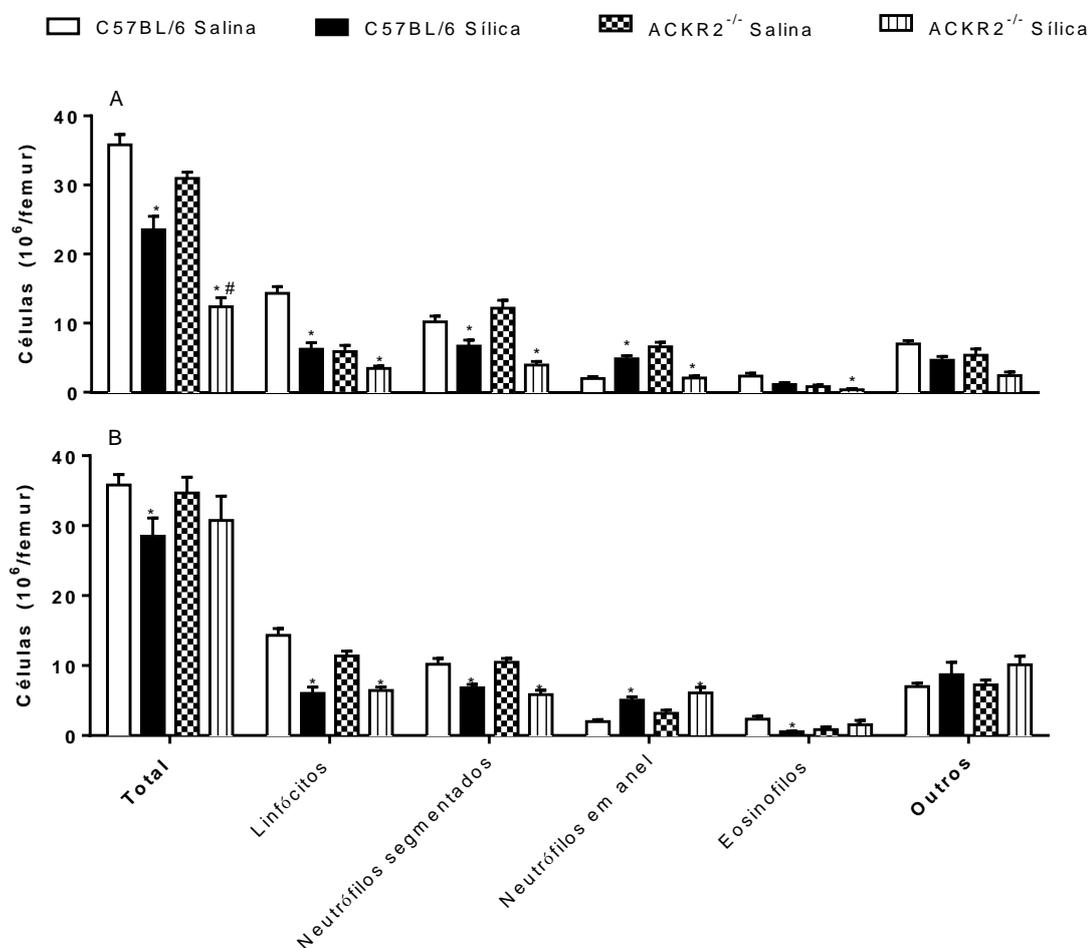


Figura 14 - Análise dos leucócitos na medula óssea de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).

Os parâmetros de leucócitos totais e diferenciais da medula óssea foram avaliados no tempo de 3 (A) e 28 dias (B) pós-sílica. As colunas representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo * e # indicam respectivamente $p < 0,05$ em comparação aos animais salina (dentro do mesmo grupo, ou seja, C57BL/6 ou ACKR2^{-/-}) e entre os grupos silicóticos (C57BL/6 e ACKR2^{-/-}).

5.9 Análise da população de macrófagos no pulmão de camundongos selvagens e nocautes para o receptor ACKR2 estimulados com sílica

Os macrófagos são células efetoras e reguladoras do sistema imune, que podem assumir uma condição de ativação clássica (fenótipo M1) ou alternativa (M2), desempenhando então um papel pró-inflamatório ou pró-resolutivo, respectivamente (81). Desta feita, considerando que os camundongos nocautes para o receptor ACKR2 mostraram redução da resposta fibrótica quando estimulados com sílica, e que os macrófagos são cruciais no contexto da silicose (82), resolvemos investigar se os macrófagos poderiam estar envolvidos neste processo. Nesta etapa do trabalho, partimos para análise imunofenotípica dos macrófagos utilizando o sistema de citometria de fluxo.

Como primeira abordagem, avaliamos o perfil de celularidade total proveniente de homogenato do tecido pulmonar e foram considerados os parâmetros de tamanho ("forward-scatter" - FSC) e granulosidade ("side-scatter"- SSC) compatíveis para seleção de possíveis macrófagos (Figura 15 A). A segunda etapa foi a utilização de anticorpo marcado com fluorocromo direcionado para reconhecimento do CD45, um marcador comum a todos os leucócitos (Figura 15 B). A partir do qual selecionamos somente as células CD45 positivas (Figura 15 C) para então analisar as marcações e gerar os gráficos (Figura 15 D).

Com essa fração de células previamente selecionadas a etapa seguinte consistiu em utilizar marcadores mais específicos na identificação de macrófagos: F4/80 (macrófagos totais), CD11b (conjuntamente com F4/80, garante a identificação de macrófagos totais) e CD206 (macrófagos do subtipo M2). A avaliação inicial e tardia qualitativa revelou o perfil de "dot-plot" referente aos macrófagos totais dos grupos selvagem e nocaute e entre os grupos salina e sílica (Figura 16). Na Figura 17 está refletida a quantidade de células marcadas positivamente para CD45, F4/80 e CD11b (macrófagos totais). Pudemos observar que na fase aguda (3 dias) somente os animais silicóticos selvagens tiveram um aumento significativo de macrófagos totais em relação aos demais grupos analisados (selvagem salina, nocaute salina e nocaute silicótico) (Figura 17 A). Em contrapartida, na fase crônica (28 dias) foi observado um aumento significativo da quantidade de macrófagos em ambos os grupos submetidos à silicose (selvagem e nocaute), sendo que esse aumento foi semelhante quando comparamos esses grupos silicóticos (Figura 17 B).

Utilizamos como ferramenta anticorpos marcados com fluorocromos para reconhecer os determinantes antigênicos CD45, F4/80 e CD206. Novamente, com o intuito de diminuir a interferência das outras populações, foram consideradas somente as células CD45 positivas. Todas as células F4/80 e CD206 duplo-positivas (F4/80⁺CD206⁺) foram consideradas como os macrófagos do subtipo M2.

A avaliação inicial e tardia qualitativa revelou o perfil de “dot-plot” referente aos macrófagos do subtipo M2 aos grupos selvagem e nocaute e entre os grupos salina e sílica (Figura 18). Na análise quantitativa, observamos que na fase aguda (3 dias) os animais selvagens não apresentam diferença estatística entre normais grupo salina e silicótico. Todavia, os nocautes apresentaram uma diminuição na quantidade de células F4/80⁺CD206⁺ em relação aos selvagens e essa diminuição foi igual quando comparamos os grupos nocaute salina e silicótico (Figura 19 A).

Ao avaliarmos a fase crônica (28 dias), observamos que não há diferença dos níveis celulares analisados entre os grupos salinas selvagem e nocaute. Porém, a sílica induziu um aumento dos níveis de células F4/80⁺CD206⁺ tanto nos camundongos selvagens quanto nos nocautes, quando comparado com os seus respectivos controles (Figura 19 B).

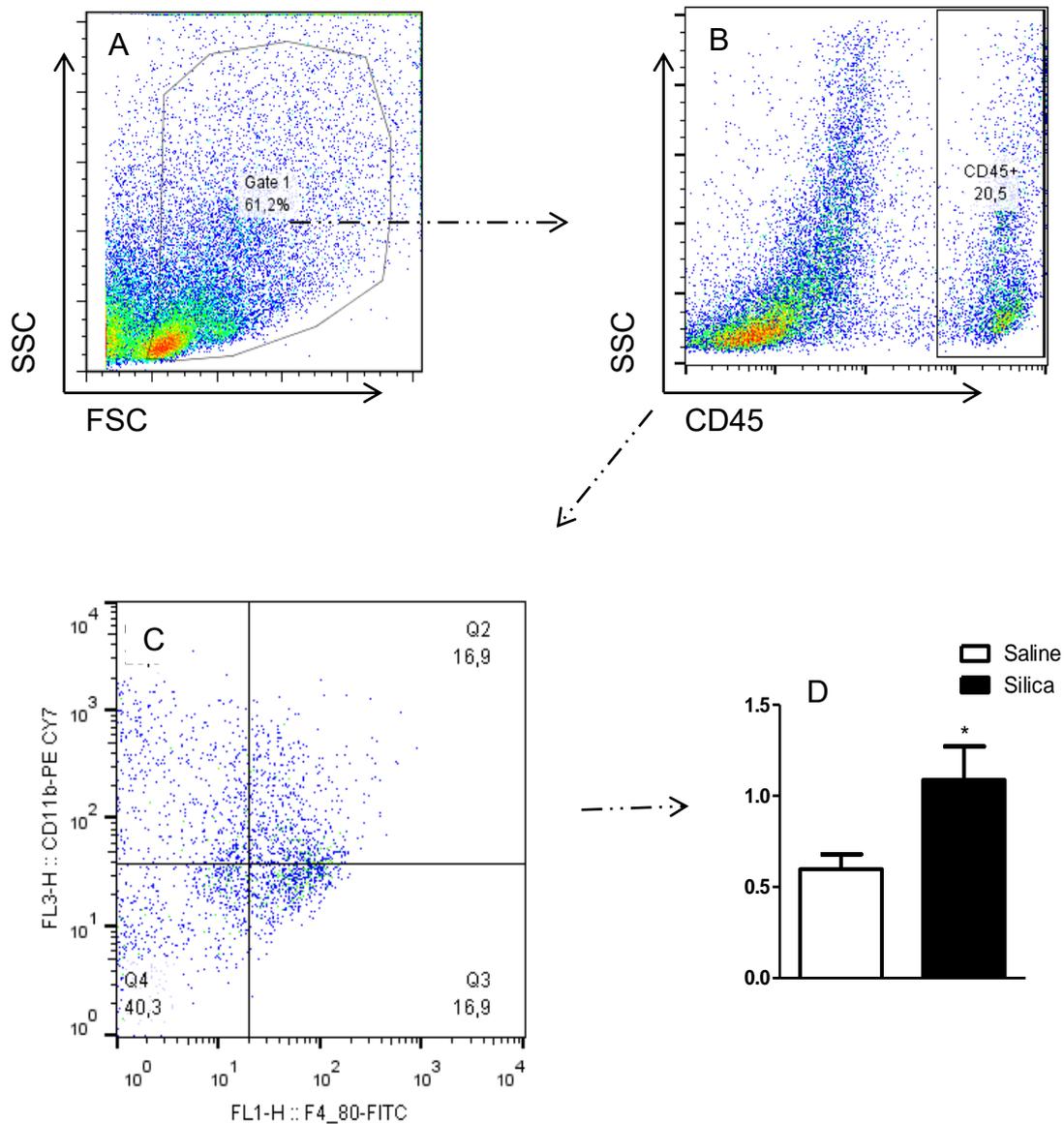


Figura 15 - Análises dos dados de citometria de fluxo dos pulmões de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com salina e sílica (10 mg/50 µL). As análises foram realizadas 3 e 28 dias após estimulação com sílica. O ensaio foi realizado através de citometria de fluxo (FACScalibur), onde: (A) “Dot-plot” de SSC e FSC, onde foram selecionadas as populações de interesse, (B) “Dot-plot” de SSC e CD45, mostrando a seleção na região positiva para CD45, (C) “Dot-plot” dos marcadores utilizados (F4/80, CD11b e CD206) e (D) Gráfico resultado da quantificação do número de eventos.

