

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Natalia Barreto da Silva Ribeiro

Efeito do tratamento com nanopartículas de ouro sobre a fibrose pulmonar induzida por sílica em camundongos

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

Orientador: Prof. Dr. Patrícia Machado Rodrigues e Silva

RIO DE JANEIRO

2018

Barreto da Silva Ribeiro, Natalia .

Efeito do tratamento com nanopartículas de ouro sobre a fibrose pulmonar induzida por sílica em camundongos / Natalia Barreto da Silva Ribeiro. - Rio de Janeiro, 2018.

61 f.; il.

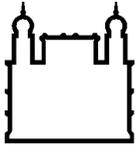
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: Patrícia Machado Rodrigues e Silva.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Pulmão. 2. Fibrose. 3. Sílica. 4. Terapia. 5. Nanopartículas de ouro. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: *Natalia Barreto da Silva Ribeiro*

EFEITO DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE A FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR SÍLICA EM CAMUNDONGOS.

ORIENTADOR: Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado - Presidente

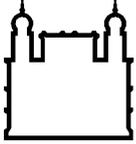
Prof. Dr. Pedro Leme Silva

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto

Prof. Dra. Adriana Ribeiro Silva

Prof. Dr. João Alfredo de Moraes Gomes da Silva

Rio de Janeiro, 15 de maio de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a toda minha família por sempre me apoiar, mas principalmente aos meus pais, Mariza Ribeiro e Renato Ribeiro e minha irmã Tatiana Ribeiro que sempre acreditaram em mim e nos meus sonhos, que estavam sempre presentes quando precisei de uma palavra, um empurrão ou uma bronca, com certeza a pessoa que sou e a profissional que estou me tornando é devido a eles e ao esforço deles em fazer esse sonho se tornar realidade.

Gostaria de agradecer, também, ao Rayan Vahia, que sempre esteve comigo durante esses anos acreditando no trabalho que realizo, que sempre se mostrou companheiro ao me escutar e dar sua opinião sincera e crítica, além disso sempre me fazendo sorrir quando algo não estava certo. Agradeço também a toda sua família por sempre me acolher com muito carinho.

Agradeço à toda equipe do Laboratório de Inflamação, principalmente Dr. Marco Aurélio Martins e à Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva por me deixarem realizar esse trabalho incrível com o qual me identifico, e que sempre estiveram à disposição para me explicar como as coisas funcionam. À Bianca Torres Ciambarella pelo apoio e ajuda sempre.

Agradeço também ao pessoal da Cultura Celular, Carolina Azevedo, Yago Amigo e Thamiris Andrade pela amizade e ajuda em tudo que precisei. Ao pessoal da Histologia, Ana Carolina Arantes, Joyce Lima e Camila Dantas pela compreensão e agilidade, com eficiência, no processamento dos cortes de pulmão, os quais foram fundamentais para entendermos o efeito das GNP's. Também agradeço a Dra. Andressa Bernardi, Amanda Cotias, Maria Talita Pacheco, Letícia Lima e Aryella Maryah que além da amizade sempre se prontificaram em me ajudar. À Dadá e a Ana Lúcia Pires por todo apoio na parte burocrática. Gostaria mais uma vez de agradecer a todos os alunos do Laboratório de Inflamação, já que todos são importantes e contribuem à sua maneira para que o ambiente de trabalho seja alegre e cheio de boas discussões.

Ao Dr. Marcelo Pelajo Machado por se mostrar sempre disposto a ajudar e facilitar nossa compreensão acerca do mundo da Patologia;

A Dra Adriana Ribeiro Silva pela eficiente leitura prévia desta dissertação, e a todos os membros da banca por aceitarem o convite;

Agradeço às agências financiadoras por me permitir realizar esse trabalho, como CNPq, CAPES, FAPERJ.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFEITO DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO
SOBRE A FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR SÍLICA EM
CAMUNDONGOS.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Natalia Barreto da Silva Ribeiro

Resumo

A silicose é uma doença pulmonar, de caráter ocupacional, que se desenvolve em decorrência da inalação de partículas de sílica cristalina, e para qual não há tratamento até o momento. Evidências mostram que nanopartículas de ouro (GNPs) possuem marcada atividade anti-inflamatória, o que as coloca como opção terapêutica em potencial. Neste projeto investigamos o efeito das GNPs sobre a fibrose pulmonar na silicose murina. Foram utilizados camundongos Swiss-Webster instilados com partículas de sílica, por via intranasal, e tratados terapêuticamente com GNPs (0,3 - 60 µg/Kg), por aerossol. Foram avaliados parâmetros histológicos e de mecânica respiratória (resistência e elastância pulmonares). Adicionalmente, estudos com macrófagos alveolares in vitro foram realizados. Observamos que animais silicóticos apresentaram marcada expressiva resposta de formação de granulomas, dispersos no parênquima pulmonar, que ocorreu em paralelo com alterações da função pulmonar, aumento dos níveis de resistência e elastância, somado a um quadro de hiperreatividade pulmonar. O tratamento terapêutico dos animais silicóticos com GNPs, levou a uma clara alteração do perfil de resposta tecidual, quando desestruturação do padrão dos granulomas foi notado. Foi observado aspecto mais frouxo, alargamento dos espaços alveolares em paralelo com presença de células mononucleares na região adjacente, além da presença de tampões celulares no interior das vias aéreas (bronquíolos). Redistribuição de fibras colágenas foi igualmente detectada, sem diferença no conteúdo de colágeno total no pulmão. Estes eventos foram acompanhados por reversão do comprometimento da função pulmonar, quando reversão do quadro de hiperreatividade foi observado. O tratamento com GNPs inibiu a geração de citocinas relevantes na silicose com destaque para o TNF- α . Ensaio in vitro com macrófagos alveolares (linhagem AMJ2C11) revelaram o efeito inibitório das GNPs sobre ativação por partículas de sílica, verificado pela redução nos níveis de TNF- α liberado, de forma não relacionada ao processo de morte celular. Em conjunto, nossos resultados mostram o potencial terapêutico das GNPs em reverter a resposta granulomatosa pulmonar, em camundongos silicóticos, associada a um desarranjo do processo de fibrose estabelecido à propriedade e atividade supressora sobre células alvos importantes (macrófagos), com vistas ao favorecimento do processo de reventilação e consequente melhora da funcionalidade pulmonar. Ensaio complementares se fazem necessários para melhor compreensão do mecanismo e, posterior avaliação da aplicabilidade de GNPs em doenças inflamatórias de natureza fibrótica.

Palavras-chave: Pulmão, Fibrose, Sílica, Terapia, Nanopartículas de ouro.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFEITO DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO
SOBRE A FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR SÍLICA EM
CAMUNDONGOS.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Natalia Barreto da Silva Ribeiro

Abstract

Silicosis is an occupational lung disease developed as a result of crystalline silica particle inhalation. At the moment, there is no treatment for this disease. Evidence exists that gold nanoparticles (GNPs) have a marked anti-inflammatory activity, which indicates that they are a potential therapeutic option. We investigated, herein, the effect of GNPs on lung fibrosis in a murine model of silicosis. Swiss-Webster mice were instilled with silica particles, intranasal, and treated therapeutically with GNPs (0.3 – 60.0 µg/kg) by aerosol. Histological parameters and respiratory mechanics (lung resistance and elastance) were evaluated. In addition, *in vitro* alveolar macrophages were investigated. We observed that silicotic animals presented a marked response of granuloma formation, shown to be dispersed in the whole parenchyma, and paralleled with changes of lung function – increased resistance and elastance together with airways hyper-reactivity. Therapeutic treatment of silicotic mice with GNPs led to altered tissue response, when the granuloma pattern was disrupted. A looser aspect with enlargement of alveolar spaces, in parallel to the presence of adjacent mononuclear cells, besides the presence of cellular plugs inside the airways (bronchiole). Redistribution of collagen fibers was also detected, with no difference in the lung total collagen content. These phenomena were accompanied by reversal of compromised lung function, when inhibition of the hyperreactivity was observed. Treatment with GNPs inhibited the generation of important cytokines in silicosis, mainly affecting TNF- α . *In vitro* assays using alveolar macrophages (AMJ2C11 line) showed inhibition of silica-induced cell activation, as attested by reduced levels of TNF- α release, unrelated to cell death. Altogether, our results show the therapeutic effect of GNPs in reversing lung granulomatous response in silicotic mice, in association to derangement of an established fibrotic process and to suppressive of important target cells (macrophages), with the purpose of favoring re-ventilation and consequently improvement of lung functionality. Additional experiments are needed to understand better the mechanism involved and for subsequent evaluation of the applicability of GNPs in fibrotic inflammatory diseases.

Key words: Lung, Fibrosis, Silica, Therapy, Gold Nanoparticles

Lista de Abreviações

- ALP- Fosfatase alcalina, do inglês “Alcaline phosphatase”
- ALT- Alanina aminotransferase do inglês “Alanine transaminase”
- GNPs- Nanopartículas de Ouro, do inglês “Au nanoparticles”
- BCA- Ácido Bicinchonínico, do inglês “Bicinchoninic acid”
- BrdU- 5-bromo-2-deoxiuridina
- BSA- Albumina do Soro Bovino, do inglês “Bovine serum albumin”
- CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais
- Cu⁺²- Óxido de cobre (II)
- DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO- Dimetilsulfóxido, do inglês “Dimethyl sulfoxide”
- DPOC- Doença pulmonar obstrutiva crônica
- EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético, do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid”
- HE- Hematoxilina & Eosina
- IL- () - Interleucina-(), do inglês “interleukin” – ()
- LPS- Lipopolissacarídeo, do inglês “Lipopolysaccharide”
- MEC- Matrix Extracelular
- MCP-1- do inglês Monocyte chemoattractant protein-1
- MIP-1 α - do inglês Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha
- MIP-2- do inglês Macrophage inflammatory protein-2
- MMPs- Metaloproteinases, do inglês “Matrix metalloproteinases”
- mRNA- Ácido Ribonucleico Mensageiro, do inglês “Messenger ribonucleic acid”
- MTT- 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo
- NF- κ B- *Nuclear Factor kappa B*
- NIH- National Institutes of Health
- Nm- Nanômetros
- NPs- Nanopartículas, do inglês “nanoparticles”
- OEH- Occupational and Environmental health
- PBS- Tampão fosfato-salino, do inglês “Phosphate buffered saline”

PS- Picrus Sirius

RF- Resorcina Fucsina

SFB- Soro Fetal Bovino

SiO₂- Dióxido de silício

TIMPs- Inibidores Teciduais de Metaloproteinases, do inglês “Tissue inhibitors of metalloproteinases”

TNF- α - Fator de necrose tumoral, do inglês “Tumor Necrosis Factor-alpha”

Sumário

1.0	Introdução	1
1.1	Sistema Respiratório	1
1.12	Anatomia Pulmonar	1
1.13	Fisiologia Pulmonar	3
1.2	Doenças Pulmonares.....	5
1.3	Fibrose Pulmonar	6
1.31	Pneumoconioses.....	8
1.32	Silicose.....	9
1.321	Epidemiologia.....	11
1.322	Fisiopatologia da silicose	11
1.323	Morfologia & Curso clínico	13
1.324	Diagnóstico & Tratamento	14
1.4	Nanotecnologia	14
1.41	Nanopartículas de ouro.....	16
2.0	Objetivo	18
2.1	Geral	18
2.2	Específicos.....	18
3.0	Metodologia	19
3.1	<i>In vivo</i>	19
3.11	Animais.....	19
3.12	Sistema de estimulação por via intranasal.....	19
3.13	Tratamento com Nanopartículas de Ouro.....	19
3.14	Análise da Função pulmonar e Hiper-reatividade das Vias Aéreas	20
3.15	Análise histológica.....	20
3.16	Quantificação de Proteína.....	21
3.17	Quantificação de colágeno	21
3.18	Quantificação de mediadores inflamatórios por ELISA	21
3.2	<i>In vitro</i>	22
3.21	Ensaio de ativação macrófagos <i>in vitro</i>	22
3.22	Análise da incorporação de BrdU	23
3.24	Viabilidade celular	23
3.3	Análise Estatística.....	24

4.0	Resultados	25
4.1	Análise da mecânica respiratória e alterações morfológicas no pulmão de camundongos instilados com sílica	25
4.2	Efeito do tratamento com GNPs sobre alterações morfológicas e função pulmonar induzidas pela instilação de sílica em camundongos	27
4.21	Administração de GNPs a animais normais	27
	28
4.22	Administração de GNPs a animais silicóticos	30
4.3	Efeito do tratamento com GNPs sobre a produção de citocinas pulmonares induzida pela instilação de sílica em camundongos	40
4.4	Efeito das GNPs sobre a reatividade de macrófagos <i>in vitro</i>	41
5.0	Discussão	45
6.0	Conclusão	52
7.0	Referência Bibliográfica	53

1.0 Introdução

1.1 Sistema Respiratório

O pulmão é principal órgão responsável pela troca gasosa, fazendo parte do sistema respiratório inferior, junto com a laringe, traqueia e brônquios. Durante a entrada de ar nas vias aéreas, este é conduzido e condicionado até chegar aos pulmões através do sistema respiratório superior, que consiste na cavidade nasal, seios nasais e faringe (Figura 1.1).

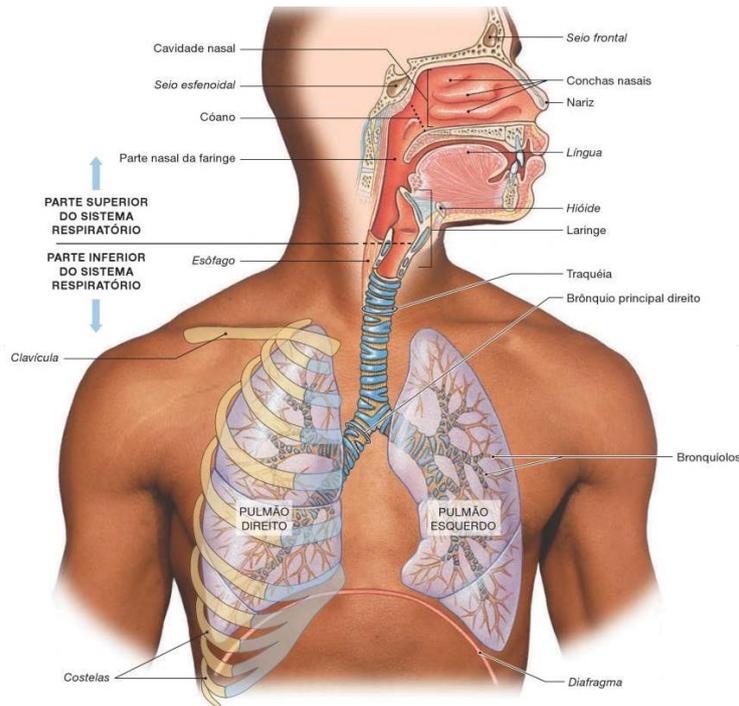


Figura 1.1: Estrutura do sistema respiratório (1).

1.12 Anatomia Pulmonar

Os pulmões possuem dois lóbulos, o direito e o esquerdo, situados em suas respectivas cavidades pleurais. Apresentam um formato cônico, onde o ápice de cada lóbulo é a parte superior, se estendendo da base do pescoço até a parte superior da primeira costela, e a base de cada lóbulo se encontra na superfície superior do diafragma. Cada lóbulo é dividido por fissuras profundas, o pulmão direito possui 3 lóbulos e o esquerdo apenas dois. O pulmão direito é mais amplo por causa da localização do coração e das grandes veias projetadas na cavidade pleural esquerda, no entanto o pulmão esquerdo é mais longo porque o diafragma sobe do lado direito para poder acomodar a massa do fígado (Figura 1.2).

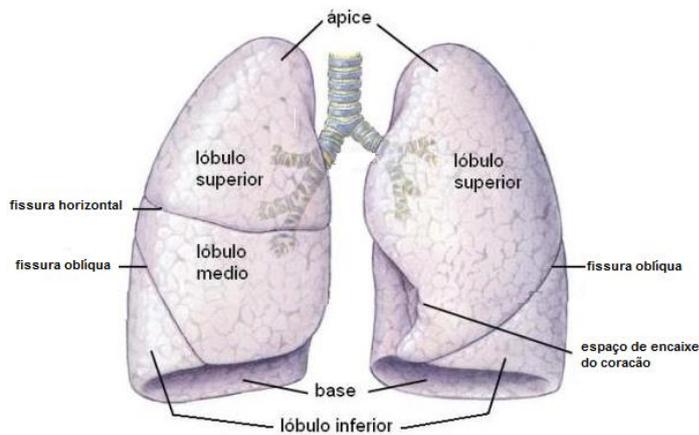


Figura 1.2: Anatomia pulmonar humana (adaptado de 2).

Diferente do pulmão dos humanos, o pulmão de camundongos possui uma estrutura que consiste em um lóbulo pulmonar esquerdo sem fissuras, e o pulmão direito é dividido em quatro lóbulos distintos: o superior, mediano, inferior e o pós-cava (3) (Figura 1.3).

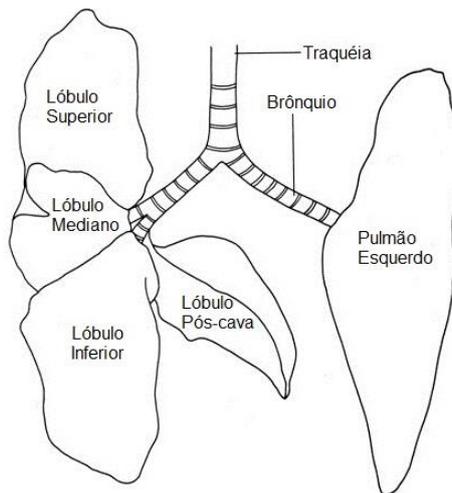


Figura 1.3: Anatomia pulmonar murina (adaptado de 3).

Independente das diferenças anatômicas, o ar chega aos pulmões através dos brônquios que os invadem, sendo chamados de brônquios intrapulmonares, uma vez que entram e se dividem em brônquios, primários, secundários e terciários formando passagens cada vez menores, até chegar aos bronquíolos e alvéolos, onde de fato irá ocorrer a troca gasosa. Os brônquios possuem um epitélio estratificado contendo células secretoras e ciliadas e à medida que os brônquios se ramificam as paredes que os revestem possuem progressivamente menos cartilagem, ao chegar nos bronquíolos já não existe mais suporte cartilagenoso sendo dominados por tecido muscular liso. A ativação simpática

sobre esse tecido muscular leva ao aumento no calibre das vias aéreas, ou broncodilatação, enquanto que a estimulação parassimpática leva a broncoconstrição. Essas mudanças alteram os parâmetros da função pulmonar de resistência ao fluxo de ar.

Os bronquíolos respiratórios são ligados aos alvéolos em regiões chamadas de ductos alveolares. Estas passagens terminam em sacos alveolares, que são câmaras comuns conectadas a vários alvéolos individuais. Nos alvéolos existem dois tipos de células epiteliais que os revestem, as células alveolares planas, ou pneumócito tipo I, que são as mais predominantes cobrindo 90% da superfície alveolar e responsáveis pela troca gasosa. O segundo tipo são as células alveolares cubóides, ou pneumócito tipo II, cobrem 10% da superfície alveolar, sendo mais resistentes que os pneumócitos tipo I e desempenham funções importantes para a fisiologia pulmonar, como a produção de surfactante e transporte de íons, servindo também como células progenitoras de pneumócito tipo I em casos de lesão tecidual. Além dessas células estruturais, os alvéolos possuem células de defesa residentes chamadas de macrófagos alveolares, barreira imunológica contra os patógenos que resistiram ao condicionamento do ar (Figura 1.4).

1.13 Fisiologia Pulmonar

A entrada de ar nos pulmões ocorre a partir da mecânica respiratória, onde os pulmões podem ser expandidos e contraídos de duas maneiras: através do movimento de subida ou descida do diafragma para aumentar ou diminuir a cavidade torácica ou então através da elevação ou depressão das costelas induzindo o aumento ou diminuição do diâmetro anteroposterior da cavidade torácica. Em ambos os casos, para se realizar a movimentação da caixa torácica é necessário a utilização de musculatura apropriada.

