

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Livia Lacerda Mariano*

Estudo do efeito anti-inflamatório e antifibrótico da lidocaína na silicose experimental murina.

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

**Orientador:** Prof. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva

**RIO DE JANEIRO**

2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M333 Mariano, Livia Lacerda

Estudo do efeito anti-inflamatório e antifibrótico da lidocaína na silicose experimental murina / Livia Lacerda Mariano. – Rio de Janeiro, 2016.

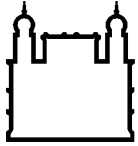
xviii, 64 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 54-64

1. Pulmão. 2. Silica. 3. Inflamação. 4. Fibrose. 5. Lidocaína. 6. Macrófagos. I. Título.

CDD 616.244



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Lívia Lacerda Mariano*

ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIFIBRÓTICO DA LIDOCAÍNA NA SILICOSE EXPERIMENTAL MURINA.

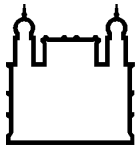
**ORIENTADOR: Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva**

**Aprovada em: 20/05 /2016**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Hugo Castro Caire Faria Neto  
**Prof. Dr.** José Carlos Alves Filho  
**Prof. Dra.** Priscilla Christina Olsen  
**Prof. Dra.** Claudia Farias Benjamim  
**Prof. Dr.** Jorge Carlos Santos da Costa

Rio de Janeiro, 20 de Maio de 2016



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre me guiando meus passos e me amparando nos momentos de dificuldade, e por Nossa Senhora das Graças por sua interceção;

Agradeço aos meus pais, Luiz Antônio Lacerda Mariano e Maria de Fatima Oliveira Lacerda Mariano por estarem sempre me incentivando e por serem os principais responsáveis por me trazer até aqui;

Agradeço ao meu irmão, Felipe Lacerda Mariano, e minha cunhada, Jane Cleia Lessa Lacerda, por me apoiarem e estarem ao meu lado nos momentos de dificuldade;

Agradeço a minha orientadora na Fiocruz, Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva por ter me aceitado como orientanda, e por todo conhecimento transmitido;

Agradeço ao chefe do Laboratório de Inflamação, Dr. Marco Aurélio Martins por me conceder a oportunidade de desenvolver esse projeto;

Agradeço a Dr. Tatiana Paula Teixeira Ferreira por me apoiar ao longo de todo esse caminho.

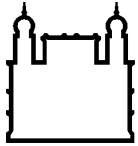
Agradeço a todos da equipe do Laboratório de Inflamação do Instituto Oswaldo Cruz por terem tido a paciência para me transmitir o conhecimento, e pela paciência de todos nas horas de nervosismo. Destaco aqueles que mais diretamente me ajudaram incluindo Ana Carolina Santos de Arantes (sistema Buxco), Thaís Lima e Ana Lúcia (sistema de Elisa), Rodrigo (histologia), Yago Amigo e Bianca Ciambarella pela ajuda nos experimentos de cultura de célula, Davidson Dias pela ajuda nos experimentos. Agradeço também pelo suporte e amizade de todos citados, incluindo Diego Coutinho, Fernanda Verdini, Tassia Santoro, Jessika do Prado, Dani Bianchi;

Agradeço ao apoio da secretaria com a Dadá e ao pessoal do biotério;

Agradeço também a disponibilidade do Dr José Carlos Alves Filho por ter me recebido em seu laboratório, e pela ajuda de Paula Viacava e João Paulo Mesquita Luiz por terem me auxiliado nos experimentos.

Agradeço às agências financiadoras por me permitirem realizar esse trabalho, como CNPq, CAPES e PDTIS/Fiocruz;

Por fim, não posso deixar de agradecer às minhas amigas Thais, Carolina, Gabrielle, Jéssica, Thais da Hora e Vivian Almeida por estarem sempre ao meu lado.



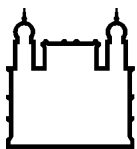
Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

“Life is not easy for any of us. But what of that? We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained.”

(Marie Curie)



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIFIBRÓTICO DA LIDOCAÍNA NA SILICOSE EXPERIMENTAL MURINA.

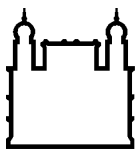
### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Lívia Lacerda Mariano**

A silicose é uma doença inflamatória pulmonar, de caráter ocupacional, causada pela inalação de partículas de sílica, sendo caracterizada por marcada inflamação e fibrose, e para qual não há tratamento até o momento. A lidocaína é um anestésico local que possui atividade anti-inflamatória conforme já demonstrado em processos de natureza alérgica. Neste estudo buscamos avaliar o efeito do tratamento com lidocaína sobre a silicose experimental murina. Para tanto, camundongos Swiss-Webster foram instilados, por via intranasal, com partículas de sílica (0,5 – 10  $\mu\text{m}$ ) e as análises realizadas em diferentes tempos após o desafio. A lidocaína foi administrada sob forma de aerossol, em doses diárias de 1 e 2%, por sete dias consecutivos, iniciando-se 6 horas (fase inicial) ou 21 dias (tardia) após a instilação de sílica. Verificamos que os camundongos silicóticos apresentaram comprometimento da função pulmonar (aumento de resistência das vias aéreas e elastância pulmonar) e hiper-reatividade frente à metacolina. Observamos uma correlação temporal com a ocorrência de alterações morfológicas como infiltrado inflamatório, com presença de células F4/80 positivas (macrófagos), produção de citocinas e quimiocinas (CXCL2/MIP-2, CXCL-1/KC, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), progressiva fibrose e marcada formação de granulomas durante o curso da doença. O tratamento com lidocaína, na fase inicial, foi capaz de inibir as alterações de função pulmonar, infiltrado de macrófagos, produção de citocinas e a resposta fibrótica, tanto em 7 como em 28 dias após instilação da sílica. De forma contrária, a administração da lidocaína na fase tardia (21 dias) falhou em causar alteração ou reversão dos parâmetros analisados. Adicionalmente, demonstramos que a lidocaína foi capaz de inibir a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos alveolares (linhagem AMJ2C11) estimulados com sílica *in vitro*. Ademais, utilizando macrófagos derivados de medula óssea, diferenciados *in vitro* para os fenótipos M1 (próinflamatório) e M2 (anti-inflamatório), verificamos que apenas o subtipo M1 mostrou-se sensível ao tratamento com lidocaína, conforme atestado pela redução dos níveis de citocinas liberadas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ). Em conclusão, nossos resultados mostram que o tratamento com a lidocaína se mostrou eficiente em interferir somente com a fase de instalação da silicose, falhando quando administrada na condição do quadro fisiopatológico estabelecido. Isto pode ser atribuído, pelo menos em parte às propriedades anti-inflamatórias da lidocaína, conforme demonstrado pela inibição da atividade secretora de macrófagos possuidores de perfil próinflamatório (M1).

Palavras chave: Pulmão, sílica, inflamação, fibrose, lidocaína e macrófagos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDY OF LIDOCAINE'S ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-FIBROTIC EFFECT IN MURINE EXPERIMENTAL SILICOSIS.

### ABSTRACT

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Lívia Lacerda Mariano**

Silicosis is an occupational lung inflammatory disease caused by silica particle inhalation, being characterized a inflammation and fibrosis - there is no treatment available until now. Lidocaine is a local anesthetic showing anti-inflammatory activity already demonstrated in allergic processesess. In this study we investigated the effect of lidocaine treatment on a model of murine experimental silicosis. Swiss-Webster mice were instilled intranasally with silica particles (0.5 - 10  $\mu$ M) and the analyses were performed at different time points after challenge. Lidocaine was administered by aerosol 1 - 2% during seven consecutive days, starting 6 hours (initial phase) or 21 days (late phase) after silica instillation. We showed that silicotic mice exhibited decreased lung function (increased airways resistance and lung elastance) and hyper-reactivity after methacholine stimulation. A temporal correlation was noted concerning morphological alterations including inflammatory infiltrate F4/80 positive cells (macrophages), production of cytokines and chemokines (CXCL2/MIP-2, CXCL1/KC, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) and a progressive fibrosis and granuloma formation during the course of the disease. Treatment with lidocaine, at the initial phase, inhibited lung function alterations, macrophage infiltration, cytokine production and fibrosis, both at 7 and 28 days after silica instillation. In contrast, lidocaine administration at the late phase (21 days) failed to modify or reverse all the parameters analyzed. Additionally, we demonstrated that lidocaine inhibited TNF- $\alpha$  production by alveolar macrophages (AMJ2C11 lineage) stimulated with silica *in vitro*. Moreover, using bone-marrow derived macrophages differentiated *in vitro* to M1 phenotype (pro-inflammatory) and M2 phenotype (anti-inflammatory), we noted that only the M1 macrophages were sensitive to lidocaine as attested by reduced levels of cytokine release (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ). In conclusion, our results show that treatment with lidocaine was shown to be effective to interfere only with silicosis installation and failed when the physiopathology was already established. This could be attributed, at least partially, to the anti-inflammatory properties of lidocaine as shown by its ability to inhibit the secretory function of pro-inflammatory macrophages (M1).

Key words: lung, silicosis, silica, inflammation, lidocaine, macrophage

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEC – (3-Amino-9-EthylCarbazole) - 3-Amino-9-Etilcarbazole

AMJ2C11 – (Macrophage (alveolar); infected with J2 virus) – Macrófago alveolar infectado com vírus J2

ANOVA – (Analysis of Variance) – Análise de Variância

BSA – (Bovine Serum Albumin) – Albumina de Soro Bovino

CCL22/MDC – (Chemokine (C-C motif) ligand 22) – Ligantes de quimiocina (C-C) 22

CCL17/TARC - (Chemokine (C-C motif) ligand 17) – Ligantes de quimiocina (C-C) 17

CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratórios

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

CSF1 – (Colony stimulating factor 1) – fator estimulador de colônia 1

CXCL1/KC – (Chemokine (C-X-C motif) ligand 1) – Ligante de quimiocina (C-X-C) 1

CXCL2/MIP-2- (Chemokine (C-X-C motif) ligand 2)–Ligante de quimiocina (C-X-C) 2

DMEM – (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) – Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

DMSO – (Dimethyl Sulfoxide) – Dimetilsulfóxido

EDTA – (Ethylenediamine Tetraacetic Acid) – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA – (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) - Ensaio de imunoabsorção enzimática

EPM – Erro Padrão da Média

F4/80 – (Mature mouse macrophage marker (antibody)) – Marcador de macrófagos maduros de camundongos (anticorpo)



H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> - Ácido perbórico

HCL - Ácido clorídrico

H&E – Hematoxilina e eosina

HGF – (Hepatocyte growth factor) - Fator de crescimento de hepatócitos

HRP – (Horseradish peroxidase) - Peroxidase de rabanete

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ácido sulfúrico

IFN- $\gamma$  – (Interferon gamma) – Interferon gama

IgG – (Immunoglobulin G) – Imunoglobulina G

IL-1 $\beta$  – (Interleukin-1 beta) – Interleucina- 1 beta

IL-4 – (Interleukin-4) – Interleucina- 4

IL-13 – (Interleukin-13) – Interleucina- 13

KPO<sub>4</sub> – Tetraoxidofosfato de potássio

L929 – (L929 mouse fibroblastos) – Fibroblastos de camundongos L929

LPS – (Lipopolysaccharide) – Lipopolissacarídeo

M0 – Macrófagos não ativados

M1 - Macrófagos de fenótipo M1 (ativação clássica)

M2 - Macrófagos de fenótipo M2 (ativação alternativa)

M-CSF – (Macrophage colony stimulating factor) – Fator estimulador de colônia de macrófago

MDMO – Macrófago derivado de medula óssea

MMP – (Matrix metalloproteinase) - metaloproteinases de matriz

MSCs – (Mesenchymal Stem/Stromal Cells) – Células mesenquimais estromais

MTT – (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

NF- $\kappa$ B – (Factor nuclear kappa B) – Fator nuclear kappa B

PBMC – (Peripheral blood mononuclear cell) - Células mononucleares do sangue periférico

PBS – (Phosphate Buffered Saline) – Solução Salina Tamponada com Fosfato

p38 MAPK – (p38 mitogen-activated protein kinases) - proteínas quinases ativadas por mitógenos

RPMI – (Roswell Park Memorial Institute medium) - Meio Roswell Park Memorial Institute

SFB – Soro fetal bovino

TBS – (Tris Buffered Saline) – Tampão Tris Salina

Th1 – (T Helper 1) – célula T Auxiliar 1

Th2 – (T Helper 2) – célula T Auxiliar 2

TIMP – (Tissue inhibitor of metalloproteinase) - inibidores teciduais de metaloproteinases

TNF- $\alpha$  – (Tumor necrosis factor alpha) – Fator de necrose tumoral alfa

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
<b>Figura 3.1:</b> Esquema de tratamento com lidocaína.....	14
<b>Figura 3.2:</b> Retículo de linhas e pontos.....	15
<b>Figura 4.1:</b> Cinética de função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos instilados por via intranasal com sílica.....	20
<b>Figura 4.2</b> Cinética das alterações morfológicas no pulmão de camundongos instilados por via intranasal com sílica.....	21
<b>Figura 4.3:</b> Efeito da sílica sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos silicóticos.....	22
<b>Figura 4.4:</b> Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos na fase inicial da silicose.....	23
<b>Figura 4.5:</b> Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre alterações morfológicas no pulmão de camundongos na fase inicial da silicose.....	26
<b>Figura 4.6:</b> Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre a geração de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos na fase inicial da silicose.....	27
<b>Figura 4.7:</b> Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos na fase inicial da silicose.....	28
<b>Figura 4.8:</b> Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) na fase aguda sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos na fase tardia da silicose.....	29
<b>Figura 4.9:</b> Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) na fase aguda sobre alterações morfológicas no pulmão de camundongos na fase tardia da silicose.....	31
<b>Figura 4.10:</b> Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) na fase aguda sobre a geração de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos na fase tardia da silicose.....	32
<b>Figura 4.11:</b> Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) na fase aguda sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos na fase tardia da silicose	33
<b>Figura 4.12:</b> Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos na fase tardia da silicose.....	34
<b>Figura 4.13:</b> Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre alterações morfológicas no pulmão de camundongos na fase tardia da silicose.....	35
<b>Figura 4.14:</b> Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre a geração de	

mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos na fase tardia da silicose.....	36
<b>Figura 4.15:</b> Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos na fase tardia da silicose.....	37
<b>Figura 4.16:</b> Efeito da lidocaína sobre a ativação de macrófagos alveolares (linhagem AMJ2C11) estimulados com sílica <i>in vitro</i> .....	38
<b>Figura 4.17:</b> Avaliação da diferenciação de células derivadas da medula óssea de camundongos em macrófagos.....	40
<b>Figura 4.18:</b> Avaliação da viabilidade celular (%) de macrófagos derivados de medula óssea.....	41
<b>Figura 4.19:</b> Efeito da lidocaína sobre a produção de citocinas por macrófagos derivados de medula incubados com LPS (100 mg/mL) e IL-4 (10 ng/mL).....	42
<b>Figura 4.20:</b> Avaliação da viabilidade celular (%) de macrófagos derivados de medula óssea.....	42
<b>Figura 4.21:</b> Efeito da lidocaína sobre a produção de citocinas por macrófagos derivados de medula incubados com IFN- $\gamma$ (1 ng/mL) e IL-4 (10 ng/mL).....	43

## SUMÁRIO

	Páginas
Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Lista de Abreviaturas e siglas.....	vii
Lista de Figuras.....	x
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Pulmão.....	1
1.2. Pneumoconioses.....	2
1.2.1. Silicose.....	3
1.2.1.2. Epidemiologia.....	4
1.2.1.3 Sílica.....	5
1.3. Fisiopatologia.....	6
1.3.1. Células epiteliais.....	6
1.3.2. Macrófagos.....	7
1.3.3. Fibroblastos/Miofibroblastos/Fibrócitos.....	9
1.4. Tratamento.....	10
1.5. Anestésicos Locais.....	10
1.5.1. Lidocaína.....	11
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
3.1. Animais.....	13
3.1.2. Indução da silicose e tratamento.....	13
3.2. Avaliação da Função pulmonar e Hiper-reatividade das vias aéreas.....	14
3.3. Análise Histológica.....	15
3.3.1. Morfometria.....	15
3.4. Quantificação de Colágeno.....	16
3.5. Quantificação de Mediadores.....	16
3.6. Imunohistoquímica.....	17
3.7. Ativação de macrófagos <i>in vitro</i> .....	17
3.8. Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) de	

camundongos.....	17
3.8.1. Polarização e ativação de MDMO.....	18
3.8.2. Viabilidade Celular.....	18
3.9. Análise Estatística.....	18
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
4.1. Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos silicóticos.....	19
4.2. Alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos.....	19
4.3. Infiltrado de células F4/80 positivas no pulmão de camundongos silicóticos.....	19
4.4. Efeito do tratamento com lidocaína quando administrada na fase inicial da silicose em camundongos.....	22
4.4.1. Análise na fase inicial.....	23
4.4.2. Análise na fase tardia.....	25
4.5. Efeito do tratamento com lidocaína quando administrada na fase tardia da silicose em camundongos.....	30
4.6. Efeito do da lidocaína sobre a atividade de células AMJ2C11.....	38
4.7. Efeito da lidocaína sobre a ativação de subtipos de macrófagos (M1 e M2) murinos <i>in vitro</i> .....	39
4.7.1. Estabelecimento do modelo de macrófagos derivados de medula óssea (MDMO).....	39
4.7.2. Avaliação do efeito da lidocaína sobre a ativação de MDMO.....	39
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>

## **1- INTRODUÇÃO**

As disfunções respiratórias crônicas constituem um amplo espectro de alterações e incluem asma, rinite, enfisema, doenças de caráter ocupacional, hipertensão pulmonar, broncoqu Coastasia, doenças pulmonares intersticiais e distúrbios respiratórios do sono (1).

