

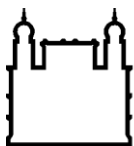
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA ADENOSINA NA RESPOSTA
FIBRÓTICA PULMONAR EM CAMUNDONGOS SILICÓTICOS**

YAGO AMIGO PINHO JANNINI DE SÁ

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

YAGO AMIGO PINHO JANNINI DE SÁ

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA ADENOSINA NA RESPOSTA FIBRÓTICA PULMONAR EM CAMUNDONGOS SILICÓTICOS

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2017

Amigo Pinho Jannini de Sá, Yago.

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA ADENOSINA NA RESPOSTA FIBRÓTICA PULMONAR EM CAMUNDONGOS SILICÓTICOS / Yago Amigo Pinho Jannini de Sá. - Rio de Janeiro, 2017.

74 f.

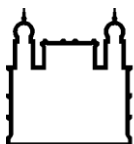
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Patricia Machado Rodrigues e Silva.

Bibliografia: f. 61-74

1. silicose. 2. adenosina. 3. purinérgicos. 4. adora2a. 5. pneumoconiose. 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

YAGO AMIGO PINHO JANNINI DE SÁ

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA ADENOSINA NA RESPOSTA FIBRÓTICA PULMONAR EM CAMUNDONGOS SILICÓTICOS

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof^a. Dra. Maria das Gracas Muller de Oliveira Henriques - Presidente IOC- Farmanguinhos

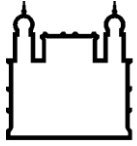
Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filhos – USP / Ribeirão Preto

Prof^a. Dra. Claudia Farias Benjamim - UFRJ

Prof^a. Dra. Tatiana Maron Gutierrez – FIOCRUZ / RJ

Prof. Dr. Pedro Leme Silva - UFRJ

Rio de Janeiro, 09 de fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Agradecimentos

À minha mãe Maristela Amigo e meu pai Antônio Carlos pelo apoio, suporte e paciência ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Às minhas avós, Orquídia Gil (*in memorium*) e Solange Jannini, e meus avôs, Manuel Amigo (*in memorium*) e Antônio de Sá, pelo carinho, aconchegos e preocupação que tiveram por mim;

Em especial à Thaís Rizzo Ribeiro, minha noiva, pela paciência e dedicação mesmo nos curtos finais de semana devido aos experimentos. Espero retribuir da mesma forma que contribuiu para mim e para a conclusão deste trabalho;

À Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva pela orientação ao longo destes dois anos de mestrado, dedicação, paciência, amizade e oportunidade que me permitiram evoluir e aprender muito, tanto como profissional como pessoal;

Ao Dr. Marco Aurélio Martins, chefe do Laboratório de Inflamação, pela oportunidade de trabalhar em sua equipe e laboratório, sendo parte fundamental para a realização deste trabalho;

Ao Dr. Vinícius Frias pela amizade, conversas, conselhos e apoio ao longo deste tempo de laboratório;

Aos membros da banca: Dra. Maria das Gracas, Dr. José Carlos, Dra. Claudia Benjamim e aos suplentes: Dra. Tatiana Maron e Dr. Pedro Leme pela disponibilidade de tempo para participar deste importante processo para minha formação acadêmica. Em especial a Dra. Tatiana Maron pela revisão deste trabalho;

Aos amigos do laboratório de inflamação: Bianca Torres, Tatiana Paula, Amanda Cotias, Leonardo Braga, Natalia Barreto, Thamiris, Thielen, Gabriela, Fernanda Verdini e Cristiano Gomes pelas conversas, caronas, discussões sobre os mais variados temas e principalmente ajudando na realização deste projeto;

À Ana Carolina Arantes, Joyce, Camila e Thais pelo apoio técnico dado a este trabalho, fundamental para a obtenção dos resultados apresentados. Agradeço imensamente pela disponibilidade de tempo, ajuda e amizade;

À Osirene, mais conhecida como Dadá, pelo exemplo de dedicação ao laboratório e rápidas soluções para os mais variados problemas. Obrigado por todas as ajudas ao longo deste tempo;

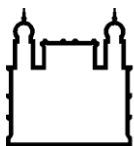
A todos os outros integrantes do Laboratório de Inflamação, não menos importantes, mas porque são muitos para listar aqui, pela companhia, ajuda e companheirismo no desenvolvimento deste projeto;

Ao Dr. José Carlos, Dr. Robson Coutinho, Dr. Luiz Eduardo e Dra. Vanessa Carregaro pela disponibilidade, receptividade e colaboração neste projeto;

Aos órgãos de fomento, a CNPq e FAPERJ, que tornaram este trabalho possível de ser realizado.

“Oh tell me Lord how could it be,
That though our cells make ATP,
It’s not all used for energy,
But sometimes is secreted free.
It puzzles you, it puzzles me,
While Geoffrey Burnstock smiles with glee
At the many roles of ATP.”

- Poema de Samuel C. Silverstein, citado por
Burnstock (2006) viii



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

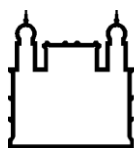
AValiação DO PAPEL DA Adenosina NA RESPOSTA Fibrótica Pulmonar EM Camundongos Silicóticos

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE Mestrado em Biologia Celular e Molecular

YAGO AMIGO PINHO JANNINI DE SÁ

A silicose é uma doença crônica, de caráter ocupacional, que se caracteriza pelos componentes inflamatório e fibrogênico, com marcada formação de granuloma. É irreversível e não há tratamento efetivo disponível até o momento. A adenosina é um nucleosídeo cuja implicação na fibrose tem sido reportada, o que a coloca como um potencial alvo terapêutico para doenças fibróticas. Neste estudo, investigamos o envolvimento da adenosina na fibrose pulmonar em camundongos silicóticos. A reatividade de fibroblastos pulmonares *in vitro* também foi avaliada. Camundongos foram instilados, por via intranasal, com partículas de sílica e as análises feitas em 7 ou 28 dias. Os parâmetros avaliados incluíram a função pulmonar (resistência e elastância), através do sistema de pletismografia de corpo inteiro invasiva, e alterações teciduais por técnicas morfológicas e morfométricas e as colorações de H&E e Picro sirius. Foram também realizados ensaios *in vitro* com fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos controles, submetidos à estimulação com IL-13 e adenosina, e com análise de proliferação e produção de MCP-1. Os camundongos silicóticos apresentaram aumento de resistência e elastância, tanto em 7 como em 28 dias pós-sílica, em paralelo à fibrose progressiva e formação de granulomas. A expressão da ectonucleotidases CD39 e CD73, responsáveis pela formação de adenosina a partir do ATP, se mostrou aumentada no tecido pulmonar, na fase inicial da silicose. Os receptores de adenosina tiveram sua expressão alterada no pulmão dos animais silicóticos, refletindo aumento nos receptores A₁ e A_{2B} e redução no receptor A_{2A}, em condições onde o A₃ ficou inalterado. Os ensaios *in vitro* mostraram que a estimulação de fibroblastos com a adenosina induziu aumento na taxa de proliferação e produção de MCP-1, fenômenos sensíveis ao tratamento com antagonista seletivo do receptor A_{2A} (ZM 241385). Fibroblastos de camundongos nocautes para o receptor A_{2A} foram refratários à estimulação por adenosina. O aumento da proliferação foi também observado quando da estimulação dos fibroblastos pela IL-13, fenômeno suprimido pelo antagonista do receptor A_{2A}. Estes dados indicam a participação intermediária da adenosina na ação prófibrótica da IL-13, mediante ligação ao receptor A_{2A}. A supressão da proliferação dos fibroblastos por IL13 foi também notada quando do tratamento com os inibidores das enzimas CD39 e CD79. Verificamos, ainda, que camundongos nocautes para o gene que codifica para o receptor A_{2A} apresentaram redução do quadro silicótico, expresso tanto no que se refere ao comprometimento da função pulmonar como a resposta fibrótica. Em conclusão, nossos resultados mostram de forma original que a adenosina parece estar implicada na resposta fibrótica associada ao quadro silicótico em camundongos, por um mecanismo dependente, pelo menos em parte, de sua ação indutora de proliferação sobre fibroblastos, e de sua ação sobre o receptor A_{2A}. Além disso, nossos resultados sugerem que antagonistas do receptor A_{2A} da adenosina poderiam vir a constituir uma ferramenta farmacológica útil de aplicação em doenças fibróticas pulmonares como a silicose.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF THE ROLE OF ADENOSINE IN PULMONARY FIBROTIC RESPONSE IN SILICOTIC MICE

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN CELULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

YAGO AMIGO PINHO JANNINI DE SÁ

Silicosis is a chronic occupational disease characterized by inflammatory and fibrogenic components, with marked granuloma formation. It is irreversible and there is no effective treatment available so far. Adenosine is a nucleoside that has been reported to be implicated in fibrosis, being considered as a potential therapeutic target for fibrotic diseases. In this study, we investigated the involvement of adenosine in pulmonary fibrosis in silicotic mice. Lung fibroblast reactivity was also evaluated *in vitro*. Mice were instilled intranasally with silica particles and the analyzes performed at 7 and 28 days. The parameters evaluated included lung function (resistance and elastance) by invasive whole body plethysmography and tissue alterations by morphological and morphometric techniques using H&E and Picro sirius staining. Lung fibroblast reactivity to IL-13 and adenosine stimulation was evaluated *in vitro* with proliferation and MCP-1 production being analyzed. Silicotic mice exhibited increased lung resistance and elastance, in parallel to progressive fibrosis and granuloma formation, at 7 and 28 days post-instillation. Expression of the CD39 and CD73 ectonucleotidases, responsible for adenosine generation from ATP, was shown to be increased in lung tissue at the initial phase of silicosis. Adenosine receptor expression was altered in the lung of the silicotic animals, reflected by an increase in A₁ and A_{2B} receptors and reduction in A_{2A} receptor. A₃ receptor was unchanged. *In vitro* assays showed that stimulation of fibroblasts with adenosine led to an increase in the proliferation rate and production of MCP-1, phenomena sensitive to treatment with selective A_{2A} receptor antagonist (ZM-241385). Fibroblasts from A_{2A} receptor knockout mice were refractory to stimulation with adenosine. Increased fibroblast proliferation was also observed after stimulation with IL-13, a phenomenon suppressed by the A_{2A} receptor antagonist. These data indicate that adenosine acts mediating IL-13 profibrotic effect by means of binding to A_{2A} receptor. Suppression of IL-13 stimulated fibroblast proliferation was also noted after treatment CD39 and CD79 enzyme inhibitors. We also observed that A_{2A} receptor knockout mice showed a reduction of the silicotic conditions as attested by impairment of lung function and fibrotic response. In conclusion, our results show originally that adenosine seems to be implicated in the fibrotic response associated with silicosis in mice, by a mechanism, at least partially dependent on its ability to induce fibroblast proliferation, and its action on A_{2A} receptors. In addition, our results suggest that adenosine A_{2A} receptor antagonists could provide a useful pharmacological tool for application in fibrotic diseases such as silicosis.

Sumário

1.	Introdução	1
1.1.	Pneumoconioses	1
1.1.1	Silicose	2
1.1.1.1.	Patogênese da silicose	3
2.	Objetivos	13
2.1.	Objetivo Geral	13
2.2.	Objetivos específicos.....	13
3.	Material e métodos	14
3.1.	Animais	14
3.1.1.	Indução de silicose	14
3.1.2.	Medida de Função pulmonar	14
3.1.3.	Análise histológica	15
3.1.4.	Quantificação de colágeno	15
3.1.5.	Avaliação da expressão gênica através de RT-PCR.....	15
3.2.	Cultura primária de fibroblastos pulmonares em monocamada	16
3.2.1.	Estímulos e tratamentos <i>in vitro</i>	17
3.2.2.	Cultura primária de fibroblastos pulmonares em sistema tridimensional	17
3.2.3.	Proliferação celular	17
3.2.4.	Ensaio de ELISA.....	18
3.3.	Análise estatística.....	18
4.	Resultados	19
4.1.	Análise da função pulmonar e alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos.....	19
4.2.	Avaliação da expressão das enzimas CD39, CD73 e receptores P1 no pulmão de camundongos silicóticos	21
4.3.	Avaliação e caracterização do efeito da adenosina sobre fibroblastos pulmonares de camundongos.....	24
4.4.	Avaliação do envolvimento da adenosina na estimulação de fibroblastos pulmonares murino por IL-13	30
4.5.	Análise do efeito da deleção do gene para o receptor A _{2A} no desenvolvimento da silicose em camundongos.....	36
5.	Discussão.....	40
6.	Conclusão	46
7.	Bibliografia	47

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema de ativação de fibroblastos e desenvolvimento da fibrose tecidual	6
Figura 2 – Esquema de formação e liberação de adenosina no meio extracelular.....	9
Figura 3 – Esquema representativo dos receptores (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3) e cascata intracelular quando ativados pela adenosina	10
Figura 4 – Avaliação da função e alterações morfológicas pulmonares em camundongos silicóticos, em 7 e 28 dias	20
Figura 5 – Quantificação da expressão das enzimas CD39 e CD 73 no pulmão de camundongos silicóticos e controles.....	22
Figura 6 – Quantificação da expressão do mRNA dos receptores P1 no pulmão de camundongos silicóticos e controles.....	23
Figura 7 – Ativação de fibroblastos pulmonares de camundongos controles por IL-13 e adenosina (ADO) <i>in vitro</i>	24
Figura 8 – Avaliação do diâmetro de esferóides (cultura 3D). Análises foram realizadas 24, 48 e 72 horas após estímulo com IL-13 (40 ng/mL) ou ADO (100 – 1000 mM).....	26
Figura 9 – Análise da ativação de esferóides.....	27
Figura 10 – Efeito do tratamento com antagonistas seletivos de receptores de adenosina na proliferação de fibroblastos pulmonares de camundongos controles <i>in vitro</i>	28
Figura 11 – Efeito da ativação do receptor A_{2A} pelo agonista seletivo CGS 21680 em miofibroblastos pulmonares de camundongos controles <i>in vitro</i>	29
Figura 12 – Efeito do tratamento com antagonista seletivo do receptor A_{2A} na proliferação de fibroblastos pulmonares <i>in vitro</i>	30
Figura 13 – Efeito da co-estimulação de fibroblastos pulmonares controles com IL-13 e adenosina (ADO) <i>in vitro</i>	32
Figura 14 – Efeito do tratamento com antagonista seletivo do receptor A_{2A} na proliferação de fibroblastos pulmonares <i>in vitro</i>	33
Figura 15 – Avaliação do efeito da deleção do gene codificante para o receptor A_{2A} na proliferação de miofibroblastos pulmonares <i>in vitro</i>	34
Figura 16 – Efeito dos inibidores das enzimas CD 39 (ARL 67156) e CD 73 (AMPCP) na proliferação de fibroblastos pulmonares <i>in vitro</i>	35
Figura 17 – Avaliação da função pulmonar em camundongos deficientes para o receptor A_{2A} em camundongos silicóticos ($A_{2A}^{-/-}$).....	37
Figura 18 – Avaliação morfológica e morfométrica do pulmão de camundongos silicóticos.....	38
Figura 19 – Avaliação da deposição de fibras colágenas em cortes histológicos do pulmão de camundongos silicóticos.....	39
Figura 20 – Esquema do envolvimento dos receptores A_{2A} e A_{2B} na modulação de respostas pró-fibróticas.....	42

Lista de Tabelas

Tabela 1- Localização e proteínas G associadas aos receptores de adenosina.....	12
Tabela 2 - Sequência dos primers utilizadas no RT-PCR	16

Lista de Siglas e Abreviaturas

- AP-1 – Fator de transcrição proteína ativadora-1
- ATP - Adenosina trifosfato
- ADA – Adenosina deaminase
- ADO - Adenosina
- ADP – Adenosina difosfato
- AMP – Adenosina monofosfato
- AMP-c – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- ATS – Sociedade Torácica Americana
- cGMP - Monofosfato cíclico de guanosina
- CNT – Transportador concentrativo de nucleosídeo
- DMEM – Meio eagle modificado por Dulbecco
- DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica
- ENT – Transportador equilibrativo de nucleosídeo
- EMT –Transição epitélio-mesenquimal
- EndMT–Transição endotélio-mesenquimal
- EPI - Equipamento de proteção individual
- IL - Interleucina
- IL-13PE – Interleucina-13 conjugada a exotoxina de pseudomonas
- MCP-1–Proteína quimiotática de monócitos 1
- MEC - Matriz extracelular
- MMP – Metaloproteinase de Matriz
- NF- κ B –Fator nuclear kappa-B
- PBS – Tampão fosfato-salina
- ROS –Espécies reativas de oxigênio
- TGF- β –Fator de transformação do crescimento beta
- TNF α –Fator de necrose tumoral alfa
- α -SMA – Actina de músculo liso alfa

1. Introdução

Doenças pulmonares englobam várias condições patológicas que afetam os órgãos e tecidos que possibilitam a troca de gases em organismos superiores e, inclui as condições do trato respiratório superior, traqueia, brônquios, bronquíolos, alvéolos, pleura e cavidade pleural, além de nervos e músculos envolvidos no processo da respiração (Hall e Guyton, 2011). Podem variar em intensidade e serem classificadas de maneiras diferentes, pelo órgão ou tecido envolvido, pelo tipo e padrão de sinais e sintomas associados, ou ainda pela causa (etiologia) da doença. As disfunções pulmonares crônicas são conhecidas por afetar as vias aéreas e outras estruturas do pulmão, não são curáveis. No entanto, há formas de tratamento que ajudam a dilatar grandes passagens aéreas e melhorar a falta de ar que podem ajudar a controlar os sintomas e aumentar a qualidade de vida para as pessoas com a doença. As doenças pulmonares restritivas compõem uma categoria de disfunções respiratórias caracterizadas pela perda da complacência pulmonar, causando expansão pulmonar incompleta e aumento da rigidez do órgão (Beckett, 2011).

1.1. Pneumoconioses

As pneumoconioses compõem um grupo de doenças pulmonares crônicas, de caráter ocupacional, geralmente associada a trabalho em metalúrgicas, construtoras ou minas. Estão associadas à inalação de quantidades expressivas de poeira inorgânicas, contendo partículas, como por exemplo, carvão, asbestos e sílica (Lynch e McCunce, 1997; ATS, 1997). Dados da literatura apontam que, em 2013, houve um total de 260.000 mortes de indivíduos com pneumoconioses, dentre estas a maioria associada à silicose (46.000), seguida por asbestose e antracose (GBD, 2013). Esta classe de doenças se desenvolve de forma lenta e silenciosa (20 a 30 anos), sem que os indivíduos percebam os sintomas, que são tosse, dificuldade para respirar, cansaço, perda de peso que evoluem de forma progressiva e persistente (NIOSH, 2002; Glazer e Newman, 2004). O diagnóstico é feito através de exame físico, história do paciente, e radiografia simples de tórax, onde se pode constatar a presença de um padrão típico de cicatrizes e nódulos. De forma complementar é realizado teste de função pulmonar (espirometria) para averiguação do grau de disfunção e incapacidade do paciente (Chong et al., 2006; Ehrlich et al., 2011). As pneumoconioses podem ser evitadas desde que se apliquem padrões de níveis máximos permitidos de poeira nos locais de trabalho, e também utilizando equipamentos de proteção individual (EPI), principalmente o uso de máscaras de proteção. Além disso, a realização de exames médicos regulares pode ser muito útil no caso de

indivíduos considerados em situação de risco, uma vez que podem detectar a doença em estágios iniciais, antes que ela se torne incapacitante (NIOSH, 2002).

1.1.1 Silicose

A silicose é considerada como uma das doenças ocupacionais mais antiga conhecida desde a Antiguidade, no Egito, Grécia e Roma. É uma das principais causas de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento e desenvolvidos, representando, assim, um importante problema de saúde pública (Leung et al., 2012). De acordo com a publicação da OMS a silicose é uma doença que causa graves transtornos para a saúde do trabalhador, levando ao óbito centenas de pessoas em todo o mundo anualmente resultando em um sério impacto socioeconômico (Organização Mundial da Saúde, 1996).

A silicose tem sua ocorrência associada a atividades de trabalho que incluem jateamento de areia, construção civil, mineração, construção de túneis, artes plásticas, joalheria, confecção de próteses dentárias dentre outras (Leung et al., 2012). O risco de desenvolvimento desta doença está diretamente dependente da concentração, do tamanho da partícula, da duração do tempo de exposição, do tipo de sílica cristalina e, do tempo decorrente da formação dos cristais, uma vez que as partículas recém-fragmentadas são mais tóxicas, provavelmente devido ao maior número de radicais em sua superfície (Kim et al., 2014; Kusaka et al., 2014). A sílica é um dos componentes mais abundantes na superfície da terra, composta por um átomo de silício e dois átomos de oxigênio (SiO_2), podendo ser encontrada em duas formas na natureza - amorfa ou cristalina- apresentando-se esta última sob três formas: quartzo, tridimita e cristobalita (Greenberg et al., 2007).

De acordo com a Sociedade Torácica Americana, foi detectado que em torno de 2 milhões de trabalhadores dos Estados Unidos estejam expostos à poeira contendo partículas de sílica (ATS, 1997). No Brasil, o número estimado de trabalhadores potencialmente expostos a poeiras contendo sílica é superior a 3 milhões, com particular ênfase na região sudeste onde a mineração (9%), exploração de pedreira (16%), construção civil (67%) e indústrias de processamento de minerais (34%) constituem atividades econômicas predominantes. Na região nordeste, em função da seca, as atividades de escavação de poços com alto conteúdo de quartzo resulta em uma prevalência de 26% de silicose nos indivíduos (Ribeiro, 2010).