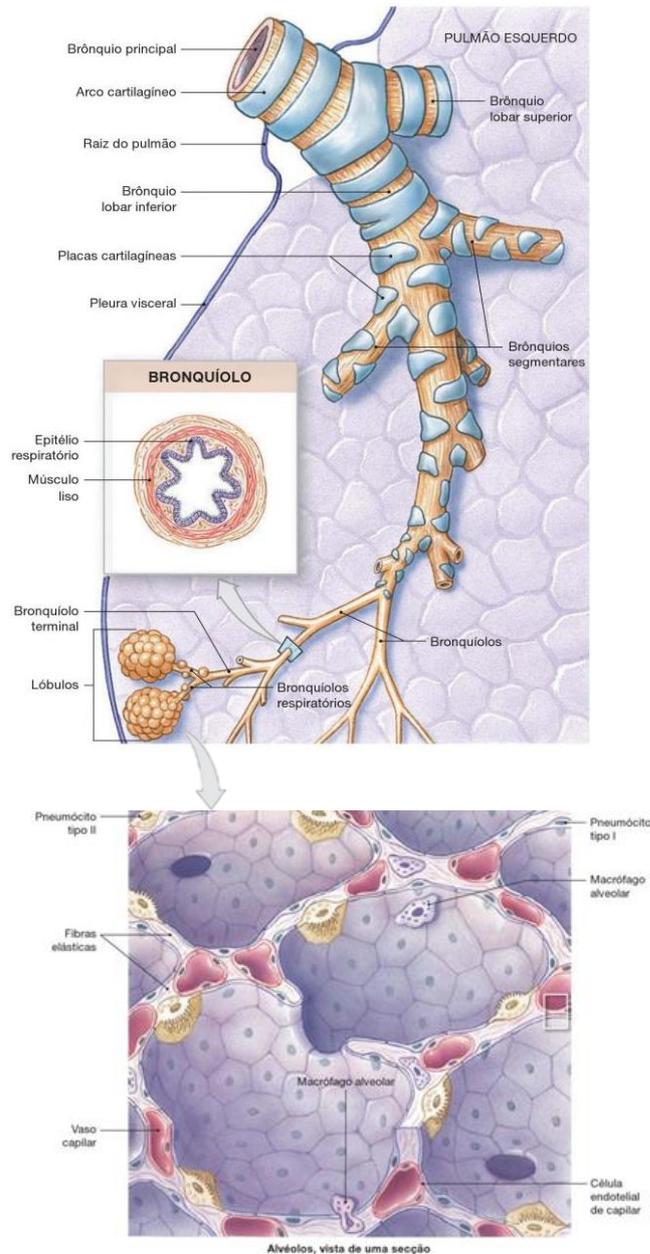


Figura 1.4: Anatomia árvore brônquica e alveolar (adaptado de 1)

Por ser um órgão elástico o pulmão tem a tendência a colapsar, o que não ocorre devido a presença do líquido pleural, este por sua vez sofre sucção contínua pelos vasos linfáticos, criando assim uma leve pressão negativa chamada de pressão pleural. Este líquido possibilita a lubrificação do órgão e também a sua capacidade de expansão e contração. Na inspiração quando o diafragma se contrai permite a distensão do pulmão e a pressão dentro dos pulmões torna-se ainda mais negativa. Na expiração ocorre o contrário, os músculos respiratórios se contraem, levando à contração do pulmão e consequente aumento da pressão pleural. Tanto ao final da inspiração, como da

expiração, quando o fluxo aéreo é nulo, a pressão alveolar se iguala à pressão atmosférica, o ar só se move para fora ou para dentro da via aérea quando há um gradiente entre o meio ambiente e a pressão alveolar. A pressão alveolar que é a pressão do ar dentro dos alvéolos, durante a inspiração, precisa ficar ligeiramente mais negativa para que haja a entrada do ar, e na expiração ocorre o contrário (4).

A capacidade do pulmão em se distender é conhecida como complacência e é medida pelo aumento na pressão transpulmonar, ou seja, a diferença entre as pressões alveolar e a pleural. Além da pressão ser necessária para os movimentos de distensibilidade do pulmão, as características elásticas do próprio tecido também são importantes, como por exemplo a presença de fibras de elastina e colágeno. A resistência pulmonar é a dificuldade da passagem de ar através das vias aéreas. Dentre os fatores que influenciam a resistência das vias respiratórias se encontram: a geometria da árvore traqueobrônquica, o volume pulmonar, a complacência das vias respiratórias, a musculatura lisa dos brônquios e a densidade e viscosidade do gás inspirado (5) (6).

1.2 Doenças Pulmonares

As doenças pulmonares, em uma perspectiva global, não podem ser subestimadas uma vez que infecções respiratórias primárias, como a bronquite e pneumonia, são frequentes. Também, o crescente aumento da poluição do ar atmosférico e a presença de inalantes tóxicos, como o tabagismo, favorecem o desenvolvimento destas doenças. Estas implicam em um índice elevado de internação, incapacitação e morte no mundo inteiro, consequência das alterações que provocam na fisiologia pulmonar. Além disso, os pulmões estão secundariamente envolvidos em quase todas as formas de doença terminal, de modo que pacientes frequentemente apresentam um quadro clínico de edema pulmonar, atelectasia ou broncopneumonia (7).

As doenças pulmonares podem ser divididas em dois principais grupos: de caráter obstrutivo, caracterizadas pelo aumento da resistência das vias aéreas devido à obstrução total ou parcial, ou as de caráter restritivo que tem como característica a redução da expansão do parênquima pulmonar e a

diminuição da capacidade pulmonar total. No caso das doenças restritivas, estas podem ocorrer em duas condições gerais: i) distúrbios da parede torácica, devido a um quadro de obesidade severa, ii) em casos de doenças pleurais, muito embora distúrbios dessa natureza sejam muito raros, ou iii) na forma de doença pulmonar intersticial crônica, decorrente de um processo de fibrose pulmonar como o que ocorre no caso das pneumoconioses (7).

1.3 Fibrose Pulmonar

Doenças fibróticas frequentemente são resultado de uma condição de cronicidade, sendo caracterizadas pela ocorrência de uma resposta imunológica que persiste por diversos meses e cuja componente inflamatório, remodelamento de tecido e reparo ocorrem simultaneamente. Apesar de existirem diversas etiologias e manifestações clínicas, a maioria das doenças fibróticas têm em comum um irritante persistente que mantém a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas fibrogênicas, os quais estimulam a deposição de elementos do tecido conjuntivo que progressivamente promovem o remodelamento e destroem a arquitetura tecidual normal (8) (9) (10).

O dano tecidual pode resultar de diversos estímulos, como infecções, reações autoimunes, toxinas, radiação e injúria mecânica. O processo de reparo normalmente envolve duas fases distintas: a fase regenerativa, na qual, as células lesionadas são substituídas por células saudáveis do mesmo tipo celular, sem deixar evidências de dano tecidual, e a fase chamada de fibroplasia, na qual o tecido normal é progressivamente substituído por um tecido conjuntivo (11). Biologicamente o processo de reparo tecidual é fundamental para a reorganização e substituição de células afetadas por uma lesão, porém ele se torna deletério quando não é controlado apropriadamente, resultando na deposição considerável de componentes da matriz extracelular (MEC) em que o tecido normal é substituído por um tecido cicatricial permanente, todo esse processo fibrótico pode resultar na falência do órgão e até mesmo levar a morte do paciente portador (9).

Doenças pulmonares, em geral, se mostram refratárias aos tratamentos disponíveis e que possui uma alta taxa de mortalidade, de acordo com os órgãos

de saúde públicos não existem dados confiáveis para determinar o número preciso de pessoas afetadas no mundo, no entanto estima-se que esse número possa chegar à casa dos milhões, e que cada ano sejam reportados mais casos da doença de acordo com dados da NIH (12). Diversos fatores podem desencadear a fibrose pulmonar, entre eles estão a utilização de alguns medicamentos, como quimioterápicos, infecções por patógenos, aerossolização de toxinas no ar e inalação de partículas inorgânicas, mas apesar de tudo a forma de manifestação mais prevalente da doença no mundo é a fibrose idiopática pulmonar, ou seja, sem uma causa conhecida (13).

Os principais tipos celulares envolvidos no desenvolvimento da doença e alvos de estudo e tratamento são os macrófagos alveolares e os miofibroblastos. Macrófagos são sentinelas do sistema imunológico estando presentes em praticamente todos os tecidos do corpo humano, são assim conhecidas porque são as primeiras células de defesa a chegar ao local de lesão, realizar o reconhecimento de antígeno e a fagocitose de patógenos e células em processo de morte celular (14). Devido a essas características, estudos têm demonstrado que os macrófagos são reguladores cruciais da fibrose, a partir de populações específicas que exercem atividades funcionais únicas nas fases de iniciação, manutenção e resolução da fibrose. O processo de ativação de macrófagos através da ingestão e destruição de partículas sólidas (fagocitose) é caracterizado pela liberação de mediadores inflamatórios capazes de realizar o recrutamento de outros tipos celulares e subsequente liberação de mediadores pró-fibróticos, como TGF- β e PDGF, fundamentais para a síntese de MEC e promoção do desenvolvimento do fenótipo de miofibroblasto. Além da produção de mediadores, a localização dos macrófagos mostra que estão sempre fisicamente próximos aos fibroblastos, demonstrando uma forte evidência de que ocorra uma interação entre esses tipos celulares (8). Os macrófagos também são as principais células responsáveis pela produção de metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs), componentes enzimáticos extracelulares que controlam a reposição e degradação da MEC, na maioria das doenças fibróticas se apresenta uma condição de proteólise deficiente (15).

Fibroblastos são células constituintes do tecido conjuntivo, que em sua condição ativada (miofibroblastos) passam a expressar a α -actina de músculo liso e a secretar componentes da MEC. Na fase de remodelamento os

miofibroblastos apresentam um papel essencial no reparo tecidual através contração da lesão, processo no qual as bordas da lesão se direcionam para o centro e as células epiteliais e endoteliais se dividem e migram através da matriz temporária para regenerar o tecido lesionado. No entanto, na fibrose as lesões se tornam severas devido à desregulação do processo de reparo ou a persistência do agente patológico, o que leva a estimulação contínua para produção de mediadores inflamatórios e prófibróticos que impedem a finalização do processo de reparo (9).

1.31 Pneumoconioses

O termo pneumoconiose é utilizado para descrever doenças causadas pela inalação exagerada de partículas inorgânicas, principalmente relacionadas as atividades laborais, sendo então caracterizada como de caráter ocupacional (16) (Tabela 1.1). Elas podem ainda ser classificadas em pneumoconioses fibrogênicas ou não-fibrogênicas, dependendo do tipo de reação induzida pela partícula. São excluídas dessa denominação as alterações neoplásicas e reações de vias aéreas, como asma, bronquite e enfisema.

Doenças Pulmonares Causadas pelos Poluentes do Ar		
Agente	Doença	Exposição
Poeiras Minerais		
Poeira do carvão	Antracose Máculas Fibrose maciça progressiva Síndrome de Caplan	Mineração do carvão (particularmente carvão duro)
Silica	Silicose Síndrome de Caplan	Trabalho em fundições, jateadores de areia, mineração, laminação, outros
Asbestos	Asbestose Placas pleurais Síndrome de Caplan Mesotelioma	Mineração, laminação e fabricação; instalação e remoção de material isolante
Berílio	Carcinoma do pulmão, laringe, estômago, cólon Beriliose aguda Granulomatose do berílio Carcinoma broncogênico (?)	Mineração e fabricação
Óxido de ferro	Siderose	Soldagem
Sulfato de bário	Baritose	Mineração
Óxido de estanho	Estanose	Mineração

Tabela 1.1: Tipos de doenças pulmonares causadas por poluente do ar (7).

O desenvolvimento de uma pneumoconiose dependerá da quantidade de partícula retida nas vias aéreas, tamanho, forma, solubilidade, reatividade físico-química e além disso da possibilidade da interação com outros irritantes, como por exemplo toxinas presentes nos cigarros. A quantidade de partículas retidas nos pulmões é determinada pela concentração de poeira presente no ar do ambiente, o tempo de exposição e a efetividade dos mecanismos fisiológicos de

clearance. Outras influências como fumo, diminuem essa capacidade do *clearance*, aumentando significativamente o acúmulo de partículas nos pulmões. Dentre as mais perigosas encontram-se aquelas com 1 a 5 μm de diâmetro, isso porque têm uma maior capacidade de alcançar as vias aéreas terminais e os sacos alveolares, instalando-se no seu revestimento. A solubilidade e citotoxicidade das partículas são influenciadas, em grande parte, pelo seu tamanho - em geral pequenas partículas possuem maior solubilidade podendo resultar em um dano tecidual mais rápido. As partículas maiores tendem a resistir à dissolução, podendo persistir no parênquima pulmonar por tempo mais longo -, essas partículas tendem a causar pneumoconioses colágenas fibrosantes, como a silicose.

Uma vez no tecido, as partículas inaladas podem ser captadas por células epiteliais ou atravessar o revestimento epitelial, interagindo diretamente com células do sistema imunológico como os macrófagos residentes. Algumas podem alcançar os vasos linfáticos, por drenagem direta ou através da migração dos macrófagos iniciando assim uma resposta imune a componentes das partículas. Outras partículas têm a capacidade de ativar inflamossomos após serem fagocitadas por macrófagos, esse tipo de reação imune amplifica a intensidade e a duração da reação local. Os efeitos da inalação dessas partículas não se restringem apenas aos pulmões, já que as partículas podem entrar na circulação sanguínea e linfática, mas também a própria inflamação pulmonar induz a respostas sistêmicas, como o recrutamento de células da medula óssea vermelha (7).

1.32 Silicose

A silicose compõe o grupo das pneumoconioses, sendo causada pela inalação de partícula de sílica cristalina, que leva a uma inflamação persistente e que tem como consequência uma fibrose intensa caracterizada pela formação de uma estrutura granulomatosa no tecido pulmonar (17), resulta em uma das principais causas de invalidez entre as doenças respiratórias, sendo também responsável por um elevado índice de mortalidade no mundo. O dióxido de silício (SiO_2), ou conhecido apenas sílica, é o mineral mais comum na crosta terrestre, representando 60% da constituição do planeta, podendo ser encontrado na forma amorfa ou na forma cristalina (18). O quartzo é o tipo de

mineral cristalino mais patogênico, tendo maior importância do desenvolvimento da silicose (19). Essas partículas sólidas estão presentes nas poeiras formadas durante o processamento de minerais ou materiais rochosos, quando cortados, perfurados ou escavados. Dentre as atividades de maior risco estão aquelas que envolvem o jateamento de areia, mineração, trabalho em fundição de ferro, indústrias de cerâmicas e abrasivos, pedreiras e moagem de granito (20). Geralmente essas partículas são maiores que $0,5 \mu\text{m}$, porém dependendo do tamanho se depositarão em diferentes locais do sistema respiratório (Figura 1.5). A exposição crônica às partículas de sílica pode aumentar o risco de desenvolvimento de outras disfunções pulmonares como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e tuberculose, independente do desenvolvimento da silicose, além disso por serem muito pequenas as partículas têm capacidade de permanecer no ambiente por longos períodos de tempo e serem carregada pelo vento, sendo também um risco a saúde de indivíduos não envolvidos em atividades de risco (21). A associação da doença em consequência a inalação das partículas de sílica tem seu primeiro registro feito no ano de 1690 por Hipócrates, mas apenas em 1930 foi definida como um problema de saúde pública (22).

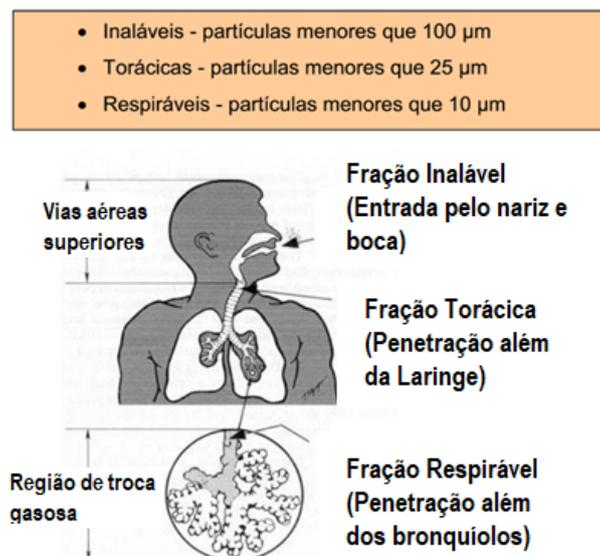


Figura 1.5: Localização de diferentes tamanhos de partículas no sistema respiratório (adaptado de 15).

1.321 Epidemiologia

Silicose é a pneumoconiose mais prevalente e mais antiga do mundo (23), com dados epidemiológicos sendo escassos e por vezes subestimados, uma vez que se trata de uma doença subnotificada. Apesar de ser uma disfunção predominante em países em desenvolvimento como a China, Brasil, Índia e África, países do continente europeu e os Estados Unidos apesar de diminuírem o número de casos da doença por meio da prevenção, estimam ter milhões de trabalhadores em situação de risco e centenas de morte anualmente (24). No Brasil, dados apontam que cerca de 6 milhões de trabalhadores estão expostos às partículas de sílica, dentre estes, a grande maioria se encontrando na região sudeste (25) (26). Apesar de haver uma política nacional para a prevenção da doença, a falta de fiscalização e conscientização dos trabalhadores ainda é muito precária no Brasil.

1.322 Fisiopatologia da silicose

As poeiras contendo as partículas de sílica ao serem inaladas chegam aos alvéolos e são reconhecidas pelo sistema imune inato, como estranhas, sendo então fagocitadas principalmente pelas células residentes, os macrófagos alveolares. Estes podem migrar através da lâmina mucociliar e através do parênquima pulmonar e vão ocasionar uma lesão no tecido. A fagocitose desta partícula leva uma série de respostas por parte dos macrófagos, dentre elas estão: a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e a ativação de fatores transcricionais como o fator nuclear kappa β (NF- κ B) e do inflamossomo. A ativação celular culmina na produção e liberação de mediadores inflamatórios como fatores de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), proteases, como MMP e TIMPs, e a prostaglandinas (22).

Os macrófagos contendo sílica também podem acabar morrendo devido à toxicidade das partículas, resultando na sua liberação no tecido pulmonar. As partículas de sílica são então re-fagocitadas por outros macrófagos alveolares, induzindo assim a um ciclo de fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios e morte celular. Este ciclo é acompanhado pelo movimento dos neutrófilos e linfócitos para as áreas de lesão inflamatória, resultando em mais alterações a esse tecido. As citocinas inflamatórias, interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral e quimiocinas, tais como interleucina 8 (IL-8), proteína

inflamatória de macrófago-2 (MIP-2), proteína inflamatória de macrófago-1 (MIP-1), interleucina 13 (IL-13) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) se encontram altamente envolvidas neste processo (9).

Estes mediadores levarão ao recrutamento de outras células do sistema imune e também de fibroblastos, e alguns deles como TGF- β e IL-13 são responsáveis pela a ativação dos fibroblastos recrutados, e uma vez ativados eles começam a secretar componentes da MEC, principalmente as fibras colágenas que levam à formação de uma estrutura chamada de granuloma, que tem a função de isolar e reparar a lesão causada pela partícula de sílica. Como o fibroblasto recebe estímulos constantes, devido à incapacidade de depuração adequada das partículas de sílica, o processo de reparo apresenta-se exacerbado, sendo caracterizado por produção e deposição excessiva MEC. O colágeno depositado é principalmente do tipo I e III, e desta forma o tecido pulmonar elástico vai sendo substituído por um tecido fibroso (27) (28) (Figura 1.6), o que irá culminar na perda da função pulmonar (com redução da troca gasosa) e, conseqüentemente, diminuição da expectativa de vida dos indivíduos portadores desta doença.

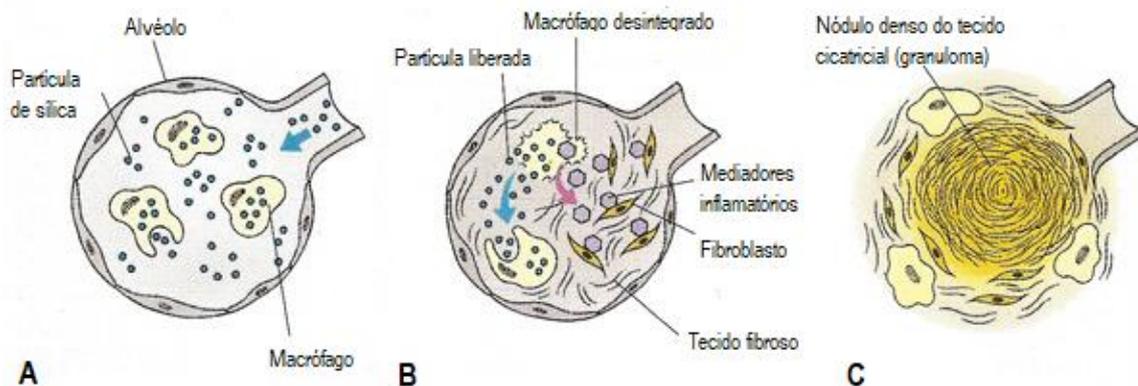


Figura 1.6: Esquema do estabelecimento da silicose. **(A)** Entrada da partícula de sílica e sua fagocitose pelos macrófagos alveolares. **(B)** Liberação de mediadores inflamatórios e fibróticos recrutando e ativando células do sistema imune e fibroblasto, que iniciam a deposição de MEC. **(C)** Esse processo culmina na formação de um granuloma no tecido pulmonar (adaptado de 29).