Observa-se um aumento na prevalência e gravidade das doenças respiratórias, principalmente em crianças e pessoas de idade avançada, e estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas em todo mundo sofram de doenças respiratórias crônicas, e dessa parcela, mais de 500 milhões de pessoas vivem em países em desenvolvimento (2). Apesar de muitas doenças respiratórias crônicas poderem ser prevenidas, como por exemplo as doenças ocupacionais, elas ainda causam muitos efeitos adversos, afetando a qualidade de vida e levando à invalidez dos indivíduos afetados. A Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Banco Mundial estimaram que 4,6 milhões de pessoas com doenças respiratórias crônicas em todo mundo iriam morrer prematuramente em 2005, e projetaram um aumento significativo dessas doenças em todo o mundo nos próximos anos (3).

Dentre as doenças respiratórias crônicas, podem-se destacar as de caráter ocupacional, que continuam a figurar como uma das principais causas de morbidade relacionada ao trabalho. A exposição a agentes químicos e tóxicos no ambiente de trabalho, principalmente em fábricas e indústrias, pode ser fatal para os trabalhadores ao longo do tempo, podendo afetar invariavelmente diferentes órgãos. Entretanto, devido à sua anatomia e fisiologia, o sistema pulmonar é um dos mais afetados no organismo devido à exposição de agentes tóxicos (2). Uma das dificuldades no tratamento e diagnóstico adequado dos pacientes, é que muitas vezes ocorre uma longa latência entre a exposição ao agente e o desenvolvimento dos sintomas clínicos, com muitos pacientes apresentando sintomas ou anormalidades radiográficas anos ou décadas após a exposição ter cessado (4).

### **1.1 PULMÃO**

O principal órgão do sistema respiratório são os pulmões. Eles estão localizados na cavidade torácica, recobertos por uma membrana serosa denominada pleura, e apoiados em um órgão músculo-membranoso, denominado diafragma. Os pulmões são responsáveis pela troca gasosa entre o ambiente e o sangue, e consistem em um par de brônquios primários que se ramificam a partir da traqueia dando origem a seções progressivamente mais finas das vias aéreas, denominados bronquíolos, os quais se abrem para a região alveolar ductal, local onde ocorrem as trocas gasosas (5).

O epitélio brônquico normal é formado por uma estrutura celular estratificada consistindo de uma camada de células secretoras e células ciliadas, suportadas por uma camada de células basais (6). No epitélio é possível identificar dois tipos de células epiteliais, também chamadas de células alveolares. Aquelas mais predominantes no tecido pulmonar são as células alveolares planas (pneumócito do tipo I), que cobrem cerca de 90% da superfície alveolar e são responsáveis pela troca gasosa. O segundo tipo celular é denominado de células alveolares cubóides (pneumócito do tipo II), e cobrem os 10% restantes da superfície alveolar. Estas células são mais resistentes que as células alveolares planas, e desempenham funções importantes no pulmão, como a produção de surfactante, transporte de íons, e servem como células progenitoras para a regeneração de células do tipo I após uma lesão (7).

As vias aéreas, das narinas aos alvéolos, em um ambiente de trabalho, entram em contato com 14.000 litros de ar durante apenas uma semana de trabalho de 40 horas. A atividade física no trabalho pode aumentar a ventilação, levando a um aumento na contabilidade de ar inalado, e aumentar em até doze vezes a exposição a contaminantes no ambiente (8). O pulmão é capaz de isolar tais contaminantes evitando que provoquem uma lesão ao tecido, como por exemplo, as substâncias podem ser fisicamente removidas do pulmão através do “clearance” mucociliar, ou do transporte por canais intersticiais e linfáticos que conduzem aos nódulos linfáticos. As substâncias também podem ser localmente detoxificadas por anticorpos ou neutralizadas no interior de células fagocíticas (9).

## **1.2 PNEUMOCONIOSES**

Pneumoconioses são um grupo de doenças do parênquima pulmonar que resultam da inalação de partículas inorgânicas no ambiente de trabalho. Algumas partículas são biologicamente inertes e não provocam qualquer doença clínica ou déficit na função pulmonar, enquanto que outras, como amianto e sílica cristalina, causam a destruição do parênquima pulmonar (10). Para algumas doenças há uma ligação muito clara entre a exposição e a doença, por exemplo, a silicose é causada apenas pela exposição às partículas de sílica. Já outras exposições podem provocar mais de um tipo de doença, ou mais um tipo de doença respiratória, como por exemplo, amianto pode provocar asbestose e provavelmente doença pulmonar obstrutiva crônica (11). Classicamente, estas partículas dão origem a padrões radiológicos característicos e profundo déficit na função pulmonar, com redução na capacidade de difusão do pulmão. Notadamente, a doença pode progredir anos após a exposição às partículas ter cessado (10).



Doenças pulmonares ocupacionais são uma das principais causas de comprometimento pulmonar em todo mundo, e estima-se que só no ano 2000 houve 386.000 mortes no mundo devido a problemas respiratórios, e quase 6,6 milhões de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (“DALY”) atribuídos à inalação de partículas no ambiente de trabalho (11). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que só as pneumoconioses consideradas clássicas, como a silicose, a asbestose e a pneumoconiose dos trabalhadores de carvão, resultaram na morte de 30.000 pessoas e cerca de 1,3 milhão de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade só no ano 2000 (12).

As doenças pulmonares podem ainda ser divididas em dois grandes grupos: as restritivas e as obstrutivas. As de caráter obstrutivo são caracterizadas pela obstrução do fluxo de ar em qualquer nível das vias aéreas, enquanto que as de caráter restritivo são caracterizadas pela diminuição da capacidade de extensão do parênquima pulmonar. As pneumoconioses, que estão dentre as doenças pulmonares de caráter ocupacional, podem ser divididas em fibrogênicas e não-fibrogênicas de acordo com o composto inalado. Os efeitos que tais compostos inalados podem provocar vão variar de acordo com a sua concentração, da duração de exposição e a forma química do composto. Como exemplo de pneumoconioses fibrogênicas tem-se a antracose, a silicose, a asbestose e a beriliose. Já a siderose, causada por óxido de estanho e a baritose são exemplos de pneumoconioses não-fibrogênicas (13)(14).

### **1.2.1 SILICOSE**

A silicose é uma doença pulmonar crônica causada pela inalação de partículas de sílica cristalina. A exposição ocorre mais comumente em indústrias que cortam, moem ou perfuram pedras, azulejo, alvenaria e concreto contendo sílica, e incluem as atividades na fabricação de tijolos, concreto, e cerâmica, jateamento de areia e fundições (12).

Existem diversas categorias clínicas para esta pneumoconiose, as quatro principais formas clínicas incluem: silicose simples (nodular), silicose complicada, silicose acelerada e silicose aguda (silicoproteinose). A silicose simples ocorre de 10 a 20 anos de baixa a moderada exposição à sílica, e não causa sintomas ou comprometimento respiratório, com os pacientes apresentando nódulos de 1 – 9 mm nas regiões superiores do pulmão. A silicose complicada é a forma mais comum da doença, e é definida pela presença de fibrose coalescente nas regiões centrais e periféricas dos pulmões. Esta forma da doença ocorre após 10 anos ou mais de exposição a baixas concentrações de sílica, é extremamente debilitante e leva à dispnea e comprometimento da função respiratória. A silicose acelerada é definida como o rápido desenvolvimento da silicose complicada devido a exposições a uma quantidade

muito elevada de sílica em um curto período de tempo. A silicose aguda ocorre 1 a 3 anos após alta exposição às partículas de sílica, com os pacientes apresentando falta de ar progressivamente. Nesta forma da doença, ocorre uma alta proliferação de pneumócitos do tipo II, com produção excessiva de surfactante, enchendo os espaços alveolares com material lipoproteináceo (15)(12).

Os pacientes com silicose desenvolvem não apenas complicações respiratórias, como bronquite crônica, enfisema e fibrose pulmonar, mas também doenças autoimunes. As doenças autoimunes tipicamente relacionadas com silicose incluem artrite reumatóide (também conhecida como síndrome de Caplan), lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica e vasculite associada a anticorpo citoplasmático anti-neutrófilos (16).

O diagnóstico de uma doença pulmonar ocupacional depende de um histórico de avaliação completo, sem o qual o diagnóstico de silicose poderia facilmente ser descartado na ausência de lesões nodulares típicas nos pulmões. O diagnóstico de silicose se baseia em um histórico da exposição às partículas de sílica e características radiológicas compatíveis, juntamente com a exclusão de outros diagnósticos como tuberculose miliar, sarcoidose, infecções fúngicas, fibrose pulmonar idiopática, carcinoma e outras doenças intersticiais (17). Através da tomografia computadorizada de alta resolução, a silicose é determinada como múltiplos nódulos, de 2 – 5 mm localizados predominantemente nas regiões superior e posterior dos pulmões, e concentrados em uma distribuição centro lobular (4).

### **1.2.1.2 EPIDEMIOLOGIA**

Embora a silicose possa ser prevenida pelo controle de poeira no local de trabalho e uso de máscaras, esta doença continua a ser um problema no mundo todo, principalmente em países em desenvolvimento. As fontes de sílica são numerosas, dado que este é o mineral mais abundante na crosta terrestre e presente em matérias-primas de uma ampla gama de setores industriais (18).

Os dados epidemiológicos relativos à silicose são, de maneira geral, escassos e muitas vezes subestimados, principalmente em países de baixa ou média renda. Durante o período de 1968 – 2002 estima-se que a silicose foi responsável ou contribuiu com a causa de morte de cerca de 74 milhões de óbitos nos Estados Unidos. De acordo com o Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos, cerca de 3,7 milhões de trabalhadores, que trabalham na agricultura neste país, estiveram expostos à sílica em 2002 (19). Na Índia estima-se que 11,5 milhões de trabalhadores estão expostos à sílica (20), e a China teve mais de 500 mil casos registrados entre 1991 e 1995, e mais de 6.000 novos casos e 24.000 mortes

reportadas anualmente. No Brasil, só na área de mineração em Minas Gerais, foram notificados 4500 casos de silicose nos trabalhadores entre 1978 e 1998, e estima-se que o número de trabalhadores potencialmente expostos no país seja de 6 milhões, sendo cerca de 500 mil só na mineração e garimpo (17)(21).

### 1.2.1.3 SÍLICA

A sílica é um mineral formado por um átomo de silício e dois átomos de oxigênio ( $\text{SiO}_2$ ), podendo se apresentar na forma cristalina e não-cristalina (amorfa). Como o oxigênio e o silício são tão abundantes na crosta terrestre, muitos minerais contém sílica, geralmente combinados com outros elementos, como alumínio, ferro e magnésio. Existem seis formas naturais de sílica livre cristalina, a maioria bastante rara e produzida sob forte calor e pressão. As formas de sílica cristalina mais comumente reconhecidas por causar a doença são quartzo, cristobalita, tridimita, moganita, coesita e estichovita. Dentre estes minerais, o quartzo é de longe a forma polimórfica mais comum, e por consequência mais associado à silicose. A sílica livre em sua forma amorfa é considerada menos perigosa que a forma cristalina, entretanto, sob calor e pressão a forma amorfa pode mudar sua estrutura para a forma polimórfica cristalina. Por exemplo, a terra de diatomáceas, utilizada comercialmente como material de filtração e isolamento, é sílica em sua forma amorfa formada por esqueletos de diatomáceas, e pode ser convertida em cristobalita sob aquecimento e trituração (22)(23).

A sílica recém-fraturada é considerada mais tóxica, e esse aumento em toxicidade se deve ao potencial redox na superfície da sílica, que é altamente reativa com hidrogênio, oxigênio, carbono, e por vezes, nitrogênio. O fraturamento da sílica leva à formação de radicais  $\text{Si}^\cdot$  e  $\text{SiO}^\cdot$ , que reagem com água e produz o radical hidroxila (-OH), extremamente danoso às estruturas celulares. Em conjunto, na presença de água, a superfície da sílica se torna hidratada, levando à produção de grupos silanóis (-SiOH). Esses grupos silanóis podem ser doadores de hidrogênio, formando pontes de hidrogênio com macromoléculas da membrana plasmática das células, resultando em forte interação entre a sílica e a membrana biológica, causando dano ao tecido. Uma segunda teoria, diz que em pH 7, um em cada trinta grupos silanóis se torna negativamente carregado, e partículas negativamente carregadas podem interagir com receptores “scavenger” em macrófagos alveolares, ativando a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e citocinas inflamatórias. As diferenças estruturais das formas polimórficas de sílica cristalina são consideradas importantes para a sua reatividade biológica, por exemplo, quartzo é mais reativo que a tridimita, que é mais reativa que a cristobalita e, esta é mais reativa que a coesita (24)(22)(23).

### **1.3 FISIOPATOLOGIA DA SILICOSE**

Uma vez inaladas, as partículas de sílica vão se depositar nos alvéolos e bronquíolos respiratórios. Se a quantidade de sílica inalada for superior à capacidade do “clearance” mucociliar e do sistema linfático, de remover as partículas do pulmão, elas acabam por provocar um processo inflamatório (24). Os macrófagos alveolares, as células epiteliais e os fibroblastos podem ser ativadas pelas partículas de sílica e produzem uma gama de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e metabólitos de ácido araquidônico (eicosanoides). Esses mediadores levam ao recrutamento de células inflamatórias, como neutrófilos, monócitos e linfócitos, dando origem à alveolite e consequente perda da barreira epitelial, ampliando assim o processo inflamatório no interstício pulmonar. Embora o processo de lesão ao tecido seja iniciado pelas próprias partículas de sílica, devido ao seu tamanho e o potencial redox da sua superfície, as lesões adicionais estão associadas ao influxo de células inflamatórias. As espécies reativas de oxigênio e as enzimas proteolíticas liberadas pelas células inflamatórias causam danos celulares, apoptose e a ruptura da matriz extracelular (25)(22).