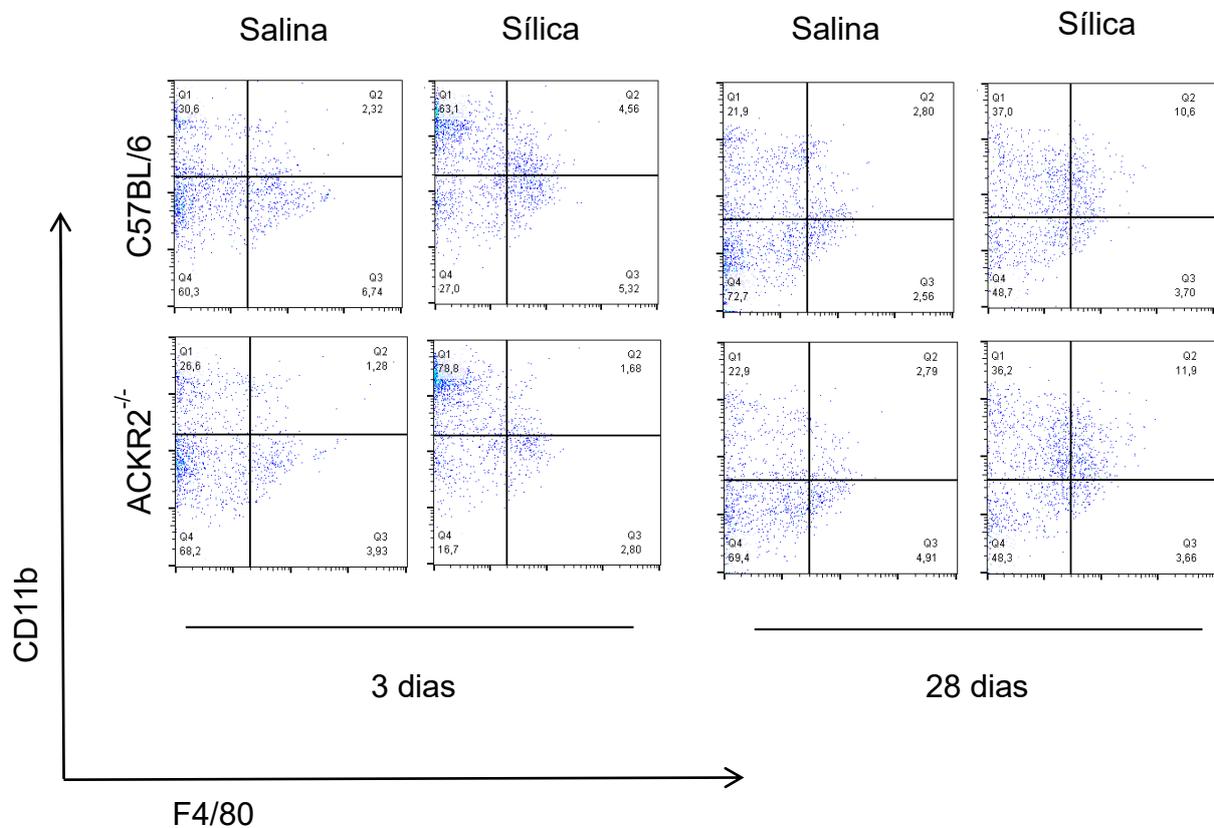


Figura 16 - Análise dos macrófagos pulmonares de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).

Os macrófagos pulmonares totais (F4/80⁺CD11b⁺) foram avaliados nos tempos de 3 e 28 dias pós-sílica. O ensaio foi realizado através de citometria de fluxo (FACScalibur).

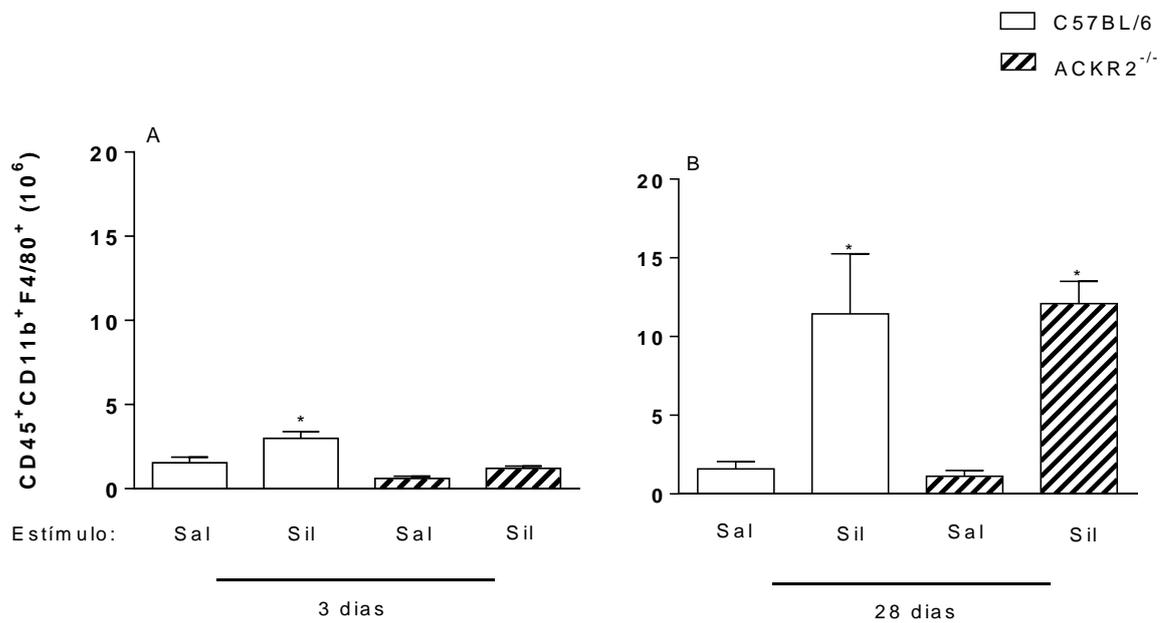


Figura 17 - Análise do perfil de macrófagos pulmonares de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).

Foram utilizados animais instilados com salina (Sal) ou com sílica (Sil), onde o perfil dos macrófagos pulmonares totais (F4/80⁺CD11b⁺) foi avaliado nos tempos de 3 e 28 dias pós-sílica. O ensaio foi realizado através de citometria de fluxo (FACScalibur). As colunas representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo * indica $p < 0,05$ em comparação aos animais C57BL/6 instilados com salina.

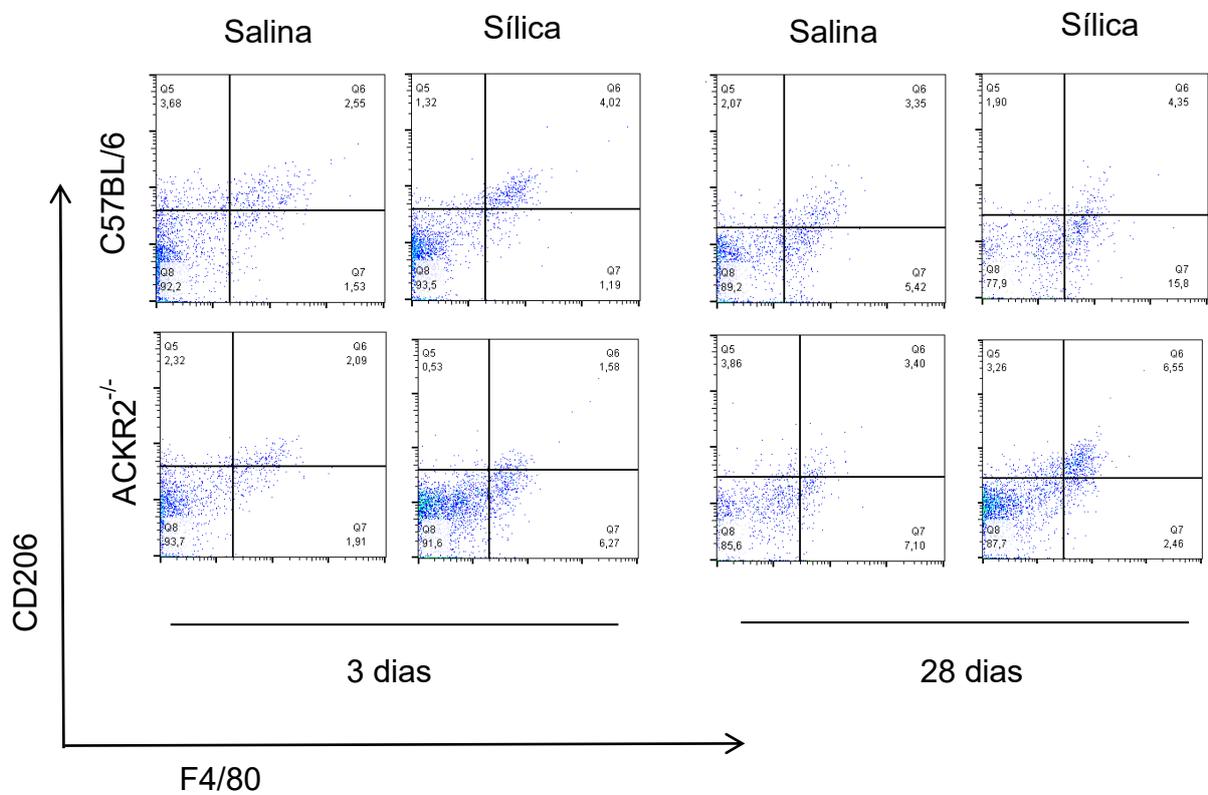


Figura 18 - Análise dos macrófagos pulmonares M2 de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).

Os macrófagos pulmonares (subtipo M2) (F4/80⁺CD206⁺) foram avaliados nos tempos de 3 e 28 dias pós-sílica. O ensaio foi realizado através de citometria de fluxo (FACScalibur).

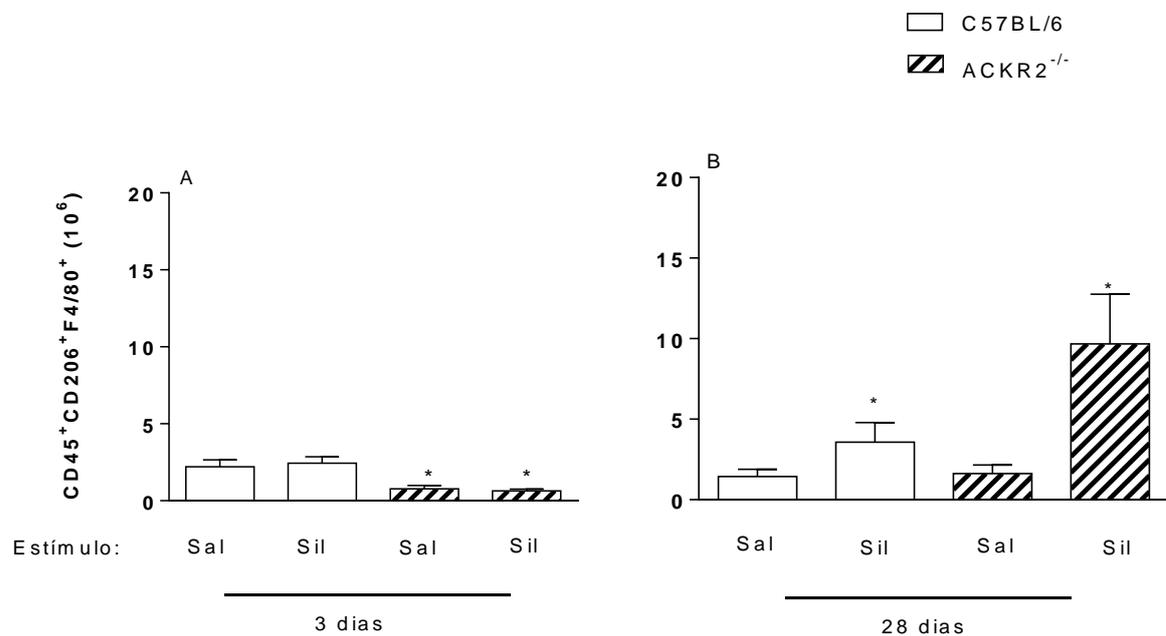


Figura 19 - Análise dos macrófagos pulmonares M2 de digerido pulmonar de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com salina e sílica (10 mg).

Foram utilizados animais instilados com salina (Sal) ou com sílica (Sil), onde o perfil dos macrófagos do subtipo M2 (F4/80⁺CD206⁺) foi avaliado no tempo de 3 e 28 dias pós-sílica. O ensaio foi realizado através de citometria de fluxo (FACScalibur). As colunas representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo * indica $p < 0,05$ em comparação aos respectivos animais C57BL/6 instilados com salina.