1.323 Morfologia & Curso clínico

Nos estágios iniciais da doença existe a presença de nódulos pouco poupáveis e discretos nos linfonodos e nas zonas superiores do pulmão. Com a progressão, os nódulos coalescem em cicatrizes colagenosas mais firmes. As lesões fibróticas também podem ser observadas nos gânglios linfáticos hilares e pleura. Na radiologia algumas vezes pode se observar, também, uma camada de calcificação dos nódulos presentes nos gânglios, que são conhecidos como calcificação casca de ovo. Se a doença continua progredindo pode haver uma expansão e maior coalescência das lesões produzindo um quadro de fibrose maciça e progressiva. O exame histológico revela uma lesão marcante e caracterizada por uma área central de fibra colágena com uma zona periférica composta principalmente por macrófagos carregado de partículas (7).

Os pulmões através do exame simples de raio-x apresentam nódulos medindo cerca de 10mm (30). A função pulmonar dos pacientes se apresenta normal ou moderadamente afetada, e a maioria não desenvolve encurtamento da respiração até se instalar a fibrose massiva e progressiva. A silicose pode ser observada sob algumas formas clínicas que são descritas a seguir.

- Aguda: caracterizada pela exposição à grandes quantidades de sílica e o aparecimento de sintomas em um curto espaço de tempo, estimado em 5 anos.

- Acentuada: caracterizada pela exposição a quantidades intermediárias de sílica e o aparecimento de sintomas em um espaço de tempo entre a aguda e a crônica, considera-se de 5 a 10 anos.

- Crônica: caracterizada pela exposição a pequenas quantidades de sílica e o aparecimento de sintomas em um longo espaço de tempo, considera-se maior que 10 anos.

O indivíduo que apresenta a doença sob a forma aguda apresenta intensa dispneia, astenia, perda de peso e hipoxemia. Em geral a progressão da doença ocorre de maneira muito rápida, levando o indivíduo ao óbito. Já as manifestações clínicas da doença acentuada e crônica são bastante semelhantes, inicialmente assintomáticas, evoluindo com sintomas de dispneia progressiva (26).

1.324 Diagnóstico & Tratamento

O diagnóstico da silicose é realizado através do histórico médico e das atividades do paciente, exame físico, teste de função pulmonar, radiografia de tórax, tomografia computadorizada e biópsia. Os testes que avaliam a função pulmonar do indivíduo são mais utilizados para identificar o grau de comprometimento do tecido. Como um dos mais comuns podemos destacar os que se utilizam da sensibilidade do paciente a metacolina, que é uma ferramenta valiosa e amplamente utilizada no estudo da irritabilidade das vias respiratórias. Alguns indivíduos que possuem problemas respiratórios demonstram ter uma sensibilidade aumentada a alguns agentes broncoconstritores como a metacolina, em relação a indivíduos saudáveis, gerando um quadro de hiperreatividade. Esses testes são mais frequentemente realizados em pacientes que apresentam quadro alérgico ou asmático.

Atualmente não existe nenhum tratamento capaz de reduzir significativamente a mortalidade associada à silicose (19), apenas o uso de uma terapia de suporte, que consiste no uso de anti-inflamatórios, broncodilatadores, antitussígenos, terapia de oxigênio e em último caso a realização do transplante de pulmão. Este fato tem sido um elemento importante para que grupos de pesquisa dediquem seus projetos para a busca de uma terapia eficaz para utilização na silicose.

1.4 Nanotecnologia

A nanotecnologia se apresenta como um instrumento de grande interesse para o aperfeiçoamento, descobrimento e desenvolvimento de novas drogas. Nanotecnologia é uma ciência designada ao estudo e aplicação de nanoestruturas ou nanosistemas, e isso envolve o desenho, a caracterização, sintetização e aplicação de matérias projetadas em escala de tamanho atômico e molecular que possuem dimensões que variam de 0,1 a 100 nanômetros (nm) (31) (32) (Figura1.7).

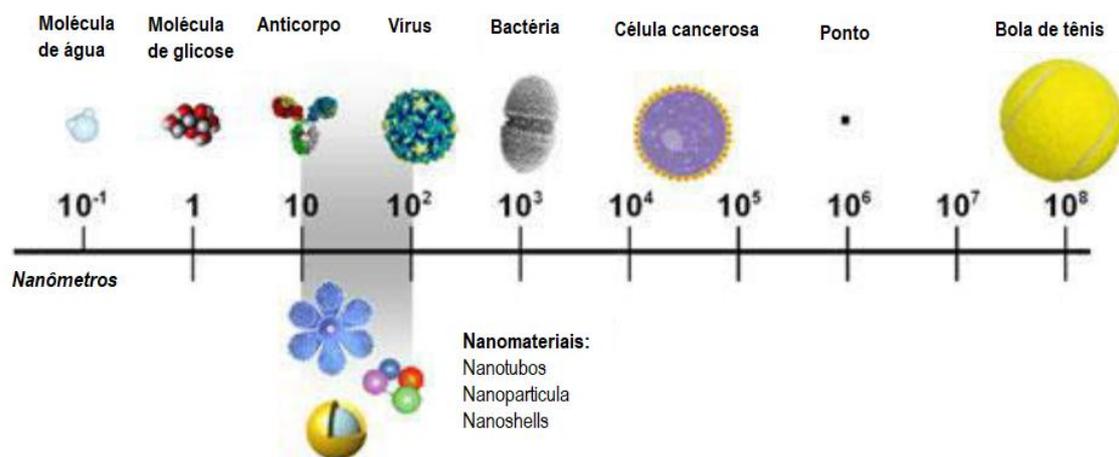


Figura 1.7: Nanoescala e nanoestruturas Adaptado de (adaptado de 33).

Quanto menor a partícula mais átomos se encontram presentes na sua superfície quando comparada a partículas maiores. Além disso as estruturas nanométricas apresentam uma maior área de superfície por unidade de massa. Como a maioria das reações catalíticas ocorrem na superfície, nanopartículas são mais reativas do que as partículas maiores (34). Os efeitos gerados pelo tamanho das nanopartículas são utilizados como uma ferramenta promissora na medicina no que tange a obtenção de imagens biológicas, terapia gênica, diagnóstico e tratamentos de doenças em geral. As nanopartículas possuem propriedades biológicas e físico-químicas distintas daquelas apresentadas pelas mesmas substâncias escala de tamanho maior. As propriedades de nanopartículas podem influenciar diretamente nas suas interações biológicas devido as suas peculiaridades como: tamanho, forma, composição química, estrutura de superfície, carga, solubilidade e capacidade de aglomeração (35). Essas peculiaridades apresentadas podem contribuir para solução de problemas presentes atualmente no desenvolvimento de drogas como toxicidade e biodisponibilidade de algumas moléculas, refletindo dessa maneira na diminuição da dose de administração e consequentemente redução dos efeitos colaterais provocados pelo tratamento (31). Outros pontos positivos no uso de nanotecnologia na medicina incluem: tempo de reação bioquímica menor, maior biocompatibilidade e interação mais específica com células alvo (36).

Apesar das vantagens oferecidas pelo uso das nanopartículas ainda se tem muitas dúvidas sobre sua utilização quanto aos efeitos toxicológicos que elas podem desencadear por serem partículas tão pequenas em organismos vivos (31). Outro ponto importante é como essas partículas são eliminadas,

principalmente nanopartículas metálicas, e quais as consequências que a presença delas no meio ambiente pode trazer.

1.41 Nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (GNP) são partículas metálicas provenientes da nanotecnologia e o impacto delas na medicina e biologia tem crescido rapidamente nos últimos anos. Nanopartículas de ouro têm propriedades vantajosas como estabilidade química e afinidade por biomoléculas, o que as torna candidatas promissoras e de grande importância para transporte de drogas, diagnóstico e terapia em geral (37).

De todos os minerais da Terra, o ouro é um dos mais utilizados com diversas aplicações, primeiramente utilizado como símbolo de status social apreciado em joias e usado como moeda de troca, depois utilizado para a confecção de materiais eletrônicos e aplicações na medicina (38). Os primeiros relatos do ouro sendo aplicado para uso medicinal são provenientes de países do continente asiático, como China e Índia, e datam do início dos séculos V-IV. Em 1997, ocorreu pela primeira vez a aplicação bem sucedida de ouro coloidal em um paciente com artrite reumatóide (39). De acordo com esses dados se percebe desde os primórdios o interesse em saber como as propriedades do ouro são capazes de promover a cura ou melhora de doenças, principalmente as de caráter inflamatórias (40).

Atualmente, trabalhos na literatura demonstram o potencial efeito anti-inflamatório e antioxidante da nanopartícula de ouro em modelos experimentais de doenças inflamatórias humanas (41) e, sua capacidade em inibir o acúmulo de células inflamatórias, com redução no nível de citocinas próinflamatórias, como o TNF- α e IL-1 β , em consequência a diminuição da atividade do ativador transicional NF- κ B (42) (43). A redução do nível dessas citocinas próinflamatórias também foi observada em modelo de doença infecciosa de cunho fibrótico granulomatoso que é a esquistossomose, assim como a presença de um efeito antioxidante no qual as GNPs proporcionaram uma melhora no quadro geral dos animais, tudo isso culminando na redução de granulomas hepáticos (44). Ao nível pulmonar, Barreto e colaboradores, 2014 (45) também mostraram que a administração local de GNP foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e a produção de citocinas, prevenindo as alterações

inflamatórias pulmonares causadas pela asma induzida por ovoalbumina. O mecanismo pelo qual a nanopartícula de ouro atua ainda não é completamente esclarecido, no entanto, diversos estudos apontam para a afinidade por diversos tipos celulares, principalmente os macrófagos. O que já foi observado é que as GNPs levam a uma mudança de comportamento do macrófago residente, o que pode afetar o progresso de desordens relacionadas com processos inflamatórios, o que as tornam um alvo de grande interesse e importância (46). Sendo assim, essa informação é de grande relevância no caso do estabelecimento e desenvolvimento da silicose, pois são os macrófagos alveolares um dos principais responsáveis por desencadear a resposta imune inata ao entrar em contato com a partícula de sílica (47).

Apesar do uso do ouro coloidal há tantos séculos, não é comprovado o mesmo benefício atribuído às nanopartículas. Um dos principais entraves no uso futuro de GNPs como medicamento é a sua toxicidade, pois se trata de uma partícula metálica. Não há estudos suficientes que apontem o seu uso de maneira segura por um período de tempo longo ou indeterminado, como no caso de doenças crônicas. Mesmo sendo uma nanopartícula, que se esperaria uma toxicidade mais baixa, isso nem sempre será verdadeiro, pois muitos fatores influenciam nas propriedades das partículas, como aquelas descritas no tópico de nanotecnologia (48). Em um estudo geral sobre a toxicidade da GNP, camundongos tratados 1, 24 e 72 horas não apresentaram acúmulo da GNP em nenhuma das condições e em nenhum dos principais órgãos analisados, o cérebro, rins e coração (46). Outros estudos realizados por tempo mais prolongado (dias após administração) apontam a presença das GNPs em diversos órgãos importantes como cérebro, rins e fígado, porém em nenhum dos casos foram verificadas alterações fisiológicas que comprometessem o funcionamento dos órgãos (49) (50).

2.0 Objetivo

2.1 Geral

Conforme apresentado acima, é premente a necessidade pela identificação um tratamento efetivo para doenças inflamatórias de caráter fibrótico como a silicose. Mais ainda, é reconhecida a atividade anti-inflamatória das GNPs em diversos contexto de modelos de doenças, incluindo aqueles que ocorrem ao nível pulmonar. Neste contexto, este projeto foi desenvolvido com vistas a investigar o potencial efeito do tratamento terapêutico com as GNPs sobre a resposta fibrótica pulmonar tardia em camundongos estimulados com partículas de sílica. Sistema biológicos *in vivo* e *in vitro* foram utilizados.

2.2 Específicos

Neste estudo avaliamos:

- O efeito da administração de GNPs aerosolizadas no pulmão de camundongos normais, avaliando parâmetros histológicos e funcionais do pulmão;
- O efeito terapêutico das GNPs sobre os parâmetros de área de granuloma, vias aéreas e infiltrado celular no pulmão de camundongos, 28 dias após a instilação de sílica;
- O efeito terapêutico das GNPs sobre componentes estruturais (fibras colágenas e elásticas) do pulmão de camundongos, 28 dias após a instilação de sílica;
- O efeito terapêutico das GNPs sobre a função pulmonar (resistência e elastância) de camundongos, 28 dias após a instilação de sílica;
- O efeito terapêutico das GNPs sobre a produção de citocinas/quimiocinas inflamatórias no pulmão de camundongos, 28 dias após a instilação de sílica;
- O efeito direto das GNPs sobre a reatividade de macrófagos alveolares estimulados com sílica *in vitro*.

3.0 Metodologia

3.1 *In vivo*

3.11 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss Webster machos, pesando de 20 - 25g, provenientes da Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sendo todos os procedimentos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA) da FIOCRUZ (licença LW57/14). Os animais foram mantidos em estantes aclimatizadas, sob condições de temperatura entre 22 e 25°C, ciclo de luz claro/escuro definido em 12h/12h.

3.12 Sistema de estimulação por via intranasal

Os camundongos foram anestesiados com isoflurano (2%) até completa sedação, e em seguida foram instilados com 10 mg de sílica dissolvidos em 50 µL de salina 0,9% estéril (tamanho das partículas 0,5 – 10 µm; Sigma Aldrich) (63). As análises foram realizadas 28 dias após a provocação com sílica. Os camundongos controles foram instilados com 50 µL de salina 0,9% estéril.

3.13 Tratamento com Nanopartículas de Ouro

Para o tratamento, as GNPs 0,3 - 10 µg/Kg (Sigma Aldrich- 10 nm) foram administradas aos camundongos silicóticos, por aerossol, em dias alternados, durante 7 dias consecutivos, dando início 21 dias pós-sílica (45). As análises foram realizadas 1 dia após a última administração das GNPs, como indicado no esquema abaixo:

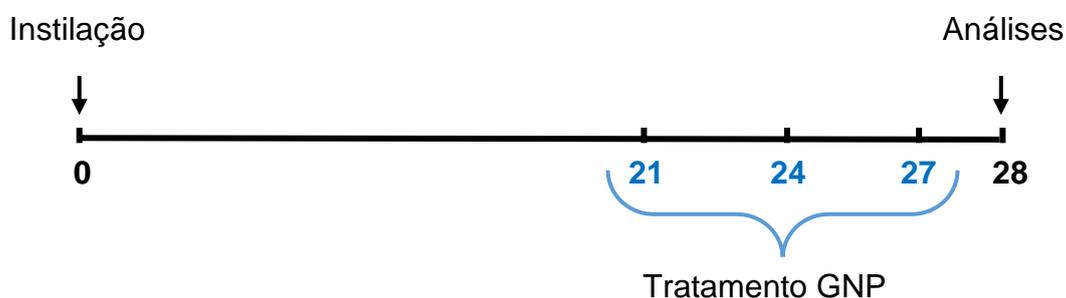


Figura 3.1: Esquema de tratamento com GNP.

3.14 Análise da Função pulmonar e Hiper-reatividade das Vias

Aéreas

Foi utilizado o sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasiva (Buxco Research System-), no qual os animais foram submetidos à anestesia com pentobarbital sódico (60 mg/Kg, por via intraperitoneal). Em seguida foi realizada a inserção de uma cânula na traqueia ao qual foi conectada a um ventilador mecânico e depois curarizados com brometo de pancurônio (2 mg/Kg), os animais são mantidos no sistema para registros dos parâmetros de resistência (cmH₂O/mL/s) e elastância pulmonar (cmH₂O/mL). Para a análise da hiper-reatividade das vias aéreas, foram aerosolizados 5 µL de concentrações crescentes do agente brococonstrictor metacolina (9 - 81 mg/mL) com a duração de 5 minutos para cada. Em seguida, os animais foram mortos e os pulmões perfundidos com uma solução de salina contendo EDTA 10 mM. O pulmão esquerdo foi fixado com paraformaldeído e destinado a procedimentos histológicos e o pulmão direito foi retirado e congelado a - 20°C para outras análises.

3.15 Análise histológica

Após a análise da função pulmonar, os animais foram mortos com pentobarbital (250 mg/kg) e o pulmão esquerdo foi recuperado e submetido à fixação em solução de paraformaldeído. As etapas posteriores constaram de desidratação, através de banhos com concentrações crescentes de etanol (70% a 100%), seguida de clarificação através da substituição do etanol por um líquido mais miscível com o meio de inclusão, o xilol. O pulmão esquerdo foi então imerso em banhos sucessivos de parafina (temperatura de 60°C) até a etapa de emblocamento, sendo então processado para a confecção dos cortes finos (5 µm) em micrótomo. A seguir, os cortes foram submetidos às colorações com hematoxilina e eosina (H&E), picro sirius (PS) e resorcina fucsina (protocolo de Weigert sem pré-oxidação). Na sequência, foi realizado escaneamento em sistema 3DHISTECH - Pannoramic MIDI), e posteriormente realizadas as análises através *software* Pannoramic viewer. No caso da morfometria, foi utilizada uma ferramenta de delimitação de área que permitiu o cálculo do percentual de área total do parênquima pulmonar ocupada por granuloma (%).

3.16 Quantificação de Proteína

Foi realizada quantificação do conteúdo total de proteínas no pulmão através do método colorimétrico de ácido bicinconínico (BCA). Fragmentos de tecido pulmonar foram macerados em uma solução de PBS 1x contendo Triton 0,1% e coquetel de inibidores de proteases (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suíça). Após centrifugação a 13.000 x g a 4°C, por 15 minutos, o sobrenadante foi recolhido e, as amostras foram diluídas em PBS (5 vezes) e adicionadas à placa de 96 poços, seguidas da colocação da solução de BCA e Cu⁺² mantida por 15 minutos a 60°C. Neste ensaio foi utilizada uma curva padrão que consistiu de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (2,0 mg/mL – 0,351 mg/mL). Após o término da reação, a densidade óptica foi medida em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 540 nm.

3.17 Quantificação de colágeno

Para a quantificação do conteúdo total de fibras colágenas presente no pulmão, utilizamos a técnica colorimétrica de Sircol™ (Biocolor). Para isso os pulmões foram macerados (em uma solução de TRIS 0.05 M, NaCl 1M e coquetel com inibidores de proteases pH=7,5) e em seguida o material foi centrifugado a 15.000 x g a 4°C, por 1 hora. Ao sobrenadante recolhido (20 µL) e na curva padrão (100 µg/mL- 5 µg/mL de colágeno do *kit* de Sircol) foi adicionado o reagente Sirius Red (200 µL), e após 30 minutos de reação o material foi novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e ao *pellet* foi adicionado o reagente Alkaline (200 µL). As amostras foram colocadas em placas de 96 poços, e a densidade óptica obtida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 590 nm. Os resultados obtidos foram expressos em µg de colágeno/pulmão direito.

3.18 Quantificação de mediadores inflamatórios por ELISA

Para avaliação dos níveis de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar (TNF-α, IL-1β, MIP-1α, MIP-2 e MCP-1), foi utilizada a técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) com kits comerciais (Duo Set, R&D System, Estados Unidos), seguindo as recomendações do fabricante. O tecido pulmonar foi macerado em uma solução de PBS 1x contendo Triton 0,1% e um coquetel de inibidores de proteases (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suíça). Em seguida,

as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g a 4°C, por 15 minutos, os sobrenadantes recolhidos e usados para a análise dos mediadores inflamatórios.