A doença pode ser classificada em três formas clínicas: i) a aguda ou silicoproteinose (mais rara), sendo característica de indivíduos expostos a quantidades elevadas de pó de sílica por um espaço de tempo curto (meses a até 5 anos), sendo habitualmente observada em

operários que trabalham com jateamento de areia ou moagem de pedra. Nesta forma é observado o aparecimento de um infiltrado inflamatório importante no parênquima pulmonar. ii) a acelerada é a forma intermediária da silicose, quando os indivíduos são diagnosticados entre 5 a 10 anos após o último contato com a sílica. Nesta condição é possível ser observada a formação de pequenos nódulos fibróticos difusos no parênquima pulmonar; iii) a crônica é forma mais comum de ser encontrada e se desenvolve após 10 anos ou mais após a última exposição à sílica, sendo observada a formação de grandes nódulos fibróticos localizados predominantemente no terço superior dos pulmões. (Santos et al., 2010). O diagnóstico da silicose é feito predominantemente pelo raio-X ou tomografia computadorizada de tórax, porém a associação da silicose com o desenvolvimento de outras patologias pulmonares é discutida como fator agravante. Relatos na literatura definem que a coexistência de fatores como tabagismo, infecções pulmonares e câncer, tem dificultado o estabelecimento de um padrão funcional que caracterize a doença antes do aparecimento dos sintomas (Rees e Murray, 2007; Eduardo et al., 2008).

A silicose é uma doença irreversível e para qual não há tratamento efetivo até o momento. No entanto, medidas podem ser adotadas no sentido de impedir a evolução do quadro, como a interrupção da exposição à sílica, logo que os primeiros sintomas forem detectados, e o lavado bronco alveolar, com o objetivo de retirar uma parcela das partículas acumuladas. Alternativamente, têm sido utilizadas terapias de suporte que visam a melhoria da condição do paciente, incluindo o uso de antitussígenos para redução da tosse seca, de broncodiladores para a insuficiência respiratória, de mucolíticos para redução do muco, terapia com oxigênio e se for necessário, podem ser administrados antibióticos quando houver um quadro de silicotuberculose (Cullinan e Reid., 2013). Por último e, considerando os elevados riscos por se tratar de um procedimento bastante invasivo, existe a possibilidade de realização de transplante pulmonar, que tem aumentado a sobrevida dos pacientes em aproximadamente 10 anos (Di Giuseppe et al., 2009).

1.1.1.1. Patogênese da silicose

A patogênese da silicose tem como base o ar inalado que passa através das vias aéreas superiores, traqueia, brônquios e, eventualmente chegando aos bronquíolos e alvéolos. As partículas inaladas são em sua maioria exaladas ou depositadas nas vias aéreas superiores, e removidas através da camada mucociliar. Além dos bronquíolos terminais (ou respiratórios) existem aglomerados de alvéolos onde ocorrem as trocas de oxigênio e dióxido de carbono. Pequenas partículas inaladas (<10 µm diâmetro aerodinâmico) podem se depositar na área dos

bronquíolos respiratórios e nos alvéolos (ATS, 1997; Bon e Santos, 2010). Os macrófagos alveolares normalmente são encontrados dentro dos alvéolos, e são as primeiras células residentes a entrar em contato com a partícula de sílica (Becker et al., 2005; Byrne et al., 2015). Estas células compõem de forma essencial a resposta da imunidade inata à inalação de partículas de sílica. A participação dos macrófagos no estabelecimento da inflamação e no reparo é fundamental, já que eles têm a capacidade de fagocitar às partículas e de produzir/secretar citocinas e quimiocinas que podem regular a proliferação e diferenciação local de células mesenquimatosas (fibroblastos). (Hamilton et al., 2006; Beamer et al., 2010). No caso da silicose, as partículas são reconhecidas pelo receptor MARCO e podem induzir a morte celular pela geração de ROS quando fagocitadas por macrófagos alveolares. A ativação destas células pela sílica resulta na liberação de mediadores importantes para o estabelecimento da resposta inflamatória como TNF- α e IL-1 β (Iyer et al., 1996; Beamer e Holian, 2007; Hamilton et al., 2008). Além destes fatores, macrófagos são conhecidos por apresentarem fenótipos distintos (M1 ou M2) devido a influência do microambiente pró-inflamatório ou fibrótico em que eles se encontram (Orfila et al., 1998; Murthy et al., 2009; Wynn et al., 2013).

Associados a ativação de macrófagos, neutrófilos formam o primeiro estágio da fase aguda da resposta inflamatória, e podem ter um papel igualmente importante no processo de fibrose, já que são capazes de liberar espécies reativas de oxigênio e citocinas, metaloproteinases, entre outros. Todos estes fatores agem em conjunto, resultando na fibrose tecidual observada em muitas disfunções pulmonares (Castranova et al., 2002).

A resposta da fibrose pulmonar é tradicionalmente vista como um fenômeno que ocorre após uma resposta inflamatória aguda, embora até o momento não existam evidências clínicas que provem a real existência de uma relação direta entre parâmetros inflamatórios e a evolução da doença. No entanto, a literatura especializada já descreveu que a fibrose tecidual inicia sua amplificação a partir de uma lesão inicial, e age modulando o fenômeno de reparação tecidual, tanto no sentido do acúmulo de células mesenquimatosas quanto da síntese de componentes da matriz extracelular (Choi et al., 2009; Joshi, e Knecht, 2013). No caso particular da matriz extracelular, existem evidências de que a sua manutenção é um processo dinâmico, envolvendo a síntese de proteínas como fibrilas de colágeno, fibronectina e proteoglicanas, sempre equilibradas através de uma proporção equivalente de proteólise. No caso dos reguladores, também têm importância as metaloproteinases (MMPs), cuja ação enzimática é regulada por uma família de inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs) (Mossman e Churg, 1998; Yoshiji et al., 2000). Alguns estudos demonstram que durante um processo de desregulação do processo homeostático é possível observar a formação de fibrose

tecidual, correspondendo ao fenômeno de reparação excessiva, dando origem a importantes alterações funcionais. Em um cenário assim tão amplo, também há outras células residentes envolvidas no estabelecimento da resposta inflamatória pela partícula de sílica, como as células epiteliais, que têm um papel importante no processo de agressão tecidual através da produção de ROS e mediadores quimiotáticos como IL-8 (Becker, et al., 2005; van Berlo, e Damien, 2010; Peeters et al., 2013; Øvrevik et al., 2015).

Os achados patológicos na fibrose pulmonar (acúmulo excessivo de MEC e reparo da arquitetura pulmonar) são consequência de distúrbios em dois processos fisiologicamente equilibrados: proliferação/apoptose de fibroblastos e acúmulo/desagregação da MEC (Huaux, 2007). Quando o balanço normal entre a deposição e a degradação de MEC é deslocado para a deposição, ocorre um acúmulo excessivo de MEC. Quando o equilíbrio entre proliferação e apoptose de fibroblastos é deslocado para uma proliferação acelerada, ou menor apoptose, os fibroblastos - produtores primários de MEC - se acumulam. Várias são as origens possíveis descritas para as células mesenquimais produtoras de MEC e incluem o acúmulo de fibroblastos pulmonares residentes, quimiotaxia e diferenciação fibroblástica de células derivadas da medula óssea, tais como fibrócitos ou monócitos circulantes, ou por transformação epitélio-mesenquimal (EMT), ou endotélio-mesenquimal (EndMT). Independente da fonte de expansão de fibroblastos nos pulmões (residentes ou sistêmicos) parece ser de consenso que a célula efetora final na fibrose pulmonar é o miofibroblasto, um fibroblasto diferenciado que possui propriedades contráteis semelhantes às células do músculo liso e que se caracteriza pela presença de actina alfa-músculo liso (α -SMA) e produção de MEC (Borthwick et al., 2013; Akamatsu et al., 2013; Sampson et al., 2014).

Além de células mesenquimais alteradas, anormalidades do epitélio alveolar em pacientes com fibrose pulmonar foram observadas. A perda de epitélio alveolar tipo I normal e a substituição por células hiperplásicas tipo II ou células cuboidais bronquiolares é um achado consistente em pacientes com fibrose idiopática pulmonar. Além dessas observações, estudos mecanísticos mais recentes têm focado na interação, ou “cross-talk”, entre células epiteliais danificadas e células mesenquimais pulmonares. Esta interação epitelial-mesenquimal dá suporte a um tema-chave na fibrose pulmonar, no qual as células mesenquimais pulmonares alteradas associadas à lesão das células epiteliais alveolares resultam no acúmulo de MEC e no remodelamento da arquitetura pulmonar (Benson et al., 1986; Bonnans et al., 2014; Suwara et al., 2014) (Figura 1).

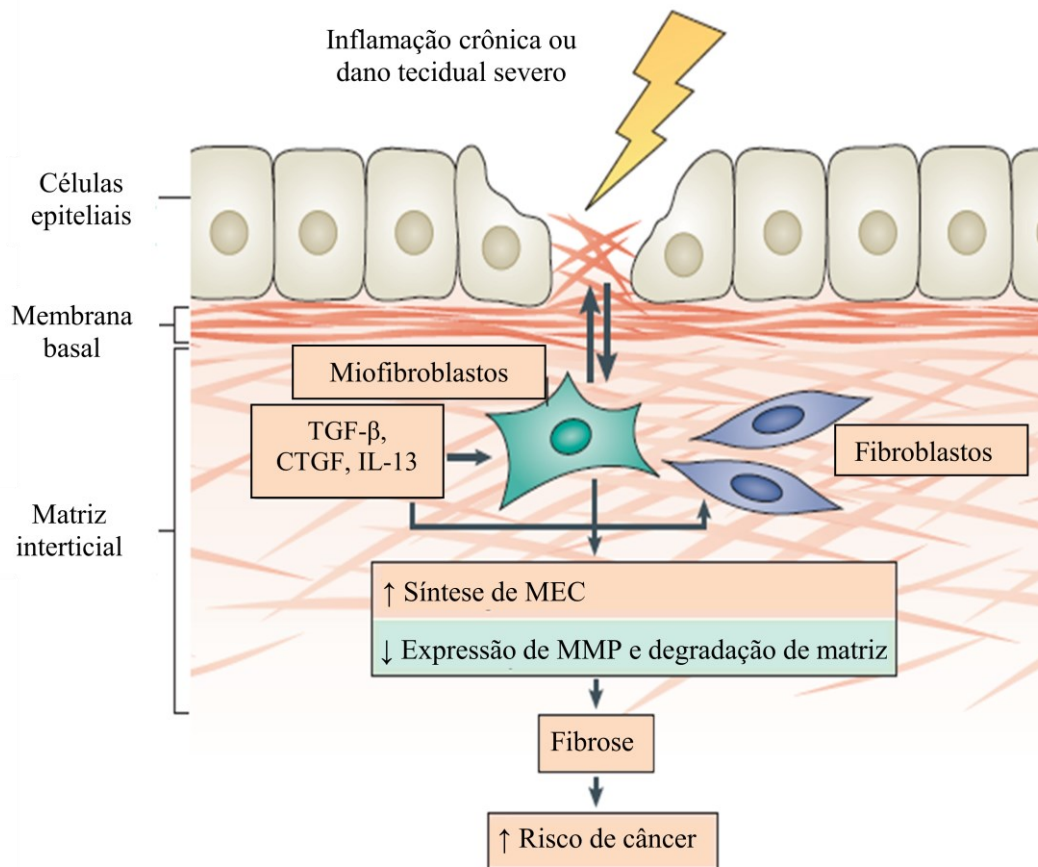


Figura 1– Esquema de ativação de fibroblastos e desenvolvimento da fibrose tecidual. A partícula de sílica quando inalada induz um processo inflamatório crônico associado a extenso dano tecidual. Neste contexto, mediadores do processo de cicatrização são produzidos (TGF- β , CTGF e IL-13) induzindo diferenciação e proliferação de fibroblastos em miofibroblastos. A perda de controle deste processo em conjunto com a inflamação crônica irreversível promove um aumento da síntese e redução da degradação de MEC, resultando na fibrose tecidual. Todo este processo é ainda associado ao risco de câncer devido ao microambiente gerado pela resposta pró-inflamatória e fibrótica. Adaptado de: Bonnans et al. (2014).

Nos últimos anos, uma imensa literatura descreveu alterações na expressão e função de citocinas em animais e pacientes portadores de fibrose pulmonar. A maioria dos achados descreveu uma propensão para uma variedade de citocinas promover e aumentar o processo fibrótico pulmonar, cujas fontes são numerosas e incluem células epiteliais, mesenquimais ou inflamatórias residuais ou sistêmicas (linfócitos T, linfócitos B, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e plaquetas) (Cassel et al., 2008; Boveda-Ruiz et al., 2013; Liu et al., 2016). Estudos prévios descreveram que citocinas multifuncionais como IL-1 β , TGF- β , TNF- α e IL-13 atuam como importantes agentes reguladores da inflamação, desempenhando assim um papel chave na ativação das cascatas prófibróticas. Outros fatores moleculares também foram

identificados como relevantes no contexto da fibrose, com destaque para as quimiocinas como a MCP-1. Esta quimiocina é secretada por fibroblastos, células epiteliais e monócitos e tem como função clássica o recrutamento de monócitos para o tecido inflamado. A importância deste mediador é visualizada na sua ausência através de animais nocautes para seu receptor (CCR2), havendo redução da resposta inflamatória e fibrótica em modelos de lesão pulmonar aguda em camundongos (Warminton et al., 1999; Deshmane et al., 2009; Giordano et al., 2010).

A citocina IL-13 tem recebido particular atenção de diferentes grupos de pesquisa, em função de sua implicação mais ampla em fisiopatologias como a asma brônquica e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), onde participa responde em parte pela hiper-reatividade das vias aéreas, hipersecreção de muco e remodelamento tecidual (Zhu, et al., 2002; Kaviratne et al., 2004). Estudos utilizando o tratamento de camundongos com anticorpos neutralizantes para IL-13 mostraram efeito protetor na resposta de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina, conforme atestado pela redução no conteúdo de hidroxiprolina (Belperio, et al., 2002; Yang et al., 2004). Mais ainda, a utilização de uma estratégia terapêutica inovadora – a imunotoxina IL-13PE – se mostrou eficiente em reduzir significativamente o quadro de fibrose peribrônquica pulmonar induzida por bleomicina (Jakubzick, et al., 2003), além de também suprimir a reposta fibrótica verificada na condição de alergia experimental por *Aspergillus fumigatus* (Blease et al., 2001; 2002) e fibrose granulomatosa induzida por *Schistosoma mansoni* (Jakubzick et al., 2002). A IL-13PE é uma quimera derivada da fusão de um fragmento da molécula de IL-13 humana (faz o reconhecimento e ligação ao receptor da IL-13) e de uma forma mutada da exotoxina de *Pseudomonas*. Esta última atua através da ligação aos receptores IL-13R α 1 e IL-13R α 2 na superfície celular, impedindo a iniciação da síntese protéica levando conseqüentemente à morte celular, através de processos de necrose e/ou apoptose (Joshi et al., 2002; Shimamura et al., 2010). De forma interessante, achados anteriores de nosso grupo demonstraram que o a administração terapêutica de IL-13PE a camundongos silicóticos reverteu o comprometimento da mecânica respiratória (aumento de resistência das vias aéreas e aumento da elastância pulmonar), inibindo a produção de citocinas inflamatórias e pró-fibróticas, assim como a população de miofibroblastos e a produção de colágeno. Estes resultados nos permitiram implicar, de forma original, o envolvimento da IL-13 no componente fibrótico na silicose experimental (Ferreira et al., 2013). A literatura apresenta relatos de que a citocina IL-13 pode atuar através da produção de TGF- β e TNF- α por um mecanismo dependente da ativação dos fatores de transcrição NK-kB e AP-1 (Fichtner-Feigl et al., 2006; MacDonald, 2006), bem como pela capacidade de ativar diretamente fibroblastos (Kraft et al., 2001). Muito embora vários estudos tenham sido

desenvolvidos com vistas ao entendimento do mecanismo associado à ação fibrótica da IL-13, é consenso que o mesmo ainda não está satisfatoriamente esclarecido. Dentro deste contexto, há evidências indicativas de que a adenosina parece desempenhar um papel importante na patogênese de alterações teciduais induzidas pela IL-13, assim como a IL-13 e a adenosina podem atuar regulando-se mutuamente em tecidos do trato respiratório (Blackburn, 2003).

A adenosina é um nucleosídeo de purina intracelular que está normalmente em baixas concentrações extracelularmente, sendo gerado em excesso durante situações de hipóxia, trauma ou estresse, como resultado do metabolismo do ATP. A produção se dá através do catabolismo dos nucleotídeos trifosfato de adenosina (ATP) e difosfato de adenosina (ADP) pela ação da enzima NTPDase (CD39) gerando AMP, este é metabolizado posteriormente pela ecto-5'-nucleotidase (CD73) formando a adenosina. O catabolismo da adenosina em inosina se dá pela ação da enzima adenosina deaminase (ADA) (Möser, et al., 1989; Reutershan et al., 2009). De forma importante, foi descrito recentemente a existência de dois tipos de transportadores responsáveis por manter o equilíbrio intra e extracelular de adenosina, fazendo com que ela seja secretada sem a necessidade da liberação e catabolismo do ATP. A captação de adenosina e de outros nucleosídeos em células de mamífero é mediada por transportadores de membrana específicos. Estes transportadores desempenham um papel importante na regulação da sinalização da adenosina, controlando as suas concentrações extracelulares nos locais receptores. Duas famílias distintas de transportadores estão envolvidas neste processo de captação de nucleosídeos: i) ENT1-2 (transportador equilibrador de nucleosídeo) e ii) CNT 1-2 (transportador concentrador de nucleosídeo) (Griffith e Jarvis, 1996; Ritzel, et al., 2001; Della Latta et al, 2013) (Figura 2).

Durante a inflamação e a destruição tecidual, a adenosina é liberada para o espaço extracelular, atingindo níveis elevados de acúmulo local que variam de 10 a 100 μM , e onde desempenha inúmeros papéis na regulação do processo inflamatório e remodelamento tecidual (Marquardt et al., 1984; Eckle et al., 2007; Peng et al., 2008). A adenosina desempenha o papel de uma molécula de sinalização autócrina e parácrina, atuando através da ligação a seus receptores. Desta forma, uma vez produzida, a adenosina se liga a receptores de sete domínios transmembranas específicas, acoplados a proteínas G, que se encontram expressos na superfície das células. Foram identificados quatro tipos de receptores para a adenosina: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , e estes apresentam padrões diversos de expressão em tecidos e células, podendo a ativação destes receptores produzir uma ampla gama de respostas como modulação da função das células a degranulação dos mastócitos, broncoconstrição, apoptose e proliferação celular (Figura 3).

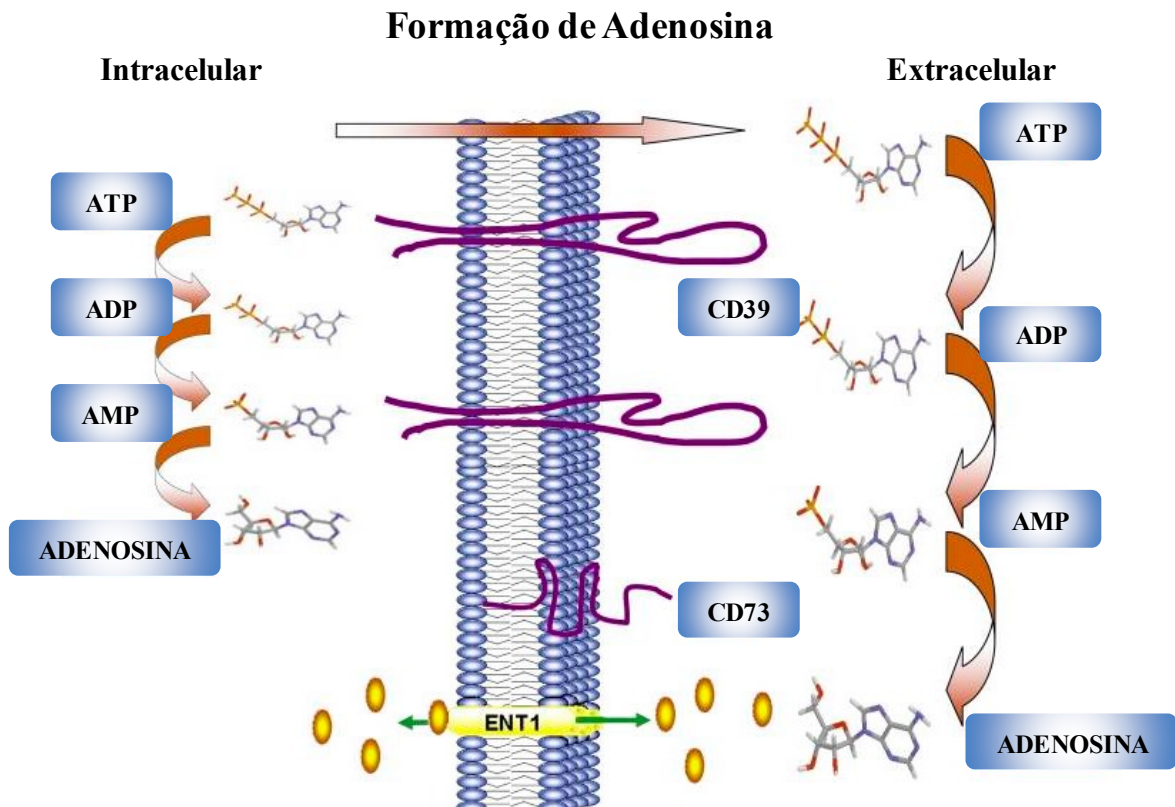


Figura 2 – Esquema de formação e liberação de adenosina no meio extracelular. O aumento da concentração extracelular acontece pelo: i) catabolismo do ATP pela ação das enzimas CD39 e CD73 ou ii) pela liberação direta dos transportadores ENT. Adaptado de Cronstein (2011).