5.10 Análise *in vitro* da ativação de macrófagos provenientes de camundongos selvagens e nocautes para o receptor ACKR2

Nesta etapa, partimos para avaliar a reatividade de macrófagos frente à estimulação *in vitro*. Em uma primeira abordagem, utilizamos macrófagos recuperados da cavidade peritoneal de camundongos selvagens e nocautes não estimulados. As células foram submetidas à estimulação com LPS (0,5 µg/mL) e sílica (12,5 µg/mL) e depois feita quantificação de IL-6 e TNF-α liberados no sobrenadante. Como ilustrado na Figura 20, a estimulação de macrófagos selvagens com sílica e LPS induziu a produção de IL-6 (Figura 20 A) e TNF-α (Figura 20 B), enquanto que os macrófagos nocautes mostraram menor liberação das citocinas frente ao LPS e refratariedade à estimulação com a sílica (Figura 20 A, B).

Em um segundo momento, foi utilizado o sistema de macrófagos derivados de medula, tendo como fonte animais selvagens e nocautes para o receptor ACKR2. Após incubação com meio enriquecido de M-CSF por 7 dias, os macrófagos M0 foram submetidos à polarização mediante incubação com IFN-γ (para diferenciação preferencial no subtipo M1) e IL-4 (para diferenciação preferencial no subtipo M2). Ao final, ambas as populações foram ativadas com LPS (100 µg/mL) ou sílica (125 µg/mL), e feita quantificação das citocinas/quimiocinas liberadas no sobrenadante. Verificamos que a estimulação com LPS, nos macrófagos subtipo M1 levou ao aumento da liberação das citocinas TNF-α e IL-1β tanto na população provinda de animais selvagens quanto nas de nocautes, em relação aos seus respectivos controles (Figura 21 A, B). Por outro lado, a estimulação dessas mesmas células com sílica levou ao aumento da liberação somente de TNF-α na população de células provenientes de animais selvagens (Figura 21 A).

Quanto a população de macrófagos subtipo M2 verificamos que a estimulação com LPS levou ao aumento da liberação das citocinas CCL22/MDC (Figura 22 A) e CCL17/TARC (Figura 22 B) tanto na população provinda de animais selvagens quanto nas de nocautes, em relação aos seus respectivos controles (Figuras 22 A, B). Vale ressaltar que o aumento de CCL17/TARC foi maior nas células providas de animais selvagens (Figura 22 B). Por outro lado, a estimulação dessas mesmas células com sílica não levou a modificações significativas na liberação das citocinas CCL22/MDC e CCL17/TARC (Figuras 22 A, B).

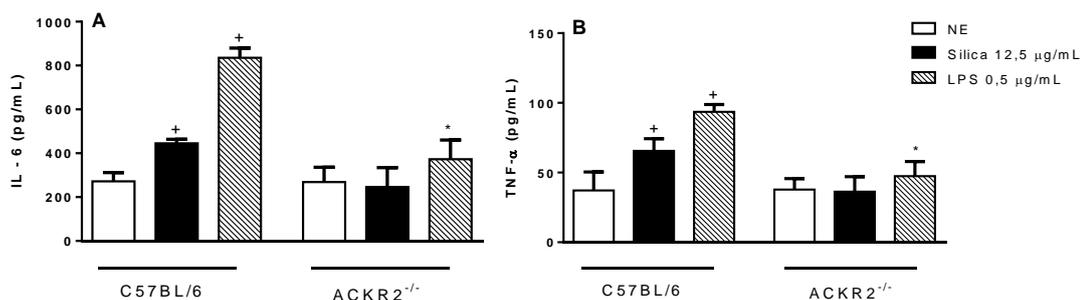


Figura 20 - Análise da ativação dos macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 μL).

As células foram incubadas com meio de cultura (NE) ou estímulos de sílica (12,5 μg/mL) e LPS (0,5 μg/mL). Os níveis de IL-6 (A) e TNF-α (B) foram quantificados a partir do sobrenadante obtido 6 horas pós-estímulos. As colunas representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo + e * indicam respectivamente p < 0,05 em comparação às células NE (dentro do mesmo grupo, ou seja, C57BL/6 ou ACKR2^{-/-}) e ao grupo selvagem (com a estimulação correspondente).

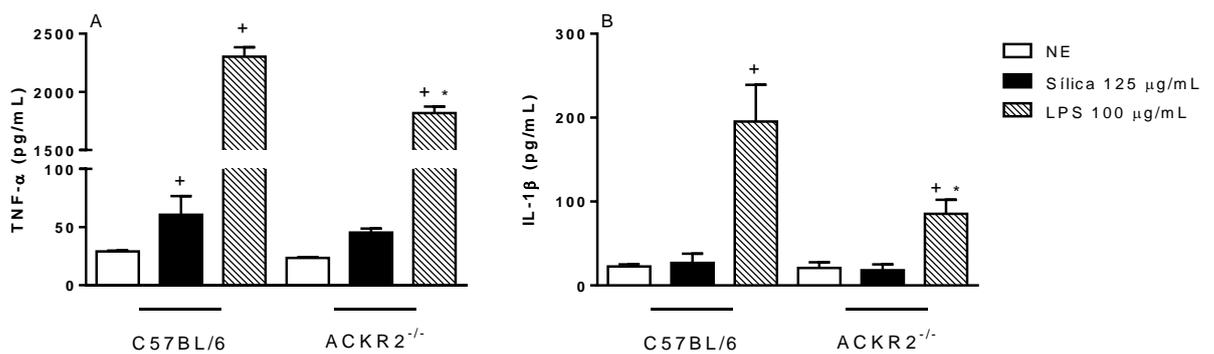


Figura 21 - Análise da ativação dos macrófagos perfil M1 diferenciados de medula óssea de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 μL).

As células foram diferenciadas com IFN-γ e incubadas com meio de cultura (NE) ou estímulos de sílica (125 μg/mL) e LPS (100 μg/mL). Os níveis de TNF-α (A) e IL-1β (B) foram quantificados a partir do sobrenadante obtido 48 horas pós-estímulos. As colunas representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo + e * indicam respectivamente p < 0,05 em comparação às células NE (dentro do mesmo grupo, ou seja, C57BL/6 ou ACKR2^{-/-}) e ao grupo selvagem (com a estimulação correspondente).

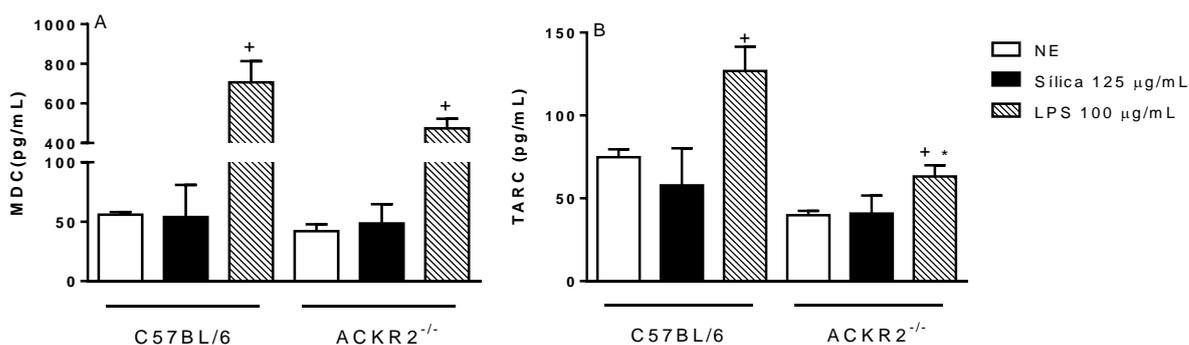


Figura 22 - Análise da ativação dos macrófagos perfil M2 diferenciados de medula óssea de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).

As células foram diferenciadas com IL-4 e incubadas com meio de cultura (NE) ou estímulos de sílica (125 µg/mL) e LPS (100 µg/mL). Os níveis de MDC (A) e TARC (B) foram quantificados a partir do sobrenadante obtido 48 horas pós-estímulos. As colunas representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo + e * indicam respectivamente $p < 0,05$ em comparação às células NE (dentro do mesmo grupo, ou seja, C57BL/6 ou ACKR2^{-/-}) e ao grupo selvagem (com a estimulação correspondente).

5.11 Análise do processo de adesão e rolamento *ex vivo* de leucócitos de camundongos selvagens e nocautes para os receptores ACKR2

Avaliamos a resposta de adesão e rolamento de leucócitos do sangue circulante através de ensaio de microscopia intravital. A Figura 23 mostra o quantitativo de leucócitos nas etapas de adesão e rolamento ao endotélio vascular na ausência de estimulação. As células provenientes dos animais nocautes para o receptor ACKR2 apresentaram índice de rolamento (Figura 23 C) e adesão (Figura 23 D) inferior quando comparado com as dos animais selvagens. Ensaio complementares estão previstos para a avaliação destes mesmos parâmetros na condição de estimulação com agonistas indutores de recrutamento leucocitário.

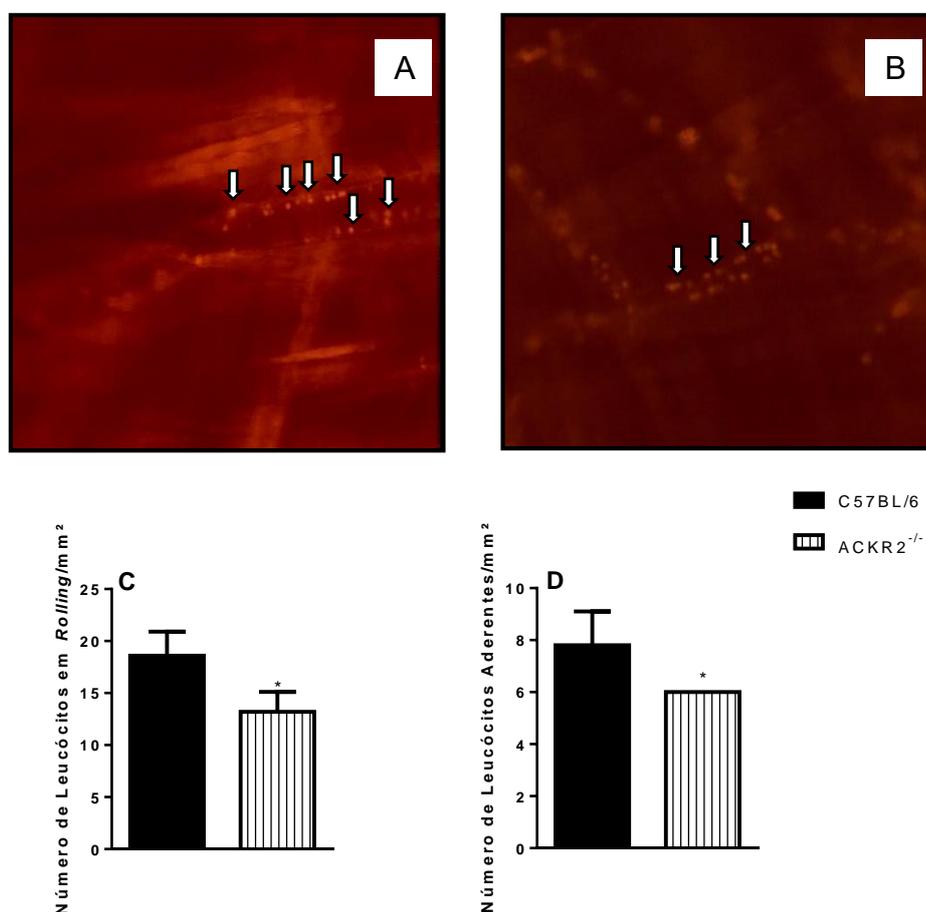


Figura 23 - Análise da adesão e rolamento dos leucócitos sanguíneos de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).

(A) Fotomicrografias da microcirculação do C57BL/6. (B) Fotomicrografias da microcirculação do ACKR2^{-/-}. (C) Número de leucócitos em rolamento e (D) Número de leucócitos aderentes. O ensaio foi realizado utilizando a técnica de microscopia intravital. As setas indicam os locais de adesão leucocitária. As colunas representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 5 animais por grupo. O símbolo * indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo C57BL/6.