Para tanto foram utilizadas placas de 96 poços, às quais foram adicionados 50 µL/poço do anticorpos de captura diluídos em solução tampão (NaCl 1.5M, H₃BO₄ 0,5M e NaOH 1N, pH = 7.4), seguindo-se período de incubação de 12 horas a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes (200 µL/poço) com solução de tampão contendo timerosal, KPO₄ 1M e Tween-20 0,005%, em seguida para o bloqueio de sítios inespecíficos, os poços foram preenchidos com 200 µL/poço de solução contendo PBS 1x e BSA, 1%. Após 1 hora em temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas 3 vezes (200 µL/poço) com a solução tampão de lavagem. As amostras e a curva padrão foram diluídas em solução tampão contendo BSA 2% em PBS 1x e adicionadas 100µL/poço. Após o período de incubação (2 horas a 37°C) os poços foram lavados 3 vezes com solução tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo de detecção biotinilado (50 µg/mL) e se seguiu com período de incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Na sequência, os poços foram lavados com solução tampão de lavagem (200 µL/poço), e adicionado ao anti-corpo secundário a enzima (50 µL/poço) neutravidina “horseradish peroxidase” (HRP) (50 µL/poço) diluído em tampão contendo BSA 2% em PBS 1x durante 1 hora a temperatura ambiente. Após a última lavagem com solução tampão de lavagem (200 µL/poço), se adicionou o substrato cromogênico (K-Blue®) (50 µL/poço) para o desencadeamento da reação colorimétrica (duração de 5 a 30 minutos), a qual foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 0,19 M (50 µL/poço). A leitura das placas foi realizada em um espectrofotômetro a um comprimento de onda específico para cada citocina em análise, e os resultados foram expressos em pg/mL.

3.2 *In vitro*

3.2.1 Ensaios de ativação macrófagos *in vitro*

Foi utilizada a linhagem de macrófagos alveolares murinos (AMJ2C11) procedente do Banco de Células do Rio de Janeiro. Para análise da ativação, as células (2,5 x 10⁵) foram adicionadas a placas de 24 poços e mantidas durante 24 horas. Posteriormente, as células foram submetidas ao pré-tratamento com

as GNPs (0,1 - 3,0 µg/mL) durante 1 hora, e em seguida estimuladas com partículas de sílica (300 µg/mL) e LPS (1,0 µg/mL), este último utilizado como controle interno do ensaio. Após 24 horas de estimulação, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -20°C para quantificação de TNF- α através da técnica de ELISA.

3.22 Análise da incorporação de BrdU

Para avaliação da incorporação de BrdU, as células AMJ2C11 ($2,0 \times 10^4$) foram adicionadas a placas de 96 poços e mantidas por 24 horas. Posteriormente, as mesmas foram incubadas com as GNPs (0,1 - 3,0 µg/mL) durante 1 hora, e em seguida estimuladas com partículas de sílica (300 µg/mL) e LPS (1,0 µg/mL). Após 24 horas do estímulo foi adicionada a solução de BrdU Chemicon® (200 µL/poço) e feita incubação por 3 horas. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante aspirado e a solução fixadora do kit adicionada (200 µL/poço). Após incubação por 30 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado, as placas foram então secas e armazenadas na geladeira. Para a detecção de BrdU, as placas foram lavadas com o tampão por 3 vezes, sendo posteriormente adicionado o anticorpo detector (100 µL/poço) e feita incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Após nova sequência de lavagens com o tampão (3 vezes), foi adicionado o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (100 µL/poço) e feita incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Ao final os poços foram novamente lavados (3 vezes), foi feita adição do substrato (100 µL/poço), e após aguardados 30 minutos a temperatura ambiente, foi colocada a solução de parada (100 µL/poço) e, posterior, leitura da densidade óptica foi realizada em um espectrofotômetro utilizando os comprimentos de ondas de 450/540 nm.

3.24 Viabilidade celular

Para a análise da viabilidade celular foi realizado o ensaio colorimétrico que tem base na utilização do reagente 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-yl) - 2,5 - difeniltetrazolium brometo (MTT). As células AMJ2C11 ($2,0 \times 10^4$) foram adicionadas a placas de 96 poços e aguardadas 24 horas. Posteriormente, foram adicionadas GNPs (0,1 - 3,0 µg/mL) e após 24 horas, foi adicionada a solução

de MTT (20 μ L/poço) a uma concentração final de 0,5 mg/mL. Após 3 horas, as placas foram centrifugadas a 2.800 rpm por 3 minutos a 4°C e sobrenadante descartado. Os cristais que se formaram foram dissolvidos ao se adicionar DMSO (150 μ L/poço), fenômeno que ocorreu em um período de 15 minutos. A leitura da densidade óptica da placa foi feita em espectrofotômetro a 440 nm.

3.3 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de Newman-Keuls-Student. Para comparação entre dois grupos experimentais, foi utilizado o teste “t” de Student para amostras não pareadas. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos em ambos os testes.

4.0 Resultados

4.1 Análise da mecânica respiratória e alterações morfológicas no pulmão de camundongos instilados com sílica

Através do processo de escaneamento digital e coloração por H&E, verificamos que a estrutura organizacional do pulmão esquerdo de camundongos controles (instilados com salina intranasal) se mostrou preservada no que tange as vias aéreas centrais e as periféricas, bem como a extensa área do parênquima pulmonar (**Figura 4.1 A**). Estes achados foram confirmados a partir de imagens obtidas com objetiva de maior aumento, permitindo melhor detalhamento, quando pode ser constatado estar a arquitetura pulmonar mantida nas regiões de vias aéreas menores (bronquíolos terminais e respiratórios) e sacos alveolares, sem evidência de infiltrado leucocitário ou proteico (**Figura 4.1 C**). Por outro lado, na condição de fase tardia da silicose (28 dias), evidenciamos a presença de inúmeros granulomas localizados de forma dispersa no pulmão esquerdo dos animais, claramente coalescentes, ocupando em torno de 40 - 60% da área total do órgão (**Figura 4.1 B**). A amplificação da imagem permitiu visualizarmos que os granulomas mostraram localização próxima a vias aéreas menores, sugerindo um processo de brotamento destes em direção à região do parênquima. Apresentaram bordos definidos, estrutura organizacional com área necrótica central (coloração rosada), com presença de neutrófilos, e região de espessamento periférico onde localizam-se macrófagos e fibroblastos, estes últimos responsáveis pela produção de componentes da matriz extracelular – predominantemente colágeno. Bordos nitidamente definidos reforçam a característica clara de granuloma do tipo de corpo estranho (**Figura 4.1 D**). Muito embora o tamanho da fotomicrografia não permita nítida visualização, partículas de sílica (elementos refringentes) foram facilmente evidenciadas, em sua maioria colocalizadas na região de granuloma.

Em paralelo, verificamos que as alterações morfológicas descritas acima para os animais silicóticos, se refletiram diretamente na mecânica respiratória, quando foi observado claro aumento dos níveis basais de resistência e elastância pulmonares (**Figuras 4.1 E e 4.1 F**, respectivamente). Na condição de aerosolização metacolina, um agente broncoconstrictor colinérgico, vimos uma exacerbação da resposta de elevação dos níveis de resistência e de

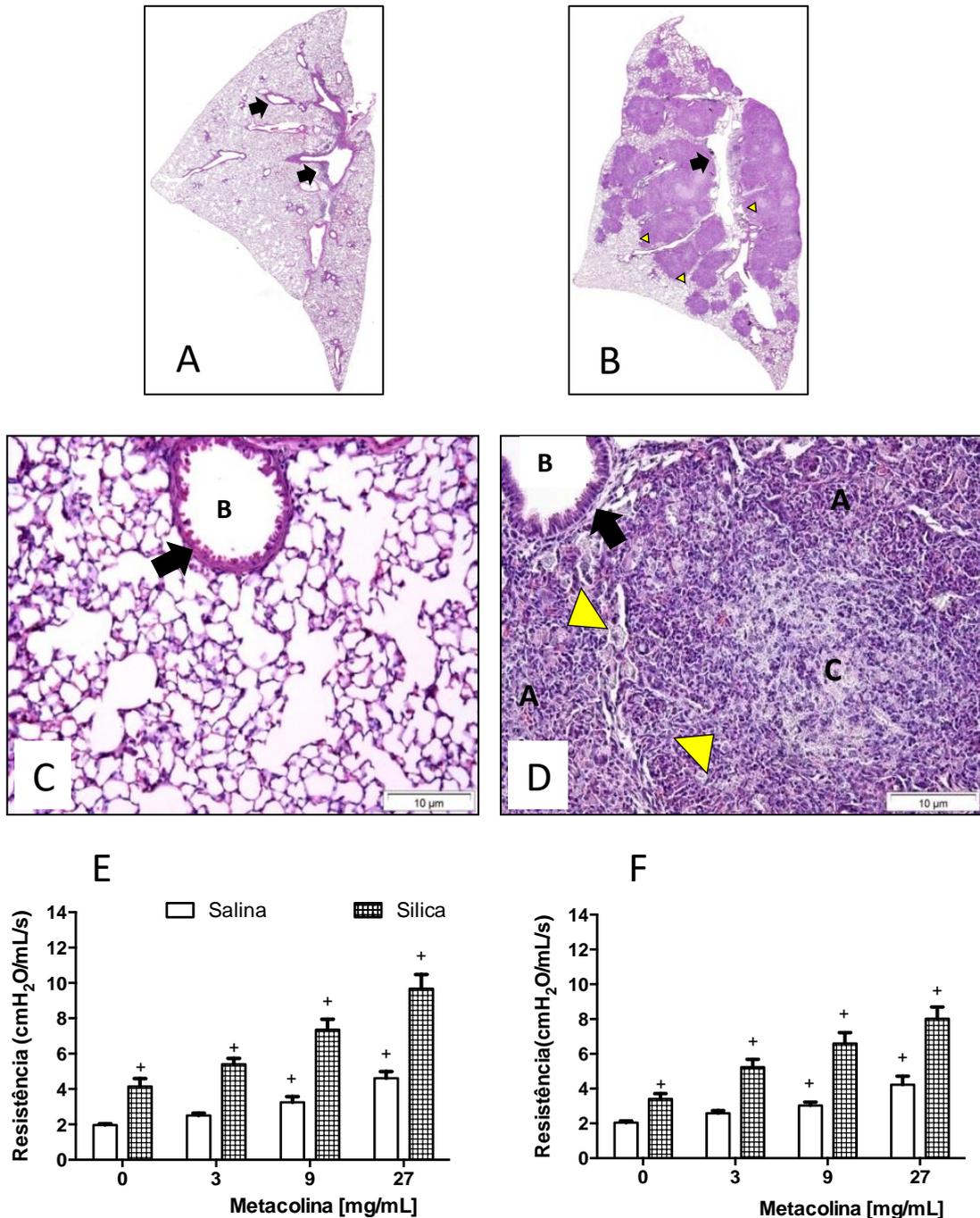


Figura 4.1– Efeito da estimulação com sílica, por via intranasal, em camundongos. Fotomicrografias de (A) (B) pulmão esquerdo total; (C) (D) área de parênquima e vias aéreas. Animais foram instilados com salina (A) (C) ou com sílica (10 mg/50 μ L) (B) (D). Coloração com hematoxilina e eosina (HE). Barra de escala 10 μ m. Setas pretas indicam vias aéreas; cabeça de seta indicam granulomas. BR= bronquíolo; CN = centro necrótico; ZN= zona neutrofílica AE = área de espessamento. Foram avaliados também os parâmetros de (E) resistência; (F) elastância.

elastância pulmonar nos animais silicóticos, indicando um claro estado de hiperreatividade, o que é característico de ocorrência em diversas doenças inflamatórias pulmonares (**Figuras 4.1 E e 4.1 F**).

4.2 Efeito do tratamento com GNPs sobre alterações morfológicas e função pulmonar induzidas pela instilação de sílica em camundongos

4. 21 Administração de GNPs a animais normais

Tomando por base a proposta de identificar um tratamento terapêutico para o quadro de fibrose associado a silicose, definimos ser necessária a utilização de um protocolo experimental que incluísse a administração de repetidas doses de GNPs aos animais. Mais ainda, considerando uma eventual toxicidade do tratamento com as referidas partículas, consideramos importante como primeira abordagem, analisar o efeito das GNPs quando administradas a animais normais. A escolha das doses a serem testadas foi baseada em estudo prévio, no qual foi demonstrado o efeito anti-inflamatório local das GNPs na asma alérgica murina (45). O protocolo adotado constou de 3 administrações de GNPs (1, 10 e 60 µg/Kg), por aerossol, nos dias 1, 4 e 7, sendo as análises realizadas 1 dia após a última dose. É interessante mencionar que este protocolo foi escolhido considerando-se a condição futura de teste na silicose. A análise morfológica do tecido pulmonar revelou que os animais normais, quando submetidos ao tratamento com as GNPs, apresentaram perfil de normalidade, com a estrutura preservada, ausência de infiltrado inflamatório (**Figura 4.2 A-D**) e conteúdo proteico similar àquele dos animais que não foram tratados (**Figura 4.2 E**). Da maneira similar, não foi notada qualquer alteração da funcionalidade pulmonar causada pelas GNPs, no que tange os parâmetros de resistência (**Figura 4.3 A**) e elastância pulmonar (**Figura 4.3 B**), na ausência ou presença de aerossolização de metacolina. Estes resultados se mostraram bastante promissores e nos encorajaram a prosseguir com o estudo das GNPs na silicose.

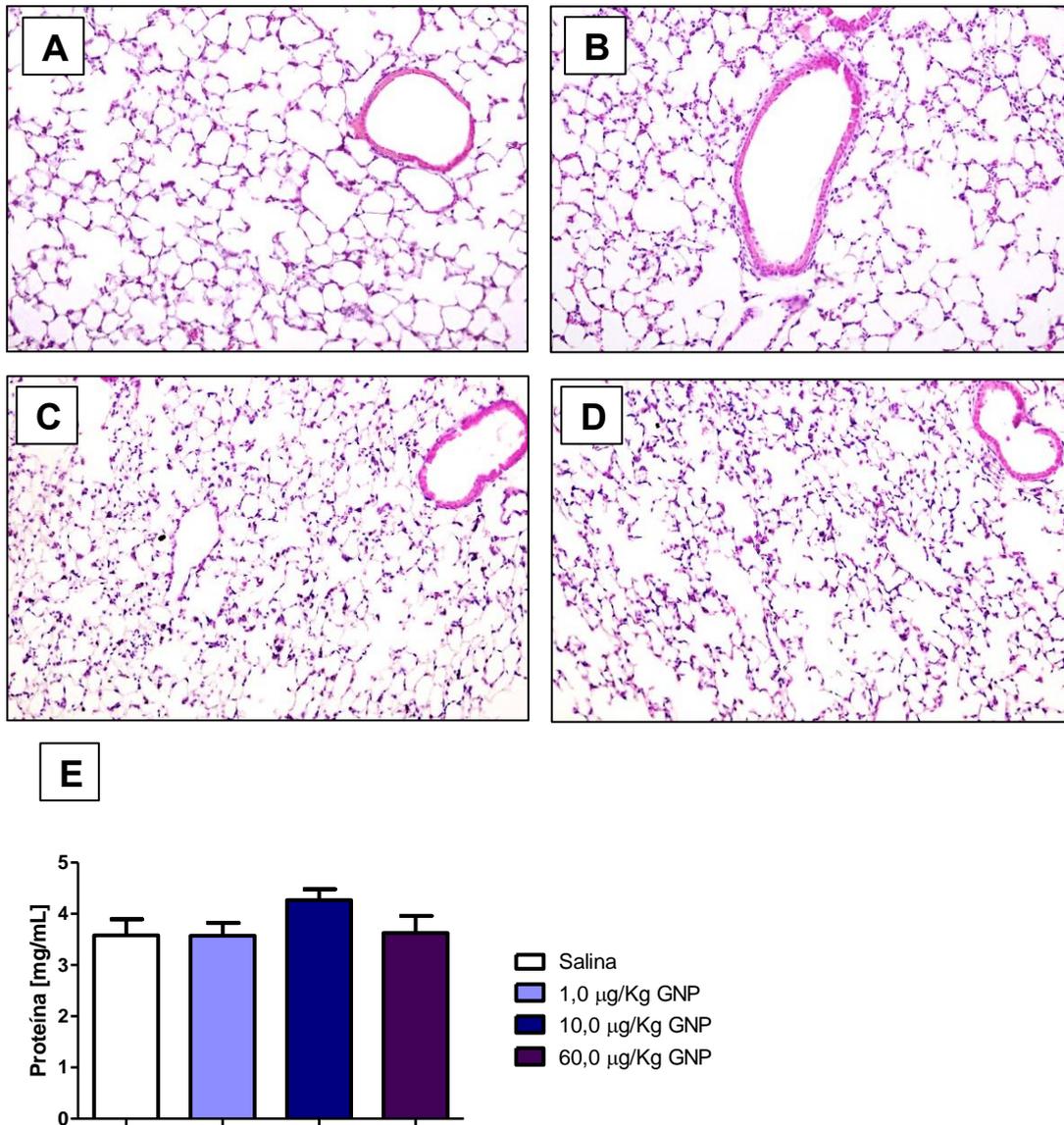


Figura 4.2- Efeito do tratamento com GNPs sobre a morfologia pulmonar e conteúdo de proteínas totais no pulmão de camundongos normais. Fotomicrografias do pulmão de animais instilados com **(A)** salina; **(B)** salina e tratados com GNP (1,0 µg/Kg), **(C)** salina e tratados com GNP (10,0 µg/Kg); **(D)** salina e tratados com GNP (60,0 µg/Kg). **(E)** Conteúdo de proteína total quantificada no pulmão. A administração das GNPs foi realizada por aerossol nos dias 1, 4 e 7, com as análises feitas 1 dia após a última dose. Coloração por H&E; aumento de 20x. Os resultados representam média \pm EPM (n=7).

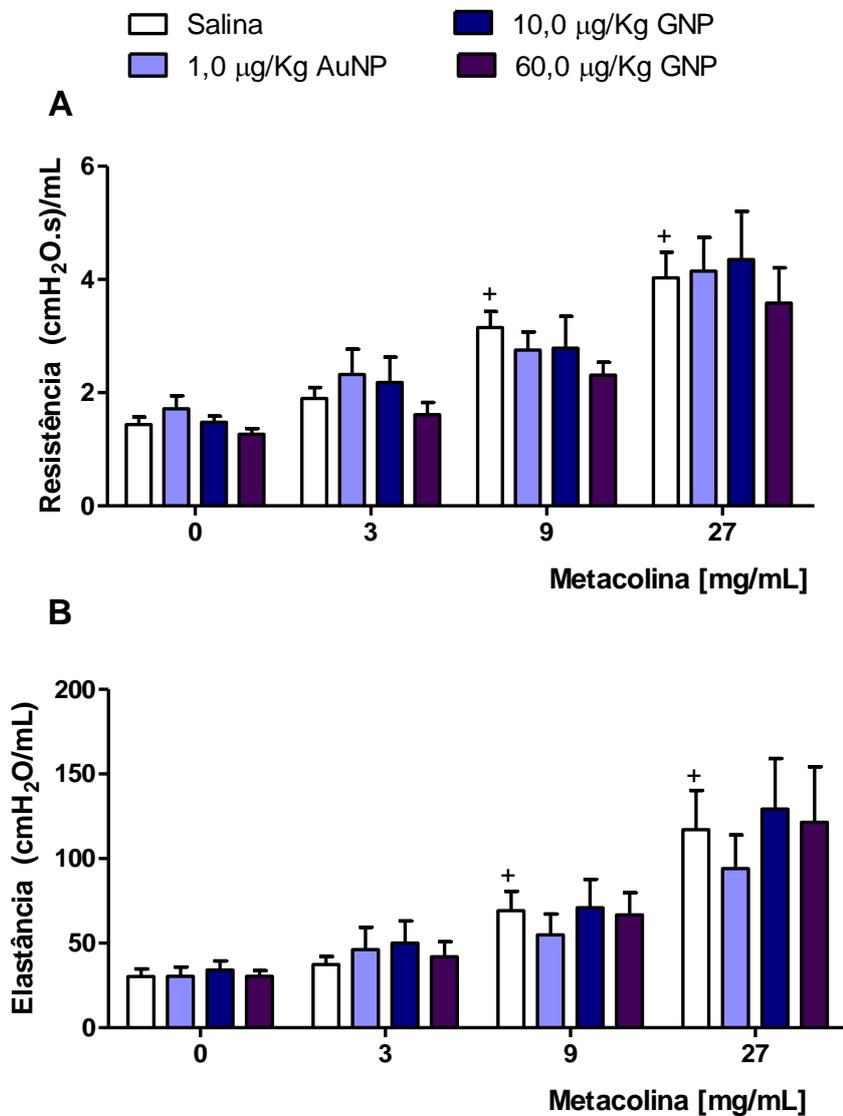


Figura 4.3- Efeito do tratamento com GNPs sobre a função pulmonar de camundongos normais. Foram avaliados os parâmetros de **(A)** resistência; **(B)** elastância. O tratamento com GNPs (1,0 - 60,0 µg/Kg) foi realizado, por aerossol, nos dias 1, 4 e 7, com as análises feitas 1 dia após a última administração. Os resultados representam média ± EPM (n=7). + $p < 0.05$ comparado com o grupo salina.