O processo inflamatório, apesar de persistente, devido à incapacidade de destruição das partículas de sílica pelas células inflamatórias, é seguido por um processo de reparação tecidual. As células inflamatórias e estruturais passam a produzir citocinas fibrogênicas e fatores de crescimento que estimulam o recrutamento e proliferação de células mesenquimais, diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos, regulam a neovascularização e re-epitalização do tecido lesionado. Em seguida, ocorre a deposição de matrix extracelular, principalmente colágeno do tipo I e tipo III, proteoglicanos e fibronectina, e remodelamento tecidual com a participação de metaloproteinases, elastases e catepsinas. No caso da silicose, a presença de partículas minerais, impossíveis de serem destruídas por células fagocíticas no pulmão, leva à ativação contínua de células inflamatórias e residentes, com a produção incessante de mediadores inflamatórios e fibrogênicos, culminando em uma resposta inflamatória crônica, reparação tecidual prejudicada e consequente fibrose pulmonar (25)(26). Vários são os tipos celulares envolvidos no quadro inflamatório pulmonar.

#### **1.3.1 CÉLULAS EPITELIAIS**

As células epiteliais formam o revestimento de superfícies e cavidades corporais, e formam folhetos unindo-se umas às outras por meio de junções intercelulares. No pulmão, o epitélio é formado por dois tipos celulares, os pneumócitos do tipo I e do tipo II, que

funcionam como barreira física e são essenciais para a manutenção da homeostase e balanço hídrico pulmonar (27).

Como uma barreira entre o ambiente externo e o meio interno, o epitélio brônquico está exposto a todo momento a vírus, bactérias, poluentes tóxicos e alérgicos capazes de causar lesão tecidual diretamente por citotoxicidade ou proteólise, e indiretamente através de células inflamatórias (6). Entretanto, inicialmente acreditava-se que o epitélio pulmonar era capaz de funcionar apenas como uma barreira física a patógenos, impedindo a invasão do tecido pulmonar por substâncias e microorganismos prejudiciais ao organismo. Além desta importante função, cada vez mais evidências mostram o papel ativo dos pneumócitos na defesa do organismo, iniciando e ampliando os mecanismos de defesa nas vias aéreas. Como por exemplo, as células epiteliais são capazes de produzir uma gama de mediadores inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, e fatores de crescimento capazes de ativar a resposta imune e regular o processo inflamatório. As células epiteliais também são capazes de produzir moléculas do sistema imune inato, como as defensinas, que são peptídeos antimicrobianos capazes de destruir diretamente os microorganismos. Também desempenham um importante papel na regeneração do tecido após uma lesão, sendo capazes de proliferar e substituir o tecido lesado por novas células epiteliais (28)(29).

### **1.3.2 MACRÓFAGOS**

No final do século 19, Metchnikoff introduziu o conceito de macrófagos e os descreveu como células fagocíticas. Desde então, foram descobertos fatores dinâmicos para definir populações de células heterogêneas identificadas por diferenças de maturação, migração nos tecidos, fenótipos e interação celular. A presença e gravidade da inflamação no tecido são primordiais na definição de subpopulações dessas células (30). Os macrófagos estão localizados em vários tecidos pelo organismo e, dependendo do órgão, recebem denominação diferente, por exemplo, células de kupfer no fígado, osteoclasto no osso, microglia no sistema nervoso central e macrófagos alveolares no pulmão. Todos contribuem para a homeostase do tecido em que se encontram e na iniciação da resposta inflamatória desencadeada por um elemento lesivo (31).

Os macrófagos são extremamente potentes na produção de mediadores pró-inflamatórios que contribuem para a resposta inflamatória local, e subsequentemente para a resposta inflamatória sistêmica. Na resposta inflamatória local, macrófagos são capazes de reconhecer patógenos por receptores do tipo toll, e receptores “scavenger” e produzem uma

gama de citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), importantes para a amplificação da resposta inflamatória.

Monócitos são uma população de leucócitos mononucleares provenientes de células precursoras da medula-óssea. Os monócitos são liberados na corrente sanguínea, de onde migram para os tecidos. Estas células compreendem um reservatório de precursores mielóides no sangue, e são definidas como as células mononucleares do sangue (32). Macrófagos são células mononucleares, com capacidade fagocítica, presentes nos tecidos. Embora se saiba que monócitos derivados do sangue são capazes de se diferenciar em macrófagos e células dendríticas nos tecidos, estudos recentes revelaram que macrófagos teciduais adultos são derivados de células progenitoras embrionárias. Estas células progenitoras embrionárias dão origem a macrófagos que se estabelecem em diferentes tecidos do corpo, que persistem e mantêm durante a vida adulta a quantidade de macrófagos nos tecidos (33).

Entretanto, apesar de seu papel crucial na imunidade e homeostase, os macrófagos e monócitos contribuem em processos patológicos no tecido. Embora os monócitos possam claramente se diferenciar em macrófagos durante a inflamação no tecido, está bem fundamentado que os macrófagos teciduais residentes no pulmão têm origem no fígado fetal durante o desenvolvimento embrionário, e diferem-se da população de macrófagos derivados de monócitos da medula-óssea durante o processo inflamatório (33).

Em resposta a diversos sinais no organismo, os macrófagos podem assumir uma ativação clássica, conhecidos como M1, estimulados por ligantes de receptores “toll” e IFN- $\gamma$ ; ou uma ativação alternativa, conhecida como M2, estimulados por IL-4 e IL-13. Uma vez que os macrófagos são importantes células efetoras e reguladoras do sistema imune, o seu estado de ativação influencia a formação de outros componentes da resposta imune. O fenótipo M1 é caracterizado pela expressão de níveis elevados de citocinas próinflamatórias, alta produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e promoção de uma resposta de perfil Th1, com forte atividade microbicida e anti-tumoral. Já o fenótipo M2, destaca-se pela produção de poliaminas e citocinas anti-inflamatórias, e estão envolvidos na promoção do remodelamento tecidual, progressão de tumores e funções imunoreguladoras. Além disso, em processos patológicos ocorrem mudanças dinâmicas no perfil de ativação dos macrófagos, com células do perfil M1 implicadas em iniciar e sustentar a resposta inflamatória, enquanto que o perfil M2 está associado à resolução da mesma (34)(35).

Os macrófagos participam como importantes células-alvo na fisiopatologia da silicose. Uma vez que as partículas de sílica são inaladas, elas irão se depositar nos alvéolos pulmonares sendo em seguida fagocitadas por macrófagos alveolares. A ligação de partículas

de sílica a receptores “scavenger” em macrófagos também resulta na apoptose de macrófagos e liberação de mediadores, como citocinas pró-inflamatórias, que contribuem para a inflamação dos pulmões e fibrose tecidual (36).

### **1.3.3 FIBROBLASTOS/MIOFIBROBLASTOS/FIBRÓCITOS**

Os fibroblastos são células derivadas do mesênquima primitivo, com morfologia fusiforme e presente em todos os tecidos do corpo humano. São as principais células do tecido conjuntivo, e sintetizam e degradam componentes da matriz extracelular, como por exemplo, produzem colágenos, fibronectina, laminina, elastina, proteoglicanos, integrinas, metaloproteinases de matriz (MMP), e inibidores tecidulares de metaloproteinases (TIMP). Conseqüentemente, os fibroblastos são responsáveis por fornecer a integridade estrutural para a maioria dos tecidos. Os fibroblastos também são capazes de produzir componentes da membrana basal específica de cada tecido, que proporciona uma barreira protetora em torno do epitélio, contribuindo assim para a especificidade, polaridade, e a funcionalidade do epitélio (37).

Os miofibroblastos são fibroblastos que sofreram uma transdiferenciação durante o processo inflamatório, passando a exibir uma alta expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso, o que lhes permite exercer forças contráteis para fechar as feridas. São uma importante fonte de colágeno do tipo I e de citocinas inflamatórias e fibrogênicas (38). Já os fibrócitos são células hematopoiéticas derivadas da medula óssea, precursoras de fibroblastos e implicados na inflamação crônica, fibrose e cicatrização de feridas (39).

Quando ocorre uma lesão tecidual, os fibroblastos proliferam e invadem a área lesada em resposta à coagulação das plaquetas. As plaquetas aderem ao subendotélio exposto nos locais de lesão de vasos sanguíneos e liberam grânulos que degradam a membrana basal, induzem proliferação celular, migração e recrutam células inflamatórias e fibroblastos. Após o fechamento da ferida, o balanço entre metaloproteinases e inibidores de metaloproteinases é alterada para favorecer a degradação de matriz extracelular, o que leva à apoptose de miofibroblastos. Por conseguinte, apenas os fibroblastos quiescentes permanecem no local da cicatrização, e como tal, miofibroblastos só são observados em condições patológicas (37)(40).

## 1.4 TRATAMENTO

A silicose é uma doença passível de precaução, entretanto, uma vez que a doença é adquirida, não existe tratamento eficaz disponível até o momento. Sendo assim, a prevenção e o diagnóstico precoce são essenciais para que a doença seja controlada (41). Uma vez que a silicose é diagnosticada, a exposição à sílica deve ser evitada imediatamente para evitar a progressão da doença. A deficiência respiratória é um quadro muito comum nesta doença e o tratamento recomendado para esses pacientes é semelhante ao tratamento utilizado nas pessoas com doença pulmonar obstrutiva crônica, que têm como objetivo aliviar os sintomas da insuficiência respiratória, com o uso de oxigênio e antitussígenos (42).

Os tratamentos com corticosteróides e citrato de alumínio têm sido utilizados. No entanto o sucesso de tais compostos é extremamente variável e o uso prolongado de corticosteróides, por exemplo, pode levar a uma série de reações adversas como perda óssea, diminuição nos níveis de testosterona, atrofia da supra-renal e perda da força muscular. A utilização da técnica de lavagem broncoalveolar pode melhorar os sintomas em alguns pacientes, no entanto, esses pacientes não demonstram uma melhoria ao longo do tempo nos parâmetros de função pulmonar (43).

Mais recentemente, algumas pesquisas vêm demonstrando graus variados de sucesso na busca por tratamentos alternativos para a silicose, como por exemplo, o uso de uma imunotoxina recombinante composta de IL-13 humana e uma forma mutada da exotoxina de *Pseudomonas* (44), o tratamento com células-tronco mesenquimais (MSCs) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (45), e a administração de células derivadas da medula óssea (PBMC) no pulmão (46).

## 1.5 ANESTÉSICOS LOCAIS

Os anestésicos locais são uma classe de drogas capazes de impedir, de forma reversível, a transmissão do estímulo nervoso no local aplicado, e exercem sua ação através do bloqueio de canais de  $\text{Na}^+$  em células excitáveis. A estrutura dos anestésicos locais utilizados clinicamente é composta de um anel aromático (hidrofóbico), ligado a uma amina terciária (hidrofóbica) ou quaternária (hidrofílica) por uma cadeia intermediária que contém uma ligação amida ou éster. Assim, as moléculas são classificadas como amino-amina ou amino-éster (47).

Quando o anestésico local é aplicado, a forma lipossolúvel (não-ionizada) difunde-se através da membrana plasmática para o interior da célula, onde encontra um pH mais baixo e



se ioniza. No interior da célula a forma ativa da droga é capaz de interagir de modo específico com os canais de Na<sup>+</sup> para bloqueá-los e impedir a transmissão do potencial de ação (48). A atividade farmacológica de cada anestésico local é determinada por suas propriedades físico-químicas. Estas incluem a lipossolubilidade, ligação a proteínas plasmáticas, e o pKa de cada molécula. Essas propriedades podem ser usadas para explicar o comportamento clínico de cada anestésico, sua potência, duração e toxicidade (47)(49).

Está bem descrito na literatura que anestésicos locais possuem outras ações além de suas ações anestésicas e antiarrítmicas. Esses efeitos resultam da interação dos anestésicos locais com outros sistemas celulares, e um desses efeitos é a atividade anti-inflamatória dessas moléculas. Curiosamente, a concentração necessária para se obter uma atividade anti-inflamatória é muito abaixo da necessária para se obter o bloqueio dos canais de Na<sup>+</sup>, sugerindo que essa ação anti-inflamatória não resulta primariamente do bloqueio dos canais de sódio (50)(51).

### **1.5.1 LIDOCAÍNA**

A lidocaína é um anestésico local do grupo amino-amida, e foi descoberta em 1943, por Lofgren, com a vantagem de ser uma molécula menos alergênica que os anestésicos locais anteriores, com reduzida toxicidade e podendo ser esterelizada (52).

Largamente utilizada como agente antiarrítmico e anestésico local na clínica, muitas pesquisas destacam o papel anti-inflamatório da lidocaína. Diversos estudos apontam o efeito desta droga sobre células estruturais e células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos, e linfócitos, levando a redução da migração e “priming” das mesmas, e da produção de citocinas pró-inflamatórias (53)(54)(55)(56)(57)(58)(59). A lidocaína também é capaz de atuar *in vivo* prevenindo a inflamação das vias aéreas, fibrose peribrônquica, produção de muco, e hiperreatividade das vias aéreas em modelo de asma em camundongos (60)(61), bem como atenuando a lesão pulmonar, aspiração, lesão de reperfusão e lesão pulmonar induzida por hiperóxia em coelhos (62), aumentando assim a possibilidade do uso da lidocaína no controle de doenças inflamatórias crônicas.

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Visto que a silicose é uma doença pulmonar de caráter inflamatório fibrótico, sem tratamento disponível, e a lidocaína uma molécula com propriedades anti-inflamatórias, neste estudo investigamos o efeito do tratamento com lidocaína sobre a resposta pulmonar desencadeada pela instilação de partículas de sílica em camundongos. De forma complementar, buscamos esclarecer o mecanismo de ação da lidocaína durante o desenvolvimento da silicose.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para tanto foram avaliados:

- ❖ A cinética de comprometimento da função pulmonar (resistência e elastância) e da hiper-reatividade das vias aéreas, de alterações morfológicas e do conteúdo de células F4/80 positivas no pulmão de camundongos estimulados por sílica (7 - 28 dias);
- ❖ O efeito do tratamento com lidocaína sobre a função pulmonar (resistência e elastância) e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos estimulados com sílica;
- ❖ O efeito do tratamento com lidocaína sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos estimulados com sílica;
- ❖ O efeito do tratamento com lidocaína sobre a geração de mediadores inflamatórios e pró-fibróticos no pulmão de camundongos estimulados com sílica;
- ❖ O efeito do tratamento com lidocaína sobre o infiltrado de células F4/80 positivas no pulmão de camundongos estimulados com sílica;
- ❖ O efeito da lidocaína sobre a atividade de macrófagos alveolares (linhagem AMJ2C11) *in vitro*;
- ❖ O efeito da lidocaína sobre a polarização de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos;
- ❖ O efeito da lidocaína sobre a ativação de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos, após polarização em M1 e M2.