5.12 Análise das partículas de sílica no pulmão de camundongos selvagens e nocautes para o receptor ACKR2 estimulados com sílica

A presença das partículas de sílica no pulmão é um parâmetro de análise importante no caso de pneumoconioses, uma vez que as partículas possuem efeito residual. No caso das partículas de sílica, existe um fenômeno de birrefringência que permite que estas sejam identificadas através do sistema de microscopia de polarização (77). Assim, é possível ser feita utilização de cortes histológicos e visualização das partículas em azul brilhante (Figura 24). A contagem de pixels comparando as fases aguda (3 dias) e crônica (28 dias) mostrou uma tendência de redução no conteúdo de partículas de sílica presentes no pulmão dos camundongos selvagens crônicos, sugerindo drenagem das partículas para o sistema linfático. Por outro lado, não houve diferença significativa da quantidade de partículas de sílica quando comparamos o grupo de animais nocautes na fase aguda e crônica (Figura 25). Se focarmos a análise na fase crônica, vemos que há significativamente menos partículas no grupo selvagem quando comparado ao grupo nocaute para o receptor ACKR2.

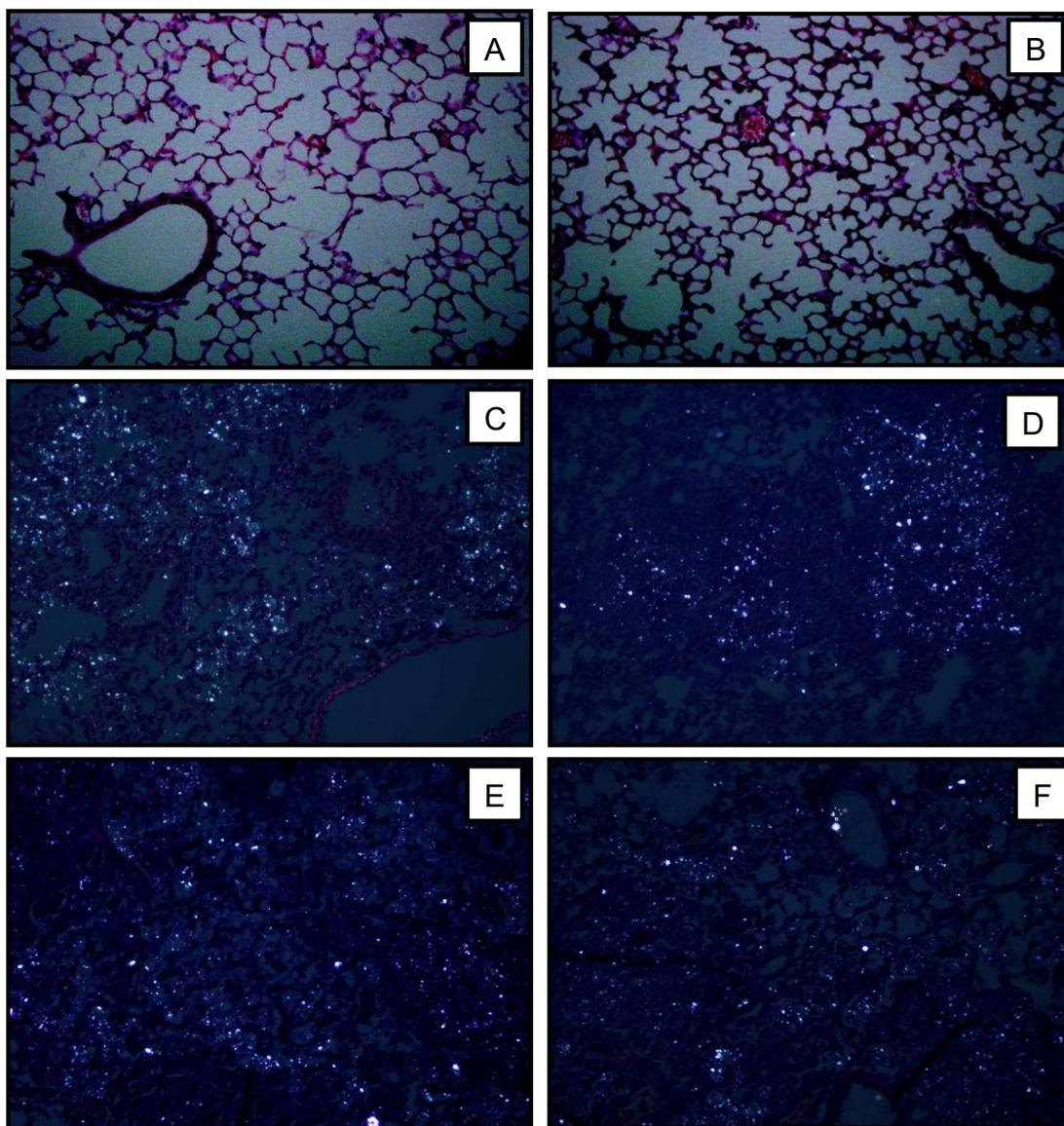


Figura 24 - Análise da presença de partículas de sílica nos pulmões de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 μ L).

Os grupos incluem os animais C57BL/6 (painéis esquerdos) e ACKR2^{-/-} (painéis direitos), com os respectivos grupos salina (A, B), sílica 3 dias (B) e sílica 28 dias (F). Os cortes foram corados com HE e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz através de um sistema de luz polarizada. Foram utilizados no mínimo 6 animais por grupo. Aumento de 200 x.

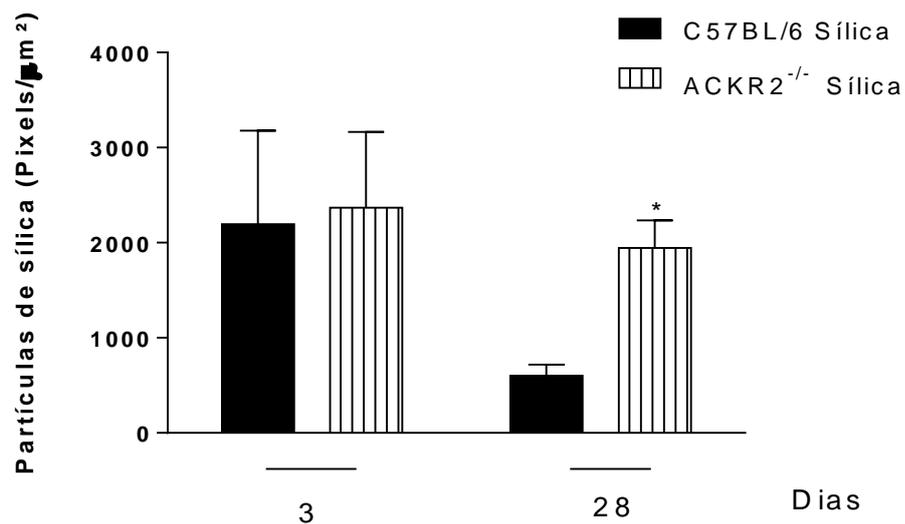


Figura 25 - Quantificação das partículas de sílica nos pulmões de camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-} instilados com sílica (10 mg/50 µL).

Os cortes foram corados com HE e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz através de um sistema de luz polarizada. Aumento de 200 x. Os valores representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. Os símbolos * denota $p < 0,05$ em comparação ao respectivo grupo C57BL/6.

6 DISCUSSÃO

As partículas de sílica, quando inaladas, induzem a ocorrência de uma resposta inflamatória de caráter crônico e altamente fibrosante nos pulmões (25). Vários estudos têm sido desenvolvidos no sentido de compreender os mecanismos envolvidos na silicose, de forma a identificar potenciais alvos terapêuticos e, conseqüentemente, permitir a descoberta de um tratamento eficaz (83, 84). No entanto, pesquisas em humanos esbarram na esfera da ética, dentre outras limitações (85). A utilização de camundongos como a principal espécie para o modelo experimental se deve, entre outros motivos, ao fato desses animais compartilharem grande semelhança genética (mais de 70%) com os seres humanos (86).

Atualmente existem quatro formas de indução experimental da silicose em modelos animais: aerossolização, aspiração orofaríngea, injeção intratraqueal e instilação intranasal. Dentre elas, a aerossolização é a forma que mimetiza mais proximamente ao que ocorre com pacientes portadores de silicose. Contudo, essa técnica é a mais onerosa, implicando prolongados períodos de exposição aos aerossóis (5 h por dia durante 12 dias), além de serem utilizadas grandes quantidades de sílica (60). Na aspiração orofaríngea, uma determinada quantidade de suspensão de sílica é colocada na boca do animal concomitantemente com a imobilização da sua língua, evitando assim o reflexo da deglutição. Então, ao induzir o fechamento das narinas do camundongo ocorre uma respiração forçada onde a sílica é aspirada e depositada nos pulmões (87). Todavia, essa técnica possui uma alta possibilidade de gerar traumas físicos aos animais. Outro método utiliza a injeção intratraqueal de sílica. Para isso, uma dissecação da traqueia dos animais é necessária para a injeção da suspensão de sílica com auxílio de uma cânula e seringa (88). Esse método é altamente invasivo, exigindo elevado grau de competência técnica e necessidade de treinamento acurado. Soma-se a isso o fato da injeção intratraqueal possuir alta taxa de insucesso (87). Por fim, há a técnica de instilação de sílica por via intranasal, desenvolvida em nosso laboratório (80). Apesar desse procedimento possuir limitações, como demandar anestesia prévia por inalação e uso obrigatório da capela de exaustão, a instilação intranasal mostrou ser mais simples, eficaz, além de possuir a melhor relação tempo e custo-benefício dentre as atuais técnicas para indução da silicose. Dados na literatura mostram que todos os métodos de exposição testados são capazes de gerar inflamação e fibrose significativas entre os grupos de sílica (89). Por isso, optamos por utilizar a instilação de sílica (in) em nosso modelo de silicose

murina. Após inúmeros testes em nosso laboratório, foi escolhida a dose de 10 mg de sílica por camundongo por melhor reproduzir as características fisiopatológicas da silicose no ser humano (80).

De forma inicial, nossos dados do perfil histológico da silicose aguda (3 dias após a exposição) e crônica (28 dias) em camundongos Swiss-Webster ratificam achados prévios de nosso grupo utilizando esse modelo experimental para estudo da silicose (77, 80). Nossos resultados com a técnica de HE (Figura 3) revelou uma morfologia íntegra nos animais instilados com salina, os quais apresentaram parênquima e vias aéreas bem preservados. Todavia, nos animais silicóticos foi possível observar que após 3 dias de exposição apresentavam um princípio de resposta inflamatória, com transudado, infiltrado celular difuso, espessamento de septos alveolares e o início da formação de granulomas. Na fase crônica (28 dias) pudemos observar uma intensificação da resposta inflamatória quando comparada com o grupo submetido à exposição aguda. Os animais silicóticos crônicos apresentaram uma intensa resposta fibrótica e granulomatosa no parênquima pulmonar (Figura 3). Esses resultados iniciais revelam que a sílica inalada é capaz de disparar uma inflamação que se torna persistente levando a formação de áreas de fibrose no tecido pulmonar. Nossos dados estão de acordo com outros da literatura, onde a fibrose pulmonar inicia-se como pequenos nódulos e evolui temporalmente para formações compostas de enormes granulomas coalescidos (90). Geralmente, ocorre uma progressiva formação de granulomas na silicose, com ênfase na fase crônica da doença, sendo eles encontrados em sua maioria nas porções superiores e posteriores dos pulmões (25). Essas análises qualitativas foram ratificadas com a morfometria, que revelou a existência de um aumento progressivo da área de parênquima pulmonar ocupada pelos granulomas (Figura 3 E). No geral, as alterações pulmonares decorrentes da inalação das partículas de sílica podem causar desde um simples nódulo até uma massa de fibrose intersticial nos pulmões e essa variação de resposta depende do tempo de exposição, da quantidade e do tamanho da partícula inalada (37). A sílica depositada no parênquima pulmonar promove um desequilíbrio entre as enzimas que degradam a matriz, ou seja, as metaloproteinases (MMPs) e as inibidoras de metaloproteinases (TIMPs), tendendo a haver estimulação da produção em excesso das MMPs (no local de deposição de partículas), além de migração e proliferação de fibroblastos nos sítios inflamatórios (produzindo mais componentes de matriz), ocorrendo dano nos tecidos pulmonares principalmente nas fases iniciais da inflamação decorrente da sílica (91). Como efeito há um ininterrupto remodelamento

das estruturas das grandes e pequenas vias aéreas, o que inclui a perda da integridade epitelial, espessamento da membrana basal, fibrose subepitelial, aumento da massa do músculo liso, das células caliciformes e das glândulas mucosas, redução da integridade da cartilagem, neovascularização e alterações no epitélio (92). Tudo isso resulta em um processo de substituição do parênquima pulmonar por componentes de matriz extracelular, comprometendo o seu caráter elástico e influenciando na função pulmonar (93).