4.22 Administração de GNPs a animais silicóticos

Tomando por base os achados descritos acima, nesta etapa partimos para avaliar o efeito das GNPs (0,3 – 10,0 µg/Kg) sobre a silicose experimental, seguindo-se o protocolo de tratamento terapêutico realizados nos dias 21, 24 e 27 pós-sílica. Confirmando nossas observações prévias, verificamos que nos animais controles (instilados com salina) a estrutura tecidual se mostrou preservada, incluindo tanto vias aéreas como o parênquima pulmonar (**Figura 4.4 A**). Na condição da silicose, vimos a presença de granulomas com organização definida, bordas delimitadas e centro necrótico (**Figura 4.4 B**). A análise dos pulmões dos camundongos silicóticos, que receberam o tratamento com GNPs revelou um processo de desorganização no padrão estrutural dos granulomas, de forma dose-dependente, quando pode ser vista diminuição do centro necrótico e perda do espessamento periférico, com bordo diluído, o que conferiu um aspecto mais frouxo à estrutura dos granulomas. Espaços alveolares mais abertos puderam ser também detectados, sugerindo o favorecimento de áreas de reventilação. Simultaneamente, foram detectadas células antes localizadas no interior dos granulomas, presentes externamente a estas estruturas, incluindo os espaços alveolares (**Figura 4.4 C- F**).

Tendo como foco as vias aéreas, observamos que nos animais controles estas se apresentaram preservadas e íntegras (**Figura 4.5 A**), enquanto que nos animais silicóticos se mostraram com lúmem de menor diâmetro ou até mesmo fechadas, provavelmente por consequência da compressão mecânica exercida pela presença física dos granulomas (**Figura 4.5 B**). De forma similar ao verificado nos granulomas, o tratamento com as GNPs promoveu alterações ao nível das vias aéreas, que se mostraram mais alargadas, sendo possível visualizar a presença de tampões celulares internos, sugerindo ser este um potencial mecanismo de “*clearance*” de células inflamatórias a partir dos pulmões, tendo como principal exemplo os macrófagos (típicos carreadores de partículas de sílica), com o propósito final de recuperação da funcionalidade do órgão (**Figura 4.5 C- F**).

Com a amplificação das imagens, foi possível confirmar que os animais controles não mostraram presença de qualquer infiltrado leucocitário e septos alveolares preservados (**Figura 4.6 A**), enquanto que no caso dos animais silicóticos foi notada a presença de infiltrado composto basicamente por células

mononucleares (**Figura 4.6B**). O tratamento com as GNPs determinou o aparecimento de células mononucleares de diâmetro grande, com características morfológicas correspondentes a macrófagos. Estas células se mostraram localizadas na periferia dos granulomas, sugerindo uma facilitação no processo de saída em decorrência da desorganização estrutural destes nódulos e, descartando uma possível chegada destas células ao tecido neste momento. Estas células mononucleares apresentaram característica de ativação, revelada por intenso processo de vacuolização. Este fenômeno também se mostrou dependente das doses de GNPs utilizadas, com fenômeno mais intenso sendo notado com a dose de 10,0 µg/Kg (**Figura 4.6 C- F**).

De forma complementar, fizemos a análise morfométrica do pulmão silicótico, na presença e na ausência do tratamento com GNPs. A quantificação da área do pulmão ocupada por granulomas revelou um percentual de aproximadamente 30% no caso dos animais silicóticos não tratados, porém esta análise não revelou alteração significativa foi notada na condição do tratamento com as GNPs (**Figura 4.7**).

Na sequência, avaliamos o conteúdo de fibras colágenas, importantes componentes do processo de fibrose tecidual. Através da coloração por Picrus Sirius, evidenciamos nos animais controles a presença de uma marcação vermelha intensa em torno dos vasos sanguíneos e das vias aéreas, refletindo o colágeno componente da membrana basal (**Figura 4.8 A**). Uma marcação basal foi também observada correspondente ao colágeno constituindo do tecido conjuntivo pulmonar. Nos animais silicóticos, vimos a existência de uma marcação mais intensa na região dos granulomas, localizada na parte externa (bordos) e, também, acumulada no centro necrótico (**Figura 4.8 B**). Quando do tratamento com as GNPs, devido ao desarranjo verificado na estrutura dos granulomas, vimos uma maior dispersão das fibras colágenas em todo o granuloma e em áreas adjacentes (**Figuras 4.8C - F**). De forma complementar, analisamos o conteúdo de colágeno total do pulmão através do método de Sircol. Vimos um aumento significativo na quantidade de colágeno no pulmão no grupo silicóticos, em comparação com aquele dos animais controles (**Figura 4.9**), no pulmão silicótico, utilizando entanto não foi vista qualquer alteração na condição animais silicóticos tratados com as GNPs, em nenhuma das doses testadas (**Figura 4.9**).

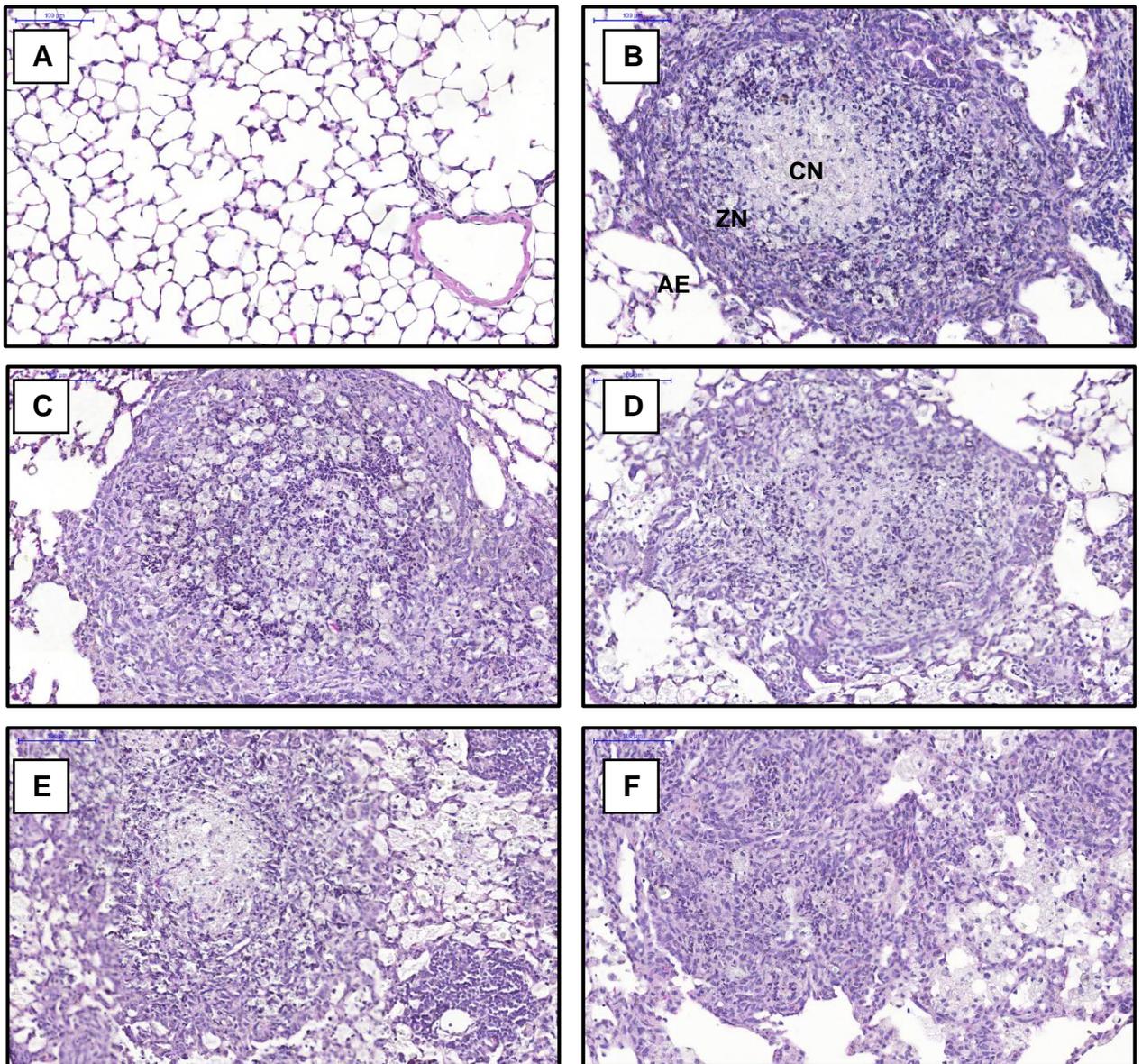


Figura 4.4– Fotomicrografias de áreas de formação de granuloma no tecido pulmonar de camundongos instilados com sílica (10 mg/animal). Os animais foram instilados com salina (A); sílica (B); sílica e tratados com GNP (0,3 µg/Kg) (C), sílica e tratados com GNP (1,0 µg/Kg) (D); sílica e tratados com GNP (3,0 µg/Kg) (E) e sílica e tratados com GNP (10,0 µg/Kg) (F). As análises foram realizadas 28 dias pós-sílica. Coloração por H&E. Barra de escala 100 µm. Setas pretas indicam vias aéreas; cabeça de seta indicam granulomas; CN = centro necrótico; ZN= zona neutrofílica AE = área de espessamento.

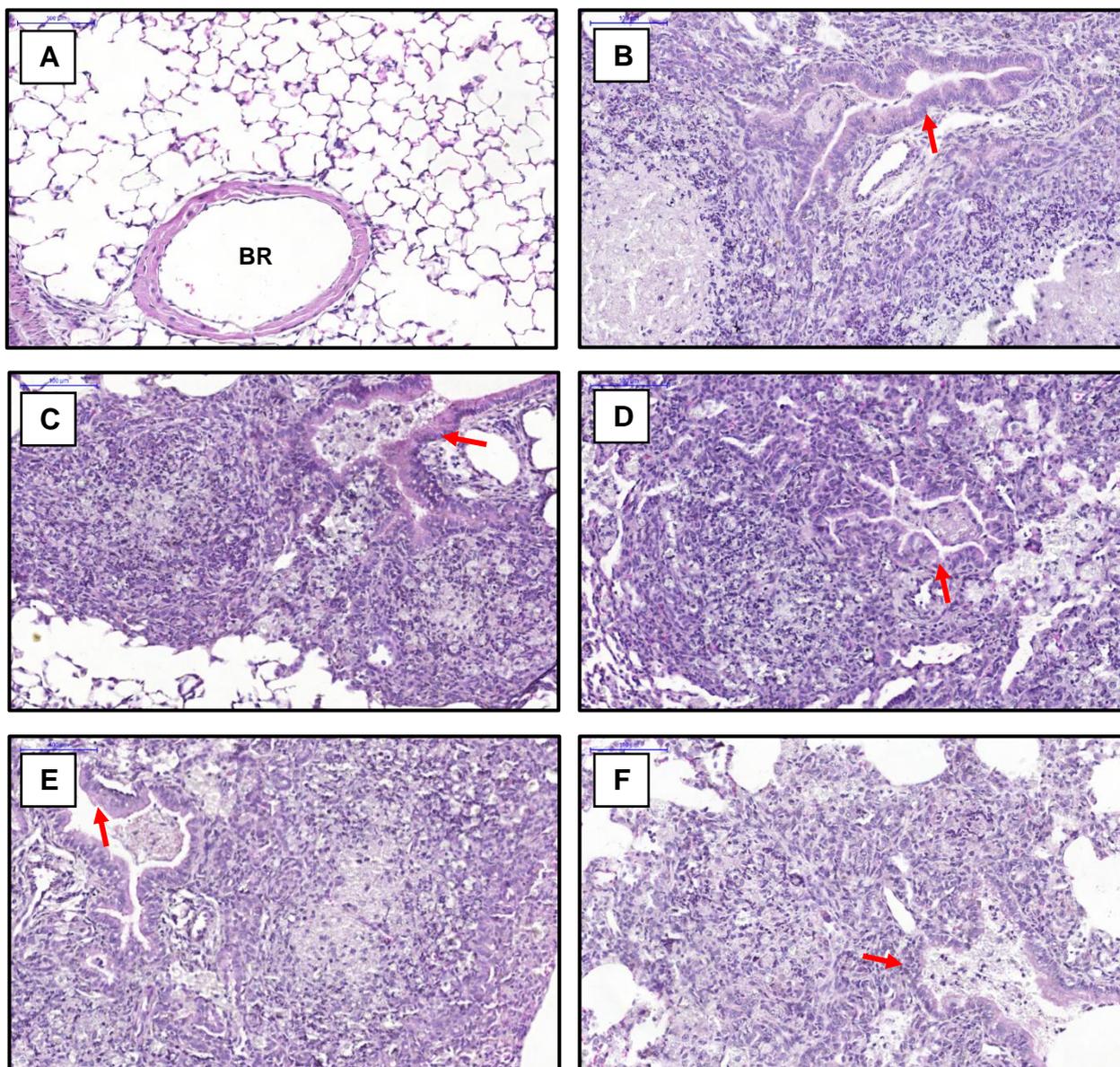


Figura 4.5– Fotomicrografias de vias aéreas no tecido pulmonar de camundongos instilados com sílica (10 mg/animal). Os animais foram instilados com salina (**A**); sílica (**B**); sílica e tratados com GNP (0,3 µg/Kg) (**C**), sílica e tratados com GNP (1,0 µg/Kg) (**D**); sílica e tratados com GNP (3,0 µg/Kg) (**E**) e sílica e tratados com GNP (10,0 µg/Kg) (**F**). As análises foram realizadas 28 dias pós-sílica. Coloração por H&E. Barra de escala 100 µm. A setas vermelhas indicam tampão celular. BR=Bronquíolo.

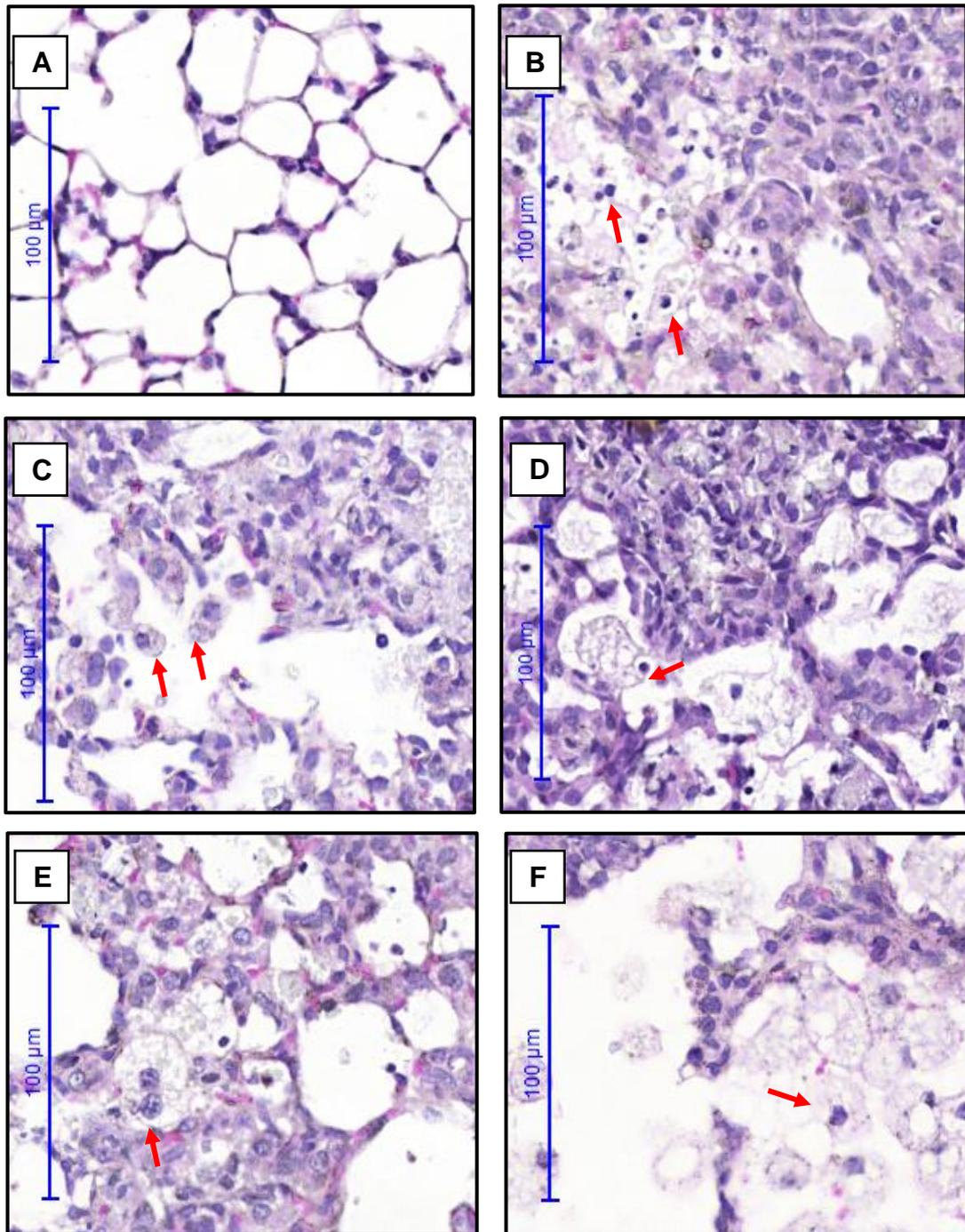


Figura 4.6– Fotomicrografias de infiltrado leucocitário no pulmão de camundongos instilados com sílica (10 mg/animal). Os animais foram instilados com salina (**A**); sílica (**B**); sílica e tratados com GNP (0,3 µg/Kg) (**C**), sílica e tratados com GNP (1,0 µg/Kg) (**D**); sílica e tratados com GNP (3,0 µg/Kg) (**E**) e sílica e tratados com GNP (10,0 µg/Kg) (**F**). As análises foram realizadas 28 dias pós-sílica. Coloração por H&E. Barra de eescala 100µm. As setas vermelhas indicam presença de macrófagos.

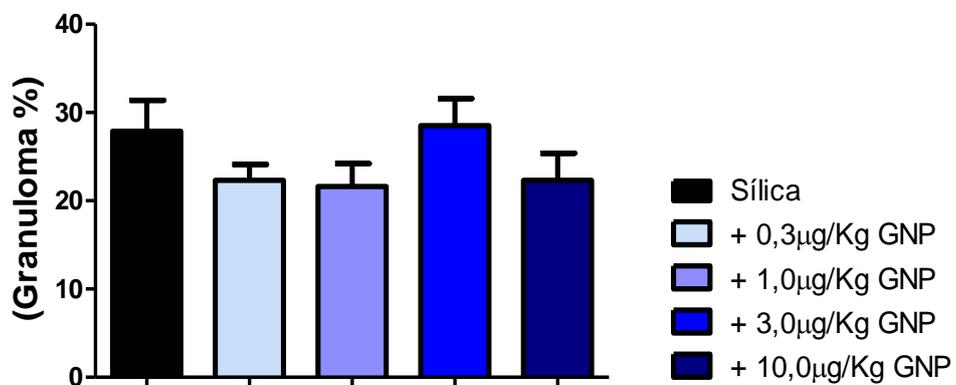


Figura 4.7 - Efeito do tratamento terapêutico com GNPs (1,0 - 10,0 µg/Kg) sobre no percentual de área ocupada por granulomas no pulmão de camundongos silicóticos. Animais foram instilados com salina (controles) ou com sílica (10 mg/50 µL). A análise foi realizada no tempo de 28 dias pós-sílica. Os resultados representam média ± EPM (n=7).