### 3.0– MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1 – ANIMAIS

Camundongos Swiss-Webster machos, pesando de 18 a 20 g, foram utilizados para o desenvolvimento do projeto. Os animais foram provenientes do Centro de Criação de Animais (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz, com todos os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) (Licença 0213-4), e mantidos sob condições de temperatura entre 25° e 28°C, em ciclo de luz definido como 12 h de claro e escuro, com livre acesso à ração e água.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (n=8/grupo):

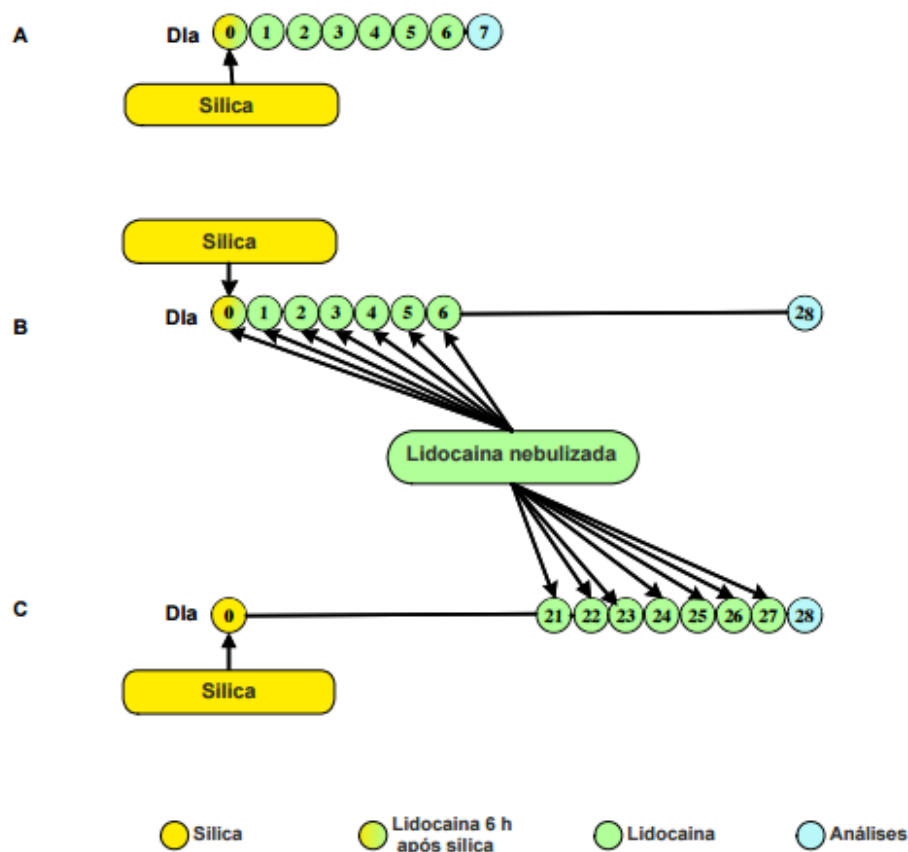
1. Salina – Animais instilados com solução salina 0,9% no dia 0;
2. Sílica – Animais instilados com sílica no dia 0;
3. Sílica + tratamento com lidocaína (1%) - Animais instilados com sílica e tratados com lidocaína (1%);
4. Sílica + tratamento com lidocaína (2%) - Animais instilados com sílica e tratados com lidocaína (2%).

#### 3.1.2 – INSTILAÇÃO DE SÍLICA E TRATAMENTO

Os camundongos foram anestesiados com halotano (Tanohalo, Cristália, São Paulo) e, em seguida, instilados com 10 mg de sílica (SiO<sub>2</sub>, S-5631 Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) (de tamanho de partícula 0,5 - 10 µm), diluídos em 50 µl de solução salina (0,9%) estéril, seguindo um modelo de indução de silicose previamente estabelecido no laboratório (44). O grupo controle recebeu igual volume de solução salina (0,9%) estéril intranasal. As análises foram realizadas 7 ou 28 dias após a instilação de sílica (**Figura 3.1**).

A lidocaína foi nebulizada uma vez ao dia, por 7 dias consecutivos em um tempo médio de 30 minutos. Para a fase aguda (7 dias), o início deu-se 6 h após a instilação de sílica e para a fase crônica (28 dias) o tratamento foi iniciado no dia 21. Animais controles foram nebulizados com solução salina.

Para esse estudo, adotamos concentrações de lidocaína já utilizadas na clínica. Para tanto, a lidocaína foi preparada imediatamente antes do uso nas concentrações de 1% e 2% (63)(64). A dose de 1% de lidocaína equivale a aproximadamente 2,4 mg/kg por animal, enquanto a dose de 2% equivale a aproximadamente 4,8 mg/kg por animal. A lidocaína (1 e 2%) foi administrada, sob a forma de aerossol, uma vez ao dia durante 7 dias consecutivos, seguindo os protocolos 1 (fase inicial) e 2 (fase tardia).



**Figura 3.1** – Esquema de tratamento com lidocaína.

### 3.2 – AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO E HIPER-REATIVIDADE PULMONAR

Adotamos o pletismógrafo invasivo de corpo inteiro (Sistema Buxco, UK) para investigar a funcionalidade do tecido pulmonar dos animais utilizados, com foco nos parâmetro de resistência das vias aéreas (cmH<sub>2</sub>O/mL/s) e elastância tecidual (mL/cmH<sub>2</sub>O). Para tanto, ao atingirmos o tempo de análise (7 ou 28 dias), os animais foram anestesiados com nembutal i.p. (60 mg/kg), traqueostomizados para a introdução de uma cânula, e, em seguida, submetidos a um bloqueio neuromuscular com brometo de pancurônio (Pavulon®, 1 mg/kg). Os animais foram posicionados em uma cama aquecida que auxiliava na manutenção da temperatura corporal dos mesmos. A cânula traqueal foi conectada a um ventilador respiratório, onde parâmetro como fluxo de ar foi mantido constante. Foi introduzido por via oral um cateter preenchido com água para captura da pressão esofágica. O pneumotacógrafo acoplado à câmara do pletismógrafo coletou o fluxo respiratório. Um transdutor ligado à câmara permitiu que os dados de pressão esofágica e pressão resultante do fluxo fossem transferidos para um computador. O software BioSystem XA processou os sinais de fluxo e pressão, determinando parâmetros importantes como a resistência e a elastância (Hoymann, 2007). Para avaliação da hiper-reatividade pulmonar foi realizada aerolização de

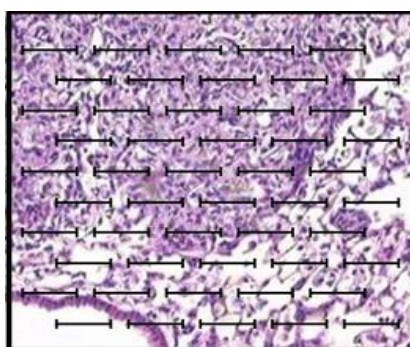
concentrações crescentes e cumulativas do agente broncoconstritor metacolina (3 - 27 mg/mL) por um período de 5 minutos para cada dose. Na sequência, os animais foram mortos com pentobarbital, 500 mg/kg i.p e foi realizada perfusão pulmonar com solução salina (0,9%) , contendo EDTA (10mM). O pulmão direito foi retirado, congelado e armazenado em freezer - 80°C para posteriores análises e o pulmão esquerdo processado para a avaliação histológica.

### 3.3 – ANÁLISE HISTOLÓGICA

O pulmão esquerdo foi perfundido com solução de paraformaldeído tamponado a (4%) e fixado em formol tamponado a 10% (24 h). O tecido sofreu consecutivas etapas de desidratação com etanol e clarificação em xilol. Em sequência, foi executada a impregnação com parafina no tecido, confecção dos blocos e realização de cortes histológicos de 5 µm de espessura. Os cortes foram corados com Hematoxilina/Eosina (H&E) para acesso a detalhes da estrutura do parênquima pulmonar.

#### 3.3.1 – MORFOMETRIA

A análise morfométrica foi obtida com o auxílio de um retículo composto de 50 linhas e 100 pontos (**Figura 3.2**) acoplado ao microscópio de luz (Olympus – U-TV1X). Em um aumento de 200X foram contados vinte campos aleatórios correspondentes aos pontos do retículo que se sobrepuseram aos granulomas. O número de pontos na área de granuloma foi dividido pelo total de pontos contados no retículo analisado e o valor percentual total da presença de granulomas foi calculado de acordo com a média  $\pm$  e erro padrão da média (EPM) no Excel e os valores foram expressos como (%) do tecido pulmonar ocupado por granuloma.



**Figura 3.2** – Retículo de linhas e pontos.

### 3.4 – QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO

Para a quantificação de fibras colágenas no tecido pulmonar foi utilizada a técnica colorimétrica de Sircol. O tecido pulmonar foi processado em solução TRIS 0.05M + NaCl 1M, em seguida o material foi centrifugado a 15000 g por 1 h a 4°C. O reagente Sirius Red foi adicionado a uma alíquota do sobrenadante, e após 30 min de reação o material foi novamente centrifugado, o sobrenadante descartado, ao “pellet” foi adicionado o reagente Alkaline. As amostras foram adicionadas em placas de 96 poços, e a absorbância foi lida em 590 nm. O resultado foi expresso em µg de colágeno/pulmão direito.

### 3.5 – QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Para avaliar a geração de citocinas e quimiocinas inflamatórias (CXCL2/MIP-2, CXCL1/KC, TNF-α e IFN-γ) no tecido pulmonar foi utilizada a técnica de ELISA. Foram utilizados kits comerciais (R&D System, Estados Unidos), sendo seguidas as recomendações do fabricante. Primeiramente, o tecido pulmonar foi macerado em uma solução PBS 1x contendo Triton (0,1%) e um coquetel de inibidores de proteases (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suíça). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram recolhidos e diluídos com *Assay Buffer* e soro fetal bovino (2%), sendo em seguida armazenados entre 4 e 8°C por 24h.

Para quantificação dos mediadores foi utilizado o kit® Duo Set (R&D System) de acordo as especificações do fabricante. Foram utilizadas placas de 96 poços, as quais foram adicionadas 50µL/poço de anticorpos de captura diluídos em solução tampão 1 (NaCl 1.5M, H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 0,5M e NaOH 1N, pH = 7.4) e incubadas por um período de 12 horas a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes (200 µL/poço) com solução tampão 2 (timerosal, KPO<sub>4</sub> 1M e Tween 20 0,005%), e em seguida para o bloqueio de ligação dos anticorpos aos sítios inespecíficos, os poços foram preenchidos (200 µL/poço) com solução contendo PBS e albumina de soro bovino (BSA, 1%). Após 1 hora em temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas 3 vezes (200 µL/poço) com solução tampão 1. As amostras e a curva padrão foram diluídas em solução tampão 2 (soro fetal bovino 2% em PBS) e adicionadas aos poços (100 µL/poço). Após o período de incubação (2 h a 37°C) os poços foram lavados 3 vezes com solução tampão 1. A seguir foi adicionado (50 µL/poço) o anticorpo de detecção biotilado (50 µg/mL) e prosseguiu com o período de incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Na sequência os poços foram lavados (200 µL/ poço) com solução tampão 1, seguido pela fase de incubação por 1 hora a temperatura ambiente (50 µL/ poço) com a neutravidina peroxidase (HRP) diluído no tampão 2.

Após a última lavagem com solução tampão 1 (200 µL/poço), foi adicionado o substrato (K-Blue®) (50 µL/poço) para o desenvolvimento da reação colorimétrica (aproximadamente 5 a 30 minutos), a qual foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,19 M). Foi realizada a leitura das placas em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como pg/pulmão direito.

### **3.6 – IMUNOHISTOQUIMICA**

Esta técnica foi utilizada para detecção de células positivas para F4/80 (macrófagos) presentes no tecido pulmonar dos camundongos. Os cortes de tecido pulmonar sofreram um processo de desparafinização, e em seguida foram hidratados com TBS pH 7.6, bloqueados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a (3%) em metanol por 15 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes com TBS e bloqueadas com Tris-HCL 0,05M PH 7.6 + BSA 5% por 1 hora. O anticorpo primário anti-F4/80 (MCAP 497, Serotec, USA) foi diluído em Tris-HCL 0,05M pH7.6 na proporção de 1:100. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário por 12 horas a 4°C, e após incubação as lâminas foram lavadas duas vezes com TBS. O anticorpo secundário, anti-IgG de cabra HRP conjugado (STAT 72, Serotec, USA), foi diluído em tris-HCl na proporção 1:80 e incubado por 2 horas. A revelação foi realizada com AEC por aproximadamente 15 minutos, e em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada, contra-coradas com hematoxilina de Mayer e montadas em meio aquoso contendo gelatina.

### **3.7 – ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS *IN VITRO***

Para avaliar o efeito do tratamento com lidocaína sobre macrófagos foi utilizada uma linhagem de macrófagos alveolares murinos AMJ2C11. Para tanto, as células foram adicionadas a placas de 24 poços em uma densidade de  $2,5 \times 10^5$  células por poço, em quadruplicata. Após 1 h, as células foram incubadas com diferentes concentrações de lidocaína ( $10^{-11}$  M a  $10^{-3}$  M) e 1 h após, estimuladas com partículas de sílica (300 µg/mL de sílica) diluídas em meio DMEM. Após 24 h o sobrenadante foi recolhido para quantificação de TNF- $\alpha$ .

### **3.8 – OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA (MDMO) DE CAMUNDONGOS**

As células foram recuperadas, a partir dos dois fêmures provenientes de animais normais, e em seguida colocadas em placas de petri, e incubadas com 20% do sobrenadante da linhagem celular L929 (fonte de M-CSF) + 10 mL de meio RPMI (20% SFB), mantidas a

37°C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após 3 dias, foram adicionados 10 mL de meio RPMI (20% SFB) às placas e feita incubação por mais 7 dias. Ao final deste período, foram 5 mL de PBS gelado e as células recuperadas com o auxílio de um “scrap”.

### **3.8.1 – POLARIZAÇÃO E ATIVAÇÃO DE MDMO**

Para indução do processo de polarização, as células recuperadas (item 3.8) foram adicionadas a placas de 96 poços, contendo meio RPMI (10% SFB), na densidade de  $3 \times 10^5$  células por poço, em triplicata. Uma hora após, as células foram incubadas com LPS (100 ng/mL) para polarização de perfil M1, ou com IL-4 (10 ng/ml) para polarização de perfil M2. Após 48 h, o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20°C para posterior análise. Em um segundo protocolo, as células foram polarizadas para M1 mediante incubação com IFN- $\gamma$  (1 ng/mL) ou IL-4 (10 ng/mL) para M2 por 24 h, a 37°C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram estimuladas com LPS (100 ng/mL) e 48 h após, o sobrenadante foi recolhido e armazenado para posteriores análises.

### **3.8.2 – VIABILIDADE CELULAR**

Para a análise de viabilidade celular foi utilizado um ensaio colorimétrico que consta da utilização do reagente 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-yl) - 2,5 - difeniltetrazolium brometo (MTT). Para tanto, as células foram adicionadas a uma placa de 96 poços na densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço. Diferentes concentrações de lidocaína foram adicionadas às células 24 h após o plaqueamento. Após 45 horas de incubação foi adicionado o MTT nos poços na concentração final de 0,5 mg/mL por 3 horas. Em seguida, foi realizada centrifugação a 2800 rpm por 3 min a 4°C e sobrenadante foi descartado. Aos cristais que se formaram foi adicionado DMSO (150  $\mu$ L), e a leitura da densidade ótica foi feita em espectrofotômetro a 540 nm.

### **3.9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente através do teste 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  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os parâmetros apresentados em forma percentual foram submetidos à transformação arcoseno, permitindo, assim, a realização de teste de variância.