Como a silicose é uma doença respiratória, avaliamos a função pulmonar dos camundongos da cepa Swiss-Webster, através de um pletismógrafo de corpo inteiro invasivo nos tempos de 3 a 28 dias após a indução da silicose. De acordo com os resultados obtidos, os animais silicóticos mostraram uma resposta basal de resistência e elastância pulmonar maior que os controles instilados com salina, em todos os tempos analisados. Na condição de estimulação com o agonista colinérgico metacolina, os grupos silicóticos apresentaram uma resposta mais exacerbada, em ambos os parâmetros analisados (resistência e elastância), quando comparados aos animais instilados somente com salina, caracterizando assim um quadro de hiper-reatividade pulmonar (Figura 2). Este fenômeno ocorre em determinadas doenças inflamatórias crônicas, como a asma brônquica, na qual ao entrar em contato com algum alérgeno há uma resposta mais intensa do que a esperada da musculatura lisa adjacente às vias respiratórias, o que leva a uma exacerbada broncoconstrição (94). Em conjunto, nossos achados indicam que o aumento da inflamação, a perda da integridade do parênquima pulmonar e a formação de granulomas decorrentes da inalação da sílica, estão correlacionados com maiores níveis da função pulmonar e a presença de hiper-reatividade nas vias aéreas em nosso modelo murino de silicose. Em parte, porque as partículas de sílica geram danos irreversíveis no epitélio pulmonar, causando inflamação sustentada e fibrose, que gera um remodelamento tecidual (95). Além da obstrução respiratória, as partículas aumentam a fosforilação de MAPK resultando no favorecimento da contratilidade das vias aéreas e da hiper-reatividade pulmonar, envolvida nesse processo da silicose (96).

Na silicose, grande parte da inflamação é sustentada pela produção e liberação de diversas quimiocinas, como MCP-1/CCL2, MIP/CCL3 e MDC/CCL22, o que torna essas moléculas mediadoras relevantes no contexto da doença (97). Nesse âmbito, o receptor atípico de quimiocina ACKR2 é incapaz de ligar-se à proteína G, logo não transduz o sinal intracelular da quimiocina (98). Por esse motivo, o ACKR2 tem sido apontado até o presente momento com um potencial efeito anti-inflamatório em alguns

modelos de doenças investigadas, tais como em modelo de psoríase (99). Há também um outro estudo apontando a expressão do ACKR2 na camada de sincitiotrofoblasto da placenta como supressora da resposta inflamatória da mãe em referência ao feto. Em doenças inflamatórias hepáticas o ACKR2 desempenha um papel modulador importante, já que animais nocautes para ACKR2 são mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença (100). Além disso, há indícios na literatura que apontam para um papel do ACKR2 na regulação das doenças cardiovasculares, com maior suscetibilidade à inflamação excessiva e remodelamento ventricular pelos animais nocautes, após infarto do miocárdio (101). Nesse contexto, até o presente momento poucos foram os avanços para se obter uma estratégia terapêutica para a silicose. Sendo assim, conhecendo o potencial anti-inflamatório do ACKR2, analisamos o efeito do mesmo sobre a inflamação pulmonar induzida por partículas de sílica, evento esse ainda não investigado.

Em nosso estudo, de forma a pesquisar o receptor ACKR2 na silicose e considerando a inexistência de um anticorpo que reconheça este receptor em camundongos, partimos para analisar a expressão do RNAm no pulmão destes animais. Seguindo estratégia anterior de indução de silicose em camundongos Swiss-Webster e C57BL/6, foi realizada uma análise cinética da expressão de ACKR2 em tempos variando de 1 a 28 dias após a provocação com sílica. Nossos resultados, utilizando animais Swiss-Webster (Figura 4), mostraram que a expressão do receptor ACKR2, no tempo de 1 dia pós-sílica, se mantém em nível similar a dos grupos controles negativos, diminuindo a expressão em 3 dias e mantendo-se reduzida nos tempos seguintes. Ao avaliarmos a cepa C57BL/6 (Figura 5), observamos uma reprodução daquele fenômeno anterior, no qual ocorreu uma expressão significativamente menor de RNA mensageiros para ACKR2 entre os tempos 3 a 28 dias. Nosso dado está de acordo com outro estudo que mostra que a expressão do receptor ACKR2 diminui em adenocarcinomas do cólon, resultando na não degradação das quimiocinas (CC pró-inflamatórias) e no consequente aumento dos níveis delas (102). De certa maneira, a diminuição da expressão do ACKR2 pode acontecer através de uma regulação negativa da resposta celular induzida por ativação de receptores, onde pode ocorrer a dessensibilização, a internalização (ou sequestro de receptores) e a diminuição do número de receptores ou “downregulation” da expressão dos seus respectivos genes, com o estabelecimento na doença (102-104).

Na sequência, partimos para a utilização de uma ferramenta biológica importante, que são os animais geneticamente modificados, ou seja, com deleção do gene codificante para o receptor ACKR2 (74). Diversos parâmetros foram avaliados no sentido de permitir o esclarecimento acerca do receptor ACKR2 na silicose, conforme iremos observar a seguir.

Estudos prévios na literatura já demonstraram a importância da ingesta e do peso corporal no desenvolvimento de determinados tipos de doenças (105, 106). Em nossos dados, verificamos que não foram observadas diferenças entre os grupos analisados, tendo os camundongos ingerido, em média, aproximadamente 2 g de ração/camundongo/dia. De acordo com o manual de cuidados com animais de laboratório da Universidade de São Paulo (107), o consumo diário de ração pelos camundongos é em torno de 5 g/camundongo/dia. Porém, essa diferença pode ser justificada em função da cepa de camundongo em questão, já que a variabilidade é uma particularidade entre as várias cepas normal. (108). Muito embora não tenha ocorrido alteração da ingesta dos camundongos C57BL/6 e ACKR2^{-/-}, controles e silicóticos (Figura 6), estes últimos apresentaram uma queda no peso corporal em tempos agudos (1 e 3 dias) após estimulação com sílica, quando comparados aos respectivos grupos controles. Este fenômeno pode estar relacionado à capacidade da sílica de influenciar a termogênese nestes animais, já que a perda de massa corporal pode ocorrer de forma independente da ingesta de ração, devido à ativação e modulação de genes envolvidos com a β -oxidação e termogênese nos tecidos adiposos (branco e pardo) (106).

Em nosso modelo de silicose por instilação (in), as análises morfológicas utilizando nocautes para ACKR2 e selvagens nos tempos de 3 e 28 dias após a instilação de sílica, que incluíram a coloração do tecido com hematoxilina e eosina (Figura 9), mostraram que os pulmões dos animais controles selvagens e nocautes apresentavam aspecto normal, enquanto que nos grupos silicóticos agudos (3 dias) foi evidenciada uma resposta inflamatória intensa e a presença de células dispersas no parênquima pulmonar, somada ao conteúdo de partículas presentes no interior das vias aéreas (tanto para os selvagens quanto para os nocautes, quando comparados com os seus respectivos controles). Notamos uma evolução da resposta inflamatória e de fibrose tecidual, com comprometimento de áreas adjacentes aos bronquíolos nos animais, após 28 dias do desafio com a sílica tanto para os selvagens quanto para os nocautes. Nesses grupos silicóticos crônicos observamos uma intersticialização do processo fibrótico e formação de granuloma, que mostraram aspecto de maior

densidade e delimitação de bordos em relação aos seus respectivos controles. Todavia, de forma não esperada os silicóticos nocautes tiveram uma resposta menos exacerbada na fase crônica descrita. A avaliação morfométrica, realizada mediante uso de um retículo de linhas e pontos, confirmou de forma quantitativa as observações anteriores (Figura 10). De forma semelhante, existem provas na literatura mostrando que o ACKR2 pode funcionar de maneira pró-inflamatória em modelo de colite murino induzido por dextrano sulfato de sódio (DSS), apresentando uma redução dos sintomas e da susceptibilidade à colite por DSS em animais nocautes para o ACKR2 (109). Especulamos então que esse receptor pode atuar de diferentes maneiras, de acordo com os modelos de doenças inflamatórias. Porém, esse mecanismo ainda não está elucidado, devendo ser realizados mais estudos para o maior entendimento dele.

Em uma análise complementar, ao observar as fibras colágenas, principal componente da matriz extracelular (Figura 11), nos animais silicóticos selvagens e nocautes, notou-se um marcado aumento no conteúdo de fibras colágenas no parênquima pulmonar, em relação aos seus grupos controles. Concordando com nossos dados morfológicos, os animais nocautes silicóticos apresentaram uma redução destas fibras colágenas quando comparados aos selvagens silicóticos. A análise quantitativa de contagem de pixels confirmou os dados qualitativos (Figura 12). Esses dados estão de acordo com outros indícios na literatura, onde a deleção do gene para ACKR2 reduziu a inflamação e fibrose renal nos animais, conferindo aos nocautes alto grau de proteção da função dos rins, apesar da hiperglicemia (110). É possível que os danos nos pulmões iniciados pelas partículas de sílica sejam mais eficientemente minimizados em animais nocautes. Também, a reparação mais rápida do dano diminui as chances de desenvolver inflamação crônica. Esse processo pode estar associado à polarização dos macrófagos, que nos tecidos amadurecem e são ativados em uma resposta dinâmica às combinações dos estímulos do microambiente, como as quimiocinas, para adquirir fenótipos funcionais especializados, como o subtipo M1 (resposta mais inflamatória) e subtipo M2 (resposta mais de reparo) (81). Logo, no contexto da silicose, pode haver maior facilidade de desenvolver macrófagos do subtipo M2 nos animais nocautes, justificando o fato deles terem menos resposta inflamatória e, conseqüentemente, menos colágeno.

De forma a verificar se estas alterações podem refletir modificações na função pulmonar, utilizamos o sistema de pleustimografia barométrica de corpo inteiro para esta análise (Figuras 7 e 8). De maneira coerente ao observado na análise histológica, verificamos que tanto em 3 quanto em 28 dias após a estimulação com sílica, os

camundongos nocautes apresentaram menor resposta quanto ao aumento de resistência e elastância, assim como de hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina, quando comparados aos selvagens. Nossos dados tomados em conjunto, indicam que a ausência do receptor ACKR2 pulmonar parece favorecer uma inibição da resposta inflamatória/fibrótica, que é refletida nos dados de função pulmonar e hiper-reatividade dos nocautes.

Considerando que o processo de recrutamento celular local se coloca como crucial na resposta inflamatória, e que este fenômeno envolve a mobilização de leucócitos entre diferentes compartimentos como sangue periférico e medula óssea, avaliamos o perfil de leucócitos nesses locais (Figuras 13 e 14, respectivamente). Vimos que a análise do sangue periférico revelou, 3 dias após o desafio com a sílica, níveis de leucócitos equivalentes nos grupos controles selvagens e nocautes (C57BL/6 e ACKR2^{-/-}, respectivamente), porém com redução nos grupos silicóticos em ambos os casos. Quanto à contagem diferencial, vimos que linfócitos apresentaram perfil similar ao encontrado para os leucócitos totais descrito anteriormente. Por outro lado, os neutrófilos mostraram valores mais elevados nos animais silicóticos quando comparados aos seus respectivos controles salina, sendo que esse aumento foi maior para o grupo nocaute de ACKR2. Monócitos e eosinófilos não mostraram qualquer alteração entre os grupos experimentais tanto no sangue periférico quanto na medula óssea.