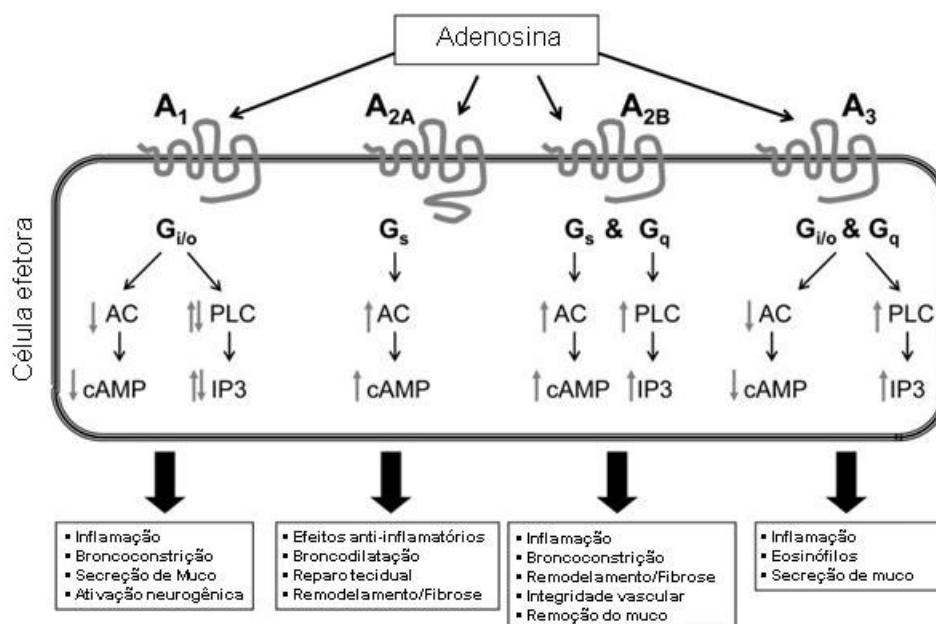


Figura 3 – Esquema representativo dos receptores (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3) e cascata intracelular quando ativados pela adenosina. Os receptores A_1 e A_{2A} apresentam alta afinidade para a adenosina enquanto que o receptor A_{2B} e A_3 , baixa afinidade. Em conjunto os receptores A_1 , A_{2B} e A_3 são responsáveis pelo estabelecimento de um quadro inflamatório enquanto que o receptor A_{2A} é o único com efeito anti-inflamatório. Adaptado de Polosa e Blackburn (2009).

Um número crescente de evidências indica que a sinalização da adenosina através dos receptores A_1 , A_{2B} e A_3 podem exercer efeitos pró-inflamatórios em doenças inflamatórias crônicas (Ball et al., 2004; Cicala e Ialenti, 2013; González-Fernández et al., 2014). Por outro lado, os efeitos da adenosina em suprimir a resposta inflamatória têm sido associados ao receptor A_{2A} , cuja expressão foi detectada em macrófagos, células dendríticas, células T, células B e células epiteliais (Collins et al., 2011; Mazzon et al., 2011). O acoplamento seletivo da adenosina ao receptor A_{2A} localizado em macrófagos humanos e murinos, pelo agonista A_{2A} (CGS-21680), inibe a expressão de TNF- α induzida por lipopolissacarídeo (Welihinda e Amento, 2014). Além disso, o papel importante do receptor A_{2A} na regulação da inflamação foi demonstrado através da observação de que camundongos nocautes para este receptor, quando expostos a estímulos inflamatórios desenvolvem resposta inflamatória exacerbada e destruição tecidual, evoluindo ao óbito (Truong et al., 2016). O receptor A_{2A} tem alta afinidade pela adenosina e, quando ativado, dispara o processo de ativação da proteína G estimulatória (G_s), acoplada à enzima adenilato ciclase, que terá como resultado o aumento nos níveis de AMPc e consequente supressão da função de células inflamatórias. Muito embora as vias de transdução de sinalização no caso da adenosina ainda não tenham

sido completamente definidas, a elevação nos níveis intracelulares de AMPc é associado à ativação da enzima proteína quinase A (PKA) e à inibição do fator de transcrição NF- κ B (Oldenburg et al., 2012). Recentemente, foi descrita a proteína de troca diretamente ativada por AMPc (EPAC) – que possui uma guanina como fator de troca, e que quando ativada por AMPc tem a capacidade de ativar outras enzimas como as Rap GTPases. Dois membros da família EPAC foram descritos (EPAC1 e EPAC2), porém um papel para EPAC na sinalização associada ao receptor A_{2A} ainda não foi definido (de Rooij et al., 1998). De forma interessante, estudos pré-clínicos mostraram que a adenosina desempenha um papel anti-inflamatório em processos associados com doenças pulmonares agudas, indicando que a ativação do A_{2A} tem implicações terapêuticas promissoras. Trabalhos complementares realizados em camundongos com deficiência da enzima ADA, caracterizados por possuírem níveis elevados de adenosina, sugeriram fortemente uma associação causal entre adenosina e fenótipo inflamatório (Blackburn, 2003).

De forma adicional, foi demonstrado que a adenosina e seus receptores desempenham um papel central na patogênese da fibrose pulmonar e renal bem como na fibrose dérmica difusa induzida pela estimulação com bleomicina. De forma mais específica, os receptores A_{2A} e os A_{2B} da adenosina foram descritos por promover proliferação, produção de citocinas e colágeno, além de outras funções de fibroblastos dérmicos, renais e pulmonares (Perez-Aso et al., 2014; Shaikh, et al., 2016; Wilkinson et al., 2016). Estudos recentes demonstraram que o agonista seletivo do receptor A_{2A} foi capaz de produzir resposta de reparo tecidual em animais selvagens, porém não em animais deficientes para este receptor. Foram identificados aumento de síntese de colágeno do tipo I e III e redução dos níveis de metaloproteinase 9 (Chan et al., 2006). Estas observações claramente suportam a ideia de que o receptor A_{2A} parece estar implicado em processos de fibrose e cicatrização. Camundongos tratados com o antagonista do receptor A_{2A} e animais deficientes para este receptor, apresentaram proteção da resposta de fibrose dérmica difusa induzida por bleomicina (Katebi et al., 2008). Estes resultados são consistentes com a hipótese de que o receptor A_{2A} participa na fibrose tecidual e que o bloqueio pode prevenir a fibrose. Corroborando com a proposição do envolvimento da adenosina na fibrose, foi também verificado que camundongos deficientes na enzima ADA apresentaram marcada resposta de inflamação pulmonar, expressão de moléculas profibróticas, deposição de colágeno e alteração extrema na estrutura das vias aéreas, respostas que se mostraram atenuadas após terapia de substituição enzimática de ADA para regular os níveis endógenos de adenosina no pulmão (Banerjee, et al., 2002; Chan et al., 2006).

De forma interessante, foi verificado que as concentrações de adenosina e os níveis de seus receptores se mostraram elevados no lavado broncoalveolar de pacientes portadores de asma e de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Driver et al., 1993). Esses pacientes geralmente apresentam focos fibróticos no pulmão devido a danos causados por episódios repetidos de inflamação pulmonar. Desta forma, a produção excessiva de adenosina no pulmão pode ativar vias profibróticas e, portanto, contribuir para o desenvolvimento e/ou manutenção da fibrose pulmonar (Jeffery, 2000).

Tabela 1- Localização e proteínas G associadas aos receptores de adenosina

Receptor	Proteína G	Localização
A1	$G_{i/o}$	Ampla distribuição: em maiores concentrações em nervos, coração, rim e tecido adiposo.
A2A	$G_{s/olf}$	Ampla distribuição: concentrações muito altas no gânglio basal e alto em nervos, vasos sanguíneos e células do sistema imune.
A2B	G_s ($G_{q/11}$; $G_{12/13}$)	Ampla distribuição, mas em baixa quantidade.
A3	$G_{i/o}$	Distribuição restrita, alta em mastócitos

G_s - Proteína G estimulatória, ativa adenilato ciclase aumentando a concentração de AMPc intracelular; $G_{i/o}$ – Proteína G inibitória, inibe adenilato ciclase reduzindo a concentração de AMPc intracelular; $G_{q/11}$ – Ativa fosfolipase C (PLC) resultando na formação de inusitol trifosfato (IP3) e diacilglicerol; $G_{12/13}$ – ativa família da Rho GTPase. Adaptado de Chen et al. (2013)

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o envolvimento do nucleosídeo adenosina na resposta fibrótica verificada na silicose experimental em camundongos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar a progressão da fibrose e comprometimento da função pulmonar no pulmão de camundongos silicóticos 7 e 28 dias após a instilação;

2.2.2 Avaliar a cinética da expressão de enzimas ectonucleotidases CD39 e CD73 associadas à produção de adenosina, no pulmão de camundongos silicóticos;

2.2.3 Avaliar a cinética de expressão dos receptores da adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 no pulmão de camundongos silicóticos;

2.2.4 Avaliar o potencial efeito da adenosina sobre fibroblastos pulmonares de animais controles, avaliando os parâmetros a proliferação e ativação celular (geração da quimiocina prófibrótica MCP-1);

2.2.5 Avaliar o potencial efeito da coestimulação de fibroblastos pulmonares controles com IL-13 e adenosina avaliando os parâmetros a proliferação e ativação celular (geração da quimiocina prófibrótica MCP-1);

2.2.6 Identificar o tipo de receptor de adenosina envolvido na estimulação de fibroblastos pulmonares de animais controles por IL-13 e/ou adenosina, através da utilização de antagonistas específicos;

2.2.7. Avaliar a interferência da deleção do gene codificante para o receptor A_{2a} da adenosina na resposta fibrótica pulmonar verificada em camundongos silicóticos.

3. Material e métodos

3.1. Animais

Neste projeto foram utilizados camundongos Swiss-Webster machos, com peso entre 18 a 20 g, provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fiocruz (CECAL), sendo protocolos experimentais previamente aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais de Laboratório (CEUA) da FIOCRUZ (licença nº LW57/14). Animais depletados para o gene codificante do receptor A_{2A} da adenosina e seus controles (Balb/c) foram gentilmente cedidos pela Dra Vanessa Carregaro Pereira do Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo. Os animais foram mantidos em microisoladores, aclimatizados sob condições de temperatura entre 22 e 25°C, ciclo de luz claro/escuro definido em 12 h/12 h com acesso livre a alimentação e água.

3.1.1. Indução de silicose

Os animais foram submetidos à anestesia por halotano (Tanohalo, Cristália, São Paulo) e, em seguida, foram instilados por via intranasal com 13 mg sílica (SiO_2) (tamanho de partícula: 0,5 -10 μm) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), dissolvidos em 50 μl de salina estéril. Os animais do grupo controle receberam igual volume de salina estéril. As análises foram realizadas 7 e 28 dias após instilação.

3.1.2. Medida de Função pulmonar

Para análise da função pulmonar (resistência e elastância) foi utilizado o sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasivo (FinePointe - Buxco System, Reino Unido), e a hiper-reatividade foi avaliada através da aerossolização de doses crescentes do agente broncoconstrictor colinérgico metacolina (3 - 81 mg/mL). Ao final do processo, os animais foram mortos com dose letal de tiopental (500 mg/kg) e realizada perfusão dos pulmões com solução salina. Em seguida, o pulmão esquerdo recuperado foi recuperado e imerso em fixador Milloning (paraformaldeído 4%, pH 7,4), sendo posteriormente submetido ao processamento histológico. Os lobos do pulmão direito foram separados e congelados a -80°C para análises posteriores (Ferreira, 2013).

3.1.3. Análise histológica

Os pulmões esquerdos foram submetidos a etapas de desidratação em solução com concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%), clarificado em xilol e incluído em parafina. Os cortes foram realizados em micrótomo Leica®, na espessura de 5 µm, sendo submetidos à coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E), para análise da estrutura do tecido pulmonar. Foi realizado o escaneamento das lâminas no equipamento 3DHISTECH - Panoramic MIDI e avaliação através do programa de análise de imagem Panoramic Viewer®. A deposição de fibras colágenas foram avaliadas em cortes corados com Picro sirius para através análise feita em microscópio de luz (Olympus BX50) acoplado a um polarizador.

3.1.4. Quantificação de colágeno

A quantificação do conteúdo de colágeno pulmonar foi realizada utilizando o método colorimétrico de Sircol (Biocolor, UK). O pulmão foi macerado em solução de Tris [0,05M] + NaCl [1M], feita homogeneização em solução de Sirius Red e, na sequência, as amostras de tecido foram centrifugadas para precipitação do complexo corante-colágeno sendo os sobrenadantes descartados. Ao precipitado foi adicionado o reagente “alkali”, seguido de nova homogeneização por 10 minutos e, em seguida, feito a adição das amostras em placas de 96 poços, para leitura da absorbância em espectrofotômetro (Spectramax M5 – Molecular Devices) 540 nm (Ferreira, 2013).

3.1.5. Avaliação da expressão gênica através de RT-PCR

O pulmão foi perfundido com solução salina 0,9% livre de RNase e um dos lobos do pulmão direito foi congelado a -80°C diretamente em RNAlater. A extração do RNA foi realizada com o reagente de Trizol® seguindo as instruções do fabricante. A análise quantitativa foi realizada através de espectrofotômetro (Nanodrop®) utilizando-se 1µL da amostra. Em seguida, para a análise da integridade do RNA, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante, utilizando-se cerca de 1 µg de RNA e uma diferença de potencial igual a 100 V por 40 minutos. As amostras foram incubadas junto com a solução de mix (formamida 70%, MOPS 2 X, azul de bromofenol e xileno cianol 0,25%) em banho seco à 65°C por 10 minutos, sendo posteriormente resfriadas em geladeira. Para a visualização do RNA foi adicionado o reagente SYBR Green II (Thermo Fisher, Massachusetts, Estados Unidos). Após a corrida eletroforética, o gel foi avaliado em sistema de fotodocumentação (L-Pix Touch, Loccus Biotecnologia, São Paulo). A remoção de DNA contaminante foi realizada mediante uso do kit de remoção de DNA (Invitrogen™ Ambion™ DNA-free™ - DNA

Removal Kit, California, Estados Unidos) Para a etapa de reação de transcriptase reversa e produção do cDNA foi utilizado 1 µg de RNA total de acordo com o protocolo do kit SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen; California, Estados Unidos). Ao final, as amostras foram incubadas por 42°C por 1 hora seguida de incubação à 85°C por 5 minutos. Para a quantificação da expressão gênica foram utilizados 2 µL de amostras e 8 µL do mix de amostra (25 µM primer; Fast SYBR® Green Master Mix) e utilizado o sistema de PCR em tempo real ViiA™ 7 programado com o ciclo: 95°C por 5 minutos; 40 x (95°C/30 segundos, 60°C/30 segundos, 72°C/1 minuto); 72°C por 5 minutos; 4°C por tempo indeterminado. Os genes alvos analisados incluíram as ectonucleotidases CD39 e CD73, os receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ e os constitutivos: β-actina e GAPDH . O aumento na expressão gênica foi calculado através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT = (\text{animal silicótico} - \text{animal salina})^{\text{gene alvo}} - (\text{animal silicótico} - \text{animal salina})^{\text{gene constitutivo}}$.

Tabela 2 - Sequência dos primers utilizadas no RT-PCR

Gene (Proteína)	Senso (Forward)	Anti-senso (Reverse)
Adora1 (A1)	ACAAAAACCAGTGGTGGAGTGA	TCTGTCCCCTCCCCTTGTC
Adora2a (A2A)	TGAAGGCGAAGGGCATCA	GGGTCAGGCCGATGGC
Adora2b (A2B)	ACGTGGCCGTGGGACTC	GCAGAAGCCCAAGCTGATG
Adora3 (A3)	GAGACCTGCATCCTCCAGGTT	GGCCTGTTACAGGACCATCAA
Entpd1 (CD39)	AGTGCCCCCTTATGGAAGAT	TCAGTCCCACAGCAATCAAA
Nt5e (CD73)	CAGGAAATCCACCTTCCAAA	AACCTTCAGGTAGCCCAGGT
β-actina	TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG	TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT
GAPDH	CTGAGGACCAGGTTGTCTCC	AGCCGTATTTCATTGTCATACCA

3.2. Cultura primária de fibroblastos pulmonares em monocamada

Os pulmões obtidos a partir de animais controles foram submetidos à dissociação mecânica e, posteriormente, enzimática utilizando para tanto uma solução de colagenase do tipo I (1 mg/mL – Gibco) em meio DMEM sem soro fetal bovino (SFB). As amostras de tecido foram mantidas em garrafa, sob agitação, durante 1 hora a 37°C, e ao final todo o conteúdo foi centrifugado. As células recuperadas foram transferidas para frascos de cultura (75 cm²) e acrescidas de meio DMEM suplementado com soro fetal bovino(10%), penicilina (1x10⁶ U/mL) e estreptomicina (0,2g/mL), mantidas em meio DMEM suplementado com 10% SFB e ao atingirem a condição de 90% de confluência, foram submetidas ao processo de tripsinização (tripsina 1,25 g/mL + EDTA e 0,2 g/mL). A partir da terceira passagem as

células foram mantidas e a cultura expandida em garrafas grandes (150 cm²) e os experimentos realizados entre a quarta e oitava passagens.

3.2.1. Estímulos e tratamentos *in vitro*

Na etapa de estimulação, as células foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 células/poço em placa de 24 poços. Após 24 horas, o meio foi substituído por DMEM sem SFB e 1 hora após foi realizada a adição dos estímulos com IL-13 (40 ng/mL) (R&D Systems, EUA) ou adenosina (10 - 300 μ M) (Sigma Chemical, St Louis, Estado Unidos). O sobrenadante foi recolhido, 24 horas após, e feita quantificação dos níveis de MCP-1 por ELISA. Em outro grupo de experimentos, as células foram submetidas ao tratamento por um período de 1 h, antes da adição de estímulos, sendo utilizados os antagonistas dos receptores de adenosina: A1 (DPCPx) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), A2A (ZM-241.385) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), A2B (MRS-1754) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e A3 (MRS-1523) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e os inibidores das enzimas ectonucleotidases CD39 (ARL 67156) e CD73 (AMPCP) (TOCRIS Bioscience, Reino Unido). Foram avaliadas a proliferação celular (ver tópico 3.2.3.) e produção de quimiocina MCP-1 no sobrenadante (ver tópico 3.2.4.).

3.2.2. Cultura primária de fibroblastos pulmonares em sistema tridimensional

Para obtenção da cultura dos esferóides, fibroblastos pulmonares foram ressuspensos em meio DMEM sem SFB e adicionados a placas de 96 poços fundo U revestidas com agarose 1% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Posteriormente, as células foram plaqueadas numa densidade de $1,25 \times 10^4$, na presença ou ausência da citocina IL-13 (40 ng/mL) e de adenosina (10 - 300 μ M), ficando mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C durante os tempos de análise (Garzoni et al., 2008). Os esferóides formados foram fotografados através de um sistema de câmera acoplada ao microscópio de luz invertido (Olympus IX70) e as imagens obtidas processadas pelo programa Image-Pro Plus para aferição do diâmetro médio (μ m). Os níveis de MCP-1 no sobrenadante foram quantificados por ELISA.

3.2.3. Proliferação celular

Para análise da taxa de proliferação em sistema de incorporação de timidina, 2×10^4 células/mL foram adicionadas a placas de 24 poços e mantidas por 18 horas a 37°C. Em seguida as células foram estimuladas com IL-13 e/ou adenosina. Após 20 horas foi feita a

adição de 0,5 μ Ci de [H^3] timidina por poço. Após 4 horas a placa foi congelada em -20°C e analisada posteriormente em contador de partículas Beta (Beckman LS6500 Multi-Purpose Scintillation Counter). Em outro grupo de experimentos, a proliferação celular foi avaliada através da incorporação de BrdU utilizando kit (BrdU Cell Proliferation Kit- Millipore – Massachusetts, United States) conforme instrução do fabricante.

3.2.4. Ensaio de ELISA

Para quantificação da quimiocina MCP-1 foi utilizado kit (R&D System, Estados Unidos). Para tal, as amostras foram adicionadas a placas de 96 poços, previamente adicionadas de 100 μ L/poço do anticorpo de captura diluído em tampão (NaCl 1,5 M, H₃BO₄ 0,5 M e NaOH 1 N) durante 12 h a 4°C. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com tampão 1 (timerosal, KPO₄ 1 M e Tween 20 0,005%), seguindo-se o bloqueio com PBS/albumina sérica bovina (BSA, 1%) por 1 hora à 20°C. Os poços foram lavados 3 vezes com tampão 1 e as amostras, bem como os padrões foram diluídos em tampão 2 (2% de soro fetal bovino - SFB em PBS). Após adição aos poços, procedeu-se incubação por 2 horas a 37°C, seguindo-se de sequência de 3 lavagens com tampão 1. Na sequência foi feita adição do anticorpo detector biotilado (50 μ g/mL) e feita incubação por 1 hora a 20°C. Os poços foram lavados com o tampão 1 e feita incubação por 1 hora a 20 °C com a mistura neutravidina horseradish peroxidase (HRP) diluída em tampão 2. Ao final foi feita a adição do substrato (K-Blue®), sendo a reação interrompida após a adição de H₂SO₄ (0,19 M). A análise espectrofotométrica foi realizada em leitora de placa no comprimento de onda de 450 nm e os resultados expressos como pg/mL.

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. Para ambos os testes, os valores de $p < 0.05$ serão considerados significativos.