## **4.0– RESULTADOS**

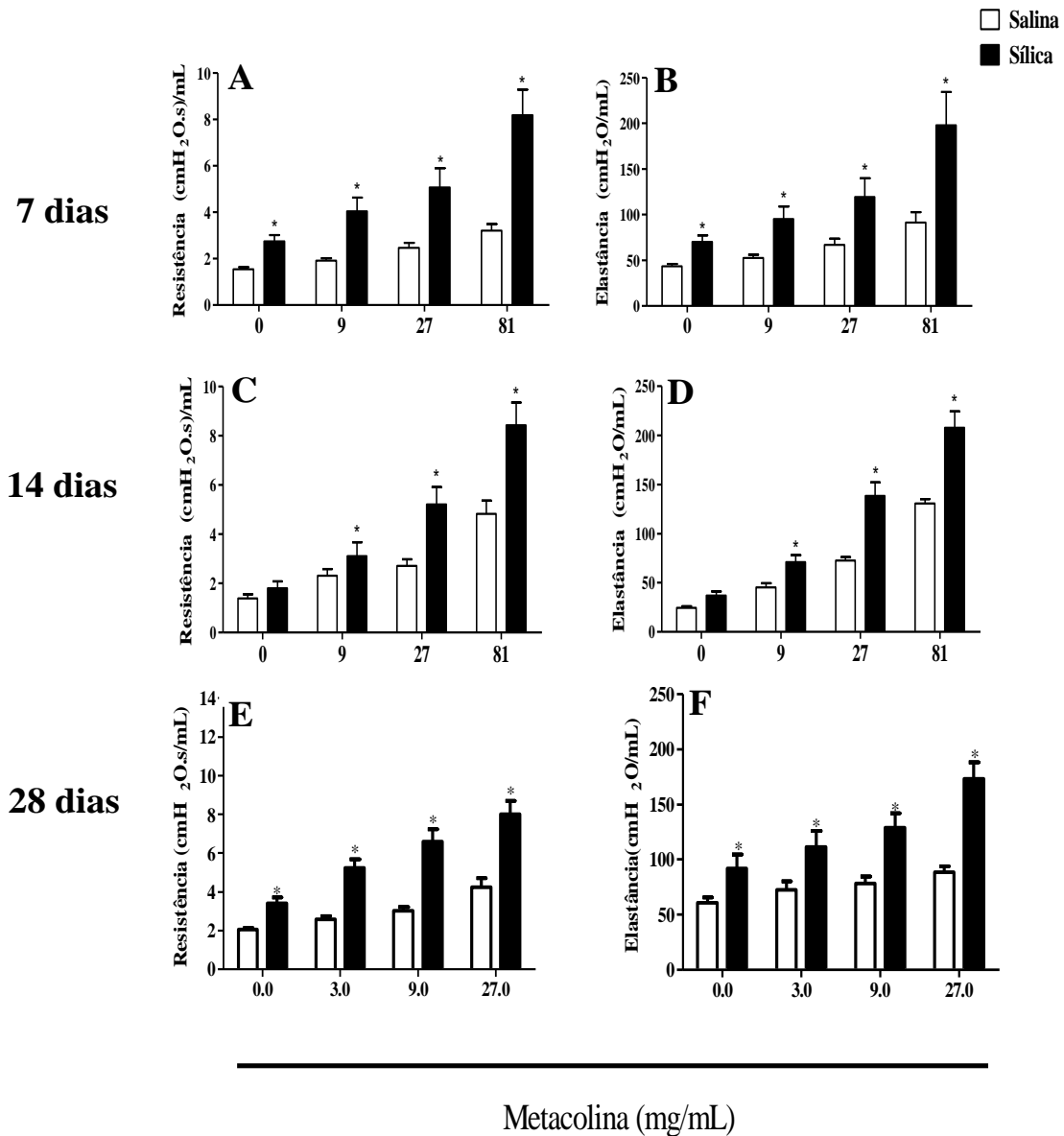
De forma a caracterizarmos a resposta pulmonar induzida pela instilação intranasal de partículas de sílica, em camundongos “Swiss”, foi realizada uma cinética para avaliação de parâmetros que incluíram a função pulmonar e alterações morfológicas, em tempos que variaram de 7 a 28 dias após o desafio.

### **4.1 – FUNÇÃO PULMONAR E HIPER-REATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS DE CAMUNDONGOS SILICÓTICOS**

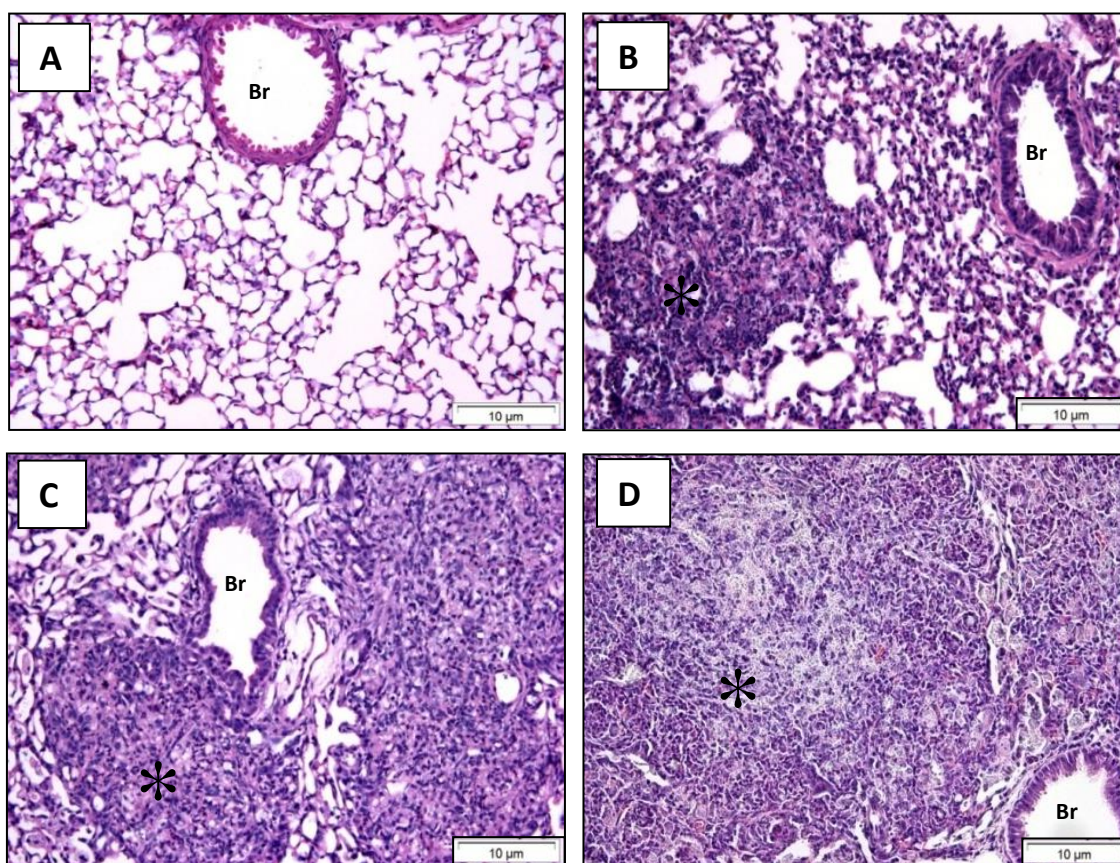
Primeiramente, investigamos o efeito da instilação de partículas de sílica sobre a função pulmonar em camundongos. Para tanto, utilizamos um pletismógrafo invasivo de corpo inteiro para avaliar os parâmetros de resistência das vias aéreas e elastância tecidual, bem como a hiper-reatividade das vias aéreas frente à estimulação com o agente colinérgico broncoconstrictor metacolina. Como podemos observar na figura 4.1, 7 dias após a instilação de sílica houve um aumento significativo nos níveis de resistência e elastância, na condição basal, quando comparado com os dos animais instilados com salina. Após a aerolização de doses crescentes de metacolina, verificamos uma exacerbação dos mesmos parâmetros, caracterizando um quadro de hiper-reatividade (**Figuras 4.1A e 4.1B**). O mesmo efeito foi observado ao longo do curso da doença, tanto em uma fase intermediária, 14 dias (**Figuras 4.1C, 4.1D**), como em uma fase tardia da silicose experimental, 28 dias (**Figuras 4.1E e 4.1F**).

### **4.2 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO PULMÃO DE CAMUNDONGOS SILICÓTICOS**

Em seguida, buscamos avaliar as alterações morfológicas no tecido pulmonar provocadas pelas partículas de sílica, visando caracterizar a evolução das respostas inflamatória e fibrótica. Observamos que o pulmão de camundongos controles mostrou-se preservado em sua arquitetura, estando livre de infiltrado de células inflamatórias (**Figura 4.2A**). Na fase inicial da silicose, notamos alteração na estrutura do parênquima pulmonar, a presença de infiltrado inflamatório e início da resposta de fibrose, já com formação de granulomas (**Figura 4.2B**). Em uma fase intermediária (14 dias), verificamos uma intensificação da resposta fibrótica, com a presença de área granulomatosa mais extensa (**Figura 4.2C**), e bronquíolos com aspecto mais constricto. Por último, na fase tardia, foi evidenciada uma exacerbação da fibrose, presença de granulomas coalescentes, apresentando região central com aspecto necrótico (**Figura 4.2**)



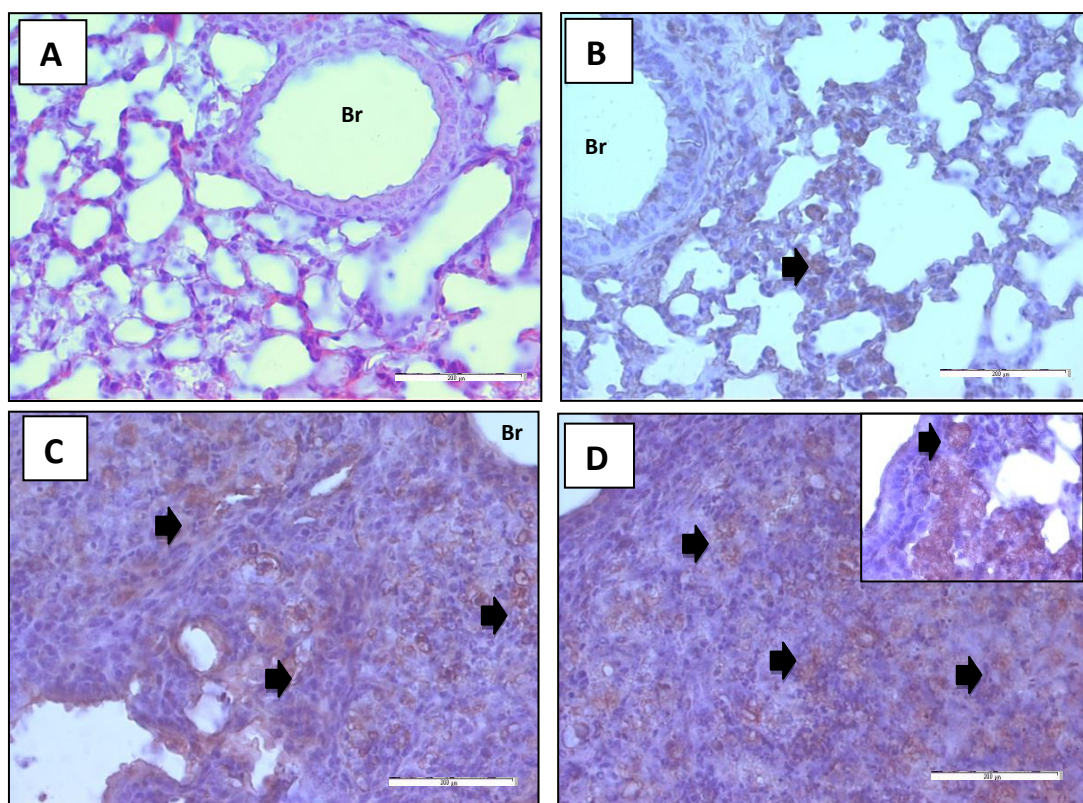
**Figura 4.1 – Cinética de função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos instilados por via intranasal com sílica.** Animais instilados com salina 0.9% foram utilizados como controles. As análises de resistência (painéis à esquerda) e elastância (painéis à direita) foram realizadas nos tempos de 7 dias (**A, B**), 14 dias (**C, D**) e 28 dias (**E, F**) após o desafio. Os resultados representam média  $\pm$  EPM (n=8). \*  $p < 0.05$  comparado com o grupo salina.



**Figura 4.2 – Cinética das alterações morfológicas no pulmão de camundongos instilados por via intranasal com sílica.** Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A) ou sílica – tempos de 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D) após o desafio. As imagens são representativas de 6 a 8 animais por grupo. Br = bronquíolos; \*= granuloma.

### 4.3 – INFILTRADO DE CÉLULAS F4/80 POSITIVAS NO PULMÃO DE CAMUNDONGOS SILICÓTICOS

Os macrófagos são células cruciais no contexto da silicose, e estes podem ser identificados através de um determinante antigênico expresso na superfície da membrana celular - F4/80. Através de técnica de imunohistoquímica, observamos não haver marcação expressiva no pulmão dos animais controles (**Figura 4.3A**), diferente do verificado no caso dos pulmões silicóticos. Detectamos presença de células F4/80 positivas no pulmão dos animais silicóticos, em todos os tempos de análise, incluindo 7 (**Figura 4.3B**), 14 (**Figura 4.3C**) e 28 dias (**Figura 4.3D**) localizadas preferencialmente na região dos granulomas.



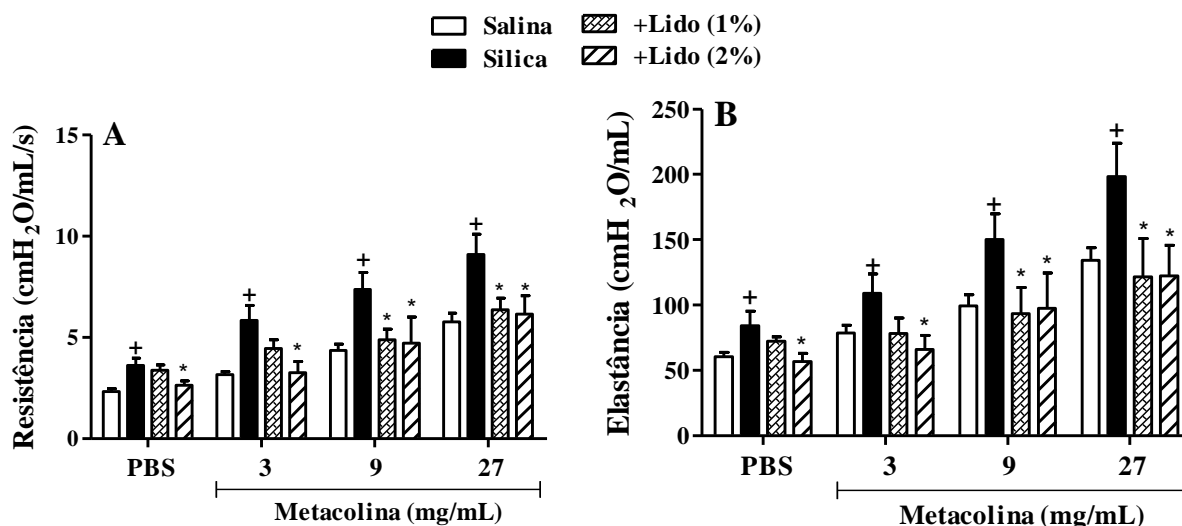
**Figura 4.3 – Efeito da sílica sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos silicóticos.** Fotomicrografias do tecido pulmonar marcadas com anti-F4/80, e contra-coradas com hematoxilina de Mayer, de animais instilados com salina (**A**); e instilados com sílica após 7 dias (**B**), após 14 dias (**C**), e após 28 dias (**D**). Br = bronquíolos; Seta = células F4/80 positivas. As imagens são representativas de 8 animais por grupo. Barra = 200  $\mu$ m.