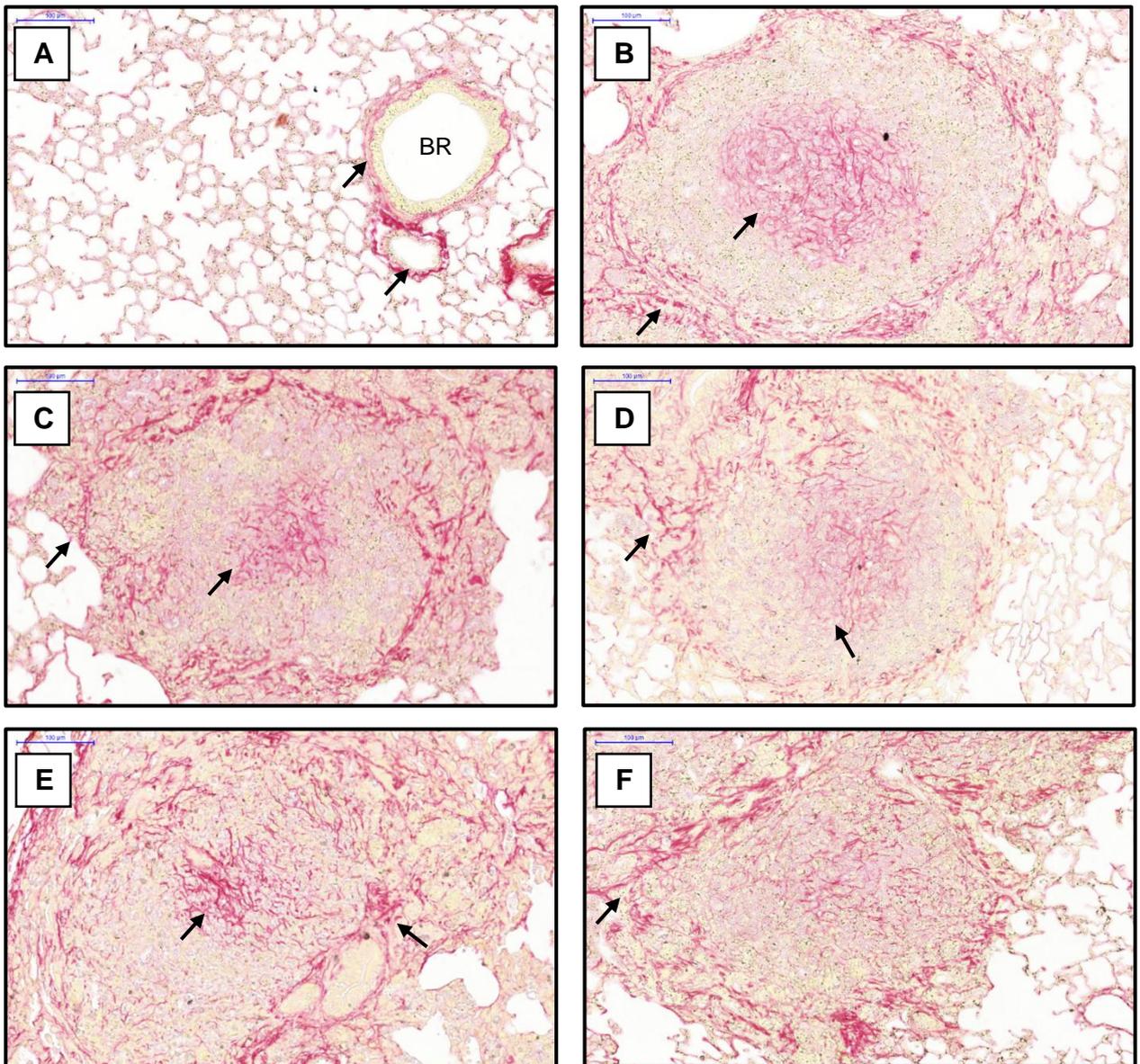


Figura 4.8– Fotomicrografias de fibras colágenas no tecido pulmonar de camundongos instilados com sílica (10 mg/animal). Os animais foram instilados com salina (**A**); sílica (**B**); sílica e tratados com GNP (0,3 µg/Kg) (**C**), sílica e tratados com GNP (1,0 µg/Kg) (**D**); sílica e tratados com GNP (3,0 µg/Kg) (**E**) e sílica e tratados com GNP (10,0 µg/Kg) (**F**). As análises foram realizadas 28 dias pós-sílica. Coloração por Picrus sirius. Barra de escala 100µm. BR= bronquíolo. As setas pretas indicam fibras colágenas.

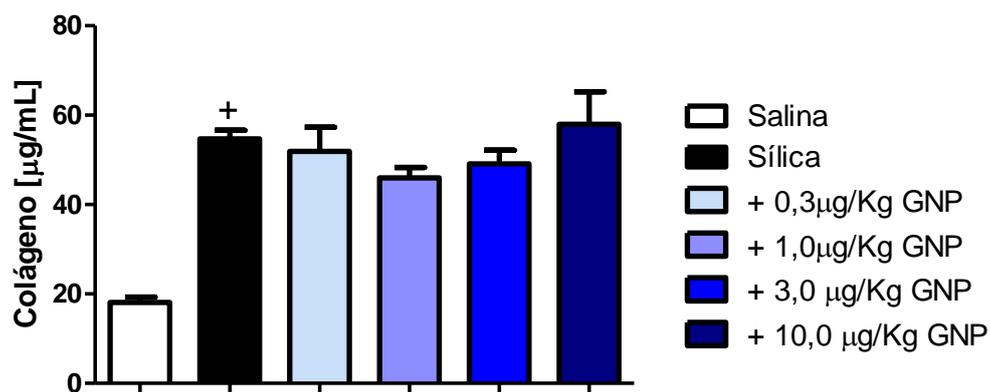


Figura 4.9- Efeito do tratamento terapêutico com GNPs (1,0 - 10,0 µg/Kg) sobre o conteúdo de colágeno total no tecido pulmonar de camundongos silicóticos. Animais foram instilados com salina (controles) ou com sílica (10 mg/50 µL). A análise foi realizada no tempo de 28 dias pós-sílica. Os resultados representam média ± EPM (n=7). + $p < 0.05$ comparado com o grupo salina. * $p < 0.05$ comparado com o grupo sílica.

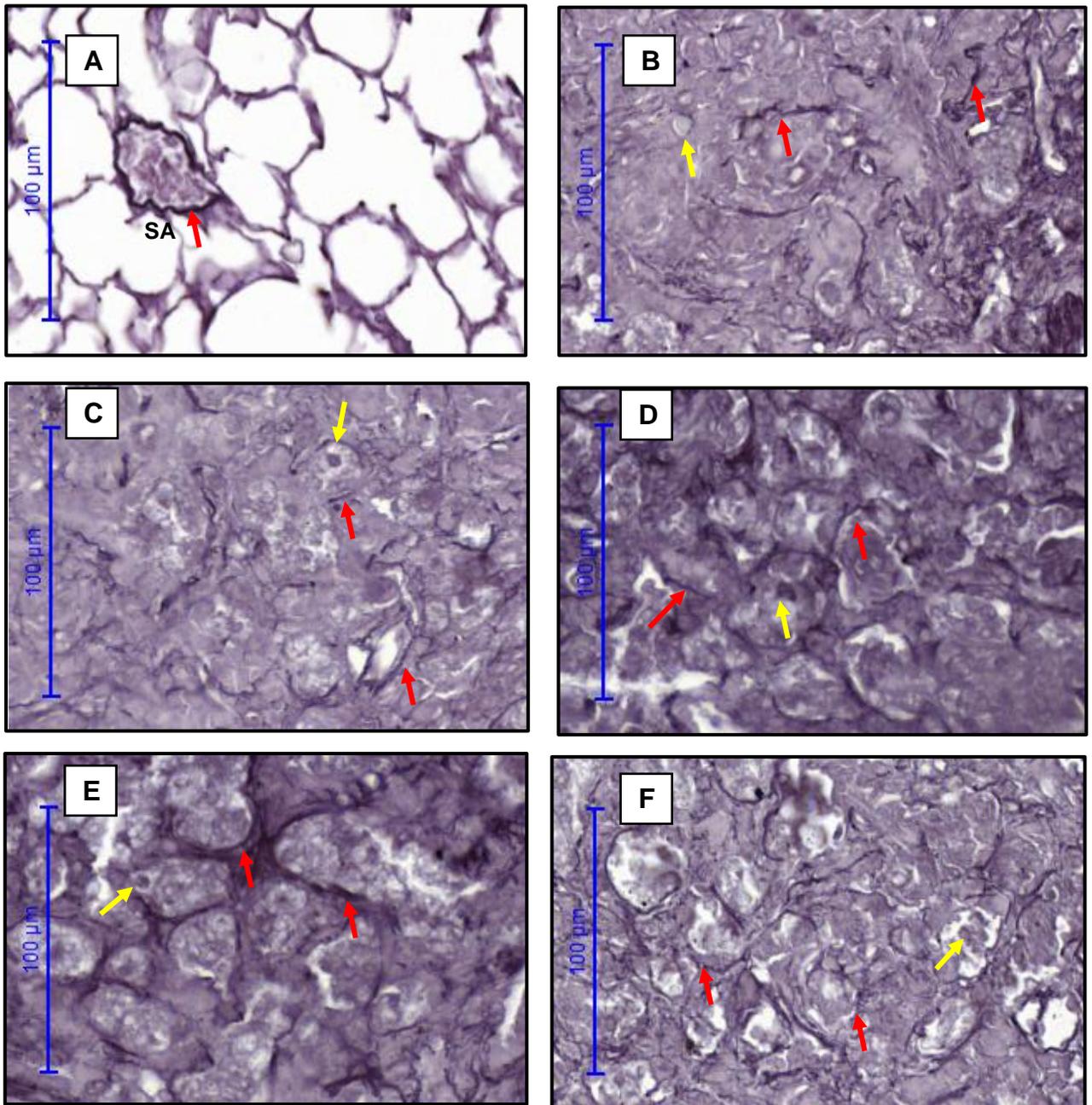


Figura 4.10– Fotomicrografias de fibras elásticas no tecido pulmonar de camundongos instilados com sílica (10 mg/animal). Os animais foram instilados com salina (A); sílica (B); sílica e tratados com GNP (0,3 µg/Kg) (C), sílica e tratados com GNP (1,0 µg/Kg) (D); sílica e tratados com GNP (3,0 µg/Kg) (E) e sílica e tratados com GNP (10,0 µg/Kg) (F). As análises foram realizadas 28 dias pós-sílica. Coloração por resorcina-fucsina. Barra de escala 100µm. SA = septo alveolar. Cabeças de seta indicam septo alveolar; setas vermelhas indicam fibras elásticas; setas amarelas indicam macrófagos.

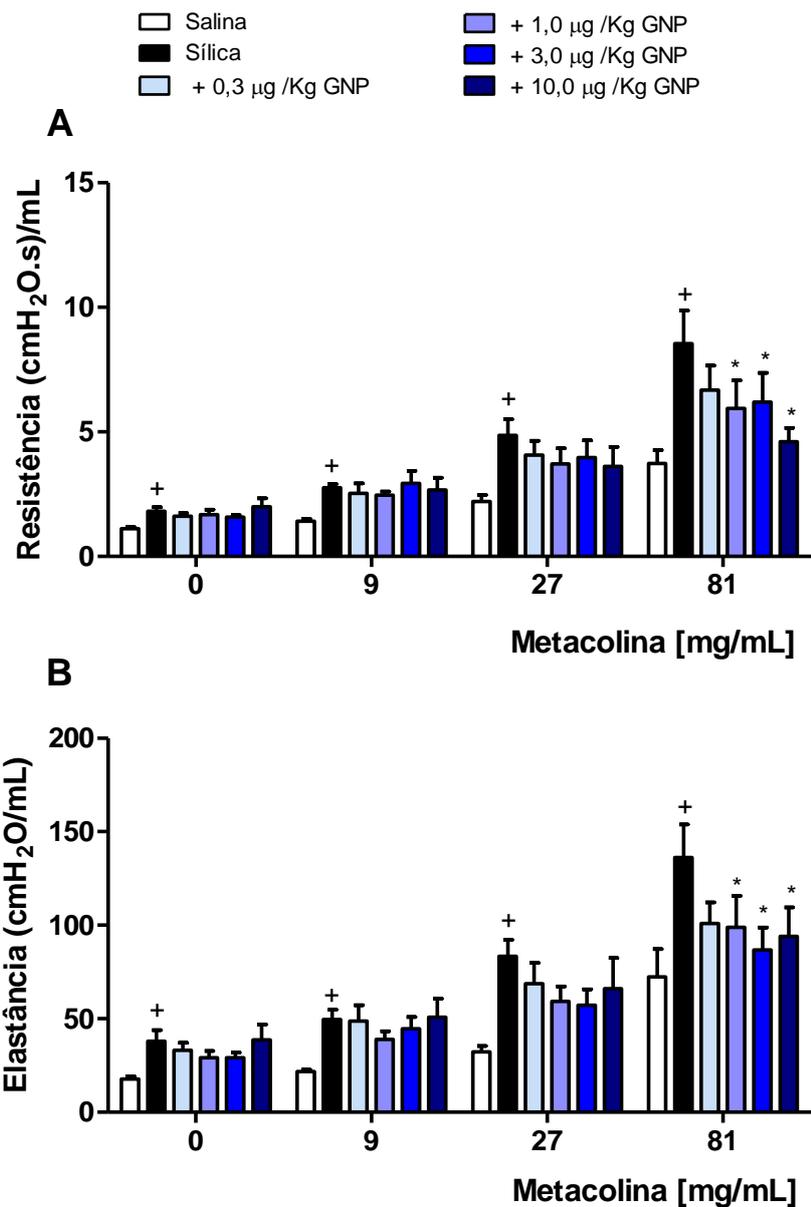


Figura 4.11- Efeito do tratamento terapêutico com GNPs (1,0 - 10,0 µg/Kg) na função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos silicóticos. As análises de resistência (A) e elastância (B) foram realizadas no tempo de 28 dias e o tratamento teve início 21 dias após a instilação de sílica. Animais foram instilados com salina (controles) ou com sílica (10 mg/50 µL). Os resultados representam média ± EPM (n=7). + $p < 0.05$ comparado com o grupo salina. * $p < 0.05$ comparado com o grupo sílica.

De forma a complementar nossa análise, o conteúdo de fibras elásticas para tanto a coloração com resorcina-fucsina. NO grupo controle verificamos a presença de fibras elásticas preservadas, tanto ao nível dos septos alveolares (**Figura 4.10 A**) como nas vias aéreas (dado não mostrado). Os animais silicóticos exibiram presença de fibras elásticas remanescentes nos septos alveolares, com destaque para a parte mais interna dos granulomas (**Figura 4.10 B**). Na condição do tratamento com GNPs, pudemos confirmar o alargamento dos espaços aéreos, com principal destaque para as áreas localizadas na periferia dos granulomas. Isto nos sugeriu um processo de tendência de recuperação do espaço alveolar e, e conseqüente melhora na funcionalidade dos pulmões. Interessante ratificar a presença de macrófagos gigantes detectados dispersos no parênquima pulmonar (**Figura 4.10 C-F**).

A mecânica respiratória se coloca como um parâmetro relevante de análise no caso de estudos acerca de doenças inflamatórias pulmonares. Assim, nesta etapa fomos investigar se as alterações morfológicas vistas nos animais silicóticos, submetidos ao tratamento com as GNPs, estariam interferindo de alguma forma com a função pulmonar. Analisando os parâmetros de resistência e elastância pulmonar, vimos que os níveis basais aumentados na condição da silicose não foram modificados pelas GNPs (**Figuras 4.11 A e B, respectivamente**). Entretanto, o quadro de hiper-reatividade observado após a aerosolização de metacolina foi revertido pelo tratamento com as GNPs, tanto a resistência como a elastância (**Figuras 4.11 A e B, respectivamente**).

4.3 Efeito do tratamento com GNPs sobre a produção de citocinas pulmonares induzida pela instilação de sílica em camundongos

Objetivando esclarecer o mecanismo de ação associado à atividade supressora das GNPs sobre a resposta de fibrose na silicose murina, resolvemos avaliar a potencial interferência do tratamento sobre a produção de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar. A estimulação com sílica induziu claro aumento nos níveis das citocinas TNF- α (**Figura 4.12 A**) e IL-1 β (**Figura 4.12 B**), assim como das quimiocinas MIP-1 α (**Figura 4.12 C**), MCP-1 (**Figura 4.12 D**), MIP-2 (**Figura 4.12 E**) e em comparação àqueles dos animais controles. A administração das GNPs produziu marcada inibição sobre a geração de TNF- α , em todas as doses testadas (**Figura 4.12 A**), enquanto que a IL-1 β (**Figura 4.12**

B), MIP-1 α (**Figura 4.12 D**) e MIP-2 (**Figura 4.12 E**) se mostraram menos sensíveis ao tratamento. A produção da quimiocina MCP-1 (**Figura 4.12 C**) não foi modificada pelas GNPs.

4.4 Efeito das GNPs sobre a reatividade de macrófagos *in vitro*

Macrófagos são considerados células alvos cruciais no contexto da silicose (8). Nesta etapa objetivamos investigar o potencial efeito das GNPs sobre macrófagos, sendo, para tanto, utilizada a linhagem de macrófagos alveolares murinos (AMJ2C11). Primeiro avaliamos o parâmetro de viabilidade celular, utilizando para isso o ensaio clássico de MTT. Como mostrado na (**Figura 4.13**) o tratamento dos macrófagos com GNPs (0,1 - 3,0 $\mu\text{g/mL}$) não modificou a taxa de viabilidade celular. Na etapa seguinte, avaliamos o efeito das GNPs sobre a ativação dos macrófagos pelas partículas de sílica (300 $\mu\text{g/ml}$). A estimulação com LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) foi utilizada para controle positivo interno do ensaio. Observamos que tanto o LPS como as partículas de sílica induziram aumento na produção de TNF- α conforme atestado pelo aumento nos níveis da citocinas detectado no sobrenadante (**Figura 4.14**). O tratamento com as GNPs, nas concentrações de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ reduziu significativamente a produção de TNF- α (**Figura 4.14**), enquanto que a maior concentração das GNPs (3,0 $\mu\text{g/mL}$) causou aumento nos níveis de TNF- α (**Figura 4.14**). A incubação de macrófagos, não estimulados, com as GNPs mostrou que a concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ não teve qualquer atividade, porém a concentração de 3,0 $\mu\text{g/mL}$ repetiu o efeito indutor de aumento nos níveis de TNF- α (**Figura 4.14**). Por último, avaliamos a atividade de incorporação de BrdU pelos macrófagos, um método que nos permite avaliar a taxa de proliferação celular. Avaliamos, também, a taxa de sobrevivência em macrófagos tratados com GNPs, utilizando o método de incorporação de BrdU. Observamos que as células estimuladas com LPS e com partículas de sílica tiveram uma redução na taxa de incorporação de BrdU, enquanto que o tratamento com as GNPs (0,1 - 1,0 $\mu\text{g/mL}$) preveniu essa resposta (**Figura 4.15**). A maior concentração de GNPs (3,0 $\mu\text{g/mL}$) não interferiu com a estimulação pelas partículas de sílica, e mostrou efeito de redução na taxa de incorporação de BrdU (**Figura 4.15**).