4. Resultados

4.1. Análise da função pulmonar e alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos

A silicose é uma doença grave cujas características principais incluem a diminuição da função pulmonar, em associação com marcado comprometimento tecidual. No modelo experimental de silicose utilizado, verificamos que na fase inicial (7 dias) ocorre um aumento nos níveis basais de resistência das vias aéreas (Fig. 4A) e elastância pulmonar (Fig. 4B), e uma nítida exacerbação da resposta de função pulmonar na condição de aerossolização do broncoconstrictor metacolina (Fig. 4A e 4B). Resposta similar foi observada em camundongos na fase tardia do processo silicótico (Fig. 4E e 4F). A análise histológica revelou que os pulmões dos animais controles apresentaram vias áreas com septos alveolares preservados (Fig. 4E e 4G), enquanto os pulmões silicóticos na fase inicial (7d) mostraram infiltrado inflamatório e presença de granulomas localizados de forma dispersa no parênquima pulmonar (Fig. 4F). Na fase tardia (28d), notamos uma clara progressão do quadro fisiopatológico, evidenciado por um marcado aumento no conteúdo e tamanho dos granulomas no tecido, estes apresentando bordas definidas e se mostrando coalescentes, o que se refletiu em importante aumento na área do pulmão ocupada por fibrose e granulomas (Fig. 4H).

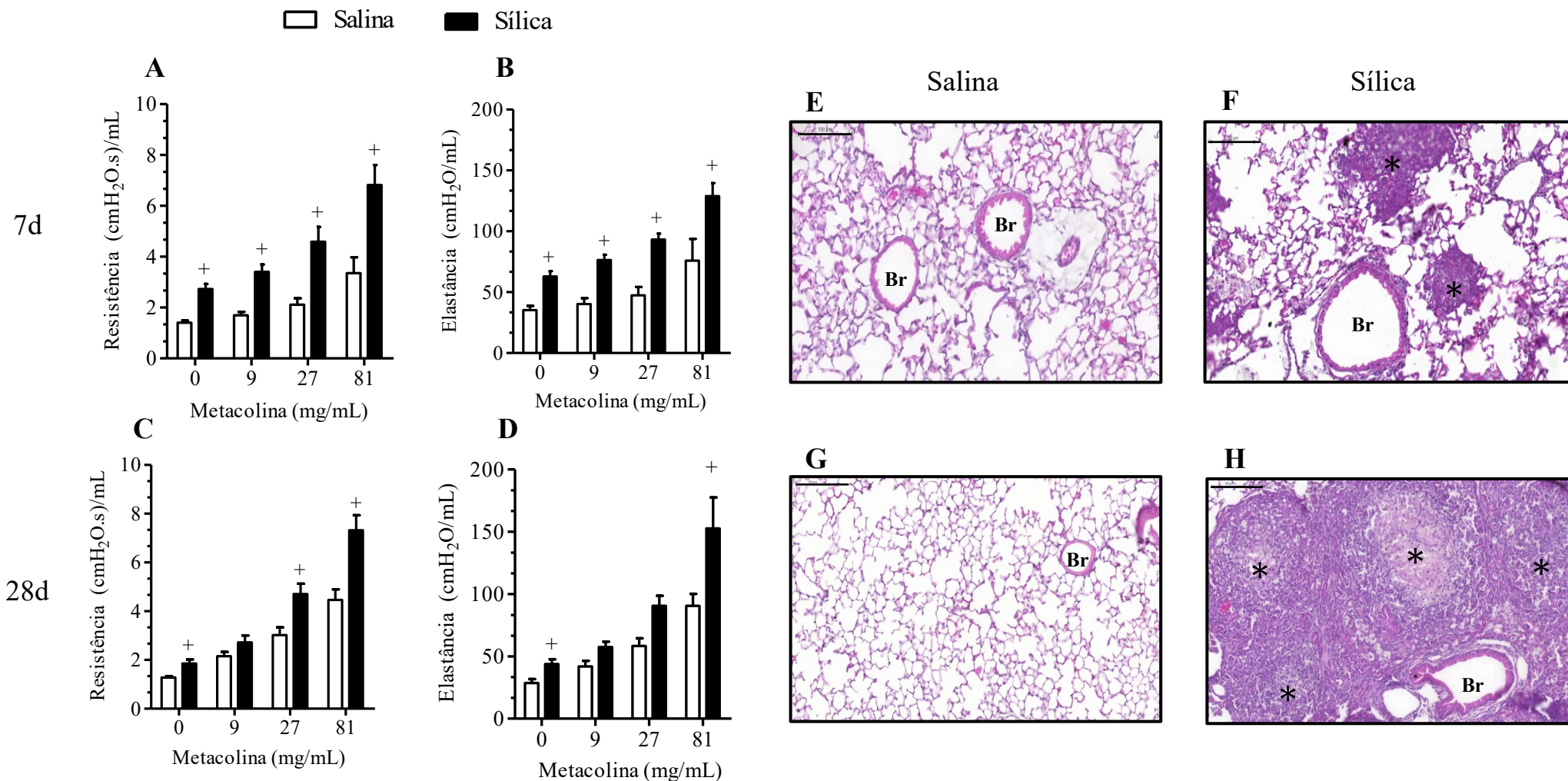


Figura 4 – Avaliação da função e alterações morfológicas pulmonares em camundongos silicóticos, em 7 e 28 dias. A avaliação da resistência (A e C) e elastância (B e D) pulmonares foram realizadas nos tempos de 7 (A e B) e 28 dias (C e D) após a instilação com sílica (13 mg) ou salina (50 µL). Imagens representativas do pulmão de animais instilados 7 dias (E e F) e 28 dias (G e H) com salina (E e G) ou sílica (F e H), corados com hematoxilina e eosina. Br = bronquíolos; *= granuloma. Barra = 100 µm. Valores indicam média ± EPM de pelo menos 7-9 animais por grupo. + p < 0,05 comparado aos animais controles na mesma dose aerossolizada de metacolina.

4.2. Avaliação da expressão das enzimas CD39, CD73 e receptores P1 no pulmão de camundongos silicóticos

De forma a buscar evidências do envolvimento da adenosina na resposta silicótica, inicialmente avaliamos a cinética da expressão das enzimas responsáveis pela formação de adenosina, as ectonucleotidases CD39 e CD73. Como ilustrado na Figura 5, observamos que a expressão de ambas as enzimas CD39 (Fig. 5A) e da CD73 (Fig. 5B) estava aumentada, em comparação a de animais controles, na fase inicial (7 dias) do quadro silicótico, com níveis basais sendo verificados na fase tardia (28 dias).

Considerando as observações acima indicativas de potencial aumento no processo de metabolismo da adenosina na fase inicial da silicose avaliamos a expressão dos receptores purinérgicos P1 (da adenosina) - A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ - no pulmão dos animais silicóticos e controles. Verificamos que na fase aguda da silicose foram detectados aumento na expressão do receptor A_{2B} (Fig. 6A) (próinflamatório) e redução do receptor A_{2A} (anti-inflamatório) (Fig. 6B), sem alteração significativa dos receptores A₁ e A₃ (Fig 6A e 6D, respectivamente). Na fase tardia, foram detectados aumento na expressão do receptor A₁ (Fig. 6A), redução dos receptores A_{2A} (Fig. 6B) e A_{2B} (Fig. 6C) e níveis não alterados do receptor A₃ (Fig. 6D).

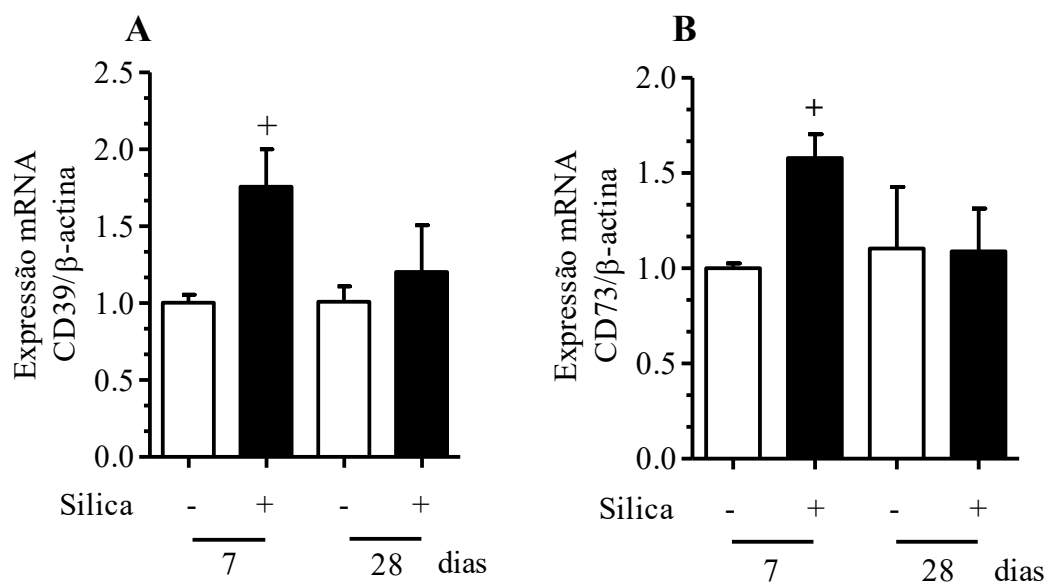


Figura 5 – Quantificação da expressão das enzimas CD39 e CD 73 no pulmão de camundongos silicóticos e controles. As análises foram realizadas 7 e 28 dias após a instilação de sílica (13 mg) ou salina (50 μ L). Foi quantificada a expressão da NTPDase (CD39) (A) e da ecto-5'-nucleotidase (CD73) (B). Valores indicam média \pm EPM de 3-5 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado aos animais controles.

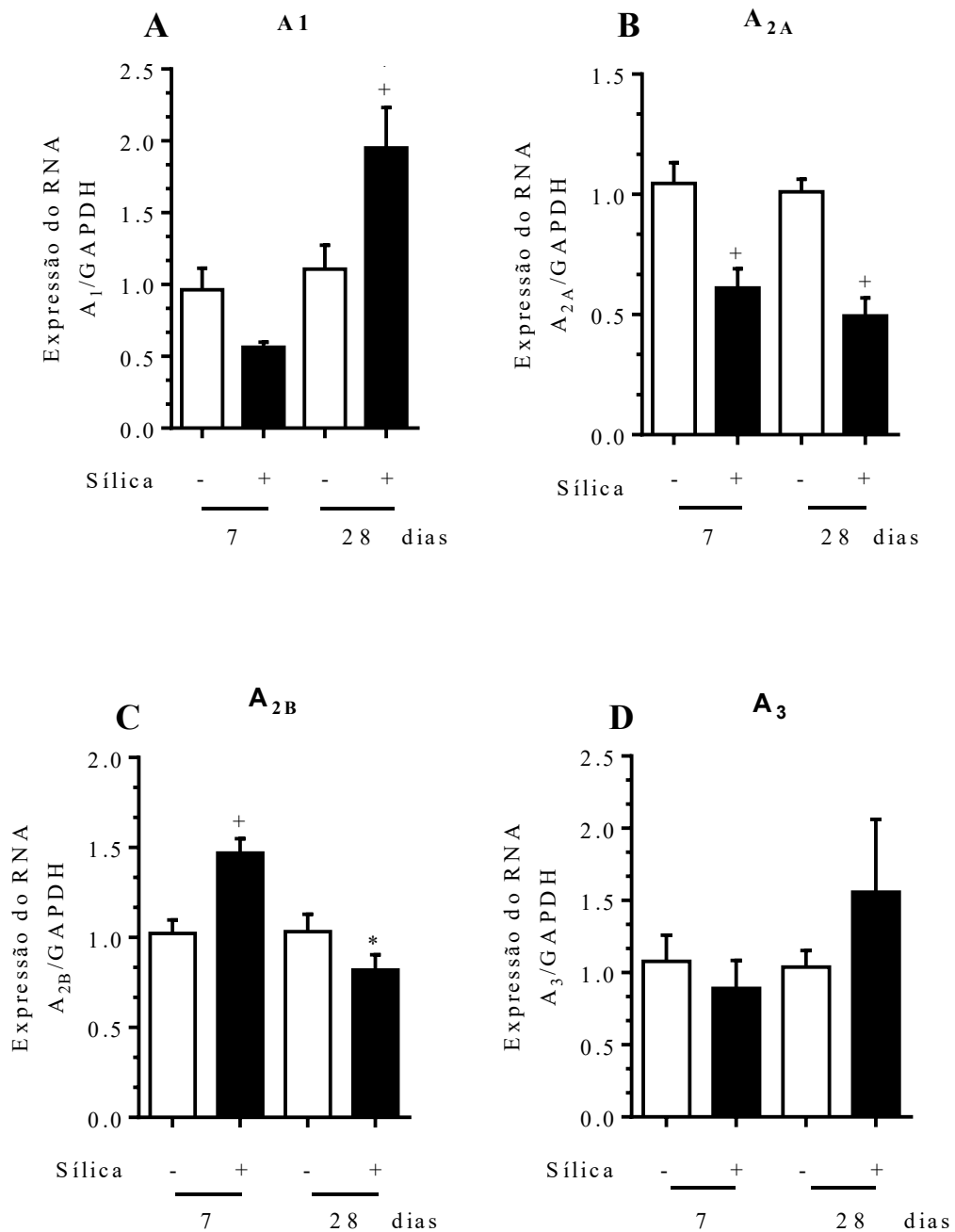


Figura 6 – Quantificação da expressão do mRNA dos receptores P1 no pulmão de camundongos silicóticos e controles. As análises foram realizadas 7 e 28 dias após a instilação de sílica (13 mg) ou salina (50 μ L). Foi quantificada a expressão do receptor A₁ (A), A_{2A} (B), A_{2B} (C) e A₃ (D). Valores indicam média \pm EPM de 8-10 animais por grupo. + p < 0,05 comparado aos animais controles.

4.3. Avaliação e caracterização do efeito da adenosina sobre fibroblastos pulmonares de camundongos

Na sequência, analisamos o potencial efeito da adenosina em ativar fibroblastos pulmonares. Células do pulmão de camundongos controles foram obtidas e utilizadas em sistema de cultura em monocamada. Os parâmetros de proliferação celular e produção/liberação da quimiocina prófibrótica MCP-1 foram analisados. A estimulação com a citocina prófibrótica IL-13 foi utilizada para comparação. Neste estudo verificamos que a estimulação com IL-13 (40 ng/mL) induziu proliferação dos fibroblastos (Fig. 7A). A estimulação dos fibroblastos com adenosina também se mostrou capaz de induzir a resposta de proliferação celular independente da concentração utilizada (100 e 300 μ M) (Fig. 7A). A análise da resposta de ativação celular revelou que a tanto a IL-13 como a adenosina (300 μ M) induziram aumento nos níveis de MCP-1 no sobrenadante (Fig. 7B).

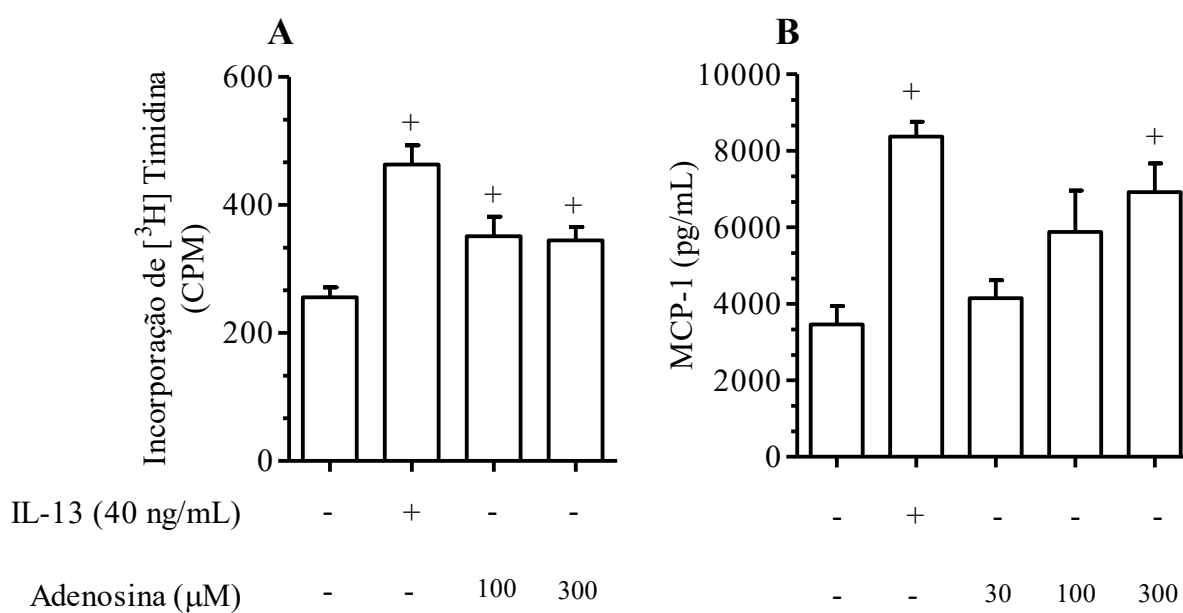


Figura 7 – Ativação de fibroblastos pulmonares de camundongos controles por IL-13 e adenosina (ADO) *in vitro*. Análise da (A) proliferação e (B) produção de MCP-1 foi realizada 24 horas após o estímulo com IL-13 (40 ng/mL) ou ADO (30 – 300 μ M). Valores indicam média \pm EPM de 4-5 animais. + $p < 0,05$ comparado ao grupo não-estimulado.

Como abordagem alternativa de análise, utilizamos o sistema de cultura tridimensional de fibroblastos, no qual há a formação de estruturas esféricas e complexas, e de interação de células com a matriz extracelular formada (esferoides). Avaliando a cinética de formação dos esferoides, os resultados confirmaram achados prévios de nosso grupo (Guimarães, 2012). Verificamos que nas primeiras 24 horas os esferoides contendo fibroblastos de animais controles mostraram maior tamanho e aspecto mais frouxo sem definição de bordas (Fig. 8A). Uma maior compactação e contorno dos esferoides foi detectado nos tempos subsequentes (48 e 72h). Dados quantitativos confirmam os achados obtidos, mostrando redução do diâmetro ao longo dos tempos analisados (Fig. 8B). Quando estimulados com IL-13 (40 ng/mL), evidenciamos um tamanho maior dos esferoides em comparação àqueles não estimulados (NE) (Fig.8B). A estimulação com adenosina também promoveu aumento no diâmetro dos esferoides apenas no tempo de 24 horas, enquanto que nos tempos seguintes os esferoides estimulados com ADO apresentaram diâmetro similar ao grupo não estimulado (Fig. 8A e 8B).

Ainda no sistema de cultura tridimensional, verificamos que o estímulo com IL-13 induziu a produção de MCP-1 de forma bastante expressiva em todos os tempos de análise (Fig. 9). No caso da adenosina, muito embora também tenha sido detectado aumento nos níveis de MCP-1, o mesmo foi inferior àquele visto no caso da estimulação com a IL-13 e, somente significativo com a maior concentração (1000 μ M) (Fig. 9).

Objetivando caracterizar o efeito da adenosina sobre os fibroblastos pulmonares, partimos para identificar qual(is) o(s) receptor(es) de purinérgicos P1 envolvido(s). Antagonistas seletivos para os quatro receptores da adenosina foram utilizados. O antagonista do receptor A_{2A} , ZM 241385 (10 e 30 μ M) foi capaz de reduzir de forma significativa a resposta proliferativa dos fibroblastos estimulados com adenosina (Fig. 10B). Os antagonistas dos receptores A_1 DPCPX (Fig. 10A), A_{2B} MRS-1754 (Fig. 10C) e A_3 MRS-1523(Fig. 10D), em concentrações semelhantes às do antagonista de A_{2A} , não apresentaram atividade farmacológica.

Na tentativa de melhor caracterizar o efeito da adenosina em fibroblastos, foi realizado ensaio onde as células foram incubadas com o agonista de receptor A_{2A} CGS 21680 (30 – 300 μ M). O estímulo com IL-13 e adenosina induziu a proliferação dos fibroblastos, conforme esperado, porém nenhum efeito foi evidenciado com o agonista CGS 21680 (Fig. 11).