#### 4.4 – EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA QUANDO ADMINISTRADA NA FASE INICIAL DA SILICOSE EM CAMUNDOGNOS

Considerando que a lidocaína apresenta propriedades anti-inflamatórias, além da reconhecida atividade anestésica local, resolvemos avaliar o efeito da lidocaína quando administrada sob a forma de aerossol, começando por tempos iniciais após a instilação da sílica. As análises foram realizadas tanto na fase inicial (7 dias) como na tardia (28 dias).

##### 4.4.1 – ANÁLISE NA FASE INICIAL

Como primeiro parâmetro, avaliamos a função pulmonar incluindo tanto a resistência das vias aéreas e como a elastância tecidual. Vimos que, conforme descrito anteriormente, os animais silicóticos apresentaram níveis basais aumentados de resistência (**Figura 4.4A**) e elastância (**Figura 4.4B**) quando comparados aos dos animais controles (instilados apenas com salina). Na presença da metacolina, os camundongos silicóticos mostraram resposta mais intensa tanto para resistência como para elastância, indicando um quadro de hiper-reatividade das vias aéreas. Na condição de tratamento com lidocaína 1 e 2%, observamos uma inibição significativa do comprometimento da função pulmonar e do quadro de hiper-reatividade (**Figuras 4.4A e B**).



**Figura 4.4 - Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos na fase inicial da silicose.** Os animais foram tratados na fase inicial (protocolo 1) e as análises de resistência das vias aéreas (**A**) e elastância pulmonar (**B**) foram realizadas no tempo de 7 dias após o desafio. Os resultados representam média  $\pm$  EPM (n=8). +  $p < 0.05$  comparado com o grupo salina.

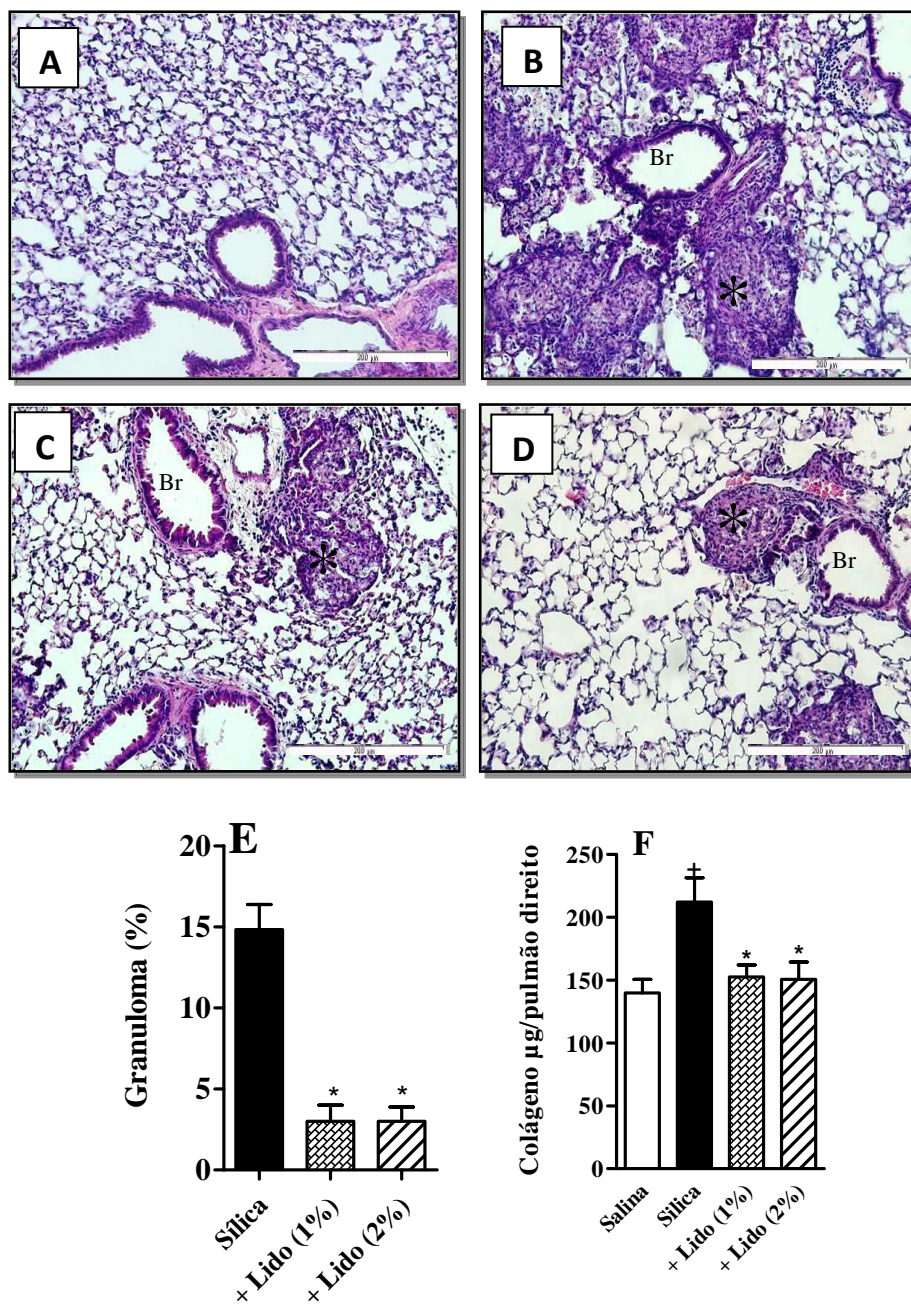
De forma a avaliar o efeito da lidocaína sobre as alterações morfológicas provocadas pela sílica, acessamos o tecido pulmonar através de cortes histológicos. Observamos que animais controles apresentaram a estrutura do parênquima pulmonar bem preservada (**Figura 4.5A**), enquanto que animais silicóticos apresentaram formação de nódulos fibróticos e infiltrado celular compatível com a resposta observada anteriormente no tempo de 7 dias de silicose (fase aguda). O tratamento com lidocaína reduziu marcadamente as alterações observadas, incluindo tanto o infiltrado celular como a formação de granulomas no pulmão (**Figuras 4.5C e 4.5D**), o que foi corroborado pela análise morfométrica (**Figura 4.5E**). De forma semelhante, a lidocaína também reduziu a quantidade de colágeno total no pulmão de camundongos silicóticos (**Figura 4.5F**). Esses resultados destacam o efeito supressor da lidocaína sobre a evolução da resposta fibrótica no pulmão provocado por sílica.

Na tentativa de investigar o mecanismo envolvido na resposta inibitória da lidocaína, partimos para investigar a geração de mediadores considerados importantes no quadro silicótico(65). Podemos observar que animais silicóticos apresentaram um aumento significativo nos níveis de quimiocinas como CXCL2/MIP-2 (**Figura 4.6A**) e CXCL1/KC (**Figura 4.6B**) e citocinas como IFN- $\gamma$  (**Figura 4.6C**) e TNF- $\alpha$  e (**Figura 4.6D**), quando comparados aos animais salina. O tratamento com lidocaína, em ambas as doses, reduziu de forma significativa a produção das duas citocinas analisadas (**Figuras 4.6C e 4.6D**), e a produção de CXCL2/MIP-2 em sua maior dose (2%) (**Figura 4.6A**), entretanto não inibiu a produção de CXCL1/KC no pulmão de animais silicóticos (**Figuras 4.6B**).

Em seguida, buscamos investigar a ação da lidocaína sobre macrófagos no pulmão em uma fase aguda da silicose. De modo similar ao observado anteriormente, camundongos controles apresentaram uma expressão basal de F4/80 quase ausente (**Figura 4.7A**), enquanto que camundongos silicóticos apresentaram um aumento significativo no total de células F4/80 positivas, quando comparados aos animais saudáveis (**Figura 4.7B**). A lidocaína reduziu a presença de células F4/80 positivas nos pulmões silicóticos na doses de 1 (**Figura 4.7C**) e 2% (**Figura 4.7D**). A análise quantitativa confirmou as observações anteriores (**Figura 4.7E**).

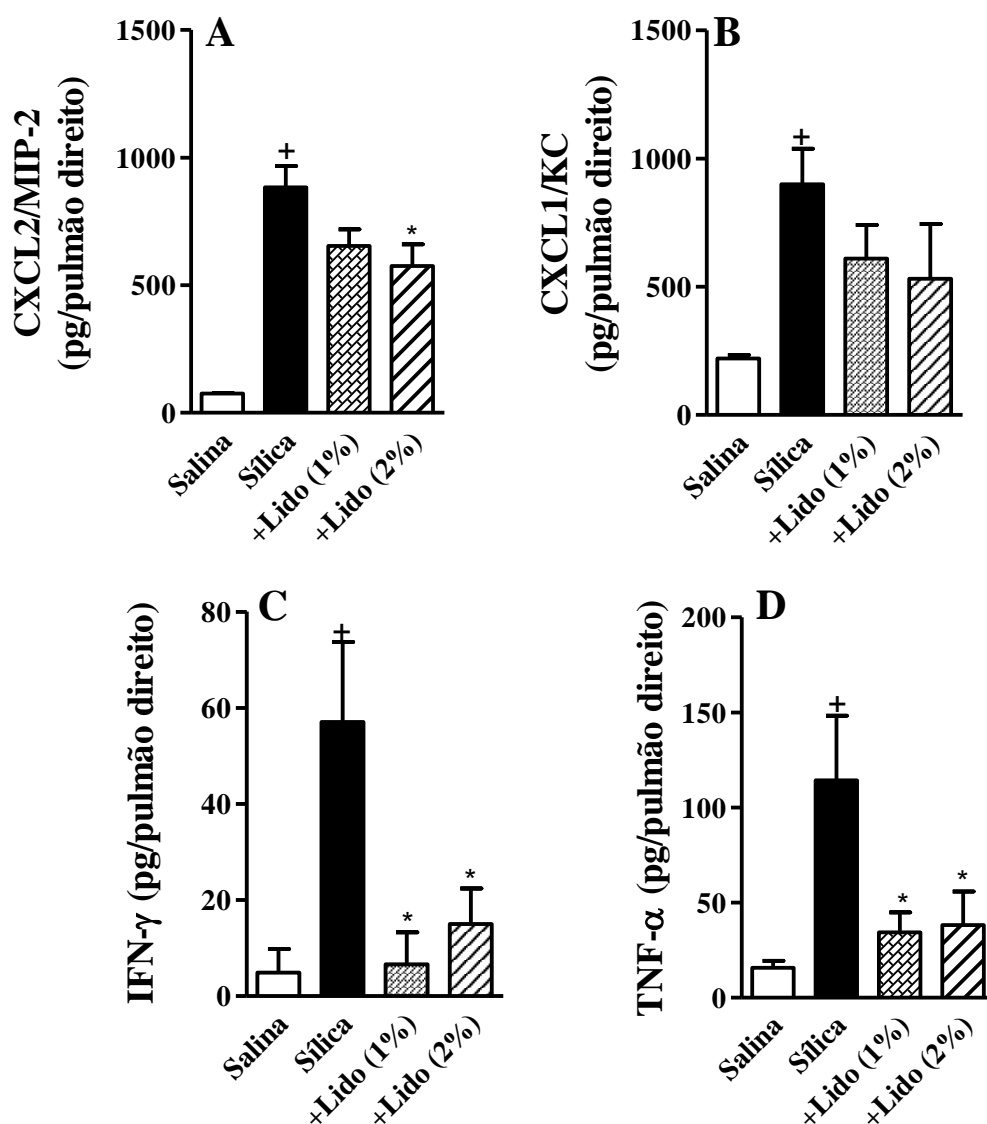
#### **4.4.2 – ANÁLISE NA FASE TARDIA**

Tomando por base o efeito supressor da lidocaína quando administrada na fase inicial da silicose experimental, passamos a avaliar se este esquema de tratamento interferiria na fase tardia do quadro silicótico. Verificamos que as alterações da função pulmonar expressas como aumento de resistência das vias aéreas (**Figura 4.8A**) e da elastância pulmonar (**Figura 4.8B**), tanto na condição basal como na estimulação com metacolina (hiper-reatividade) mostraram-se reduzidos frente ao tratamento com lidocaína (**Figuras 4.8**).

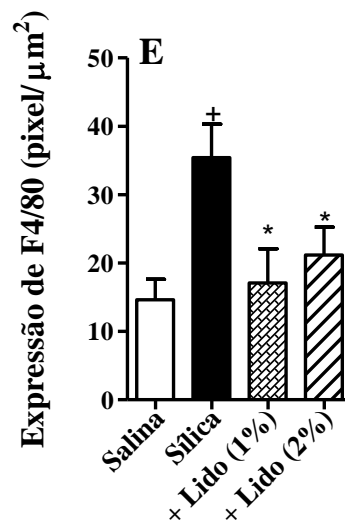
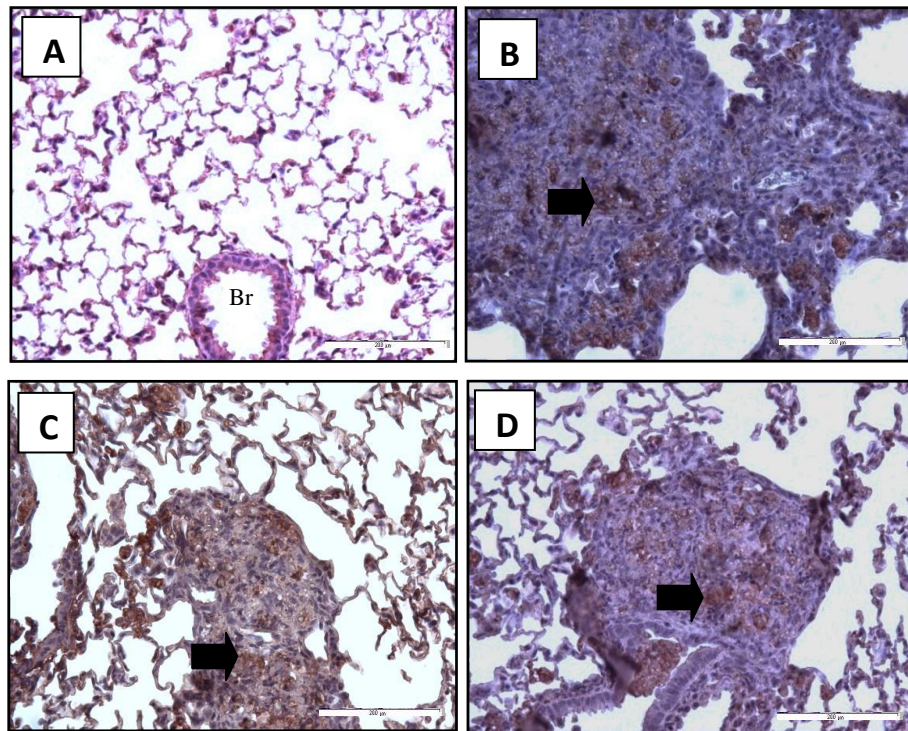


**Figura 4.5: Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre alterações morfológicas no pulmão de camundongos na fase inicial da silicose.** Fotomicrografias do tecido pulmonar, corados com Hematoxilina e Eosina de animais instilados com salina (A); sílica (B); sílica e tratados com lidocaína (1%) (C); sílica e tratados com lidocaína (2%) (D). Br = bronquíolos; \* = granulomas. Análise morfométrica de parênquima pulmonar (E). Análise quantitativa do conteúdo de colágeno tecidual (F). Os animais foram tratados na fase inicial (protocolo 1) e as análises realizadas no tempo de 7 dias após o desafio. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo.  $+ p < 0,05$  comparado ao grupo controle;  $*p < 0,05$  comparado ao grupo sílica. Barra = 200.