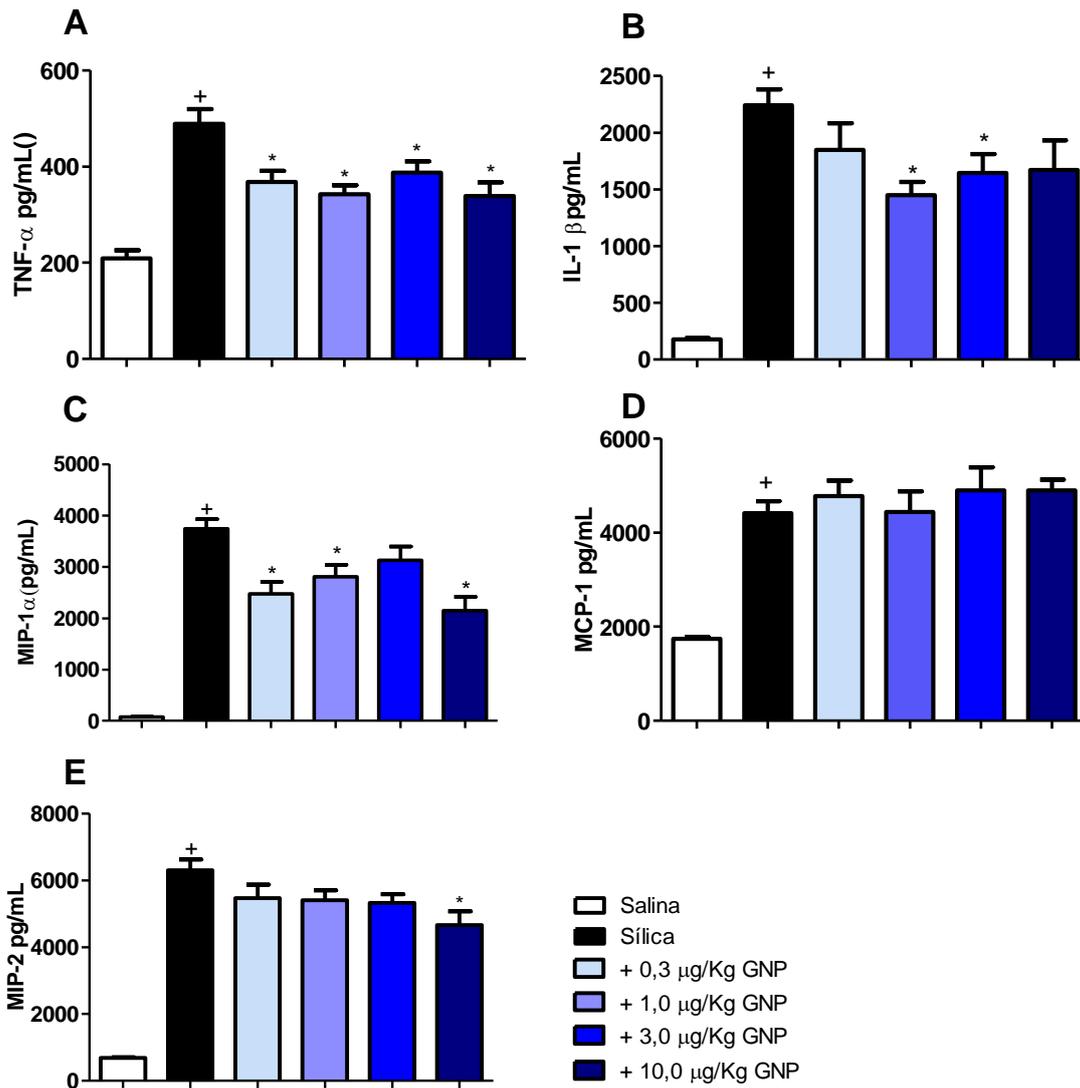


Figura 4.12- Efeito do tratamento terapêutico com GNPs (1,0 - 10,0 µg/Kg) sobre a produção de citocinas/quimiocinas de camundongos silicóticos. Foram analisadas TNF- α (A); IL-1 β (B); MIP-1 α (C); MIP-2 (D) e MCP-1 (E). As análises foram realizadas no tempo de 28 dias pós-sílica e o tratamento teve início 21 dias após a instilação de sílica. Os resultados representam média \pm EPM (n=7). + p<0.05 comparado com o grupo salina. *p<0.05 comparado com o grupo sílica.

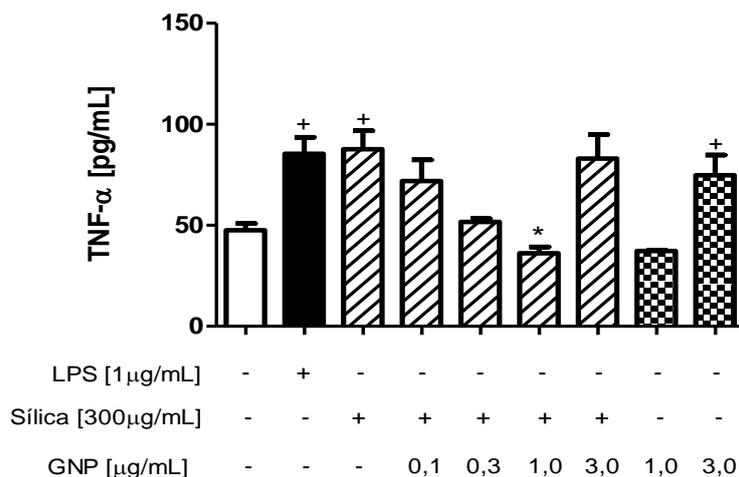


Figura 4.13- Efeito das GNPs sobre a viabilidade celular e macrófagos alveolares (linhagem AMJ2C11). A viabilidade celular foi realizada 24 horas após o tratamento com as GNPs. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de cada grupo em quadruplicata. Este gráfico é representativo de um experimento. + $p < 0,05$ comparado às células não estimulado.

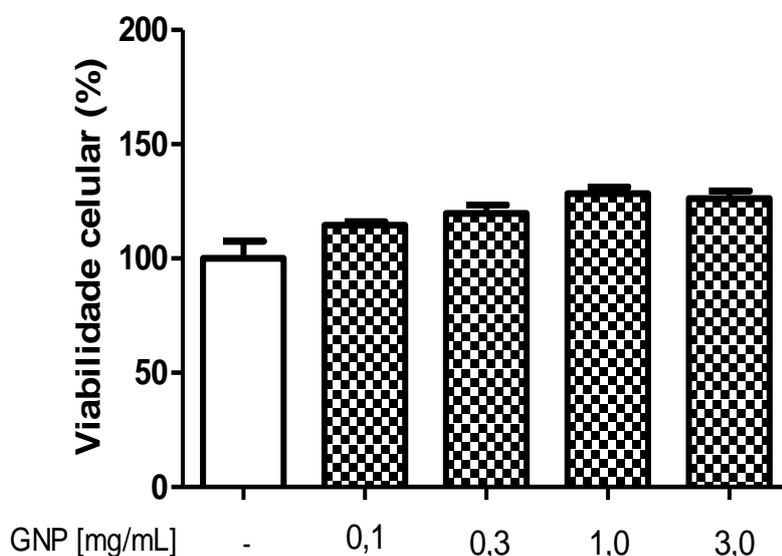


Figura 4.14- Efeito das GNPs sobre a ativação de macrófagos alveolares (linhagem AMJ2C11) estimulados com sílica *in vitro*. A quantificação de TNF- α foi realizada no sobrenadante 24 horas após a estimulação com sílica (300 μ g/mL). LPS (1 μ g/mL) foi utilizado como controle interno do ensaio. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de cada grupo em triplicata. Este gráfico é representativo de dois experimentos. + $p < 0,05$ comparado às células não estimulado; * $p < 0,05$ comparado às células estimuladas com sílica.

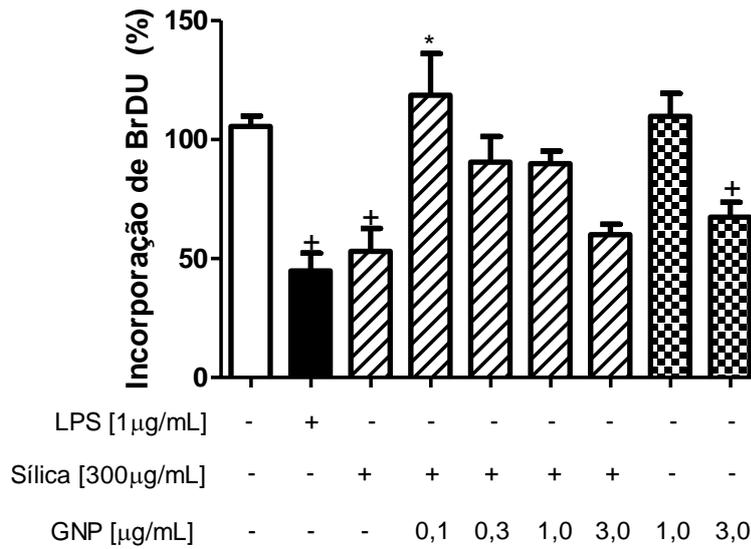


Figura 4.15 - Efeito das GNPs sobre a incorporação de BrdU por macrófagos alveolares (linhagem AMJ2C11) murinos *in vitro*. A análise foi realizada no sobrenadante 24 horas após o estímulo com sílica (300 µg/mL); a estimulação com LPS (1 µg/mL) foi utilizada como controle interno do ensaio. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de cada grupo em quadruplicada. Este gráfico é representativo de um experimento. + p<0,05 comparado às células não estimulado; *p<0,05 comparado às células estimuladas com sílica.

5.0 Discussão

Segundo OEH, a silicose é uma doença de caráter ocupacional causada pela inalação de pó de sílica cristalina, cujo desenvolvimento e gravidade dependem da quantidade e do tempo de exposição à sílica (92). Tem como característica a presença de nódulos fibróticos decorrentes de um processo inflamatório persistente e proliferação de fibroblastos, com excessivo acúmulo de colágeno, que em conjunto resultam em um quadro de fibrose e comprometimento da função pulmonar (20) (55). É uma doença de caráter permanente e sem cura, havendo como tratamento disponível, apenas o alívio dos sintomas. Isto torna de extrema relevância a busca por novas terapias.

O ouro metálico é indiscutivelmente considerado o metal menos corrosivo e, biologicamente, mais inerte (51). Isto o torna de grande interesse para o uso na medicina, e mais recentemente para a nanomedicina, através do desenvolvimento de nanopartículas de ouro. Muito embora conhecido há milhares de anos, as propriedades biológicas do ouro, ainda não foram totalmente definidas, bem como das GNPs. Além disso, poucos são os estudos na literatura que abordam os aspectos toxicológicos do ouro.

Resultados prévios mostraram que a utilização de GNPs não promove nenhum tipo de alteração morfológica que caracterize um dano tecidual. Mais ainda, não foram identificadas mudanças causadas pelas GNPs em marcadores bioquímicos importantes para o funcionamento tanto hepático como renal, incluindo ATL, ALP, bilirrubina total, ureia e creatina (46) (49) (53). No entanto, há estudos que demonstraram ter a administração de GNPs causado dano ao DNA no córtex cerebral de ratos (86). Os achados sobre a toxicidade das GNPs, até então se mostram discrepantes, possíveis explicações poderiam estar relacionadas às propriedades intrínsecas das partículas (tamanho) e, também, por diferenças quanto às doses e vias de administração utilizadas, protocolos experimentais e, ainda, os métodos de quantificação utilizados.

Visando a utilização das GNPs na silicose experimental, inicialmente analisamos o efeito da administração destas partículas em camundongos normais. Verificamos que administrando as GNPs, em aerossol, por 3 dias alternados, não foi verificada nenhuma alteração no que tange aspecto estrutural do tecido pulmonar, ausência de infiltrado inflamatório e extravasamento proteico, e função pulmonar mantida.

No que tange a situação de tratamento, as GNP's são conhecidas pelo efeito protetor em diversas condições inflamatórias, como na artrite reumatóide (90), uveíte (42) e o câncer (91). Partindo do princípio que estudos prévios, do nosso laboratório, mostraram serem as GNP's capazes de reverter a asma alérgica em camundongos, achamos ser esta uma estratégia interessante a ser estendida no caso silicose, uma doença inflamatória pulmonar crônica que necessita de controle terapêutico urgente.

Dados da literatura apontam para a existência de comprometimento da função pulmonar em indivíduos silicóticos, conforme evidenciado em trabalhadores da indústria de cerâmica ou, ainda, em trabalhadores atuantes por períodos longos de tempo em atividades de mineração (56) (57). Nas várias situações estudadas foi verificado através de testes de função pulmonar, uma clara redução do volume pulmonar e da complacência (58), em associação com quantidade de sílica a que estes indivíduos foram expostos (59). Utilizando o modelo de silicose experimental, em camundongos Swiss-Webster instilados intranasalmente com partículas de sílica, verificamos que em tempos iniciais se observa um infiltrado inflamatório e deposição das partículas de sílica nos alvéolos, e em tempos mais tardios, foi notada a presença de granulomas distribuídos pelo parênquima pulmonar, fenômenos associados a um aumento nos níveis basais de resistência e elastância, já observado no laboratório. Estes achados confirmam dados epidemiológicos referentes a pacientes silicóticos (56) (57) (60). Muito embora em outras doenças de caráter inflamatório crônico, como a asma brônquica, a hiper-reatividade das vias aéreas tenha se mostrado como um fenômeno característico (61) (62), na condição das disfunções fibróticas, como a fibrose idiopática pulmonar e a silicose, os trabalhos são ainda escassos.

Nosso grupo, em estudos anteriores, incluiu a hiper-reatividade das vias aéreas como um parâmetro relevante de análise da silicose, tomando por base relatos prévios que descreveram a ocorrência de hiper-reatividade em pacientes portadores de pneumoconioses (87) (88) (89). O procedimento utilizado inclui a avaliação da reatividade pulmonar em camundongos silicóticos, na condição de aerosolização PBS (controle) ou do agonista colinérgico metacolina. No presente estudo, confirmando dados prévios (63), vimos que os animais silicóticos apresentaram níveis basais aumentados de resistência das vias aéreas e elastância pulmonar, em comparação aos controles, bem como resposta

exacerbada quando estimulados com metacolina, reforçando ser este um quadro de hiper-reatividade das vias aéreas. Alguns mecanismos para este fenômeno foram propostos em outras condições de fisiopatologia, como a asma brônquica, incluindo: i) aumento na expressão ou na afinidade dos receptores específicos, ii) aumento da atividade da proteína G, iii) alteração da liberação e captação de Ca^{2+} intracelular e iv) aumento da atividade da quinase da cadeia leve de miosina, contribuindo, desta forma, para o aumento da contratilidade das células musculares lisas (61) (75) (46) (78). Considerando a importância da hiper-reatividade pulmonar no contexto de doenças pulmonares, este parâmetro foi escolhido como um indicador biológico com potencial aplicabilidade em ensaios na busca por terapias antifibróticas.

Evidenciamos que o tratamento terapêutico com as GNPs levou à diminuição das alterações (aumento) de resistência das vias aéreas e elastância pulmonar, bem como da hiper-reatividade, com destaque para maior dose de metacolina testada. Quadro similar foi observado por Barreto e colaboradores (2014), onde as GNPs inibiram o quadro de hiper-reatividade associada à condição de asma alérgica em camundongos, o que sugere estarem estas partículas atuando, pelo menos em parte, regulando negativamente os mecanismos propostos para este fenômeno.

Considerando que modificações na mecânica respiratória refletem, em geral, alterações estruturais no pulmão, avaliamos o efeito das GNPs no tecido pulmonar, utilizando para isso diversas colorações histológicas. A avaliação da arquitetura pulmonar, evidenciada através da coloração por HE, revelou que a administração terapêutica de GNPs produziu uma desestruturação do padrão de granuloma em comparação àqueles dos animais silicóticos não tratados. Este achado reflete em um granuloma de menor tamanho e mais disperso, com o aspecto menos denso, o que poderia explicar a melhora da função pulmonar nos silicóticos tratados. De forma similar Diab e colaboradores (2015), evidenciaram redução da resposta granulomatosa hepática na esquistossomose murina, o que reforça nossos achados indicativos da regulação negativa das GNPs sobre o desenvolvimento de granulomas. Entretanto, a análise morfométrica não confirmou os achados morfológicos, haja visto que não foi detectada alteração na condição do tratamento com as partículas. Apesar de parecerem discrepantes, as avaliações feitas indicam que o perfil da resposta

granulomatosa, e não a área do parênquima pulmonar ocupada por granulomas se encontra modificado na condição do tratamento com as GNPs. Concluímos que, neste caso, a morfometria não se mostrou a técnica mais adequada de análise.

Observações complementares do tecido pulmonar corroboraram com a ideia de uma involução dos granulomas silicóticos, frente às GNPs, uma vez que foi detectada a presença de macrófagos grandes localizados próximos às áreas granuloma. Aqui também, nossos dados foram coincidentes com aqueles de Diab e colaboradores (2015). Um fato relevante que nos permite acreditar serem estas células macrófagos, é o fato de que outros estudos mostram serem as GNPs encontradas preferencialmente em células no sistema fagocitária mononuclear (64) (65). Por último, verificamos a presença de vias aéreas alargadas e a presença de tampão celular interno nos animais silicóticos tratados com as GNPs. Isto pode ser indicativo de processo de favorecimento do *clearance* das partículas de sílica, visando a resolução do processo da silicose. De forma bastante interessante, Lin e colaboradores (2014) descreveram maior atividade mucociliar das vias aéreas e também influência na produção de surfactante corroborando assim, com a nossa observação morfológica no aumento de *clearance* das partículas de sílica dos animais tratados com GNPs.

Devido ao tamanho reduzido das GNPs, acredita-se que em sua maioria tenham conseguido atingir de forma abrangente o parênquima pulmonar, onde estão localizados os granulomas, sugerindo estas possam levar a uma mudança fenotípica de macrófagos já presentes no tecido. Esta propriedade das GNPs em induzir mudança no padrão fenotípico de macrófagos foi já descrita (67). Alternativamente, poderia estar havendo uma reativação de macrófagos quiescentes presentes no tecido pulmonar, que atuando na “limpeza” do local estariam contribuindo para a dissolução dos granulomas e consequente melhoria da condição pulmonar.

De forma adicional investigamos, alguns componentes do tecido pulmonar, iniciando pelas fibras colágenas. Assim como visto anteriormente, os granulomas após o tratamento com as GNPs, apresentaram padrão de desorganização, mostrando menor conteúdo e maior dispersão de fibras colágenas na região periférica dos granulomas, menos presentes nos centros necróticos. A quantificação do conteúdo total de colágeno no pulmão (método de

Sircol) indicou não haver diferença entre os grupos silicótico tratado e não tratado. Estes dados reforçam os resultados obtidos quando da análise morfológica. A literatura mostra, através de modelo de cultura 3D de fibroblastos cardíacos murinos, que as GNPs são capazes de reduzir a expressão de mRNA de α -actina de músculo liso (α -SMA), proteína que caracteriza a ativação de fibroblastos em miofibroblasto. Foi também verificada a redução na expressão do mRNA de colágeno tipo I, principal tipo de fibra encontrada em processos fibróticos (68). Além disso, fibroblastos mantidos em cultura, na presença de GNPs mostram redução na produção de colágeno do tipo I e aumento do tipo IV, que se caracteriza por ser uma fibra mais flexível (69). Na mesma linha de raciocínio, foi demonstrado que as GNPs têm capacidade além de alterar a função de fibroblastos, através da diminuição da produção de colágeno do tipo I, e, também, promover alterações no citoesqueleto - células mais espalhadas - e alterar a motilidade dessas células (70). As observações acima poderiam ser possíveis explicações para o aspecto mais frouxo e menos denso que os granulomas silicóticos apresentam após contato com as GNPs. De forma complementar, vimos um número expressivo de espaços alveolares abertos, com fibras elásticas se mostrando íntegras, o que reforça a ideia de que com a dissolução dos granulomas há a possibilidade da liberação das vias aéreas, e dos espaços alveolares, no sentido de permitir a reventilação dos pulmões (22) (71) (72)

Buscando entender o mecanismo de ação associado ao efeito supressor das GNPs na silicose, avaliamos os níveis de mediadores químicos com foco em citocinas e quimiocinas. Verificamos aumento na produção das citocinas TNF- α e IL-1, assim como das quimiocinas MIP-1 α , MCP-1 e MIP-2 no pulmão silicótico. À exceção da MCP-1, todos os demais mediadores foram inibidos pelas GNPs. Damos destaque ao TNF- α , por sua reconhecida atividade prófibrótica e, por ter sido o mediador sensível a todas as doses de GNPs testadas. Foi verificada a produção aumentada do TNF- α em diferentes tipos de doenças fibróticas. Além disso, camundongos modificados geneticamente para superexpressar essa citocina desenvolvem fibrose pulmonar altamente progressiva (10). Isto pode estar associado à sua capacidade em induzir ativação direta de fibroblastos, ou a transição epitélio-mesenquimal, processo no qual as células epiteliais passam a expressar o fenótipo de miofibroblasto capaz de produzir MEC, ou também

capacidade de junto com o IL-1 β aumentar a expressão de uma citocina pró-fibrótica, a IL-6, que é um fator de crescimento autócrino de fibroblastos (9). Além de promover ativação direta de fibroblastos, o TNF- α assim como sua associação a outros mediadores pode promover a fibrose pelo aumento da expressão de “plasminogen activator inhibitor 1”, que funciona como um inibidor fisiológico da MEC degradando o sistema plasmina/plasminogênio que protege o pulmão da fibrose (74). Mais ainda, além das ações prófibróticas, o TNF- α possui inúmeros efeitos biológicos e complementando ao que já foi observado, ele pode também atuar no sistema respiratório contribuindo para o quadro de hiper-reatividade das vias aéreas. Demonstramos previamente, que a instilação intranasal de TNF- α , em camundongos, pode levar a um quadro de hiper-reatividade das vias aéreas. Uma provável explicação seria o aumento da resposta contrátil de células musculares lisas das vias aéreas e diminuição da resposta a alguns agentes relaxantes, o que o coloca como um mediador relevante em processos inflamatórios pulmonares (75) (76) (77) (78) (79). Dentro deste contexto, demonstramos anteriormente que o tratamento com talidomida (inibidor da produção de TNF- α) e com o anticorpo monoclonal infliximabe foi eficaz em inibir o quadro silicóticos murino, indicando ser o TNF- α um alvo terapêutico interessante no contexto de doenças inflamatórias fibróticas. Acreditamos, então, com base nestas evidências, que o TNF- α pode ser um alvo terapêutico em potencial para a silicose.