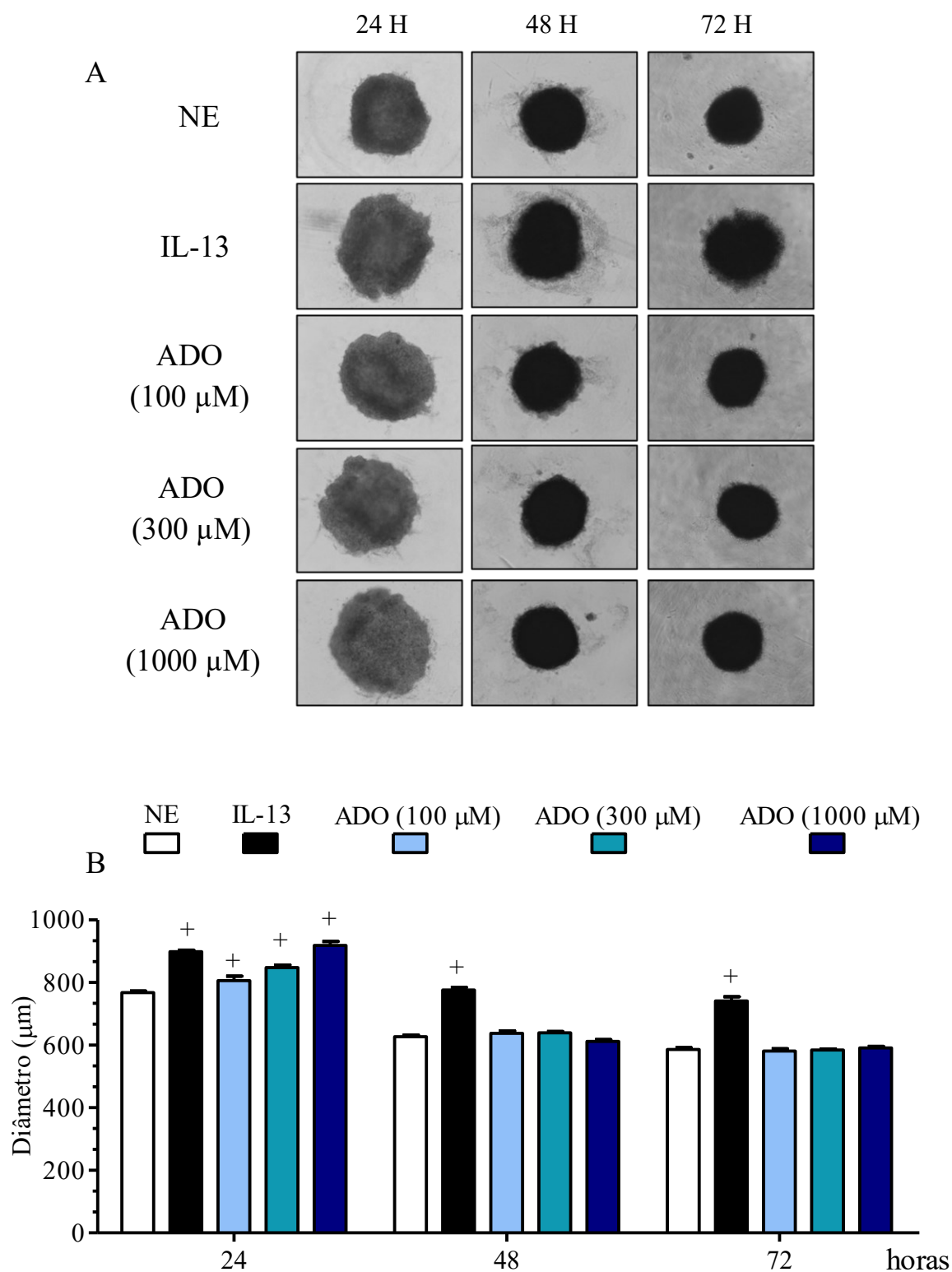


Figura 8– Avaliação do diâmetro de esferóides (cultura 3D). Análises foram realizadas 24, 48 e 72 horas após estímulo com IL-13 (40 ng/mL) ou ADO (100 – 1000 mM). Imagens representativas obtidas através de microscópio invertido (aumento de 40x) (A) e diâmetro dos esferóides (B). Valores indicam média ± EPM de 4 animais. + $p < 0,05$ comparado ao grupo NE dos respectivos tempos.

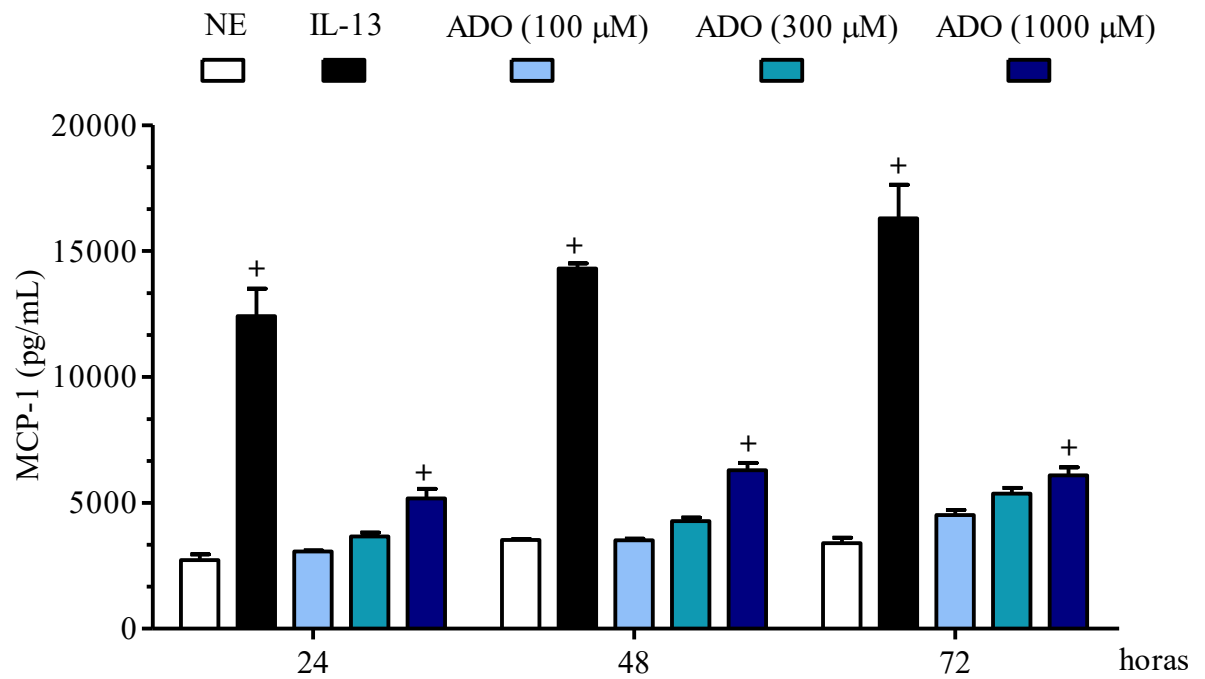


Figura 9 –Análise da ativação de esferoides. Análise da produção de MCP-1 foi realizada 24, 48 e 72 horas após o estímulo com IL-13 (40 ng/mL) ou ADO (30 – 300 μM). Valores indicam média ± EPM de 3 animais. + p < 0,05 comparado ao grupo NE dos respectivos tempos.

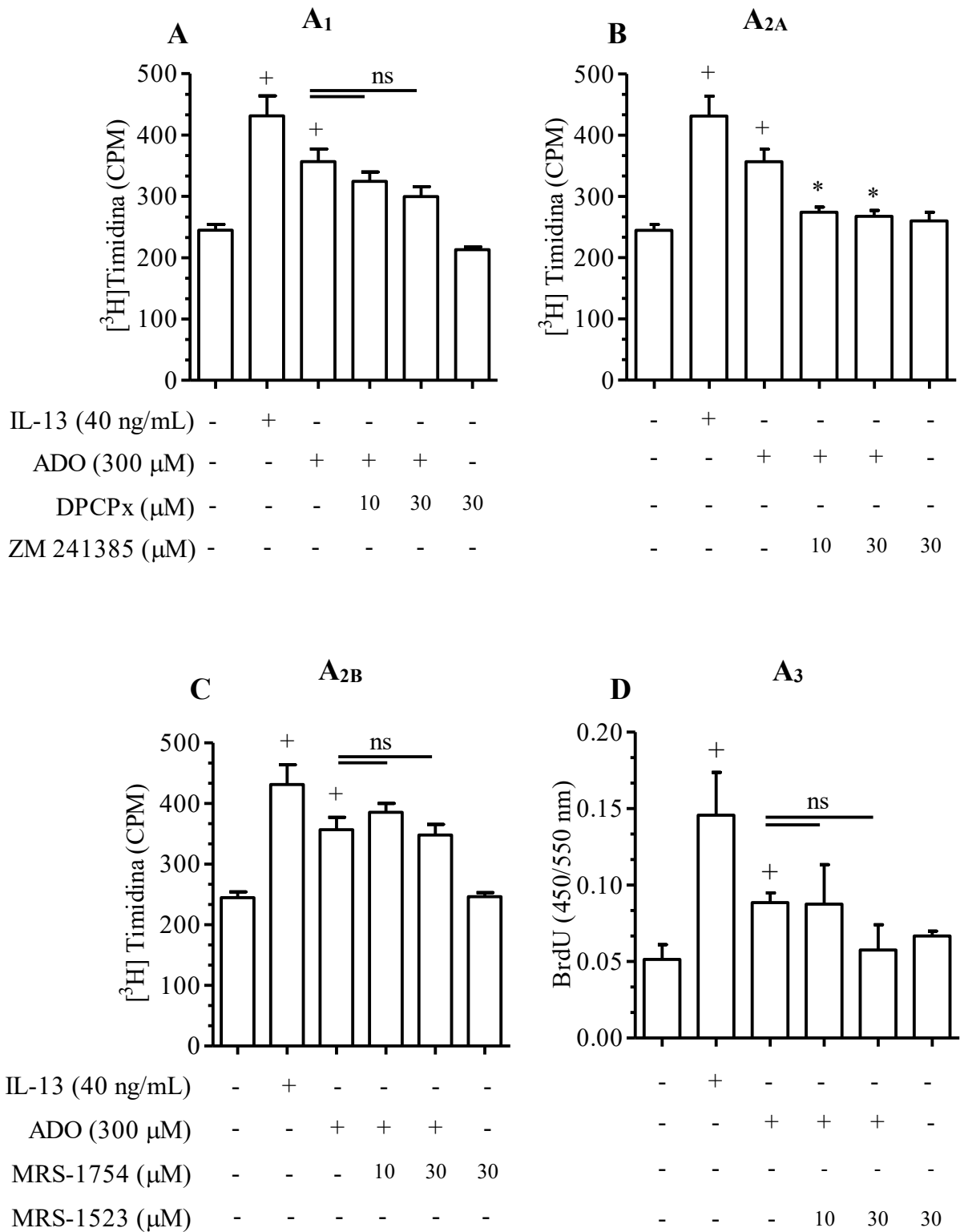


Figura 10 –Efeito do tratamento com antagonistas seletivos de receptores de adenosina na proliferação de fibroblastos pulmonares de camundongos controles *in vitro*. Análise foi realizada 24 horas após o estímulo. Foram utilizados os antagonistas para os receptores A₁ (A), A_{2A} (B), A_{2B} (C) e A₃ (D). Valores indicam média ± EPM de 4 animais. + p < 0,05 comparado ao grupo NE. * p < 0,05 comparado ao grupo estimulado somente com ADO.

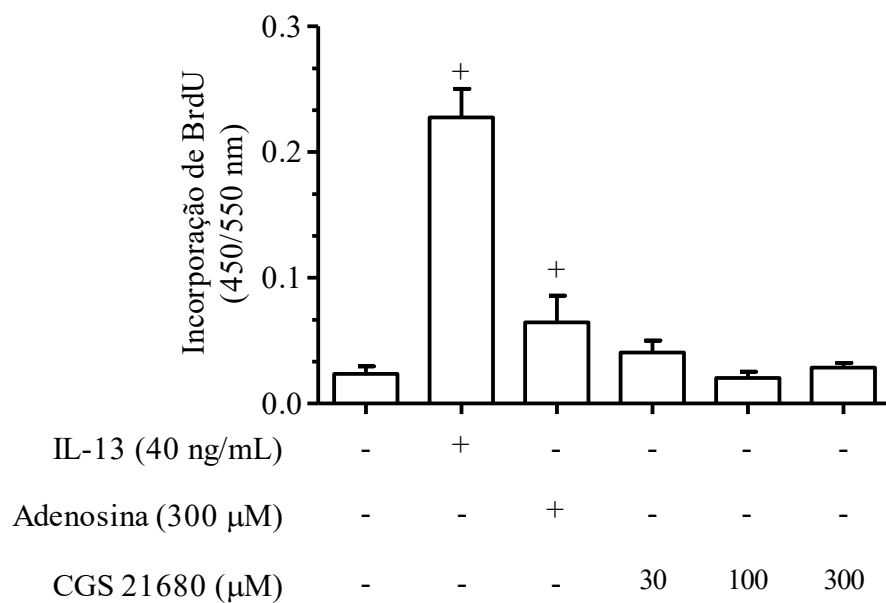


Figura 11 – Efeito da ativação do receptor A_{2A} pelo agonista seletivo CGS 21680 em miofibroblastos pulmonares de camundongos controles *in vitro*. A proliferação foi avaliada 24 horas após o estímulo. Valores indicam média \pm EPM de 3 animais. + $p < 0,05$ comparado ao grupo NE.

4.4. Avaliação do envolvimento da adenosina na estimulação de fibroblastos pulmonares murino por IL-13

Dados na literatura apontam para uma inter-relação entre o efeito prófibrótico da IL-13 e a modulação de genes envolvidos na sinalização purinérgica, com ênfase nos receptores de adenosina e na atividade da adenosina deaminase (ADA), enzima responsável pela metabolização da adenosina em inosina (Blackburn et al., 2003). Desta forma, avaliamos o potencial envolvimento da adenosina na resposta de ativação de fibroblastos induzida pela IL-13. O tratamento das células com o antagonista do receptor A_{2A} da adenosina ZM-241385 inibiu a atividade prófibrótica da IL-13 (Fig. 12), sendo um indicativo da participação da adenosina na ação da IL-13 sobre os fibroblastos pulmonares.

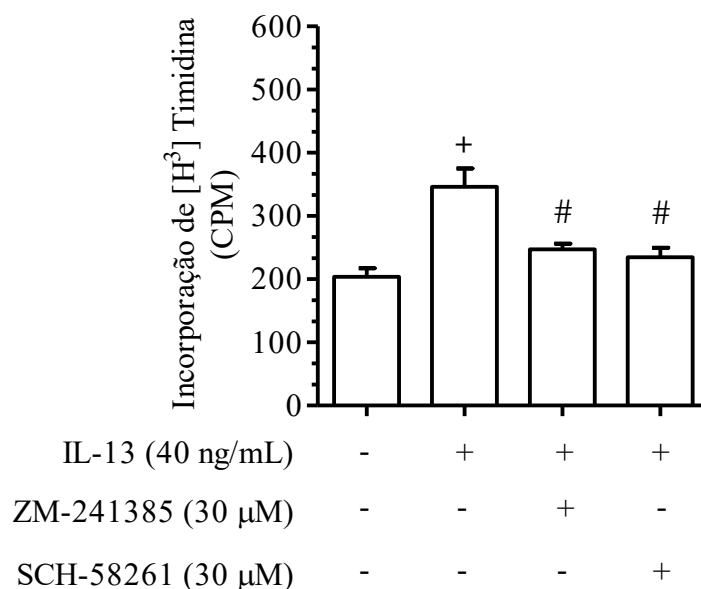


Figura 12 –Efeito do tratamento com antagonista seletivo do receptor A_{2A} na proliferação de fibroblastos pulmonares *in vitro*. Foram utilizados os antagonistas ZM-241385 (10 e 30 μ M) ou SCH-58261 (10 e 30 μ M) e a análise realizada 24 horas após o estímulo com IL-13. Valores indicam média \pm EPM de 4 animais. + $p < 0,05$ comparado ao grupo NE. # $p < 0,05$ comparado aos respectivos grupos controles.

Para melhor investigar este fenômeno, avaliamos o potencial efeito sinérgico entre IL-13 e adenosina. Utilizamos, então, o protocolo de coestimulação dos fibroblastos com IL-13 (10 e 40 ng/mL) e adenosina (10, 30 e 100 μ M). Vimos que a associação da maior concentração da IL-13 com as três concentrações de adenosina testadas induziu um aumento da resposta de proliferação celular, quando comparada ao efeito dos estímulos isoladamente (Fig. 13A). O mesmo pode ser visto no caso da produção de MCP-1, quando ambas as concentrações de IL-13 (10 e 40 ng/mL), em associação com adenosina (300 μ M), induziram resposta potenciada quando comparado ao efeito de cada estímulo isoladamente (Fig. 13A e 13B).

Seguindo o mesmo racional, foi realizado tratamento dos fibroblastos com antagonistas de receptor A_{2A} da adenosina ZM-241385 e SCH-58261 (30 μ M). Observamos que o fenômeno de proliferação induzido pela coestimulação das células com IL-13 e adenosina foi inibido por ambos os compostos (Fig. 14). Dando suporte a estes achados indicativos do envolvimento do receptor A_{2A} na resposta de estimulação por IL-13 e adenosina, verificamos que a estimulação de fibroblastos pulmonares provenientes de animais depletados para o gene codificante para o receptor A_{2A} ($A_{2A}^{-/-}$) apresentou redução no efeito proliferativo induzido por ambas IL-13 e adenosina, em comparação a resposta verificada no caso dos fibroblastos dos animais selvagens ($A_{2A}^{+/+}$) (Fig. 15).

De forma adicional, avaliamos o efeito de inibidores de enzimas responsáveis pela produção de adenosina, as ectonucleotidases CD39 (ARL 67156) e CD73 (AMPCP). Vimos que o tratamento com estes inibidores reduziu significativamente a resposta proliferativa induzida pela IL-13, reforçando a hipótese de que o efeito da IL-13 parece de fato depender pelo menos parcialmente da produção de adenosina (Fig. 16).

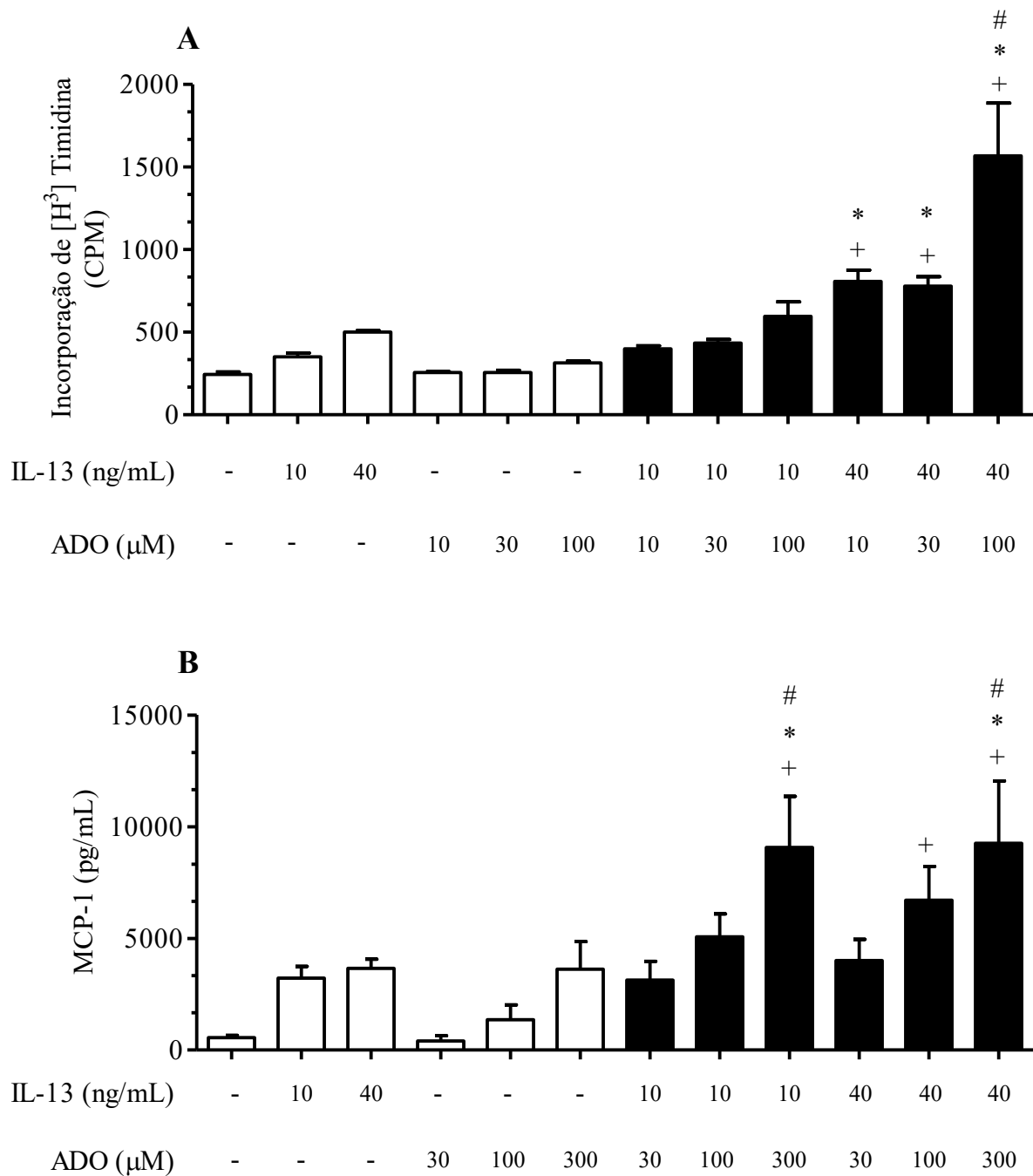


Figura 13 –Efeito da co-estimulação de fibroblastos pulmonares controles com IL-13 e adenosina (ADO) *in vitro*. As análises de (A) proliferação e (B) produção de MCP-1 foram realizadas 24 horas após a estimulação. Barras brancas indicam ausência ou somente um estímulo. Barras pretas indicam co-estimulação (IL-13+ADO). Valores indicam média ± EPM de 3-4 animais. + $p < 0,05$ comparado ao grupo NE. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo ADO. # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo IL-13.