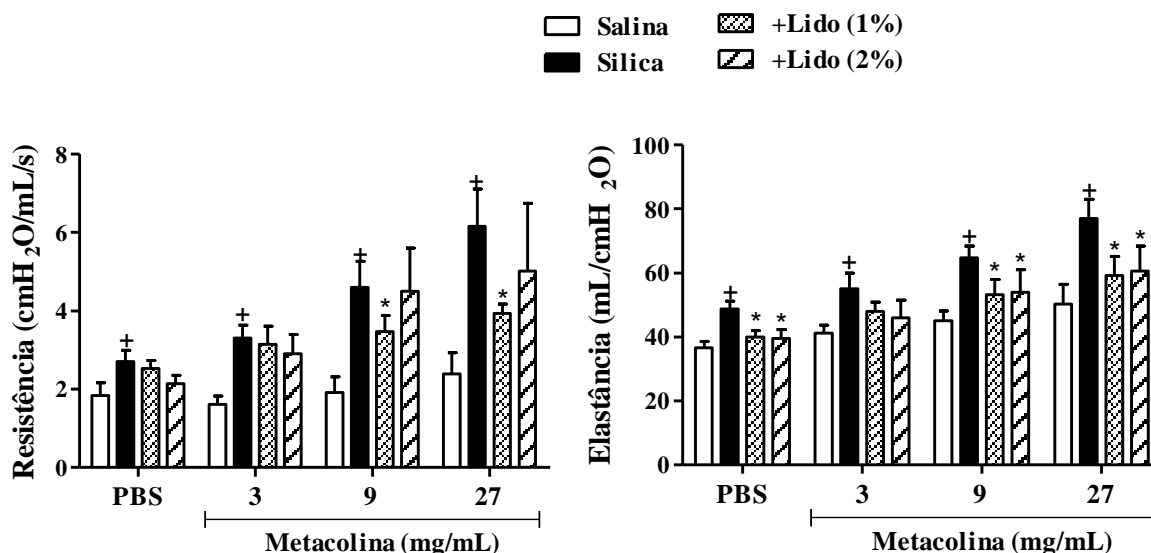




**Figura 4.6: Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre a geração de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos na fase inicial da silicose. (A) CXCL2/MIP-2, (B) CXCL1/KC; (C) IFN- $\gamma$ ; (D) TNF- $\alpha$ .** Os animais foram tratados na fase inicial (protocolo 1) e as análises realizadas no tempo de 7 dias após o desafio. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo. +  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; \* $p < 0,05$  comparado ao grupo instilado com sílica.



**Figura 4.7: Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos na fase inicial da silicose.** Fotomicrografias do tecido pulmonar marcadas com anti-F4/80, e contra-coradas com hematoxilina de Mayer, de animais instilados com salina (A); sílica (B); sílica e tratados com lidocaína (1%) (C); sílica e tratados com lidocaína (2%) (D). Br = bronquíolos; Seta = células F4/80 positivas. Os animais foram tratados na fase inicial (protocolo 1) e as análises realizadas no tempo de 7 dias após o desafio. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo (E).  $\dagger p < 0,05$  comparado ao grupo controle;  $*P < 0,05$  comparado ao grupo sílica. Barra = 200  $\mu\text{m}$



**Figura 4.8 - Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) na fase aguda sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos na fase tardia da silicose.** Os animais foram tratados na fase inicial (protocolo 1) e as análises de resistência das vias aéreas (A) e elastância pulmonar (B) foram realizadas nos tempos de 28 dias após o desafio. Os resultados representam média  $\pm$  EPM (n=8). +  $p < 0.05$  comparado com o grupo salina.

A análise morfológica revelou o pulmões silicóticos, neste momento, apresentaram uma resposta com infiltrado inflamatório e extensa área de fibrose com granulomas coalescente (Figura 4.9B), em comparação com os dos animais controles (Figura 4.9A). O tratamento com lidocaína, em ambas as doses testadas, foi capaz de reduzir a área de fibrose pulmonar (Figuras 4.9C e 4.D). Este resultado foi confirmado pela análise morfométrica, a qual revelou redução significativa do percentual de área de tecido pulmonar ocupada por granulomas (Figura 4.9E).

Corroborando estes achados, vimos que o marcado aumento na deposição de colágeno detectado no pulmão dos animais silicóticos foi sensível ao tratamento com lidocaína (Figura 4.9F).

Com o intuito de investigar os níveis de citocinas nos pulmões, verificamos que níveis aumentados de citocinas e quimiocinas foram detectados no pulmão dos animais silicóticos, em comparação aos controles, e que o tratamento com lidocaína, na dose de 1%, inibiu a produção de todos os mediadores analisados CXCL2/MIP-2 (Figura 4.10A) e CXCL1/KC (Figura 4.10B) e citocinas como IFN- $\gamma$  (Figura 4.10C) e TNF- $\alpha$  e (Figura 4.10D). A maior dose, de 2%, reduziu apenas os níveis das quimiocinas CXCL2/MIP-2 e CXCL1/KC (Figuras 4.10C e 4.10D), não interferindo com IFN- $\gamma$  (Figura 4.10C) e TNF- $\alpha$  e (Figura 4.10D).

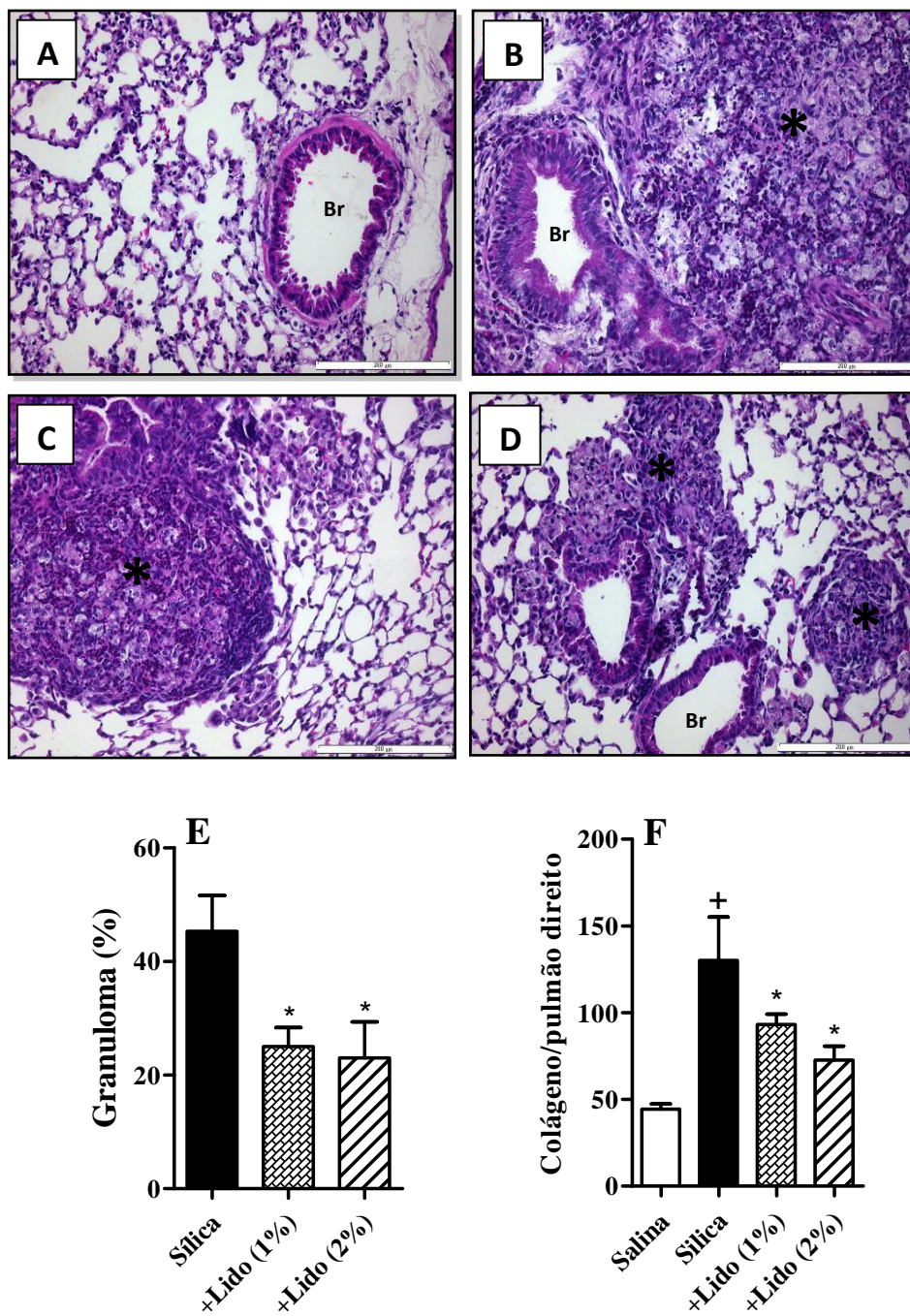
Avaliamos também o infiltrado de macrófagos e confirmamos o aumento no caso dos pulmões silicóticos (**Figura 4.11B**), também localizado na região correspondente aos granulomas, quando comparado ao dos controles (**Figura 4.11A**), e que a lidocaína significativamente reduziu a presença destas células, em ambas as doses testadas (**Figuras 4.11C e 4.11D**). A análise quantitativa confirmou as observações anteriores (**Figura 4.11E**).

#### **4.5 – EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA QUANDO ADMINISTRADA NA FASE TARDIA DA SILICOSE EM CAMUNDONGOS**

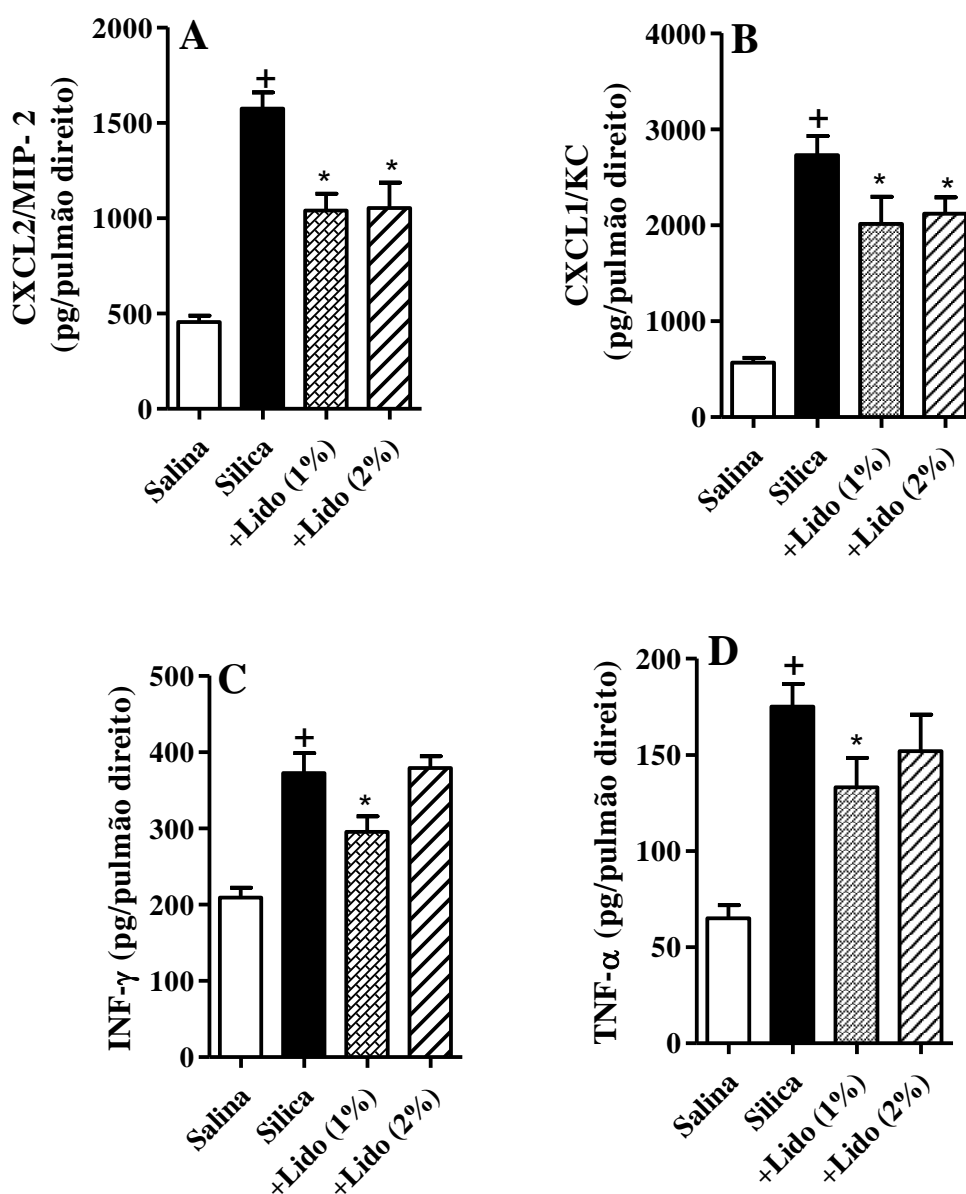
Nesta etapa, buscamos avaliar o efeito da lidocaína quando administrada de forma tardia, com o quadro da doença já instalada, com o propósito de mimetizar a situação vivenciada na clínica. Para isto usamos o protocolo no qual o tratamento dos animais foi iniciado 21 dias após a instilação da sílica e as análises feitas 24 h após a última dose, ou seja, aos 28 dias do início do processo silicótico. Observamos que os animais silicóticos tiveram níveis basais de resistência e elastância aumentados em relação aos dos controles (**Figuras 4.12B e 4.12A**, respectivamente), e quando aerossolizados com metacolina, mostraram o quadro de hiper-reatividade já descrito previamente. Na condição do tratamento com lidocaína, em ambas as doses, notamos que diferente do observado com o protocolo, não houve modificação dos parâmetros analisados (**Figuras 4.12C e 4.12D**).

Passando, então, à análise morfológica, notamos que os pulmões dos animais controles apresentaram o parênquima pulmonar preservado, com espaços alveolares e estruturas bronquioalveolares íntegros (**Figuras 4.13A**). No entanto, na condição da instilação de sílica, confirmamos a presença de uma resposta intensa de fibrose granulomatosa, de forma geral envolvendo partículas de sílica (**Figura 4.13B**). De forma contrária, mas coerente com o que foi observado no caso da função pulmonar, a lidocaína não modificou estas alterações ao nível do parênquima (**Figura 4.13C e 4.13D**). A avaliação morfométrica confirmou os achados obtidos da análise morfológica (**Figuras 4.13E**). Corroborando estes achados, a quantificação de colágeno revelou aumento na quantidade de fibras colágenas nos pulmões silicóticos em relação aos controles, porém o tratamento com lidocaína não modificou este parâmetro (**Figuras 4.13F**).