A análise do sangue periférico mostrou, 28 dias após o desafio com a sílica, que os níveis de leucócitos totais foram equivalentes entre os grupos controles salinas selvagens e nocautes. Já os animais selvagens e nocautes silicóticos apresentaram leucocitose sanguínea, quando comparados com os seus respectivos controles, sendo mais pronunciada para o grupo selvagem. Além disso, os camundongos silicóticos selvagens mostraram-se com um maior número de linfócitos que aqueles do grupo salina selvagem. Na condição de silicose em nocautes os mesmos níveis não foram diferentes. Com relação aos neutrófilos, ambos os grupos silicóticos (selvagens e nocautes) mostraram uma neutrocitose em relação aos seus respectivos controles. A análise da medula óssea, realizada nos tempos de 3 e 28 dias após o desafio com sílica, mostrou que os grupos controles selvagens e nocautes (C57BL/6 e ACKR2^{-/-}, respectivamente) não apresentaram diferença entre si, porém os grupos selvagens e nocautes silicóticos apresentaram redução nos valores de leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos maduros (segmentados) e neutrófilos imaturos (em anel) em relação aos seus respectivos controles. Embora em humanos não tenham

apontado uma correlação entre o grau de reação da medula óssea (saída de leucócitos) e a extensão do comprometimento morfológico, observada através das sombras radiológicas nos pulmões (111). Em nosso estudo, a comparação das alterações do sangue periférico e medula óssea com as mudanças histopatológicas relatadas nos pulmões na silicose experimental revela que as partículas de sílica estimulam uma intensa migração de leucócitos da medula e do sangue para o sítio da inflamação, conforme observado no aumento do número de macrófagos nos pulmões. Esse fenômeno observado pode estar refletindo uma maior presença de estímulo quimiotático no sítio inflamatório, que induz maior mobilização de células da medula para o sangue e deste para os pulmões. Adicionalmente, observamos que esse maior recrutamento de células na medula dos silicóticos nocautes pode estar ocorrendo por 2 motivos: a) os animais nocautes, devido à ausência do ACKR2, não degradam a quimiocina durante o processo inflamatório, b) a ausência do ACKR2 permite que mais quimiocinas estimulem os receptores convencionais. Esses dois fatores poderiam estar contribuindo para o maior recrutamento de células da medula.

O receptor ACKR2 encontra-se altamente expresso em diversos tipos celulares e tecidos, tais como: células endoteliais de vaso linfáticos aferentes em pele, intestino, pulmões e placenta (112). Também pode ser encontrado em baixa expressão nos leucócitos do sangue periférico (113). Tendo isso como base, em nossos dados a ausência do receptor ACKR2, pode estar promovendo um acúmulo de quimiocinas no sítio da inflamação e no endotélio do sistema linfático, conseqüentemente levando a uma congestão de leucócitos nos vasos linfáticos e impossibilitando, assim, um aumento da quantidade de monócitos e neutrófilos nos pulmões, refletido através da redução de leucócitos (macrófagos) nos animais nocautes

Os macrófagos são células cruciais no desenvolvimento da inflamação e fisiopatologia da silicose. Dentro desse contexto, estudos apontam que esses fenômenos podem ocorrer devido a maior ou menor participação dos diferentes subtipos de macrófagos (M1 e M2). Sendo assim, essa etapa implicou no estabelecimento de uma nova abordagem em nosso laboratório, onde partimos para caracterizar imunofenotipicamente a população de macrófagos no pulmão de camundongos selvagem e nocautes: saudáveis e silicóticos.

As diferentes populações de células existentes nos pulmões podem ser agrupadas e separadas de acordo com a maior ou menor expressão de moléculas na sua membrana plasmática (114). Devido à grande plasticidade dos macrófagos, eles podem apresentar uma variedade de receptores celulares expressos em sua

superfície celular. Por esse motivo, normalmente para caracterizar uma população de macrófagos são identificados no mínimo dois marcadores específicos. Sendo assim, utilizamos os marcadores clássicos para leucócitos CD45, CD11b, CD206 e F4/80 (115). Onde a marcação positiva para CD45, uma proteína transmembranar expressa em altos níveis na superfície de células hematopoiéticas e seus precursores, foi utilizada para identificar os leucócitos de interesse, separando dos demais tipos celulares, como as células epiteliais (116). Nesse mesmo sentido, foi utilizado o CD11b uma proteína da família das integrinas, geralmente expressa na superfície de leucócitos (como monócitos, neutrófilos e macrófagos), e o F4/80 um marcador clássico para macrófagos (115). Em nosso estudo, identificamos as células duplo-positivas F4/80⁺CD11b⁺ como sendo todos os macrófagos presentes no tecido, com a exceção dos residentes, que são F4/80⁺ porém com nenhuma ou baixa expressão de CD11b (117). Em nossos ensaios não pudemos determinar as populações de macrófagos residentes, já que isso exigiria a utilização de pelo menos mais um outro marcador de superfície para separar essa população.

Em nossos resultados, notamos um menor nível de células F4/80⁺CD11b⁺ nos animais nocautes para ACKR2 com 3 dias e um aumento na quantidade de células F4/80⁺CD11b⁺ nos animais que receberam a sílica após 28 dias (Figura 16). A partir desses dados, especulamos que a população F4/80⁺CD11b⁺ poderia representar os macrófagos, que estão migrando para o sítio inflamatório. Outro ponto é que a menor quantidade de macrófagos F4/80⁺CD11b⁺ nos animais nocautes poderia contribuir para um menor desenvolvimento de lesão e inflamação inicial nos animais nocautes silicóticos, fato que ratificaria os nossos dados morfológicos e morfométricos. Também nesses animais poderiam ter menores níveis do sub-tipo M1, logo com menor presença de inflamação ocorreria um retardamento inicial nas alterações morfológicas observadas na silicose. Sobre os dados da fase tardia, eles estão de acordo com a literatura, no qual ocorre a migração de células inflamatórias para o local da inflamação, graças à ação de quimiocinas e mediadores inflamatórios (118). Em nossos dados, ocorreu um aumento tardio na quantidade de células F4/80⁺CD206⁺ induzido pela sílica (Figura 19), consideradas como macrófagos totais com o subtipo M2. Geralmente o perfil M2 dos macrófagos está relacionado ao processo de resolução da doença por meio da produção citocinas anti-inflamatórias e das poliaminas, enquanto que o M1 está mais envolvido nos processos de fagocitose e liberação de citocinas inflamatórias e fatores como as espécies reativas de oxigênio (81). A maioria do processo de lesão pulmonar ocorre na fase inicial (aguda) da

silicose, justamente pelo fato da partícula recém-inhalada ser mais reativa aos tecidos e, através da interação com os macrófagos do subtipo M1, estimular a liberação de moléculas inflamatórias, como citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio. Logo, se existe menor processo destrutivo nos animais nocautes, isso pode justificar a diminuição da presença de inflamação e granuloma observados neles.

Em um segundo momento, fomos investigar a responsividade dos macrófagos presentes nos animais nocautes para ACKR2 utilizando um modelo da avaliação *in vitro* estimulado com sílica ou LPS. Optamos por essa estratégia porque, apesar do LPS ser um estímulo bastante importante para os macrófagos M1, ele nos subtipos M2 aumenta a expressão de Ym1 e Arg (marcadores de M2), ou seja, acaba ativando os dois subtipos celulares, porém a resposta ao LPS nos macrófagos M2 produz menores níveis de citocinas inflamatórias e óxido nítrico e maiores de citocinas anti-inflamatórias (81). Em nossos dados, observamos que os macrófagos avaliados respondem a estímulos (principalmente LPS) liberando mais citocinas, como IL-6 e IL1b. Todavia, tanto os macrófagos oriundos do lavado peritoneal (Figura 20) quanto aqueles que foram diferenciados a partir de células da medula óssea dos animais nocautes (Figuras 21 e 22), apresentaram uma menor ativação frente à sílica e ao LPS, revelada através da menor liberação de diversas citocinas. Normalmente essas citocinas avaliadas são produzidas e liberadas por macrófagos ativos (geralmente induzindo inflamação/fibrose), demonstrando a capacidade dos macrófagos em responder a um determinado estímulo e ativar-se. O que pode justificar, em parte, o caráter menos inflamatório observado nos animais nocautes para ACKR2 em nosso modelo de silicose. Outra possibilidade é que o próprio processo de nocauteamento possa ter influenciado na expressão de componentes importantes para a maturação e ativação dos macrófagos.

Num contexto inflamatório homeostático ou patológico, a liberação de quimiocinas promove o rolamento e a adesão leucocitária nos vasos sanguíneos. Tal mecanismo propicia a transmigração de células realizando um movimento do sangue para os tecidos. A partir dos dados anteriores, investigamos o processo de rolamento e adesão das células dos animais nocautes para ACKR2. Em nossos dados, os leucócitos dos animais nocautes mostraram-se com uma significativa redução desses fenômenos (Figura 23). Sendo assim, nos animais nocautes o processo de migração celular encontrava-se prejudicado. Sugerimos que o nocauteamento possa ter afetado a expressão regular de algumas moléculas de adesão, influenciando a movimentação dos leucócitos, como os neutrófilos e macrófagos, ao longo do processo inflamatório.

Esses resultados estão de acordo com os nossos dados obtidos em experimentos *in vitro* a partir de fibroblastos (dados não mostrados), onde as células de animais nocautes demonstravam ter menores quantidades de moléculas de adesão, além de alterações estruturais em seus citoesqueletos.

As partículas de sílica, antes de chegarem às porções terminais das vias aéreas, precisam ultrapassar a etapa de depuração mucociliar (ascendente e linfático) do sistema respiratório, que auxilia na diminuição ou remoção de componentes considerados estranhos ao organismo (119). Dentro dos alvéolos, as partículas interagem com as células residentes (células epiteliais e macrófagos alveolares), sendo o processo de reconhecimento por estes últimos dependentes dos receptores do tipo “scavengers” (120). Sendo assim, os macrófagos fagocitam as partículas de sílica e migram para órgãos linfóides periféricos – esta é uma forma de depuração eficiente das partículas de presença indesejável nos pulmões (121). Buscando melhor compreender o mecanismo envolvido na supressão do quadro fibrótico, na ausência do receptor ACKR2, realizamos a contagem das partículas em sistema de microscopia de luz polarizada (Figura 25). Nossos dados mostraram que houve uma redução progressiva e tempo-dependente do conteúdo de partículas presentes no parênquima pulmonar dos animais selvagens silicóticos, enquanto que o mesmo não foi observado no grupo nocaute silicótico. Estes achados mostram-se contrários àqueles observados quando da análise da celularidade no sangue e medula, quando os animais nocautes silicóticos apresentaram valores elevados de neutrófilos sugerindo um processo de comprometimento pulmonar exacerbado nesta condição experimental. Uma possível explicação poderia ser que a ausência do receptor ACKR2 impediria a adesão/migração de neutrófilos para o sítio inflamatório. O mesmo racional poderia ser estendido às células mononucleares (monócitos). O menor influxo de monócitos é seguido de uma consequente diminuição de macrófagos no tecido inflamado, resultando em uma maior dificuldade no processo de fagocitose das partículas de sílica. Os macrófagos possuem a fagocitose como sua função primordial, depurando o organismo de elementos indesejáveis e consequentemente ativando-se. No entanto, como efeito secundário dessa ativação, ocorre a liberação de uma série de mediadores que irão induzir à lesão tecidual, que conforme a evolução da doença, levará à ativação do processo de reparo e fibrose. Desta forma, poderíamos inferir que a ausência da resposta inflamatória inicial poderia ser causada pela menor fagocitose nos macrófagos, contribuindo para a diminuição da resposta fibrótica verificada nos animais nocautes. Sendo assim, alternativamente, considerando que

macrófagos expressam o receptor ACKR2 em sua superfície (98), a ausência desse receptor poderia determinar um comprometimento na função de fagocitose deste tipo celular e assim contribuir para o maior acúmulo de partículas de sílica no pulmão dos camundongos nocautes. De forma complementar, é conhecido que as células endoteliais linfáticas expressam ativamente o ACKR2, influenciando a degradação de quimiocinas e a migração celular (122). Nesse sentido, a ausência do receptor ACKR2 no endotélio de vasos linfáticos dos animais nocautes poderia contribuir para uma menor funcionalidade deles na depuração das partículas de sílica do parênquima pulmonar. Todos esses apontamentos tomados em conjunto sugerem que o ACKR2 participa do processo de estabelecimento da silicose, todavia os mecanismos envolvidos com esse papel ainda precisam ser melhores esclarecidos.