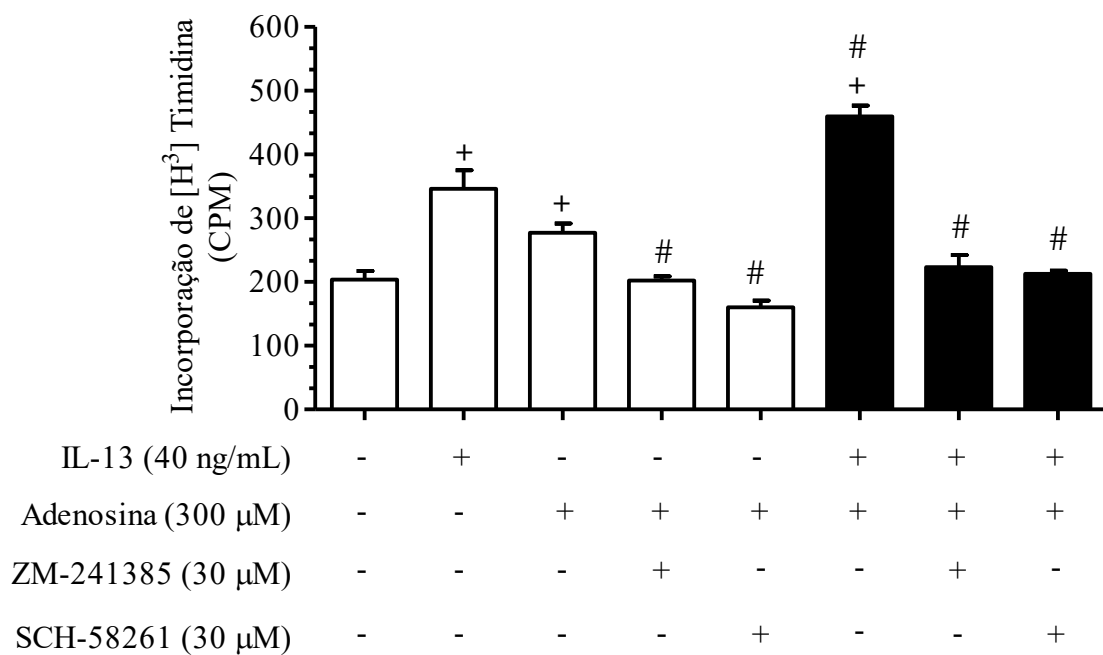


Figura 14 –Efeito do tratamento com antagonista seletivo do receptor A_{2A} na proliferação de fibroblastos pulmonares *in vitro*. Foram utilizados os antagonistas ZM-241385 (10 e 30 μM) ou SCH-58261 (10 e 30 μM) e a análise realizada 24 horas após os estímulos com IL-13, adenosina (ADO) ou com co-estimulação de IL-13+ADO co-estimuladas. Valores indicam média ± EPM de 4 animais. + $p < 0,05$ comparado ao grupo NE. # $p < 0,05$ comparado aos respectivos grupos controles.

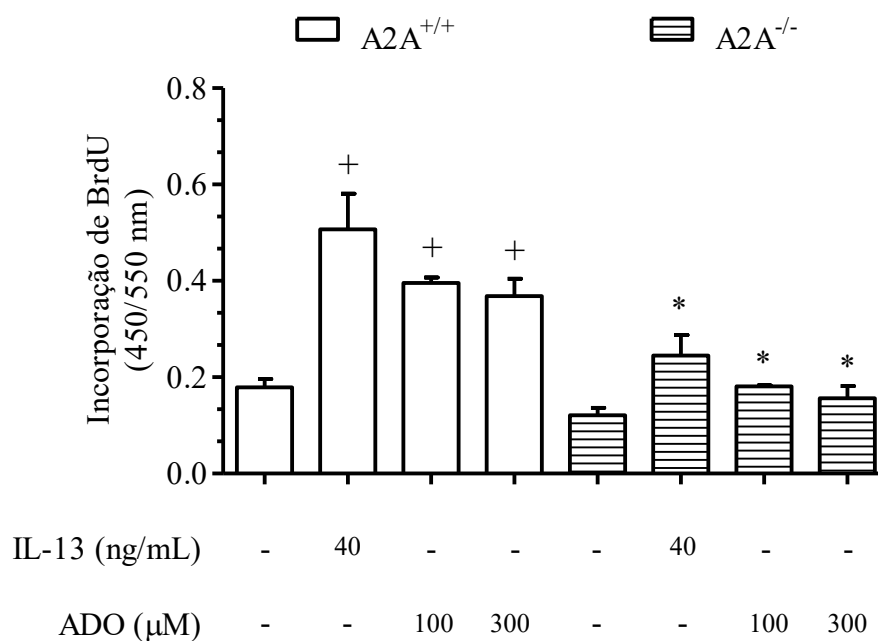


Figura 15 –Avaliação do efeito da deleção do gene codificante para o receptor A_{2A} na proliferação de miofibroblastos pulmonares in vitro. Análise foi realizada 24 horas após o estímulo com IL-13 e adenosina (ADO). Valores indicam média ± EPM de 2-3 animais. +p < 0,05 comparado ao grupo NE. * p < 0,05 quando comparado aos respectivos grupos A2A^{+/+}.

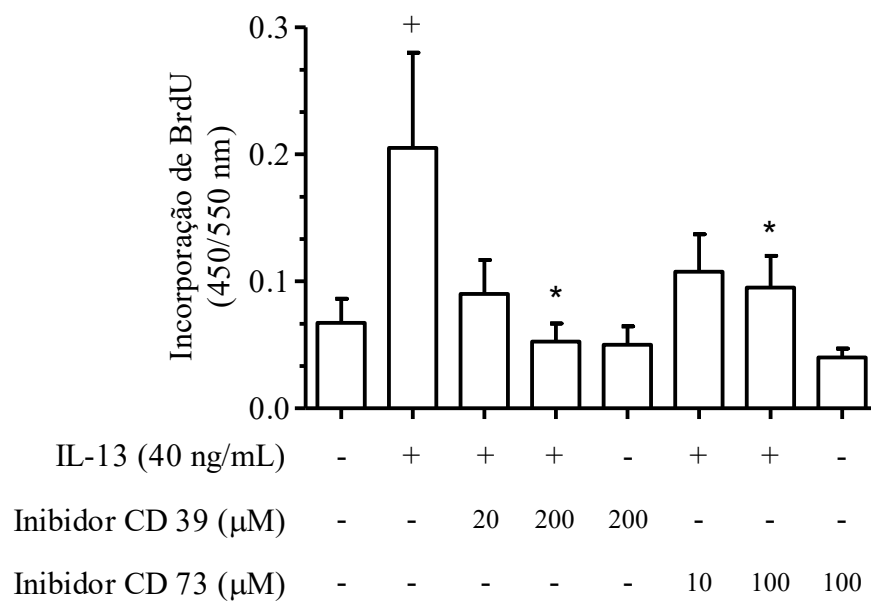


Figura 16 –Efeito dos inibidores das enzimas CD 39 (ARL 67156) e CD 73 (AMPCP) na proliferação de fibroblastos pulmonares *in vitro*. A proliferação foi avaliada 24 horas após o estímulo com IL-13. Valores indicam média \pm EPM de 4 animais. + $p < 0,05$ comparado ao grupo NE. * $p < 0,05$ comparado ao grupo estimulado por IL-13.

4.5. Análise do efeito da deleção do gene para o receptor A_{2A} no desenvolvimento da silicose em camundongos

Tomando por base nossos achados *in vitro* indicativos do envolvimento da adenosina (via receptor A_{2A}) no processo de indução de proliferação de fibroblastos pulmonares, um fenômeno crucial no contexto de respostas fibróticas, avaliamos a resposta silicótica em camundongos que não expressam o gene codificante para o receptor A_{2A}. Focando da fase tardia do quadro silicótico (28 dias), observamos que os animais selvagens Balb-c (A_{2A}^{+/+}) apresentaram claro aumento nos níveis de resistência das vias aéreas quando estimulados com metacolina (Fig. 17A), de forma semelhante ao visualizado em camundongos Swiss-Webster.

Os animais A_{2A}^{-/-} apresentaram resistência basal semelhante à do grupo A_{2A}^{+/+} controle. No entanto, detectamos um aumento na resistência das vias aéreas nos animais A_{2A}^{-/-} em comparação aos selvagens. Essa resposta demonstra uma maior reatividade dos animais deficientes deste receptor em comparação aos selvagens, sugerindo o receptor A_{2A} possa estar participando na reatividade das vias aéreas à agentes broncoconstritores, como por exemplo a metacolina. Ao analisar a resposta dos animais A_{2A}^{-/-} silicóticos, vimos que a resposta de aumento de resistência foi comparável à dos respectivos controles (Fig. 17A). No que se refere à elastância, verificamos que os animais A_{2A}^{+/+} silicóticos apresentaram resposta exacerbada, quando comparados aos controles. (Fig. 17B). Nenhuma alteração foi observada nos níveis basais de elastância pulmonar entre os camundongos A_{2A}^{-/-} e os controles A_{2A}^{+/+} (Fig. 17B). Entretanto, na condição da silicose, uma redução significativa na elastância foi observada nos animais A_{2A}^{-/-} em comparação com o grupo A_{2A}^{+/+} (Fig. 17B).

A análise morfológica revelou que camundongos Balb-c selvagens silicóticos apresentaram marcada resposta fibrótica granulomatosa (Fig. 18B), quando comparados aos controles instilados com salina (Fig. 18A). Observamos que os animais A_{2A}^{-/-} instilados com salina não apresentaram alteração na estrutura pulmonar (Fig. 18C) enquanto que os animais A_{2A}^{-/-} silicóticos mostraram redução parcial, porém significativa, da presença de granulomas no tecido pulmonar (Fig. 18D). A análise morfométrica ratificou os achados morfológicos (Fig. 18E). A análise complementar de fibras colágenas, utilizando coloração com Picrus sirius e sistema de microscopia com polarização, revelou um marcado aumento no conteúdo de fibras colágenas (cor amarela e verde) colocalizadas na região de granuloma no pulmão dos animais A_{2A}^{+/+} silicóticos (Fig. 19B). Os controles (instilados com salina) mostraram pequena quantidade basal de fibras colágenas com principal destaque para a membrana basal identificada ao redor de vasos e vias aéreas (Fig. 19A e 19C). Observamos uma significativa atenuação na deposição de fibras colágenas nos animais A_{2A}^{-/-} silicóticos

(Fig. 19D), quando comparada àquela detectada na condição dos animais $A_{2A}^{+/+}$ silicóticos (Fig 19B), reforçando nossos achados morfológicos obtidos em microscopia de campo claro.

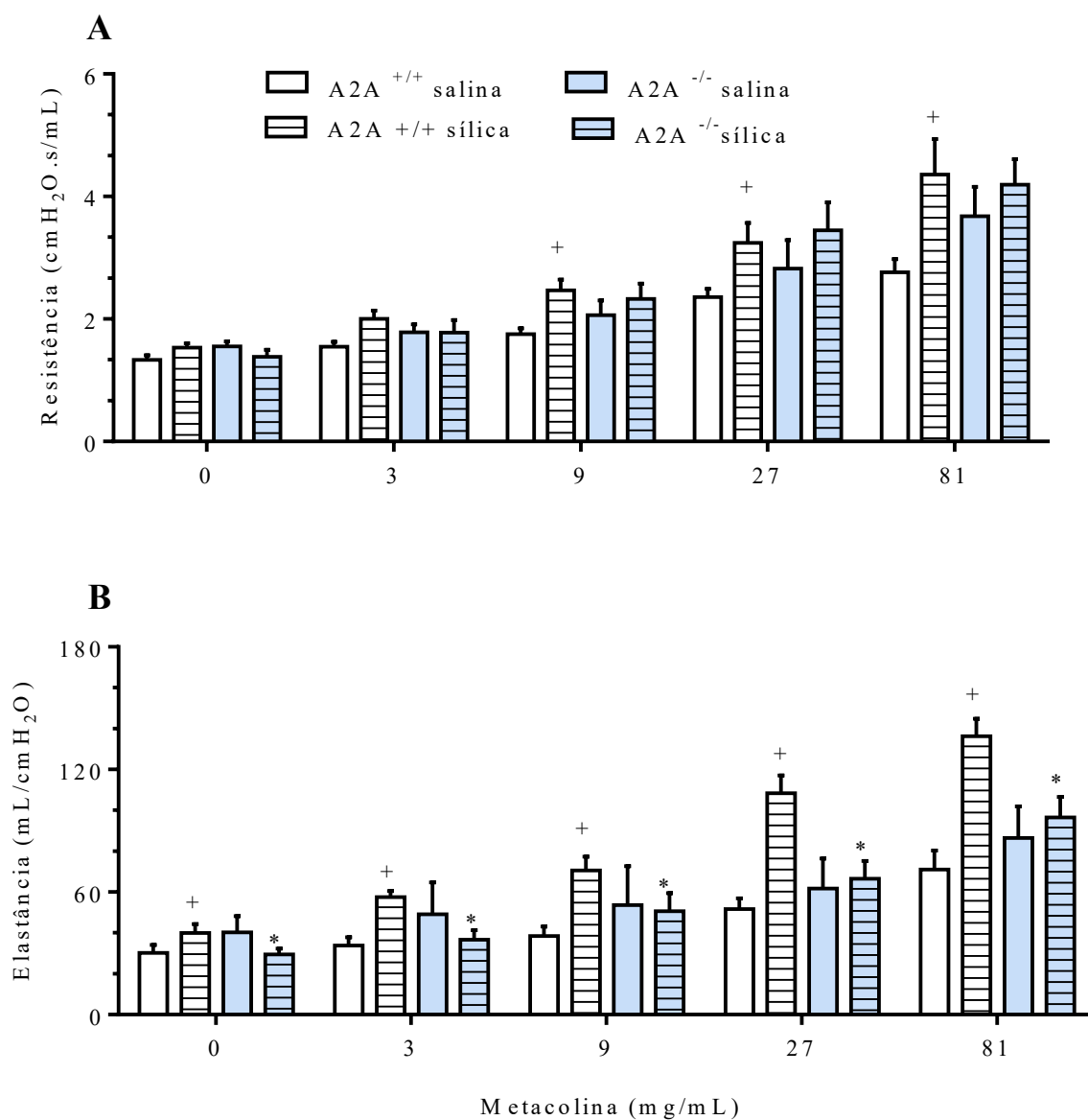


Figura 17 –Avaliação da função pulmonar em camundongos deficientes para o receptor A_{2A} em camundongos silicóticos ($A_{2A}^{-/-}$). Animais selvagens foram utilizados como controles ($A_{2A}^{+/+}$). As análises foram realizadas 28 dias após instilação de sílica (13 mg). Foram analisados os parâmetros de resistência (A) e elastância (B) pulmonar. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de 7-10 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado aos respectivos controles instilados com salina. * $p < 0,05$ comparado aos animais $A_{2A}^{+/+}$ silicóticos.

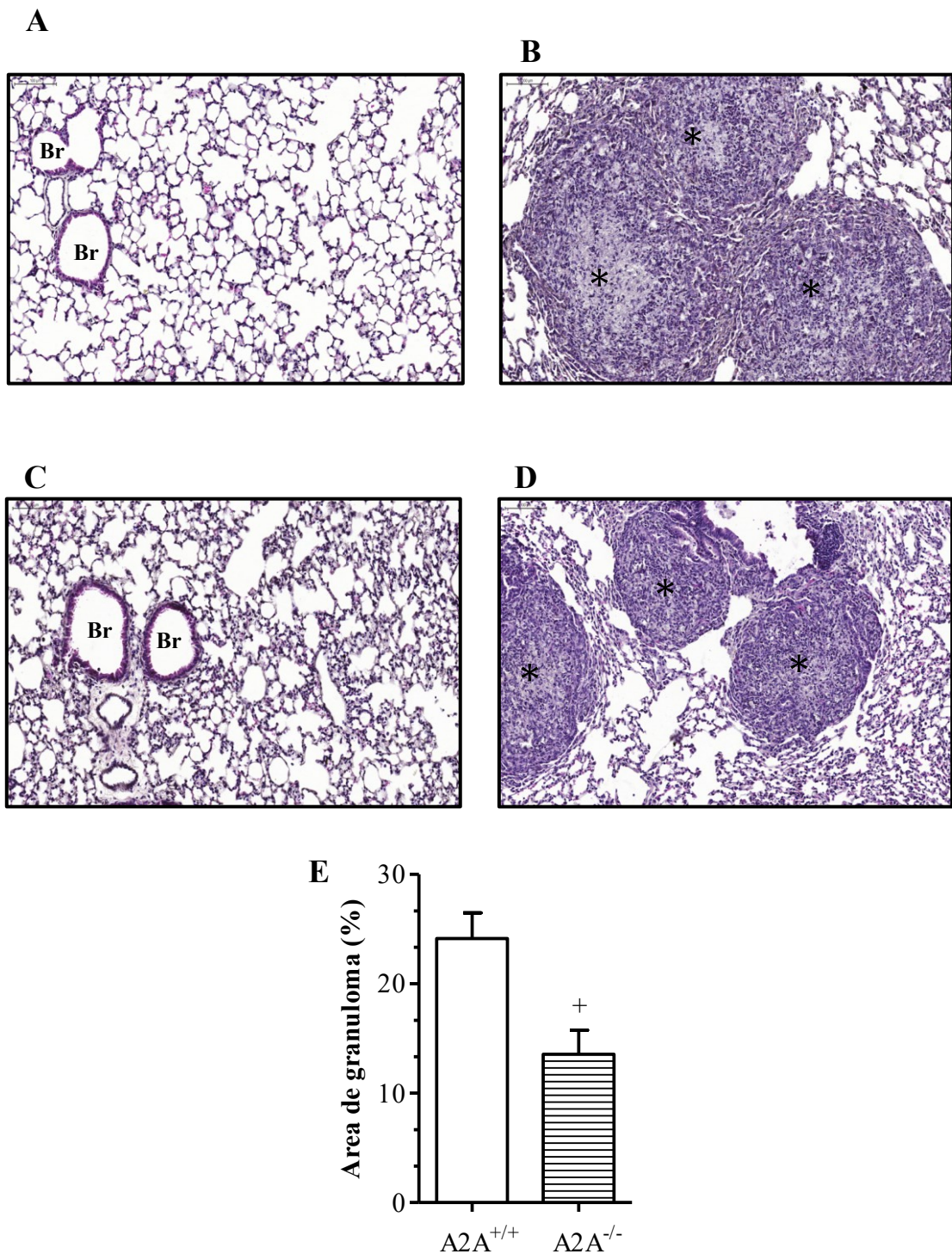


Figura 18 – Avaliação morfológica e morfométrica do pulmão de camundongos silicóticos. Os pulmões foram obtidos de animais A2A^{+/+} (A, B) e A2A^{-/-} (C,D) instilados com salina (50 μ L) (A, C) ou sílica (13 mg) (B, D). Análise morfométrica de parênquima pulmonar (E). As imagens são representativas de 7-10 animais por grupo. Barra = 100 μ m. Br = bronquíolos; *= granuloma. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 8-10 animais por grupo. * P <0,05 comparado aos animais A2A^{+/+} silicóticos.

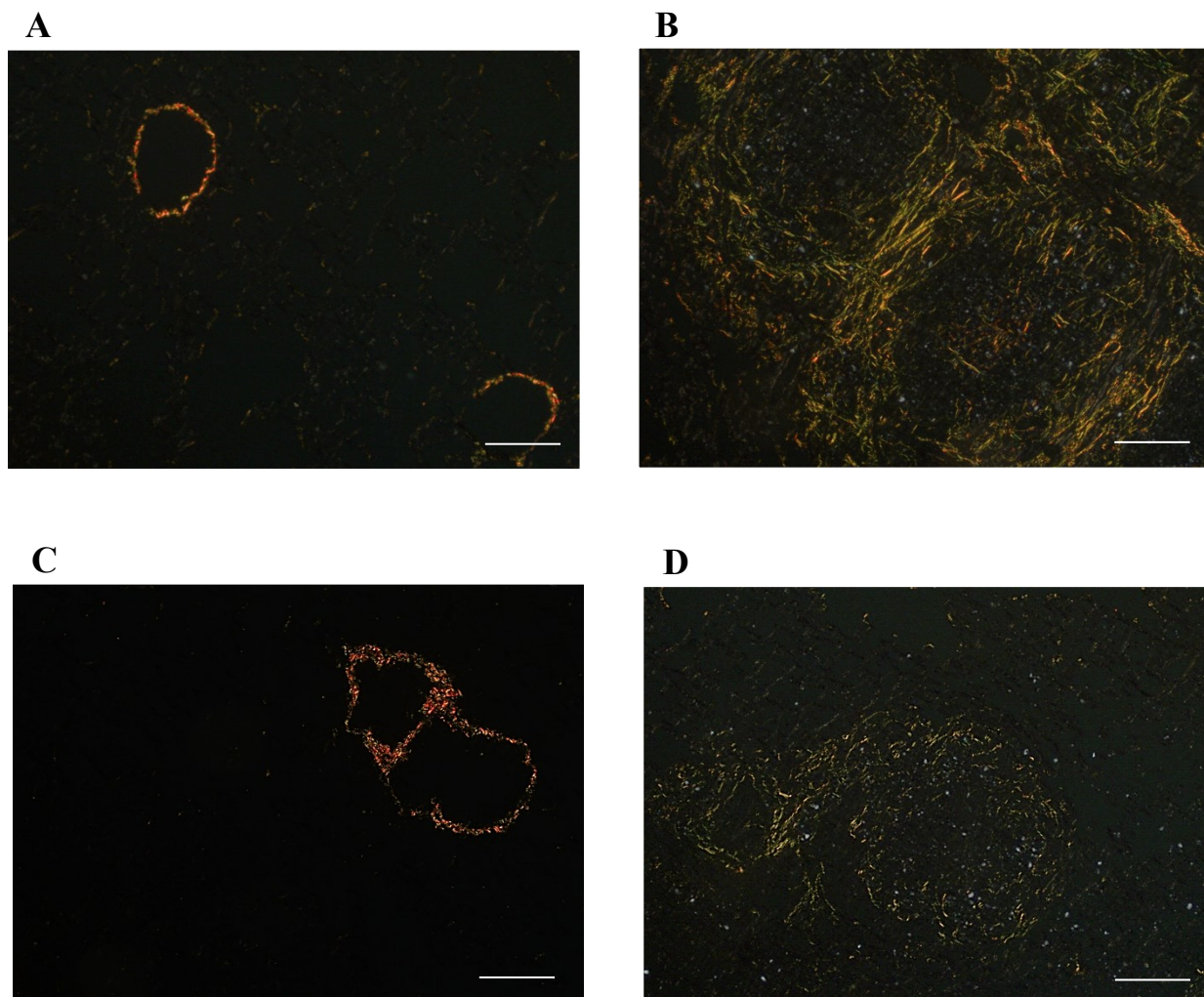


Figura 19 – Avaliação da deposição de fibras colágenas em cortes histológicos do pulmão de camundongos silicóticos. Os pulmões foram obtidos de animais A2A^{+/+} (painéis superiores) e A2A^{-/-} (painéis inferiores) instilados com salina (50 μ L) (A e C) ou sílica (13 mg) (B e D), corados com Picrus Sirius e análise em microscopia de luz polarizada. Imagens obtidas com polarizador. As imagens são representativas de 7-10 animais por grupo. Barra = 200 μ m.