Estudos prévios demonstram que as GNPs podem ser incorporadas por diversas células do tecido pulmonar incluindo as células epiteliais e endoteliais, além de macrófagos alveolares (80) (81), modulando suas funções. Como já descrito nesta dissertação (Introdução), os macrófagos têm sido apontados como reguladores cruciais da fibrose, a partir de populações específicas que exercem atividades funcionais únicas, nas fases de iniciação, manutenção e resolução da fibrose (8). Estas estão associadas à capacidade que estas células têm de fagocitar e responder através da produção de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio contra agentes externos (65). Neste sentido, os macrófagos são considerados como as principais células produtoras de TNF- α (82). Tomando por base as considerações acima, passamos a avaliar o potencial efeito direto das GNPs sobre os macrófagos em sistema *in vitro*. Nas análises realizadas utilizamos a linhagem de macrófagos alveolares (AMJ2C11) murinos,

e verificamos que GNPs não interferiram com viabilidade celular. Este resultado é suportado por outros dados que mostram igual fenômeno ocorrendo com outras linhagens de macrófagos (65) (83) (84). Na avaliação da ativação celular realizada através da quantificação de TNF- α comprovamos que o estímulo com sílica assim como o estímulo de LPS induziu o aumento da produção e liberação dessa citocina, o que também foi observado por TYNER e colaboradores, 2015. Interessantemente verificamos que o pré-tratamento das células AMJ2C11 com as GNPs levou a uma significativa redução dos níveis de TNF- α liberados após estimulação com as partículas de sílica. Entretanto a dose mais elevada das GNPs (3,0 $\mu\text{g/mL}$), diferente das demais, não inibiu a liberação do TNF- α pelos macrófagos estimulados com sílica e, produziu efeito tóxico na condição de ausência de ativação das células. Estes dados se mostraram discrepantes em relação a outros estudos (65) (83), porém devemos considerar alguns fatores como: i) as origens das partículas são distintas e ii) suas propriedades, que são fundamentais para determinar sua ação biológica. Outro parâmetro investigado foi o da proliferação celular feita através do ensaio de BrdU, quando pudemos observar uma interessante correlação entre o percentual de células proliferando e a produção de TNF- α . O pré-tratamento das células AMJ2C11 com as GNPs produziu um significativo aumento na proliferação celular após o estímulo com as partículas de sílica. Associando com a produção do TNF- α vemos que quanto menor a produção de TNF- α maior a proliferação, o que nos deixa a hipótese que o TNF- α esteja induzindo a morte celular (85) e, que de alguma forma as GNPs conseguem reverter esse fenômeno, aumentando a taxa de sobrevivência dessas células. Estes achados corroboram nossos achados histológicos, aos quais as células presentes no tecido pulmonar têm aspecto de células mais ativadas e com maior capacidade em responder contra a sílica. De forma coerente com anteriormente visto, a maior concentração de sílica reduziu a proliferação celular e aumentou a produção de TNF- α , sem alterar a viabilidade celular. A possibilidade das GNPs estarem ativando os macrófagos, tendo como consequência o aumento da atividade mitocondrial, poderia ser uma justificativa para os dados aparentemente contraditórios. De toda maneira ensaios complementares se fazem necessários para melhor compreender o efeito das GNPs sobre os macrófagos.

6.0 Conclusão

Tomados em conjunto, nossos resultados se mostram relevantes, atuais e inéditos, e revelam a eficiência do tratamento com GNPs, por aerossol, em promover a involução de granulomas estabelecidos no pulmão de camundongos silicóticos, bem como reverter o quadro de comprometimento da função pulmonar e de hiper-reatividade das vias aéreas associados à silicose. Este efeito parece estar associado a um mecanismo de supressão da reatividade de macrófagos alveolares à estimulação com as partículas de sílica e, também à redução dos níveis de TNF- α gerado no pulmão. Estes achados são encorajadores e nos desafiam a continuar com experimentos adicionais visando melhor compreender o mecanismo de ação antifibrótica das GNPs na silicose, e dimensionar sua aplicabilidade em um universo mais amplo de doenças inflamatórias pulmonares de natureza fibrótica.

7.0 Referência Bibliográfica

1. Martini F, Timmons M, Tallitsch, R. Human Anatomy. 8th ed. Pearson; 2014.
2. genomasur [Internet]. Genomasur.com. 2018 [cited 16 February 2018]. Available from:
http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/capitulo_14.htm.
3. The Anatomy of the Laboratory Mouse [Internet]. Informatics.jax.org. 2018 [cited 16 February 2018]. Available from:
<http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure53.shtml>
4. Guyton A, Hall J, Zocchi L, Aicardi G. Fisiologia medica. Milano: Elsevier; 2006.
5. West J. Fisiologia Respiratória. 6th ed. São Paulo: Manole Ltda; 2002.
6. Aires M. Fisiologia. 4th ed. Guanabara Koogan; 2012.
7. Kumar V, Abbas A, Aster J, Cotran R, Robbins S. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9th ed. 2015.
8. Wynn T, Barron L. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Seminars in Liver Disease*. 2010;30(03):245-257.
9. Wynn T. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(7):1339-1350.
10. Wynn T, Ramalingam T. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine*. 2012;18(7):1028-1040.
11. Wynn T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology*. 2008;214(2):199-210.
12. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Fibrotic Diseases: causes, consequences, prevention, and treatment. [s.l: s.n.].
13. Pulmonary Fibrosis Foundation. Pulmonary fibrosis patient information guide. Chicago; 2013.
14. Byrne A, Maher T, Lloyd C. Pulmonary Macrophages: A New Therapeutic Pathway in Fibrosing Lung Disease?. *Trends in Molecular Medicine*. 2016;22(4):303-316.

15. Giannandrea M, Parks W. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease Models & Mechanisms*. 2014;7(2):193-203.
16. Ministério da saúde. Pneumoconioses. Brasília; 2006.
17. Leung C, Yu I, Chen W. Silicosis. *Lancet*. 2012.
18. Prado A, Fariai E, Padilhaii P. Application and chemical modification of silica-gel obtained from sand. *Química Nova*. 2005;28.
19. Gutierrez T, Garcia C, Morales M, Rocco P. Entendendo a fisiopatologia da silicose. *Revista do pulmão RJ*. 2008;17:33-37.
20. Mossman B, Churg A. Mechanisms in the Pathogenesis of Asbestosis and Silicosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1998;157(5):1666-1680.
21. Ministério da saúde/ Universidade Estadual do Rio de Janeiro. O Mapa da Exposição à Sílica no Brasil. 2007.
22. Greenberg M, Waksman J, Curtis J. Silicosis: A Review. *Disease-a-Month*. 2007;53(8):394-416.
23. Mendes R. An epidemiologic study of silicosis in the Southeast Region of Brazil, from a survey of patients in tuberculosis hospitals. *Rev Saúde Pública*. 1979;13.
24. [Internet]. 2018 [cited 16 February 2018]. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6405a1.htm>>
25. Carneiro A, Santos M, Maia P, Barreto S. Câncer de pulmão em trabalhadores expostos à sílica. *Jornal de pneumologia*. 2002;28:233-236.
26. Terra Filho M, Santos U. Silicose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2006;32.
27. Davis G. Pathogenesis of silicosis: Current concepts and hypotheses. *Lung*. 1986;164(1):139-154.
28. Vuorio E, Makela J, Vuorio T, Poole A, Wagner J. Characterization of excessive collagen production during development of pulmonary fibrosis induced by chronic silica inhalation in rats. *The British journal of experimental pathology*. 1989;:305–315.

29. Case K. Silicosis Archives - Washington Workers' Advisor [Internet]. Workersadvisor.com. 2018 [cited 4 April 2018]. Available from: <https://workersadvisor.com/tag/silicosis/>
30. Barboza C, Winter D, Seiscento M, Santos U, Terra Filho M. Tuberculose e silicose: epidemiologia, diagnóstico e quimioprofilaxia. J bras pneumol. 2008;34.
31. Gardner J. Nanotechnology in medicine and healthcare: Possibilities, progress and problems. South African Journal of Bioethics and Law. 2015;8(2):50.
32. Moffatt S. Nanotechnology to Nanomedicine: Reconciling Ethical Implications and Public Health. MOJ Proteomics & Bioinformatics. 2016;3(4).
33. Makanan P. Penggunaa Teknologi Nano Dalam Industri Makanan [Internet]. Teknologimakanan.com. 2018 [cited 26 February 2018]. Available from: <http://www.teknologimakanan.com/2012/04/penggunaa-teknologi-nano-dalam-industri.html>
34. Pison U, Welte T, Giersig M, Groneberg D. Nanomedicine for respiratory diseases. European Journal of Pharmacology. 2006;533(1-3):341-350.
35. Nikalje A. Nanotechnology and its Applications in Medicine. Medicinal Chemistry. 2015;5(2).
36. Jena M, Mishra S, Jena S, Mishra S. Nanotechnology- future prospect in recent medicine: a review. International Journal of Basic & Clinical Pharmacology. 2013;:353.
37. Brandenberger C, Rothen-Rutishauser B, Mühlfeld C, Schmid O, Ferron G, Maier K et al. Effects and uptake of gold nanoparticles deposited at the air–liquid interface of a human epithelial airway model. Toxicology and Applied Pharmacology. 2010;242(1):56-65.
38. King H. Uses of Gold in Industry, Medicine, Computers, Electronics, Jewelry [Internet]. Geology.com. 2018 [cited 10 February 2018]. Available from: <https://geology.com/minerals/gold/uses-of-gold.shtml>.

39. Dykman L, Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem Soc Rev*. 2012;41(6):2256-2282.
40. Leibfarth J, Persellin R. Review: Mechanisms of action of gold. *Agents and Actions*. 1981;11(5):458-472.
41. Khanna D, Sethi G, Ahn K, Pandey M, Kunnumakkara A, Sung B et al. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Current Opinion in Pharmacology*. 2007;7(3):344-351.
42. Pereira D, Petronilho F, Pereira H, Vuolo F, Mina F, Possato J et al. Effects of Gold Nanoparticles on Endotoxin-Induced Uveitis in Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2012;53(13):8036.
43. Tsai Y, Chen Y, Cheng P, Tsai H, Shiau A, Tzai T et al. TGF- β 1 Conjugated to Gold Nanoparticles Results in Protein Conformational Changes and Attenuates the Biological Function. *Small*. 2013;9(12):2119-2128.
44. Diab M, Dkhil M, Bauomy A, Al-Quraishy S. Antioxidant and hepatoprotective role of gold nanoparticles against murine hepatic schistosomiasis. *International Journal of Nanomedicine*. 2015;;7467.
45. Barreto E, Serra M, dos Santos R, dos Santos C, Hickmann J, Cotias A et al. Local Administration of Gold Nanoparticles Prevents Pivotal Pathological Changes in Murine Models of Atopic Asthma. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2015;11(6):1038-1050.
46. Chen H, Dorrigan A, Saad S, Hare D, Cortie M, Valenzuela S. In Vivo Study of Spherical Gold Nanoparticles: Inflammatory Effects and Distribution in Mice. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e58208.
47. Gilberti R, Knecht D. Macrophages phagocytose nonopsonized silica particles using a unique microtubule-dependent pathway. *Mol Biol Cell*. 2015;;518–529.
48. Uchiyama M, Deda D, Rodrigues S, Drewes C, Bolonheis S, Kiyohara P et al. In vivo and In vitro Toxicity and Anti-Inflammatory Properties of Gold Nanoparticle Bioconjugates to the Vascular System. *Toxicological Sciences*. 2014;142(2):497-507.
49. Han S, Lee J, Ahn K, Kim Y, Kim J, Lee J et al. Size-dependent clearance of gold nanoparticles from lungs of Sprague–Dawley rats

- after short-term inhalation exposure. *Archives of Toxicology*. 2014;89(7):1083-1094.
50. Yu L, Lanry Yung L, Ong C, Tan Y, Suresh Balasubramaniam K, Hartono D et al. Translocation and effects of gold nanoparticles after inhalation exposure in rats. *Nanotoxicology*. 2007;1(3):235-242.
 51. Sung J, Ji J, Park J, Song M, Song K, Ryu H et al. Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*. 2011;8(1):16.
 52. Elbakary R, Okasha E, Ragab A, Ragab M. Histological effects of gold nanoparticles on lung tissue of adult male albino rats. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2017;.
 53. Rambanapasi C, Zeevaart J, Buntting H, Bester C, Kotze D, Hayeshi R et al. Bioaccumulation and Subchronic Toxicity of 14 nm Gold Nanoparticles in Rats. *Molecules*. 2016;21(6):763.
 54. Occupational and Environmental Health. Hazard Prevention and Control in the Work Environment: Airborne Dust. Geneva: world health organization; 1999.
 55. Ortiz L, Lasky J, Gozal E, Ruiz V, Lungarella G, Cavarra E et al. Tumor Necrosis Factor Receptor Deficiency Alters Matrix Metalloproteinase 13/Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 Expression in Murine Silicosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001;163(1):244-252.
 56. Forastiere F. Silicosis and Lung Function Decrements among Female Ceramic Workers in Italy. *American Journal of Epidemiology*. 2002;156(9):851-856.
 57. Montes I, Fernández G, Reguero J, Mir M, García-Ordás E, Martínez J et al. Respiratory Disease in a Cohort of 2,579 Coal Miners Followed Up Over a 20-Year Period. *Chest*. 2004;126(2):622-629.
 58. Selman M, Thannickal V, Pardo A, Zisman D, Martinez F, Lynch J. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Drugs*. 2004;64:405-430.
 59. Hnizdo E. Chronic obstructive pulmonary disease due to occupational exposure to silica dust: a review of epidemiological and pathological evidence. *Occupational and Environmental Medicine*. 2003;60(4):237-243.

60. Mesquita Junior J, Lopes A, Jansen J, Melo P. Avaliação das características resistivas do sistema respiratório de indivíduos portadores de silicose pela técnica de oscilações forçadas. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2006;:213 – 220.
61. Amrani Y, Panettieri R. Cytokines induce airway smooth muscle cell hyperresponsiveness to contractile agonists. *Thorax*. 1998;53(8):713-716.
62. Panettieri R. Airway smooth muscle: An immunomodulatory cell. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002;110(6):S269-S274.
63. Ferreira T, de Arantes A, do Nascimento C, Olsen P, Trentin P, Rocco P et al. IL-13 Immunotoxin Accelerates Resolution of Lung Pathological Changes Triggered by Silica Particles in Mice. *The Journal of Immunology*. 2013;191(10):5220-5229.
64. Gustafson H, Holt-Casper D, Grainger D, Ghandehari H. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today*. 2015;10(4):487-510.
65. Tyner K, Bancos S, Stevens D. Effect of silica and gold nanoparticles on macrophage proliferation, activation markers, cytokine production, and phagocytosis in vitro. *International Journal of Nanomedicine*. 2014;:183.
66. Lin Z, Monteiro-Riviere N, Riviere J. Pharmacokinetics of metallic nanoparticles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2014;7(2):189-217. *Nanobiotechnology*, 7(2), pp.189-217.
67. Pal R, Chakraborty B, Nath A, Singh L, Ali M, Rahman D et al. Noble metal nanoparticle-induced oxidative stress modulates tumor associated macrophages (TAMs) from an M2 to M1 phenotype: An in vitro approach. *International Immunopharmacology*. 2016;38:332-341.
68. Sisco P, Wilson C, Mironova E, Baxter S, Murphy C, Goldsmith E. The Effect of Gold Nanorods on Cell-Mediated Collagen Remodeling. *Nano Letters*. 2008;8(10):3409-3412.
69. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical Society Reviews*. 2009;38(6):1759.

70. Vieira L, Lins M, Viana I, dos Santos J, Smaniotto S, Reis M. Metallic nanoparticles reduce the migration of human fibroblasts in vitro. *Nanoscale Research Letters*. 2017;12(1).
71. Pandey J, Agarwal D. Biomarkers: A potential prognostic tool for silicosis. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 2012;16(3):101.
72. Lucas C, Amft N, Reid P. Systemic lupus erythematosus complicating simple silicosis. *Occupational Medicine*. 2014;64(5):387-390.
73. Vanhée D, Gosset P, Boitelle A, Wallaert B, Tonnel A. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *European Respiratory Journal*. 1995;:834–842.
74. Liu R. Oxidative Stress, Plasminogen Activator Inhibitor 1, and Lung Fibrosis. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2008;10(2):303-320.
75. Amrani Y, Krymskaya V, Maki C, Panettieri R. Mechanisms underlying TNF- α effects on agonist-mediated calcium homeostasis in human airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1997;273(5):L1020-L1028.
76. Parris J, Cobban H, Littlejohn A, MacEwan D, Nixon G. Tumour necrosis factor- α activates a calcium sensitization pathway in guinea-pig bronchial smooth muscle. *The Journal of Physiology*. 1999;518(2):561-569.
77. Nakae S, Lunderius C, Ho L, Schäfer B, Tsai M, Galli S. TNF can contribute to multiple features of ovalbumin-induced allergic inflammation of the airways in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007;119(3):680-686.
78. Brightling C, Berry M, Amrani Y. Targeting TNF- α : A novel therapeutic approach for asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;121(1):5-10.
79. Williams A, Eynott P, Leung S, Nath P, Jupp R, De Sanctis G et al. Role of cathepsin S in ozone-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2009;22(1):27-32.
80. Sadauskas E, Jacobsen N, Danscher G, Stoltenberg M, Vogel U, Larsen A et al. Biodistribution of gold nanoparticles in mouse lung

following intratracheal instillation. *Chemistry Central Journal*. 2009;3(1):16.

81. Geiser M, Quaile O, Wenk A, Wigge C, Eigeldinger-Berthou S, Hirn S et al. Cellular uptake and localization of inhaled gold nanoparticles in lungs of mice with chronic obstructive pulmonary disease. *Particle and Fibre Toxicology*. 2013;10(1):19.
82. PARAMESWARAN N, PATIAL S. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. 2010;20:87-103.
83. Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde R, Sastry M. Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview. *Langmuir*. 2005;21(23):10644-10654.
84. Khalili Fard J, Jafari S, Eghbal M. A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2015;5(4):447-454.
85. Chu W. Tumor necrosis factor. *Cancer Letters-Elsevier*. 2012;;222–225.
86. Cardoso E, Rezin G, Zanoni E, de Souza Notoya F, Leffa D, Damiani A et al. Acute and chronic administration of gold nanoparticles cause DNA damage in the cerebral cortex of adult rats. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2014;766-767:25-30.
87. Guerrin F, Voisin C. Bronchial hyperreactivity in miners with pneumoconiosis. *Inst Hyg mines*. 1980;;73-84.
88. Groetenbriel C, Marcelle R, Petit J. Bronchial Hiperreactivity and anthracosilicosis. *Bronches*. 1968;;510-513.
89. Kandt D. Clinical symptoms and findings in the lower airways of soot-exposed workers. *Erkr Atmungsorgane*. 1985;;25-41.
90. Huang Y, Shiau A, Chen S, Chen Y, Wang C, Tsai C et al. Multivalent structure of galectin-1-nanogold complex serves as potential therapeutics for rheumatoid arthritis by enhancing receptor clustering. *European Cells and Materials*. 2012;23:170-181.

91. Dreaden E, Mackey M, Huang X, Kang B, El-Sayed M. Beating cancer in multiple ways using nanogold. *Chemical Society Reviews*. 2011;40(7):3391.
92. OEH (Occupational and Environmental Health) Department of Protection of the Human Environment. Hazard Prevention and Control in the Work Environment: Airborne Dust. Geneva: world health organization; 1999.