Em conclusão, nossos resultados mostram que camundongos nocautes para o receptor de quimiocinas atípico ACKR2, quando estimulados com sílica, responderam com resposta fibrótica e comprometimento da função pulmonar de menor intensidade em comparação aos animais selvagens. Estes achados contrapõem dados prévios de literatura que mostraram a exacerbação da resposta inflamatória, em modelos de doença cutânea, na condição de ausência do receptor ACKR2. Desta forma, podemos sugerir que o receptor atípico ACKR2 parece atuar de forma diferente dependendo do sítio/órgão em questão, e que mais ensaios são imperativos de serem desenvolvidos no sentido de que seja esclarecido o papel e mecanismo de ação do ACKR2 em doenças inflamatórias pulmonares crônicas. Podemos, então, especular que o ACKR2 parece ser importante para o desenvolvimento da fisiopatologia da silicose e que a compreensão do seu papel dentro do contexto inflamatório é importante para futuras novas propostas de alvo terapêutico para o tratamento ou a cura de doenças inflamatórias pulmonares crônicas de caráter fibrótico como a silicose.

7 CONCLUSÕES

- O receptor ACKR2 se mostrou expresso no pulmão, com clara redução ocorrendo durante o progresso da silicose (1 - 28 dias);
- A sílica diminuiu os níveis do perfil leucocitário no sangue periférico e medula óssea na condição da silicose, de forma mais acentuadas nos animais nocautes;
- Houve aumento na quantidade de macrófagos presentes nos pulmões decorrente do processo inflamatório da sílica;
- Os macrófagos peritoneais de diferenciados de medula óssea dos camundongos nocautes mostraram-se menos ativos no processo de liberação de citocinas após estimulação in vitro;
- Nos camundongos nocautes houve uma maior dificuldade no processo de rolamento e adesão dos leucócitos pelos vasos sanguíneos;
- A quantificação de partículas de sílica presentes no parênquima pulmonar revelou que os camundongos nocautes apresentaram número mais elevado em comparação àqueles dos selvagens;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 2017 [cited 03/07/2017]. Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=02>.
2. Trabalho MPd. Programa nacional de eliminação da silicose. 2017.
3. Rezende AABA, J.C.R.; Cosmo, A.M.; Bonzanini, G.G.A.; de Miranda, E.F.; Rodrigues, E.S.R.; Carlotto, S.D.S. Respiratory effects of silica inhalation among marble industry workers. *Revista Médica de Minas Gerais*. 2013;24(1):52-7.
4. Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 13th edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016. xix, 1145 pages p.
5. Baharom F, Rankin G, Blomberg A, Smed-Sorensen A. Human Lung Mononuclear Phagocytes in Health and Disease. *Front Immunol*. 2017;8:499.
6. Man WH, de Steenhuijsen Piters WA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nature reviews Microbiology*. 2017.
7. Kierszenbaum AL, Tres LL. Histology and cell biology : an introduction to pathology. Fourth edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016. xiv, 734 pages p.
8. Hoffman M, Taylor BE, Harris MB. Evolution of lung breathing from a lungless primitive vertebrate. *Respir Physiol Neurobiol*. 2016;224:11-6.
9. Lefrancais E, Ortiz-Munoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*. 2017.
10. Gotway MB, Netter FH. Netter's correlative imaging : cardiothoracic anatomy. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2013. xi, 433 p. p.
11. Bhattacharya J, Westphalen K. Macrophage-epithelial interactions in pulmonary alveoli. *Semin Immunopathol*. 2016;38(4):461-9.
12. Irvin CG, Bates JH. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respir Res*. 2003;4:4.
13. Fox JG, Barthold S, Davisson M, Newcomer CE, Quimby FW, Smith A. The mouse in biomedical research. 2nd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier, AP; 2007. 2192 p.
14. Vandamme TF. Use of rodents as models of human diseases. *J Pharm Bioallied Sci*. 2014;6(1):2-9.
15. Hall JE, Guyton AC. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 12th ed. Philadelphia, Pa.: Saunders/Elsevier; 2011. xix, 1091 p. p.
16. Vanoirbeek JA, Rinaldi M, De Vooght V, Haenen S, Bobic S, Gayan-Ramirez G, et al. Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;42(1):96-104.
17. Grinnan DC, Truwit JD. Clinical review: respiratory mechanics in spontaneous and assisted ventilation. *Crit Care*. 2005;9(5):472-84.
18. Lutchen KR, Pare PD, Seow CY. Hyperresponsiveness: Relating the Intact Airway to the Whole Lung. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(4):322-31.
19. Nagaraj C, Haitchi HM, Heinemann A, Howarth P, Olschewski A, Marsh LM. Increased expression of p22phox mediates airway hyperresponsiveness in an experimental model of asthma. *Antioxid Redox Signal*. 2017.
20. Royce SG, Nold MF, Bui C, Donovan C, Lam M, Lamanna E, et al. Airway Remodeling and Hyperreactivity in a Model of Bronchopulmonary Dysplasia and Their Modulation by IL-1 Receptor Antagonist. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;55(6):858-68.
21. Woolcock AJ, Peat JK. Epidemiology of bronchial hyperresponsiveness. *Clinical reviews in allergy*. 1989;7(3):245-56.
22. Levitzky MG. Fisiologia Pulmonar. 6ª ed. Barueri (SP): Manole; 2004.
23. Lido AV, Kitamura S, Oliveira JI, Lucca SR, Azevedo VA, Bagatin E. [Occupational exposure and occurrence of pneumoconioses in Campinas, Brazil, 1978-2003]. *J Bras Pneumol*. 2008;34(6):367-72.

24. Robbins S. *Patologia Estrutural e Funcional*. 7^a ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier Editora 2005.
25. Terra Filho M, Santos UdP. [Silicosis]. *J Bras Pneumol*. 2006;32 Suppl 2:S41-7.
26. Lutgens FK, Tarbuck EJ, Tasa D. *Essentials of geology*. 13e. 13th edition . ed. Hoboken, New Jersey: Pearson Education; 2016. xx, 574 pages p.
27. Terra Filho M, Santos Ude P. [Silicosis]. *J Bras Pneumol*. 2006;32 Suppl 2:S41-7.
28. Mossman BT, Glenn RE. Bioreactivity of the crystalline silica polymorphs, quartz and cristobalite, and implications for occupational exposure limits (OELs). *Critical reviews in toxicology*. 2013;43(8):632-60.
29. Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(12):1507-16.
30. Castranova V. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(7):916-25.
31. Cockburn A, Barraco RA, Reyman TA, Peck WH. Autopsy of an Egyptian mummy. *Science*. 1975;187(4182):1155-60.
32. Greenberg MI. *Occupational, industrial, and environmental toxicology*. 2nd ed. St. Louis, Mo.: Mosby; 2003. xxiii, 829 p. p.
33. Ross MH, Murray J. Occupational respiratory disease in mining. *Occup Med (Lond)*. 2004;54(5):304-10.
34. Greenberg MI, Waksman J, Curtis J. Silicosis: a review. *Dis Mon*. 2007;53(8):394-416.
35. Plant JA, Ragnarsdottir KV, Voulvoulis N. *Pollutants, human health, and the environment : a risk based approach*. Chichester, West Sussex, U.K. ; Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell; 2012. xviii, 335 p. p.
36. Vallyathan V, Landsittel DP, Petsonk EL, Kahn J, Parker JE, Osiowy KT, et al. The influence of dust standards on the prevalence and severity of coal worker's pneumoconiosis at autopsy in the United States of America. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011;135(12):1550-6.
37. Leung CC, Yu IT, Chen W. Silicosis. *Lancet*. 2012;379(9830):2008-18.
38. Maciejewska A. Occupational exposure assessment for crystalline silica dust: approach in Poland and worldwide. *Int J Occup Med Environ Health*. 2008;21(1):1-23.
39. Rees D, Murray J. Silica, silicosis and tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007;11(5):474-84.
40. Algranti E. Occupational lung diseases in Brazil. In: Banks DE, editor. *Occupational Lung Disease - An International Perspective*. London: Chapman & Hall Medical; 1998. p. 105 - 15.
41. Ribeiro FSN. Exposição ocupacional à sílica no Brasil no ano de 2001. *Rev Bras Epidemiol*. 2008;11(1):89-96.
42. Mendes R. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE A SILICOSE PULMONAR NA REGIÃO SUDESTE DO BRASIL, ATRAVÉS DE INQUÉRITO EM PACIENTES INTERNOS EM HOSPITAIS DE TISILOGIA. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*. 1979;13:7-19.
43. Holanda MA, Martins MP, Felismino PH, Pinheiro VG. Silicosis in Brazilian pit diggers: relationship between dust exposure and radiologic findings. *Am J Ind Med*. 1995;27(3):367-78.
44. Pollard KM. Silica, Silicosis, and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2016;7:97.
45. Carneiro PJ, Clevelario AL, Padilha GA, Silva JD, Kitoko JZ, Olsen PC, et al. Bosutinib Therapy Ameliorates Lung Inflammation and Fibrosis in Experimental Silicosis. *Frontiers in physiology*. 2017;8:159.
46. Lopes-Pacheco M, Bandeira E, Morales MM. Cell-Based Therapy for Silicosis. *Stem Cells Int*. 2016;2016:5091838.

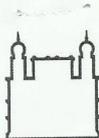
47. Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(5 Pt 1):1666-80.
48. Biswas R, Hamilton RF, Jr., Holian A. Role of lysosomes in silica-induced inflammasome activation and inflammation in absence of MARCO. *J Immunol Res.* 2014;2014:304180.
49. Hari A, Zhang Y, Tu Z, Detampel P, Stenner M, Ganguly A, et al. Activation of NLRP3 inflammasome by crystalline structures via cell surface contact. *Scientific reports.* 2014;4:7281.
50. Harijith A, Ebenezer DL, Natarajan V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Frontiers in physiology.* 2014;5:352.
51. Huaux F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007;7(2):168-73.
52. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* 2008;9(8):847-56.
53. Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(26):9035-40.
54. Lee S, Hayashi H, Mastuzaki H, Kumagai-Takei N, Otsuki T. Silicosis and autoimmunity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2017;17(2):78-84.
55. Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(6):615-22.
56. Beamer CA, Migliaccio CT, Jessop F, Trapkus M, Yuan D, Holian A. Innate immune processes are sufficient for driving silicosis in mice. *J Leukoc Biol.* 2010;88(3):547-57.
57. Barbarin V, Arras M, Misson P, Delos M, McGarry B, Phan SH, et al. Characterization of the effect of interleukin-10 on silica-induced lung fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31(1):78-85.
58. Re SL, Giordano G, Yakoub Y, Devosse R, Uwambayinema F, Couillin I, et al. Uncoupling between inflammatory and fibrotic responses to silica: evidence from MyD88 knockout mice. *PLoS One.* 2014;9(7):e99383.
59. Rabolli V, Badissi AA, Devosse R, Uwambayinema F, Yakoub Y, Palmari-Pallag M, et al. The alarmin IL-1 α is a master cytokine in acute lung inflammation induced by silica micro- and nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:69.
60. Davis GS, Pfeiffer LM, Hemenway DR, Rincon M. Interleukin-12 is not essential for silicosis in mice. *Part Fibre Toxicol.* 2006;3:2.
61. Misson P, Brombacher F, Delos M, Lison D, Huaux F. Type 2 immune response associated with silicosis is not instrumental in the development of the disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292(1):L107-13.
62. Barbarin V, Xing Z, Delos M, Lison D, Huaux F. Pulmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288(5):L841-8.
63. Rabolli V, Lo Re S, Uwambayinema F, Yakoub Y, Lison D, Huaux F. Lung fibrosis induced by crystalline silica particles is uncoupled from lung inflammation in NMRI mice. *Toxicol Lett.* 2011;203(2):127-34.
64. Williams JL, Holman DW, Klein RS. Chemokines in the balance: maintenance of homeostasis and protection at CNS barriers. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:154.
65. Vacchini A, Locati M, Borroni EM. Overview and potential unifying themes of the atypical chemokine receptor family. *J Leukoc Biol.* 2016;99(6):883-92.
66. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology.* 2008;214(2):199-210.
67. Castranova V, Vallyathan V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environmental health perspectives.* 2000;108 Suppl 4:675-84.