5. Discussão

A silicose é uma doença pulmonar de caráter ocupacional causada pela inalação de poeira de sílica cristalina, marcada por inflamação persistente e fibrose, que se apresenta como lesões nodulares localizadas geralmente na região de ápice dos pulmões. Embora a silicose seja passível de ser prevenida, mediante melhorias nos processos e nos ambientes de trabalho, a doença continua a ser um grave problema de saúde pública, com elevado índice de morbidade e mortalidade mundial (Terra Filho e Santos, 2006; Dang et al., 2013).

Disfunções fibróticas pulmonares são conhecidas desde a Antiguidade, e relatos mais recentes indicam um aumento na incidência destas doenças ao longo do tempo. A fibrose é um processo caracterizado, patologicamente, por acúmulo excessivo de MEC e remodelamento da arquitetura tecidual, caracterizada por achados clínicos, fisiológicos e radiográficos reconhecíveis (Wynn, 2007). De forma geral resulta em disfunção de tecidos e órgãos, comprometimento sistêmico e incapacitação persistente que em estágios avançados leva ao óbito (Lopes et al., 2012; Stansbury et al., 2013). Os achados patológicos da fibrose pulmonar são consequência de distúrbios em dois processos fisiologicamente equilibrados: proliferação e apoptose de fibroblastos, e acúmulo e degradação da MEC. Quando há o direcionamento deste processo para aumento da população de fibroblastos, seja induzindo a proliferação ou reduzindo a apoptose, e aumento da MEC, pelo aumento da síntese e redução da degradação, vemos o desenvolvimento da fibrose tecidual (Barron e Wynn, 2011; Xu et al., 2012).

Apesar do extenso corpo de literatura científica que se acumulou nos últimos anos, não existe ainda um tratamento efetivo para doenças fibróticas. Portanto, a busca pela compreensão acerca dos mecanismos determinantes da fibrose se faz fundamental no sentido de favorecer a identificação de alvos importantes, que no futuro possam permitir o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para aplicação em doenças fibróticas.

A instilação intranasal de partículas de sílica em camundongo induziu alterações da função pulmonar incluindo aumento de resistência das vias aéreas e da elastância pulmonar, conforme demonstrado em um trabalho anterior publicado por nosso grupo com o modelo experimental de silicose que reproduz características da doença humana (Ferreira et al., 2013).. A aerossolização de agente broncoconstritores, como o agonista colinérgico metacolina, induziu exacerbação das respostas de resistência e elastância configurando um quadro de hiper-reatividade pulmonar. Relatos prévios indicam da existência do fenômeno de hiper-reatividade pulmonar em pacientes portadores de antracossilicose (Groetenbriel et al., 1968). Em paralelo podem ser observadas alterações morfológicas que se caracterizam por

edema e infiltrado leucocitário, com predomínio de neutrófilos e macrófagos. Área de fibrose com formação de granulomas pode ser detectada, com estes apresentando aspecto mais frouxo, e com bordos pouco definidos. Com a progressão da doença, na fase tardia verificamos a presença de inflamação e uma extensa área de fibrose no parênquima pulmonar. Evidenciamos um maior número de granulomas, com bordos definidos e coalescentes entre si.

O presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de investigar o papel do nucleosídeo adenosina na resposta fibrótica da silicose experimental. A adenosina é derivada do catabolismo da molécula de ATP ou ADP, com a síntese associada às enzimas CD39 e CD73 e sua degradação é dependente da atividade da ADA (Chan *et al.*, 2006; Fredholm, 2007). O aumento da adenosina tecidual está relacionado a alteração de enzimas envolvidas no equilíbrio da adenosina intra e extracelular, como o aumento na expressão de CD73 e CD39 e redução da ADA. Verificamos o aumento na expressão das enzimas CD39 e CD73 no pulmão dos animais silicóticos, quando comparados aos controles, fenômeno que poderia contribuir para o acúmulo de adenosina no pulmão silicótico. Zhou *et al.* (2010) detectaram, em amostras do pulmão de indivíduos diagnosticados com DPOC e fibrose idiopática pulmonar grave, um aumento na expressão e na atividade da CD73 e redução da atividade da ADA, alterações estas que de forma conjunta resultam no acúmulo de adenosina no parênquima pulmonar e consequente ativação dos receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Temos como perspectiva futura avaliar o conteúdo de adenosina no tecido pulmonar, como forma obter evidências que contribuam para esclarecer o envolvimento da adenosina na silicose. Verificamos a expressão aumentada do receptor A_{2B} e diminuição do A_{2A}, na fase inicial, enquanto que houve aumento na expressão do receptor A₁ e diminuição do A_{2A} na fase tardia da silicose. O receptor A₃ se mostrou inalterado nos tempos analisados. Considerado como receptor de baixa afinidade para a adenosina, por algum tempo o A_{2B} foi tido como de menor relevância fisiológica que o A_{2A}, de alta afinidade para adenosina. Mais recentemente evidências mostram que a expressão do receptor A_{2B} tem se mostrado aumentada em situações de inflamação por hipóxia, em paralelo à elevação dos níveis adenosina extracelular (Chunn *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2009). O receptor A_{2B} favorece a inflamação em diferentes tecidos, onde estimula a secreção de mediadores inflamatórios, como a IL-6, e angiogênicos, como o VEGF. A presença de um local para ligação de HIF-1 α na região promotora do gene do receptor A_{2B} reforça sua implicação em situações de hipóxia e angiogênese (Sitaraman *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2005; Ryzhov *et al.*, 2008). Ao contrário, a adenosina pode atuar inibindo algumas vias inflamatórias através da sua ligação ao receptor A_{2A} que atua, através do aumento nos níveis de AMPc, diminuindo a ativação leucócitos e células endoteliais, a expressão de moléculas de adesão e produção de mediadores pró-inflamatórios como espécies

reativas de oxigênio e TNF- α dentre outros (Rogachev, et al.,2006; Welihinda e Amento, 2014; Caizzo et al., 2016). Estes achados nos permitem especular que o aumento na expressão do receptor A_{2B} (próinflamatório) e redução no A_{2A} (anti-inflamatório), na fase inicial da silicose, estariam contribuindo para a montagem da resposta inflamatória e consequente defesa do organismo sobre a ação lesiva das partículas de sílica. O aumento na expressão do receptor A₁, na fase tardia, poderia ser explicado por suas propriedades prófibróticas(Kalk et al., 2007).

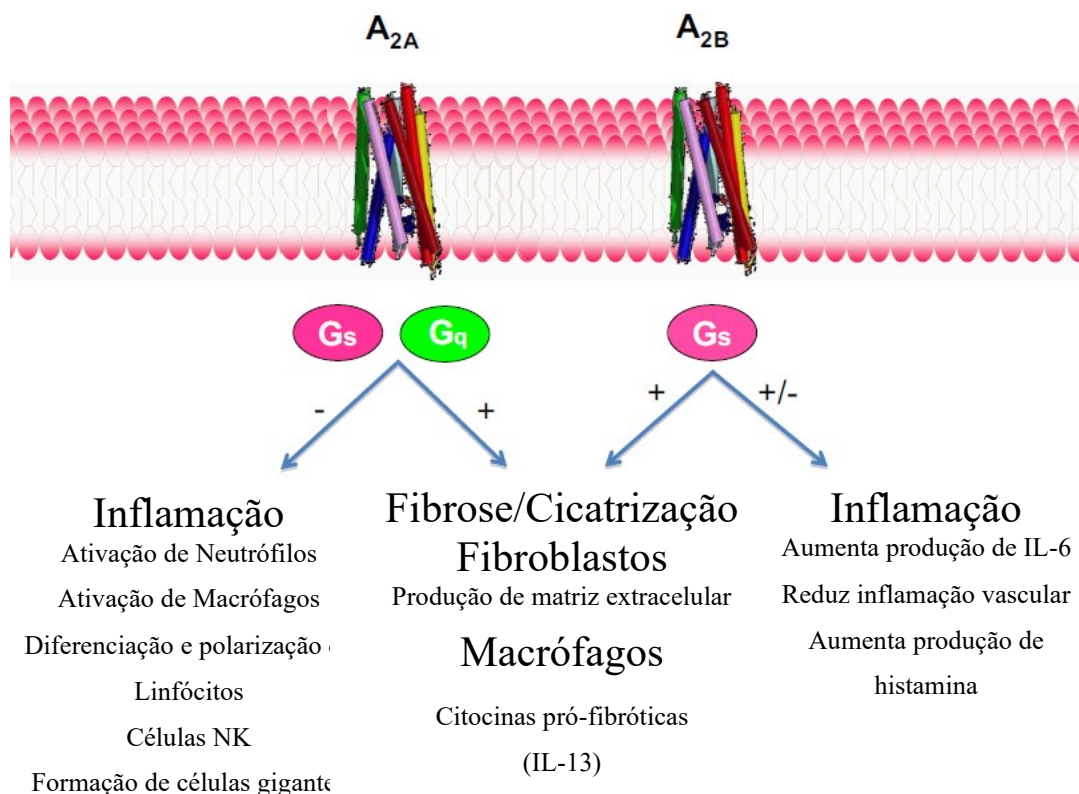


Figura 20 – Esquema do envolvimento dos receptores A_{2A} e A_{2B} na modulação de respostas pró-fibróticas. Adaptado de Cronstein (2011).

Na literatura foi descrito que a adenosina é capaz de induzir a produção da citocina IL-13, em camundongos nocautes para a enzima ADA (Chunn et al., 2006). Camundongos transgênicos para IL-13 apresentaram resposta fibrogênica importante em diversos órgãos, incluindo o pulmão. Este fenômeno se mostrou associado a níveis elevados de adenosina e redução da atividade da ADA(Blackburn et al., 2003).A administração de ADA exógena reverteu este fenótipo fibrótico, indicando que a adenosina e a sinalização de adenosina podem contribuir para as respostas teciduais produzidas pela IL-13 (Chunn et al., 2005). Além disso, evidências existem indicando que a IL-13 e a adenosina são capazes de estimular uma a

outra, em uma via de amplificação que pode contribuir para a severidade, progressão e/ou cronicidade dos efeitos desencadeados pela IL-13.

Demonstramos previamente, de forma original, que a IL-13 se encontra em níveis elevados no pulmão de camundongos silicóticos, de maneira compatível com a progressão da doença. O tratamento com a imunotoxina IL-13PE reduziu o comprometimento da função pulmonar e o componente fibrótico da silicose murina, implicando a IL-13 no contexto da silicose (Ferreira et al. 2013). Este achado foi bastante relevante, uma vez que apesar de serem descritos vários fatores com atividade prófibrótica, a IL-13 aparece como fator presente em diferentes condições fisiopatológicas, atuando por meio da ativação direta de fibroblastos pulmonares (Jakubzick et al., 2003a, Jakubzick et al., 2003b).

Como etapa seguinte, partimos para avaliar/caracterizar a atividade estimulatória da IL-13 e da adenosina na ativação de fibroblastos em sistema de cultura de células. Nossos resultados mostraram que fibroblastos provenientes do pulmão de camundongos controles foram sensíveis ao estímulo com IL-13 e com adenosina, conforme atestado pela resposta de proliferação e produção de MCP-1. Poucos são os trabalhos que relatam o estímulo com adenosina em fibroblastos. De forma geral, os autores utilizam agonistas seletivos e seus efeitos nos receptores da adenosina. Dados da literatura mostraram que o estímulo com NECA (agonista não seletivo para os receptores de adenosina) promoveu a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, de forma dependente da produção de IL-6 (Zhong et al., 2005). De forma adicional, utilizamos sistema de cultura de células tridimensional, como uma estratégia para mimetizar a maior complexidade verificada na condição tecidual. Através de microscopia de luz invertida, observamos que os fibroblastos de camundongos controles, na presença como na ausência de IL-13, foram capazes de formar esferóides já no dia 1 de cultura, com tamanho/diâmetro maior do que aquele verificado nos demais tempos de análise. Este fenômeno poderia ser explicado pelo mecanismo implicado no processo conformacional da esfera. Vimos que os esferóides de células estimuladas com IL-13 se mostraram maiores do que aqueles com células não estimuladas (48 e 72 horas), o que poderia ser indicativo do efeito indutor de proliferação pela IL-13 descrito anteriormente por nosso grupo (Guimarães, 2012). A redução do diâmetro verificada ao longo da cinética poderia ser atribuído a um possível processo de morte celular no interior dos esferóides (Vaheiri et al., 2009). Um marcado aumento nos níveis de MCP-1 foi detectado em todos os tempos de análise. Na condição de estimulação com adenosina, vimos que sua ação sobre o diâmetro dos esferóides se fez presente somente em 24h, enquanto que a produção de MCP-1 ocorreu de forma discreta, quando comparada àquela da IL-13, porém este efeito esteve presente em todos os tempos analisados. Estes dados não são conclusivos e precisam ser melhor trabalhados. A

complexidade do sistema tridimensional e a meia vida curta da adenosina (segundos) são fatores que precisam ser considerados e podem responder, pelo menos em parte, pelos dados inconclusivos (Marquardt et al., 1984; Godoy et al., 2013). Mais ensaios se fazem necessários para esclarecer o efeito da adenosina sobre esferoides.

Retomando o sistema de cultura bidimensional, investigamos quais os receptores da adenosina estariam envolvidos no efeito da ativação de fibroblastos pela adenosina. Foram utilizados antagonistas seletivos para os quatro subtipos de receptores A₁ (DPCPX), A_{2A} (ZM-241385), A_{2B} (MRS-1754) e A₃(MRS-1523). A resposta de proliferação dos fibroblastos desencadeada pela adenosina foi sensível somente ao antagonista do receptor A_{2A}. Achados similares foram obtidos quando da estimulação com a IL-13, sugerindo que a adenosina pudesse mediar o efeito de ativação da IL-13 sobre fibroblastos. Este resultados confirmam dados prévios indicativos da participação do receptor A_{2A} em processo fibróticos (Shaik et al., 2016). Na tentativa de mimetizar o efeito da adenosina no receptor A_{2A} para indução de proliferação, foi realizada incubação dos fibroblastos com o agonista de A_{2A}, CGS-21680. O composto não apresentou qualquer atividade. Estes dados vão de encontro àqueles observados no caso de fibroblastos dérmicos de humanos, que responderam proliferando quando da estimulação com CGS-21680 (Perez-Aso et al., 2014). A diferença de espécie (humana e murina), origem das células (derme e pulmão), bem como o método de análise (MTT e incorporação de timidina) podem justificar a discrepância entre os resultados encontrados.

Considerando as evidências de que IL-13 e adenosina podem se regular mutuamente, investigamos o efeito da coestimulação de fibroblastos com IL-13 e adenosina. Vimos que a proliferação e a produção de MCP-1 se mostraram potenciadas na condição da coestimulação com IL-13 e adenosina, quando comparadas a intensidade de resposta induzida por cada mediador isoladamente. Assim como descrito anteriormente para IL-13 e adenosina, o efeito da coestimulação foi também sensível somente ao tratamento com antagonistas seletivos do receptor A_{2A}, ZM-241385 e SCH-58261. Corroborando estes achados, fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos deficientes do gene codificante para o receptor A_{2A} mostraram-se refratários à estimulação com IL-13. O tratamento com os inibidores das enzimas CD39 e CD73, responsáveis pela formação da adenosina extracelular, inibiu a proliferação de fibroblastos induzida pela IL-13. Em conjunto, estes achados mostram, de forma inédita, que a adenosina através de seu receptor A_{2A} está implicada nas respostas de proliferação e ativação dos fibroblastos pulmonares estimulados por IL-13.

De forma a obtermos evidências de que tal mecanismo poderia ser igualmente aplicado à condição da silicose, camundongos deficientes do gene codificante para o receptor A_{2A} foram instilados com partículas de sílica. Com ênfase na fase tardia (28 dias),

observamos que os camundongos nocautes para A_{2A} ($A_{2A}^{-/-}$) apresentaram níveis basais de resistência das vias aéreas mais elevados em comparação aos animais selvagens ($A_{2A}^{+/+}$). Os níveis basais de elastância se mostraram inalterados quando comparados os grupos de animais $A_{2A}^{+/+}$ e $A_{2A}^{-/-}$. Os animais $A_{2A}^{+/+}$ silicóticos apresentaram níveis basais de elastância aumentados, em comparação aos controles, sendo verificada redução no caso dos $A_{2A}^{-/-}$ silicóticos. A resposta de hiper-reatividade pulmonar também se mostrou reduzida nos animais $A_{2A}^{-/-}$ silicóticos. De forma coerente, as alterações morfológicas no parênquima pulmonar - resposta de fibrose granulomatosa - se mostrou significativamente reduzida no pulmão dos animais $A_{2A}^{-/-}$ silicóticos. De forma similar, a deposição de fibras colágenas visualizadas através microscopia de luz polarizada, estava claramente diminuída nos animais $A_{2A}^{-/-}$. Estes achados, em conjunto, dão suporte a proposição de que a adenosina desempenha um papel prófibrótico na silicose experimental e que este efeito parece depender pelo menos parcialmente de sua ação no receptor A_{2A} .

6. Conclusão

Nossos resultados demonstram que:

- A instilação intranasal de sílica em camundongos induziu comprometimento da mecânica respiratória com aumento de resistência das vias aéreas e elastância pulmonar, resposta exacerbada quando da aerossolização de metacolina indicando condição de hiper-reatividade pulmonar. A análise histológica revelou presença de infiltrado inflamatório e fibrose granulomatosa de forma mais acentuada na fase tardia da silicose;
- A expressão das enzimas CD39 e CD73 se mostrou aumentada no pulmão dos animais silicóticos. Verificamos também alteração na expressão dos receptores de adenosina no pulmão silicótico, com aumento de A_{2B} e A_1 , e redução do A_{2A} , sem modificação do A_3 ;
- Os fibroblastos pulmonares responderam à estimulação com adenosina e IL-13 (proliferação e produção de MCP-1), quando utilizadas de forma isolada ou concomitante, indicando que ambos mediadores atuam em conjunto na resposta fibrótica. Em ambas as condições, o antagonismo seletivo do receptor A_{2A} inibiu a ativação dos fibroblastos pulmonares indicando ter um papel prófibrótico para o receptor A_{2A} nestas condições experimentais;
- Os camundongos deficientes na expressão do receptor A_{2A} da adenosina quando estimulados com sílica apresentaram diminuição do comprometimento pulmonar e fibrose, quando comparados aos animais selvagens silicóticos.

Tomados em conjunto, nossos achados indicam, de forma original, que a adenosina parece contribuir para a resposta fibrótica na silicose, atuando de forma dependente da ativação de fibroblastos e por um mecanismo associado ao receptor A_{2A} . Também sugerem que antagonistas do receptor A_{2A} podem representar uma alternativa terapêutica para aplicação em doenças pulmonares de caráter fibrótico como a silicose.

7. Bibliografia

Akamatsu T, Arai Y, Kosugi I, Kawasaki H, Meguro S, Sakao M, et al. Direct isolation of myofibroblasts and fibroblasts from bleomycin-injured lungs reveals their functional similarities and differences. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2013 Aug 8;6(1):15.

American Thoracic Society Committee of the Scientific Assembly on Environmental and Occupational Health. Adverse effects of crystalline silica exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Feb;155(2):761-8.

Ball HA, Van Scott MR, Robinson CB. Sense and antisense: therapeutic potential of oligonucleotides and interference RNA in asthma and allergic disorders. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004 Dec;27(3):207-17.

Banerjee SK, Young HW, Volmer JB, Blackburn MR. Gene expression profiling in inflammatory airway disease associated with elevated adenosine. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Feb;282(2):L169-82.

Barron L, Wynn TA. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 May;300(5):G723-8.

Beamer CA, Holian A. Antigen-presenting cell population dynamics during murine silicosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Dec;37(6):729-38.

Beamer CA, Migliaccio CT, Jessop F, Trapkus M, Yuan D, Holian A. Innate immune processes are sufficient for driving silicosis in mice. *J Leukoc Biol*. 2010 Sep;88(3):547-57.

Becker S, Mundandhara S, Devlin RB, Madden M. Regulation of cytokine production in human alveolar macrophages and airway epithelial cells in response to ambient air pollution particles: further mechanistic studies. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 1;207(2 Suppl):269-75.

Beckett W. Occupational lung diseases. In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2011. p. 1–2.

Belperio JA, Dy M, Burdick MD, Xue YY, Li K, Elias JA, et al. Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Oct;27(4):419-27.

Benson SC, Belton JC, Scheve LG. Regulation of lung fibroblast proliferation and protein synthesis by bronchiolar lavage in experimental silicosis. *Environ Res*. 1986 Oct;41(1):61-78.

Blackburn MR. Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. *Trends Pharmacol Sci*. 2003 Feb;24(2):66-70.