68. Bonecchi R, Graham GJ. Atypical Chemokine Receptors and Their Roles in the Resolution of the Inflammatory Response. *Front Immunol.* 2016;7:224.
69. Bachelier F, Graham GJ, Locati M, Mantovani A, Murphy PM, Nibbs R, et al. New nomenclature for atypical chemokine receptors. *Nat Immunol.* 2014;15(3):207-8.
70. Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol.* 2001;22(6):328-36.
71. Locati M, Torre YM, Galliera E, Bonecchi R, Bodduluri H, Vago G, et al. Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor for inflammatory CC chemokines. *Cytokine & growth factor reviews.* 2005;16(6):679-86.
72. Cancellieri C, Caronni N, Vacchini A, Savino B, Borroni EM, Locati M, et al. Review: Structure-function and biological properties of the atypical chemokine receptor D6. *Molecular immunology.* 2012.
73. Nibbs RJ, Kriehuber E, Ponath PD, Parent D, Qin S, Campbell JD, et al. The beta-chemokine receptor D6 is expressed by lymphatic endothelium and a subset of vascular tumors. *Am J Pathol.* 2001;158(3):867-77.
74. Jamieson T, Cook DN, Nibbs RJ, Rot A, Nixon C, McLean P, et al. The chemokine receptor D6 limits the inflammatory response in vivo. *Nat Immunol.* 2005;6(4):403-11.
75. Di Liberto D, Locati M, Caccamo N, Vecchi A, Meraviglia S, Salerno A, et al. Role of the chemokine decoy receptor D6 in balancing inflammation, immune activation, and antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 2008;205(9):2075-84.
76. Abbas AKL, A.H.; Pillai, S. *Imunologia Celular e Molecular.* 2015;8:552.
77. Ferreira TP, de Arantes AC, do Nascimento CV, Olsen PC, Trentin PG, Rocco PR, et al. IL-13 immunotoxin accelerates resolution of lung pathological changes triggered by silica particles in mice. *J Immunol.* 2013;191(10):5220-9.
78. Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *The American journal of physiology.* 1990;258(4 Pt 1):L148-56.
79. Sake RS, Leme AS, Dolhikoff M. Neonatal capsaicin treatment decrease airway and pulmonary tissue responsiveness to methacholine. *The American journal of physiology.* 1994(266 (1 Pt 1)):L23-L9.
80. Trentin PG, Ferreira TP, Arantes AC, Ciambarella BT, Cordeiro RS, Flower RJ, et al. Annexin A1 mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice. *Br J Pharmacol.* 2015;172(12):3058-71.
81. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13.
82. Wermuth PJ, Jimenez SA. The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases. *Clin Transl Med.* 2015;4:2.
83. Trentin PG, Ferreira TP, Arantes AC, Ciambarella BT, Cordeiro RS, Flower RJ, et al. Annexin A1 mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice. *Br J Pharmacol.* 2015.
84. Bhandary YP, Shetty SK, Marudamuthu AS, Fu J, Pinson BM, Levin J, et al. Role of p53-fibrinolytic system cross-talk in the regulation of quartz-induced lung injury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015;283(2):92-8.
85. Vogel G. Bioethics. Embryo engineering alarm. *Science.* 2015;347(6228):1301.
86. Cheng Y, Ma Z, Kim B-H, Wu W, Cayting P, Boyle AP, et al. Principles of regulatory information conservation between mouse and human. *Nature.* 2014;515(7527):371-5.
87. Lakatos HF, Burgess HA, Thatcher TH, Redonnet MR, Hernady E, Williams JP, et al. Oropharyngeal aspiration of a silica suspension produces a superior model of silicosis in the mouse when compared to intratracheal instillation. *Experimental lung research.* 2006;32(5):181-99.

88. Choi M, Cho WS, Han BS, Cho M, Kim SY, Yi JY, et al. Transient pulmonary fibrogenic effect induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica in A/J mice. *Toxicol Lett.* 2008;182(1-3):97-101.
89. Lacher SE, Johnson C, Jessop F, Holian A, Migliaccio CT. Murine pulmonary inflammation model: a comparative study of anesthesia and instillation methods. *Inhal Toxicol.* 2010;22(1):77-83.
90. Langley RJ, Mishra NC, Pena-Philippides JC, Hutt JA, Sopori ML. Granuloma formation induced by low-dose chronic silica inhalation is associated with an anti-apoptotic response in Lewis rats. *J Toxicol Environ Health A.* 2010;73(10):669-83.
91. Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;298(6):L715-31.
92. Li XF, Liao J, Xin ZQ, Lu WQ, Liu AL. Relaxin attenuates silica-induced pulmonary fibrosis by regulating collagen type I and MMP-2. *Int Immunopharmacol.* 2013;17(3):537-42.
93. Yang HZ, Wang JP, Mi S, Liu HZ, Cui B, Yan HM, et al. TLR4 activity is required in the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis after acute and chronic lung injury. *Am J Pathol.* 2012;180(1):275-92.
94. Olsen PC, Ferreira TP, Serra MF, Farias-Filho FA, Fonseca BP, Viola JP, et al. Lidocaine-derivative JMF2-1 prevents ovalbumin-induced airway inflammation by regulating the function and survival of T cells. *Clin Exp Allergy.* 2011;41(2):250-9.
95. Peeters PM, Perkins TN, Wouters EF, Mossman BT, Reynaert NL. Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10:3.
96. An SS, Fredberg JJ. Biophysical basis for airway hyperresponsiveness. *Canadian journal of physiology and pharmacology.* 2007;85(7):700-14.
97. Bryant VL, Slade CA. Chemokines, their receptors and human disease: the good, the bad and the itchy: *Immunol Cell Biol.*; 2015 Apr.
98. Bazzan E, Saetta M, Turato G, Borroni EM, Cancellieri C, Baraldo S, et al. Expression of the atypical chemokine receptor D6 in human alveolar macrophages in COPD. *Chest.* 2013;143(1):98-106.
99. Graham GJ, Locati M. Regulation of the immune and inflammatory responses by the 'atypical' chemokine receptor D6. *The Journal of pathology.* 2013;229(2):168-75.
100. Berres ML, Trautwein C, Zaldivar MM, Schmitz P, Pauels K, Lira SA, et al. The chemokine scavenging receptor D6 limits acute toxic liver injury in vivo. *Biological chemistry.* 2009;390(10):1039-45.
101. Cochain C, Auvynet C, Poupel L, Vilar J, Dumeau E, Richart A, et al. The chemokine decoy receptor D6 prevents excessive inflammation and adverse ventricular remodeling after myocardial infarction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2012;32(9):2206-13.
102. Langenes V, Svensson H, Borjesson L, Gustavsson B, Bemark M, Sjoling A, et al. Expression of the chemokine decoy receptor D6 is decreased in colon adenocarcinomas. *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* 2013;62(11):1687-95.
103. Savino B, Caronni N, Anselmo A, Pasqualini F, Borroni EM, Basso G, et al. ERK-dependent downregulation of the atypical chemokine receptor D6 drives tumor aggressiveness in Kaposi sarcoma. *Cancer immunology research.* 2014;2(7):679-89.
104. Hajrasouliha AR, Sadrai Z, Lee HK, Chauhan SK, Dana R. Expression of the chemokine decoy receptor D6 mediates dendritic cell function and promotes corneal allograft rejection. *Molecular vision.* 2013;19:2517-25.
105. Ma Y, Gao M, Sun H, Liu D. Interleukin-6 gene transfer reverses body weight gain and fatty liver in obese mice. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(5):1001-11.
106. Hsiao WC, Shia KS, Wang YT, Yeh YN, Chang CP, Lin Y, et al. A novel peripheral cannabinoid receptor 1 antagonist, BPR0912, reduces weight independently of food intake and modulates thermogenesis. *Diabetes Obes Metab.* 2015;17(5):495-504.
107. Neves SMP, Filho JM, de Menezes EW. *Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP.* 2013:216.

108. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. *Animais de laboratório: criação e experimentação*: Editora FIOCRUZ; 2006.
109. Vetrano S, Borroni EM, Sarukhan A, Savino B, Bonecchi R, Correale C, et al. The lymphatic system controls intestinal inflammation and inflammation-associated Colon Cancer through the chemokine decoy receptor D6. *Gut*. 2010;59(2):197-206.
110. Zheng S, Coventry S, Cai L, Powell DW, Jala VR, Haribabu B, et al. Renal Protection by Genetic Deletion of the Atypical Chemokine Receptor ACKR2 in Diabetic OVE Mice. *J Diabetes Res*. 2016;2016:5362506.
111. Warraki SE, Gammal MY, Awany AY. Bone marrow changes in silicosis. *British journal of industrial medicine*. 1965;22(4):279-84.
112. Bonecchi R, Savino B, Borroni EM, Mantovani A, Locati M. Chemokine decoy receptors: structure-function and biological properties. *Current topics in microbiology and immunology*. 2010;341:15-36.
113. McKimmie CS, Graham GJ. Leucocyte expression of the chemokine scavenger D6. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 6):1002-4.
114. Chan YH, Intosalmi J, Rautio S, Lahdesmaki H. A subpopulation model to analyze heterogeneous cell differentiation dynamics. *Bioinformatics*. 2016;32(21):3306-13.
115. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Perdiguero EG, Geissmann F, Henri S, et al. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol*. 2014;15(10):929-37.
116. Thiel N, Zischke J, Elbasani E, Kay-Fedorov P, Messerle M. Viral interference with functions of the cellular receptor tyrosine phosphatase CD45. *Viruses*. 2015;7(3):1540-57.
117. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013;14(10):986-95.
118. Mylonas KJ, Jenkins SJ, Castellán RF, Ruckerl D, McGregor K, Phythian-Adams AT, et al. The adult murine heart has a sparse, phagocytically active macrophage population that expands through monocyte recruitment and adopts an 'M2' phenotype in response to Th2 immunologic challenge. *Immunobiology*. 2015;7(15):00021-2.
119. Perez BF, Mendez GA, Lagos RA, Vargas MS. [Mucociliary clearance system in lung defense]. *Rev Med Chil*. 2014;142(5):606-15.
120. Geiser M. Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2010;23(4):207-17.
121. Huang X, Zhang F, Lee S, Swierczewska M, Kiesewetter DO, Lang L, et al. Long-term multimodal imaging of tumor draining sentinel lymph nodes using mesoporous silica-based nanoprobe. *Biomaterials*. 2012;33(17):4370-8.
122. Bonavita O, Mollica Poeta V, Setten E, Massara M, Bonecchi R. ACKR2: An Atypical Chemokine Receptor Regulating Lymphatic Biology. *Front Immunol*. 2016;7:691.

9 ANEXOS



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-57/14

Certificamos que o protocolo (P-2/14-2), intitulado "FARMACOLOGIA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO PULMONAR", sob a responsabilidade de PATRICIA MACHADO RODRIGUES E SILVA MARTINS, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 13/10/2018 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 150 Machos de C.Cg-Tg(DO11.10)10Dlo, Idade: 2 Mes(es), Peso: 20,0000 Grama(s).
- 150 Fêmeas de C.Cg-Tg(DO11.10)10Dlo, Idade: 2 Mes(es), Peso: 20,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 6000 Machos de Swiss Webster, Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 1500 Machos de BALB/c-Anx1, Peso: 18,0000 Grama(s).
- 500 Fêmeas de BALB/c-Anx1, Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 3200 Machos de A, Peso: 18,0000 Grama(s).
- 600 Fêmeas de A, Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

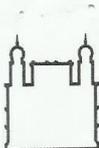
- 2300 Machos de BALB/c An, Peso: 18,0000 Grama(s).
- 500 Fêmeas de BALB/c An, Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 5333 Machos de C57BL/6, Peso: 18,0000 Grama(s).
- 312 Fêmeas de C57BL/6, Peso: 18,0000 Grama(s).

(Continua)

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-57/14

(Continuação da Licença Nº LW-57/14, Protocolo Nº P-2/14-2)

Mus musculus

- 200 Machos de B6. 129 P2 - Nos2, Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 200 Machos de B6. 129 - Tnfrs1a, Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 2000 Machos de B6. 129, Peso: 18,0000 Grama(s).

- 1000 Fêmeas de B6. 129, Peso: 18,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 13 de outubro de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550
13/10/2014

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br