Blackburn MR, Lee CG, Young HW, Zhu Z, Chunn JL, Kang MJ, Banerjee SK, Elias JA. Adenosine mediates IL-13-induced inflammation and remodeling in the lung and interacts in an IL-13-adenosine amplification pathway. *J Clin Invest*. 2003 Aug;112(3):332-44.

Blease K, Jakubzick C, Westwick J, Lukacs N, Kunkel SL, Hogaboam CM. Therapeutic effect of IL-13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma. *J Immunol*. 2001 Apr 15;166(8):5219-24.

Blease K, Schuh JM, Jakubzick C, et al. Stat6-Deficient Mice Develop Airway Hyperresponsiveness and Peribronchial Fibrosis during Chronic Fungal Asthma. *The American Journal of Pathology* 2002;160(2):481-490.

BonAMT , Santos AMA. Sílica - Exposição ocupacional . Sílica e Silicose. Fundacentro. [Acesso em 20 maio 2010]. Disponível em: 26 de outubro de 2016. Disponível em: <http://www.fundacentro.gov.br/conteudo-super-link?url=http://www.fundacentro.gov.br/silica-e-silicose/exposicao-ocupacional>

Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Dec;15(12):786-801.

Borthwick LA, Wynn TA, Fisher AJ. Cytokine mediated tissue fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jul;1832(7):1049-60. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.09.014.

Boveda-Ruiz D, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Takagi T, Naito M, Matsushima Y, et al. Differential role of regulatory T cells in early and late stages of pulmonary fibrosis. *Immunobiology*. 2013 Feb;218(2):245-54.

Byrne AJ, Mathie SA, Gregory LG, Lloyd CM. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. *Thorax*. 2015 Dec;70(12):1189-96.

Caiazza E, Maione F, Morello S, Lapucci A, Paccosi S, Steckel B, Lavecchia A, Parenti A, Iuvone T, Schrader J, Ialenti A, Cicala C. Adenosine signaling mediates the anti-inflammatory effects of the COX-2 inhibitor nimesulide. *Biochem Pharmacol*. 2016 Jul 15;112:72-81.

Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 1;105(26):9035-40.

Castranova V, Porter D, Millecchia L, Ma JY, Hubbs AF, Teass A. Effect of inhaled crystalline silica in a rat model: time course of pulmonary reactions. *Mol Cell Biochem*. 2002 May-Jun;234-235(1-2):177-84.

Chan ES, Fernandez P, Merchant AA, Montesinos MC, Trzaska S, Desai A, et al. Adenosine A2A receptors in diffuse dermal fibrosis: pathogenic role in human dermal fibroblasts and in a murine model of scleroderma. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug;54(8):2632-42.

Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Apr;12(4):265-86.

Choi SJ, Oh JM, Choy JH. Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *J Inorg Biochem*. 2009 Mar;103(3):463-71.

Chong S, Lee KS, Chung MJ, Han J, Kwon OJ, Kim TS. Pneumoconiosis: comparison of imaging and pathologic findings. *Radiographics*. 2006;26(1):59-77.

Chunn JL, Molina JG, Mi T, Xia Y, Kellems RE, Blackburn MR. Adenosine-dependent pulmonary fibrosis in adenosine deaminase-deficient mice. *J Immunol*. 2005 Aug 1;175(3):1937-46.

Chunn JL, Mohsenin A, Young HW, Lee CG, Elias JA, Kellems RE, Blackburn MR. Partially adenosine deaminase-deficient mice develop pulmonary fibrosis in association with adenosine elevations. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Mar;290(3):L579-87.

Cicala C, Ialenti A. Adenosine signaling in airways: toward a promising antiasthmatic approach. *Eur J Pharmacol*. 2013 Aug 15;714(1-3):522-5.

Collins SL, Black KE, Chan-Li Y, Ahn YH, Cole PA, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan fragments promote inflammation by down-regulating the anti-inflammatory A2a receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Oct;45(4):675-83.

Cronstein BN. Adenosine receptors and fibrosis: a translational review. *F1000 Biol Rep*. 2011;3:21.

Cullinan P, Reid P. Pneumoconiosis. *Prim Care Respir J*. 2013 Jun;22(2):249-52.

Dang GT, Barros N, Higgins SA, Langley RL, Lipton D. Descriptive review of asbestosis and silicosis hospitalization trends in North Carolina, 2002-2011. *N C Med J*. 2013 Sep-Oct;74(5):368-75.

Della Latta V, Cabiati M, Rocchiccioli S, Del Ry S, Morales MA. The role of the adenosinergic system in lung fibrosis. *Pharmacol Res*. 2013 Oct;76:182-9.

Driver AG, Kukoly CA, Ali S, Mustafa SJ. Adenosine in bronchoalveolar lavage fluid in asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Jul;148(1):91-7.

de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. 1998 Dec 3;396(6710):474-7.

- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009 Jun;29(6):313-26.
- Di Giuseppe M, Gambelli F, Hoyle GW, Lungarella G, Studer SM, Richards T, Yousem S, McCurry K, Dauber J, Kaminski N, Leikauf G, Ortiz LA. Systemic inhibition of NF-kappaB activation protects from silicosis. *PLoS One.* 2009 May 25;4(5):e5689.
- Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK. Adenosine inhibits collagen and protein synthesis in cardiac fibroblasts: role of A2B receptors. *Hypertension.* 1998 Apr;31(4):943-8.
- Eckle T, Füllbier L, Wehrmann M, Khoury J, Mittelbronn M, Ibla J, et al. Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury. *J Immunol.* 2007 Jun 15;178(12):8127-37.
- Eduardo C, Barboza G, Winter DH, Seiscento M, Santos UDP, Filho MT. Tuberculosis and silicosis: epidemiology, diagnosis and chemoprophylaxis. *Terra.* 2008;34(February):961-8.
- Ehrlich RI, Myers JE, de Water Naude JM, Thompson ML, Churchyard GJ. Lung function loss in relation to silica dust exposure in South African gold miners. *Occup Environ Med.* 2011;68(2):96-101.
- Ferreira TP, de Arantes AC, do Nascimento CV, Olsen PC, Trentin PG, Rocco PR, Hogaboam CM, Puri RK, Martins MA, Silva PM. IL-13 immunotoxin accelerates resolution of lung pathological changes triggered by silica particles in mice. *J Immunol.* 2013 Nov 15;191(10):5220-9.
- Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med.* 2006 Jan;12(1):99-106.
- Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ.* 2007 Jul;14(7):1315-23.

Garzoni LR, Adesse D, Soares MJ, Rossi MI, Borojevic R, de Meirelles Mde N. Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *J Infect Dis.* 2008 Mar 15;197(6):906-15.

GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015 Jan 10;385(9963):117-71.

Giordano G, van den Brûle S, Lo Re S, Triqueneaux P, Uwambayinema F, Yakoub Y, et al. Type I interferon signaling contributes to chronic inflammation in a murine model of silicosis. *Toxicol Sci.* 2010 Aug;116(2):682-92.

Glazer CS, Newman LS. Occupational interstitial lung disease. Vol. 25, *Clinics in Chest Medicine.* 2004. p. 467–78.

Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol.* 2013 Aug;87(8):1315-530.

González-Fernández E, Sánchez-Gómez MV, Pérez-Samartín A, Arellano RO, Matute C. A3 Adenosine receptors mediate oligodendrocyte death and ischemic damage to optic nerve. *Glia.* 2014 Feb;62(2):199-216.

Greenberg MI, Waksman J, Curtis J. Silicosis: a review. *Dis Mon.* 2007 Aug;53(8):394-416. PubMed PMID: 17976433.

Griffith DA, Jarvis SM. Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Oct 29;1286(3):153-81.

Groetenbriel C et al. Bronchial Hyperreactivity and Anthracosilicosis. Bronches 1968 Nov 18 (6), 510-513.

Hall JE, Guyton AC. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. 2011. 160 p.

Hamilton RF Jr, Thakur SA, Mayfair JK, Holian A. MARCO mediates silica uptake and toxicity in alveolar macrophages from C57BL/6 mice. *J Biol Chem*. 2006 Nov 10;281(45):34218-26.

Hamilton RF Jr, Thakur SA, Holian A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2008 Apr 1;44(7):1246-58.

Huax F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007 Apr;7(2):168-73. Review.

Iyer R, Hamilton RF, Li L, Holian A. Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor in human alveolar macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996 Nov;141(1):84-92.

Jakubzick C, Kunkel SL, Joshi BH, Puri RK, Hogaboam CM. Interleukin-13 Fusion Cytotoxin Arrests *Schistosoma mansoni* Egg-Induced Pulmonary Granuloma Formation in Mice. *The American Journal of Pathology*. 2002;161(4):1283-1297.

Jakubzick C, Choi ES, Kunkel SL, Joshi BH, Puri RK, Hogaboam CM. Impact of interleukin-13 responsiveness on the synthetic and proliferative properties of Th1- and Th2-type pulmonary granuloma fibroblasts. *Am J Pathol*. 2003 May;162(5):1475-86.

Jakubzick C, Choi ES, Joshi BH, Keane MP, Kunkel SL, Puri RK, Hogaboam CM. Therapeutic attenuation of pulmonary fibrosis via targeting of IL-4- and IL-13-responsive cells. *J Immunol*. 2003 Sep 1;171(5):2684-93.

Jeffery PK. Comparison of the structural and inflammatory features of COPD and asthma. Giles F. Filley Lecture. *Chest*. 2000 May;117(5 Suppl 1):251S-60S.

Joshi BH, Kawakami K, Leland P, Puri RK. Heterogeneity in interleukin-13 receptor expression and subunit structure in squamous cell carcinoma of head and neck: differential sensitivity to chimeric fusion proteins comprised of interleukin-13 and a mutated form of *Pseudomonas* exotoxin. *Clin Cancer Res*. 2002 Jun;8(6):1948-56.

Joshi GN, Knecht DA. Silica phagocytosis causes apoptosis and necrosis by different temporal and molecular pathways in alveolar macrophages. *Apoptosis*. 2013 Mar;18(3):271-85.

Kalk P, Eggert B, Relle K, Godes M, Heiden S, Sharkovska Y, Fischer Y, Ziegler D, Bielenberg GW, Hoher B. The adenosine A1 receptor antagonist SLV320 reduces myocardial fibrosis in rats with 5/6 nephrectomy without affecting blood pressure. *Br J Pharmacol*. 2007 Aug;151(7):1025-32.

Katebi M, Fernandez P, Chan ESL. et al. Adenosine A2A Receptor Blockade or Deletion Diminishes Fibrocyte Accumulation in the Skin in a Murine Model of Scleroderma, Bleomycin-induced Fibrosis Inflammation (2008) 31: 299.

Kaviratne M, Hesse M, Leusink M, Cheever AW, Davies SJ, McKerrow JH, et al. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J Immunol*. 2004 Sep 15;173(6):4020-9.

Kim J-H, Kim C-S, Ignacio RMC, Kim D-H, Sajo MEJ, Maeng EH, et al. Immunotoxicity of silicon dioxide nanoparticles with different sizes and electrostatic charge. *Int J Nanomedicine [Internet]*. 2014;9 Suppl 2:183-93.

Kraft M, Lewis C, Pham D, Chu HW. IL-4, IL-13, and dexamethasone augment fibroblast proliferation in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Apr;107(4):602-6.

Kusaka T, Nakayama M, Nakamura K, Ishimiya M, Furusawa E, Ogasawara K. Effect of silica particle size on macrophage inflammatory responses. *PLoS One*. 2014 Mar 28;9(3):e92634.

Leung CC, Yu ITS, Chen W. Silicosis. *Lancet*. 2012;379(9830):2008-18.

Liu F, Dai W, Li C, Lu X, Chen Y, Weng D, Chen J. Role of IL-10-producing regulatory B cells in modulating T-helper cell immune responses during silica-induced lung inflammation and fibrosis. *Sci Rep*. 2016 Jun 29;6:28911.

Lopes AJ, Costa W, Thomaz Mafort T, de Sá Ferreira A, Silveira de Menezes SL, Silva Guimarães F. Silicosis in sandblasters of shipyard versus silicosis in stone carvers in Brazil: a comparison of imaging findings, lung function variables and cardiopulmonary exercise testing parameters. *Rev Port Pneumol*. 2012 Nov-Dec;18(6):260-6.

Lynch J, McCune WF. Adverse effects of crystalline silica exposure. American Thoracic Society Committee of the Scientific Assembly on Environmental and Occupational Health. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(2):761-8.

MacDonald TT. Decoy receptor springs to life and eases fibrosis. *Nat Med*. 2006 Jan;12(1):13-4.

Marquardt DL, Gruber HE, Wasserman SI. Adenosine release from stimulated mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 ct;81(19):6192-6.

Mazzon E, Esposito E, Impellizzeri D, DI Paola R, Melani A, Bramanti P, et al. CGS 21680, an agonist of the adenosine (A2A) receptor, reduces progression of murine type II collagen-induced arthritis. *J Rheumatol*. 2011 Oct;38(10):2119-29.

Moore BB, Paine R 3rd, Christensen PJ, Moore TA, Sitterding S, Ngan R, Wilke CA, Kuziel WA, Toews GB. Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *J Immunol*. 2001 Oct 15;167(8):4368-77.

Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 May;157(5 Pt 1):1666-80.

Möser GH, Schrader J, Deussen A. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol*. 1989 Apr;256(4 Pt 1):C799-806.

Murthy S, Adamcakova-Dodd A, Perry SS, Tephly LA, Keller RM, Metwali N, et al. Modulation of reactive oxygen species by Rac1 or catalase prevents asbestos-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Nov;297(5):L846-55.

NIOSH (The National Institute for Occupational Safety and Health). NIOSH hazard review: Health effects of occupational exposure to respirable crystalline silica. Center of Disease Control and Prevention, 2002. Acesso em: 26 de outubro de 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2002-129/>

Oldenburger A, Roscioni SS, Jansen E, Menzen MH, Halayko AJ, Timens W, Meurs H, Maarsingh H, Schmidt M. Anti-inflammatory role of the cAMP effectors Epac and PKA: implications in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*.2012;7(2):e31574.

Orfila C, Lepert JC, Gossart S, Frisach MF, Cambon C, Pipy B. Immunocytochemical characterization of lung macrophage surface phenotypes and expression of cytokines in acute experimental silicosis in mice. *Histochem J*. 1998 Dec;30(12):857-67.

Organização mundial da saúde (OMS).Screening and surveillance of workers exposed to mineral dusts. 1996. Acesso em: 05 de janeiro de 2017. Disponível em: http://www.who.int/occupational_health/publications/mineraldust/en/

Øvrevik J, Refsnes M, Låg M, Holme JA, Schwarze PE. Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms. Vancurova I, ed. *Biomolecules*. 2015;5(3):1399-1440. doi:10.3390/biom5031399.

Peeters PM, Perkins TN, Wouters EFM, Mossman BT, Reynaert NL. Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology*. 2013 May;10(3).

Peng Z, Fernandez P, Wilder T, Yee H, Chiriboga L, Chan ES, Cronstein BN. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) -mediated extracellular adenosine production plays a critical role in hepatic fibrosis. *FASEB J*. 2008 Jul;22(7):2263-72.

Perez-Aso M, Fernandez P, Mediero A, Chan ES, Cronstein BN. Adenosine 2A receptor promotes collagen production by human fibroblasts via pathways involving cyclic AMP and AKT but independent of Smad2/3. *FASEB J*. 2014 Feb;28(2):802-12.

Polosa R, Blackburn MR. Adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Trends in pharmacological sciences*. 2009;30(10):528-535.

Rees D, Murray J. Silica, silicosis and tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007 May;11(5):474-84.

Reutershan J, Vollmer I, Stark S, Wagner R, Ngamsri KC, Eltzschig HK. Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. *FASEB J*. 2009 Feb;23(2):473-82.

Ribeiro, F. O mapa da exposição à sílica no Brasil. Rio de Janeiro: UERJ, Ministério da Saúde, 2010. 94 p. Acesso em: 07 de dezembro de 2016. Disponível em: <http://pesquisa.bvsalud.org/bvsms/resource/pt/mis-31292>.

Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, Graham K, Loewen SK, Smith KM, et al. Recent molecular advances in studies of the concentrative Na⁺-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *Mol Membr Biol*. 2001 Jan-Mar;18(1):65-72.

Rogachev B, Ziv NY, Mazar J, Nakav S, Chaimovitz C, Zlotnik M, Douvdevani A. Adenosine is upregulated during peritonitis and is involved in downregulation of inflammation. *Kidney Int*. 2006 Aug;70(4):675-81.

Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Novitskiy SV, Dikov MM, Blackburn MR, Biaggioni I, Feoktistov I. Effect of A2B adenosine receptor gene ablation on proinflammatory adenosine signaling in mast cells. *J Immunol*. 2008 Jun 1;180(11):7212-20.

Sampson N, Berger P, Zenzmaier C. Redox signaling as a therapeutic target to inhibit myofibroblast activation in degenerative fibrotic disease. *Biomed Res Int*. 2014;2014:131737.

Santos C, Norte A, Fradinho F, Catarino A, Ferreira AJ, Loureiro M, Baganha MF. Silicosis - brief review and experience of a pulmonology ward. *Rev PortPneumol*. 2010 Jan-Feb;16(1):99-115.

Shaikh G, Zhang J, Perez-Aso M, Mediero A, Cronstein B. Adenosine A(2A)receptor promotes collagen type III synthesis via β -catenin activation in human dermal fibroblasts. *Br J Pharmacol*.2016 Sep 5.

Shimamura T, Fujisawa T, Husain SR, Joshi B, Puri RK. Interleukin 13 mediates signal transduction through interleukin 13 receptor alpha2 in pancreatic ductal adenocarcinoma: role of IL-13 Pseudomonas exotoxin in pancreatic cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2010 Jan 15;16(2):577-86.

Silva, AMG. Avaliação da reatividade de fibroblastos provenientes de animais silicóticos estabelecimento de sistema de cultura em 3D. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Molecular]. Instituto Oswaldo Cruz.

Sitaraman SV, Merlin D, Wang L, Wong M, Gewirtz AT, Si-Tahar M, Madara JL. Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal luminal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6. *J Clin Invest*. 2001 Apr;107(7):861-9.

Stansbury RC, Beeckman-Wagner LA, Wang ML, Hogg JP, Petsonk EL. Rapid decline in lung function in coal miners: evidence of disease in small airways. *Am J Ind Med*. 2013 Sep;56(9):1107-12.

Suwara MI, Green NJ, Borthwick LA, Mann J, Mayer-Barber KD, Barron L, et al. IL-1 α released from damaged epithelial cells is sufficient and essential to trigger inflammatory responses in human lung fibroblasts. *Mucosal Immunol*. 2014 May;7(3):684-93.

Terra Filho M; Santos, UP. Silicose. *J. bras. pneumol*. 2006 May;32(2):S41-S47.

Truong LD, Trostel J, McMahan R, Chen JF, Garcia GE. Macrophage A2A Adenosine Receptors Are Essential to Protect from Progressive Kidney Injury. *Am J Pathol*. 2016 Oct;186(10):2601-13.

Vaheri A, Enzerink A, Räsänen K, Salmenperä P. Nemozis, a novel way of fibroblast activation, in inflammation and cancer. *Exp Cell Res.* 2009 Jun 10;315(10):1633-8.

van Berlo, Damien, et al. "NF- κ B dependent and independent mechanisms of quartz-induced proinflammatory activation of lung epithelial cells." *Particle and fibre toxicology* 7.1 (2010): 13.

Warmington KS, Boring L, Ruth JH, Sonstein J, Hogaboam CM, Curtis JL, Kunkel SL, Charo IR, Chensue SW. Effect of C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout on type-2 (schistosomal antigen-elicited) pulmonary granuloma formation: analysis of cellular recruitment and cytokine responses. *Am J Pathol.* 1999 May;154(5):1407-16.

Welihinda AA, Amento EP. Positive allosteric modulation of the adenosine A2a receptor attenuates inflammation. *J Inflamm (Lond).* 2014 Nov 28;11(1):37.

Wilkinson PF, Farrell FX, Morel D, Law W, Murphy S. Adenosine Signaling Increases Proinflammatory and Profibrotic Mediators through Activation of a Functional Adenosine 2B Receptor in Renal Fibroblasts. *Ann Clin Lab Sci.* 2016 Jul;46(4):339-45.

Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:425-56.

Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest.* 2007 Mar;117(3):524-9.

Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013 Apr 25;496(7446):445-55. doi: 10.1038/nature12034.

Xu H, Yang F, Sun Y, Yuan Y, Cheng H, Wei Z, Li S, Cheng T, Brann D, Wang R. A new antifibrotic target of Ac-SDKP: inhibition of myofibroblast differentiation in rat lung with silicosis. *PLoS One.* 2012;7(7):e40301.

Yang G, Volk A, Petley T, Emmell E, Giles-Komar J, Shang X, et al. Anti-IL-13 monoclonal antibody inhibits airway hyperresponsiveness, inflammation and airway remodeling. *Cytokine.* 2004 Dec 21;28(6):224-32.

Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez DE, Kawata M, Yoshii J, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology*. 2000 Dec;32(6):1248-54.

Zhong H, Belardinelli L, Maa T, Zeng D. Synergy between A2B adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Jan;32(1):2-8.

Zhou Y, Schneider DJ, Blackburn MR. Adenosine signaling and the regulation of chronic lung disease. *Pharmacol Ther*. 2009 Jul;123(1):105-16.

Zhou Y, Murthy JN, Zeng D, Belardinelli L, Blackburn MR. Alterations in adenosine metabolism and signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 2010 Feb 16;5(2):e9224.

Zhu Z, Ma B, Zheng T, Homer RJ, Lee CG, Charo IF, et al. IL-13-induced chemokine responses in the lung: role of CCR2 in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Immunol*. 2002 Mar 15;168(6):2953-62.