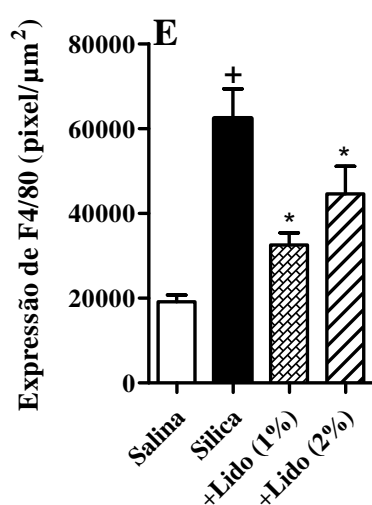
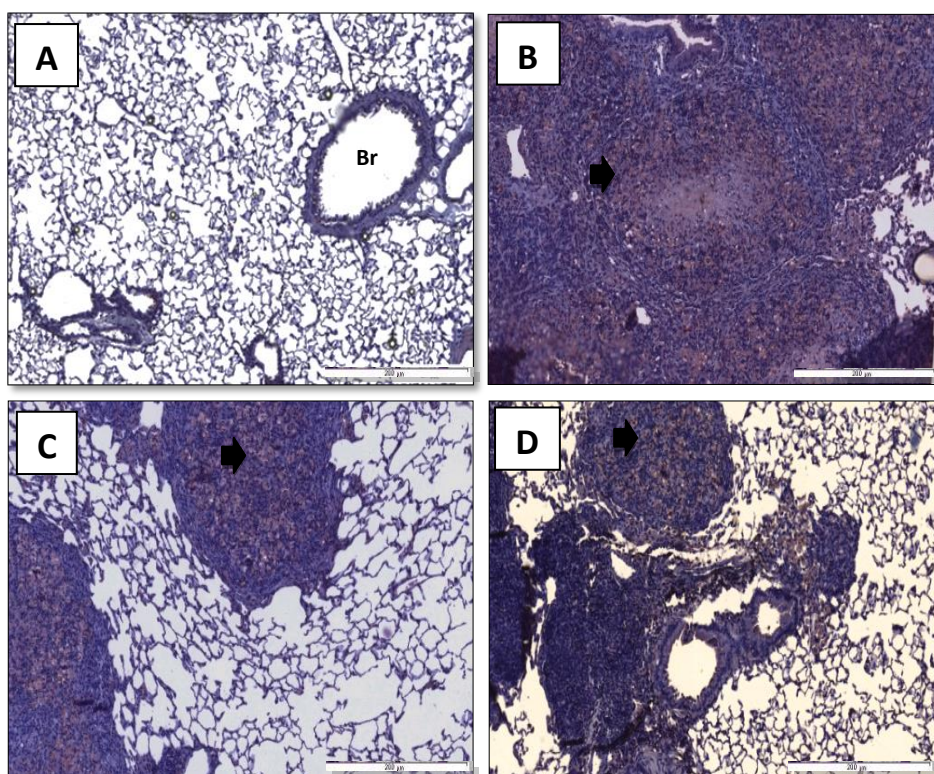
A avaliação da geração de citocinas no pulmão dos camundongos silicóticos mostrou que o tratamento tardio com lidocaína não interferiu com o aumento nos níveis das quimiocinas CXCL2/MIP-2 (**Figura 4.14A**) e CXCL1/KC (**Figura 4.14B**) e das citocinas como IFN- $\gamma$  (**Figura 4.14C**) e TNF- $\alpha$  (**Figura 4.14D**).



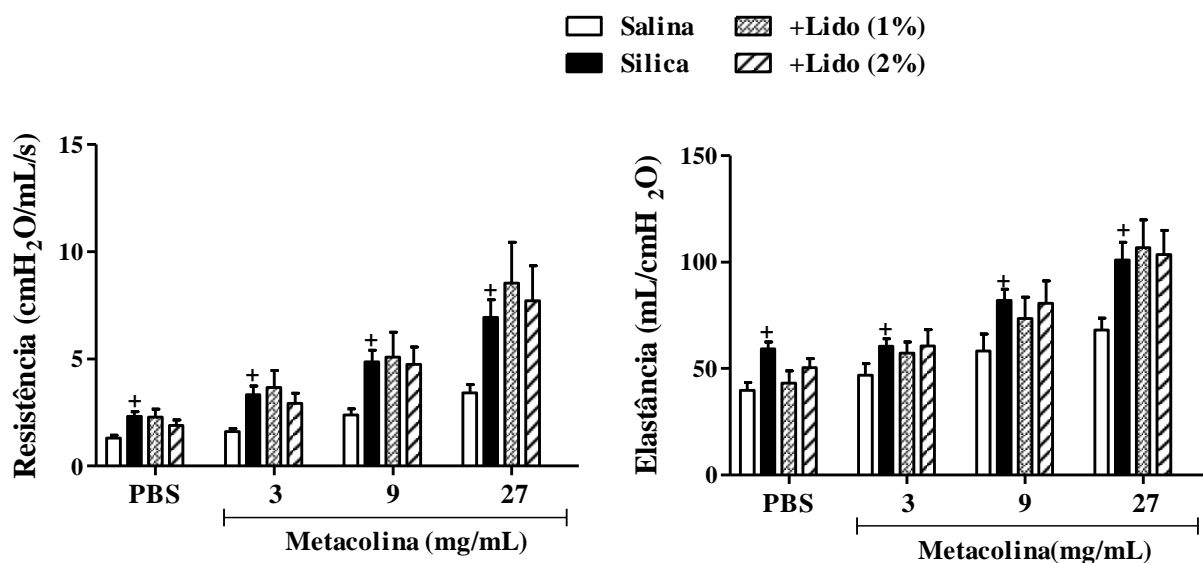
**Figura 4.9: Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) na fase aguda sobre alterações morfológicas no pulmão de camundongos na fase tardia da silicose.** Fotomicrografias do tecido pulmonar, corados com Hematoxilina e Eosina de animais instilados com salina (A); sílica (B); sílica e tratados com lidocaína (1%) (C); sílica e tratados com lidocaína (2%) (D). Br = bronquíolos; \* = granulomas. Análise morfométrica de parênquima pulmonar (E). Análise quantitativa do conteúdo de colágeno tecidual (F). Os animais foram tratados na fase inicial (protocolo 1) e as análises foram realizadas no tempo de 28 dias após o desafio. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo. +  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; \* $p < 0,05$  comparado ao grupo sílica. Barra = 200.



**Figura 4.10: Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) na fase aguda sobre a geração de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos na fase tardia da silicose. (A) CXCL2/MIP-2, (B) CXCL1/KC; (C) INF- $\gamma$ ; (D) TNF- $\alpha$ . Os animais foram tratados na fase inicial (protocolo 1) e as análises foram realizadas no tempo de 28 dias após o desafio. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo. +  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; \* $p < 0,05$  comparado ao grupo instilado com sílica.**

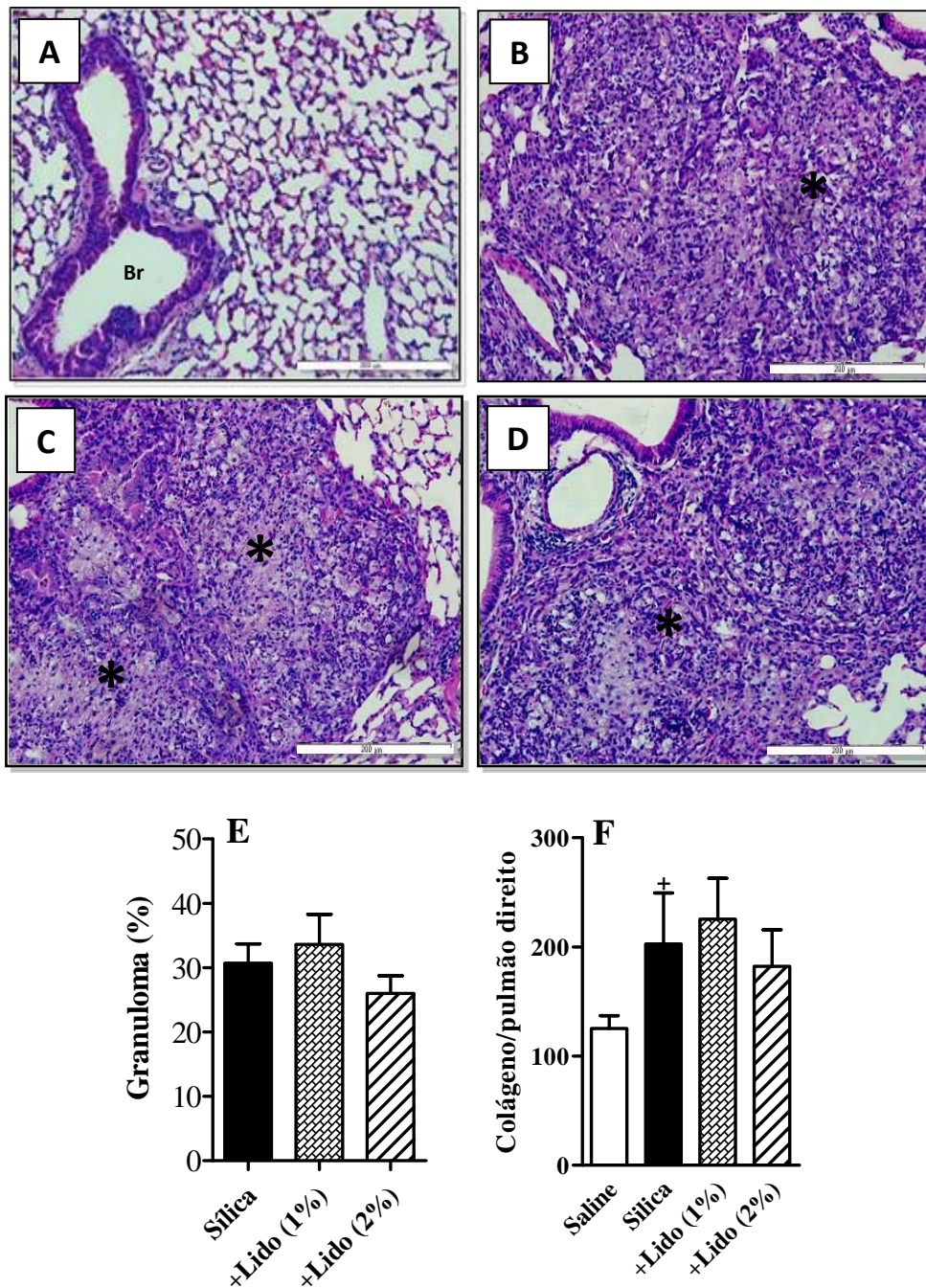


**Figura 4.11: Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) na fase aguda sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos na fase tardia da silicose.** Fotomicrografias do tecido pulmonar marcadas com anti-F4/80, e contra-coradas com hematoxilina e eosina, de animais instilados com salina (A); sílica (B); sílica e tratados com lidocaína (1%) (C); sílica e tratados com lidocaína (2%) (D). Br = bronquíolos; Seta = células F4/80 positivas. Os animais foram tratados na fase inicial (protocolo 1) e as análises foram realizadas no tempo de 28 dias após o desafio. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo (E). +  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; \* $P < 0,05$  comparado ao grupo sílica. Barra = 200  $\mu\text{m}$ .

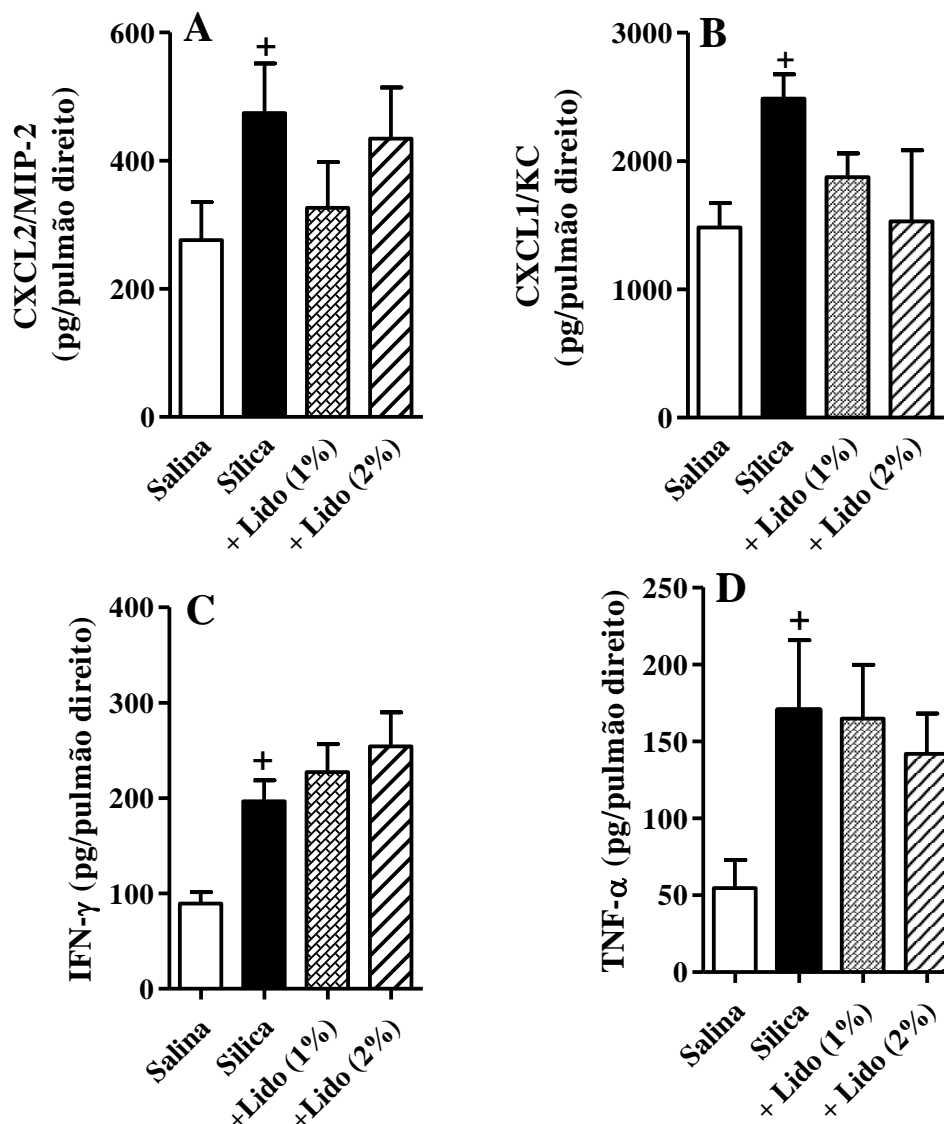


**Figura 4.12 - Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos na fase tardia da silicose.** Os animais foram tratados na fase tardia (protocolo 2) e as análises de resistência das vias aéreas (A) e elastância pulmonar (B) foram realizadas no tempo de 28 dias após instilação com sílica. Os resultados representam média  $\pm$  EPM (n=8). +  $p < 0.05$  comparado com o grupo salina.



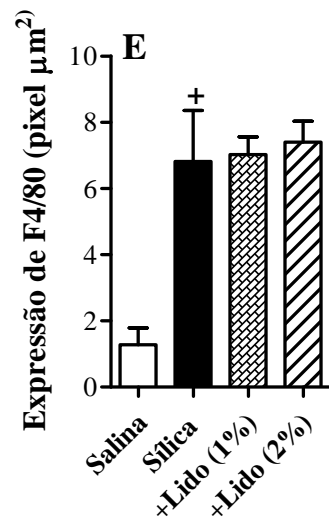
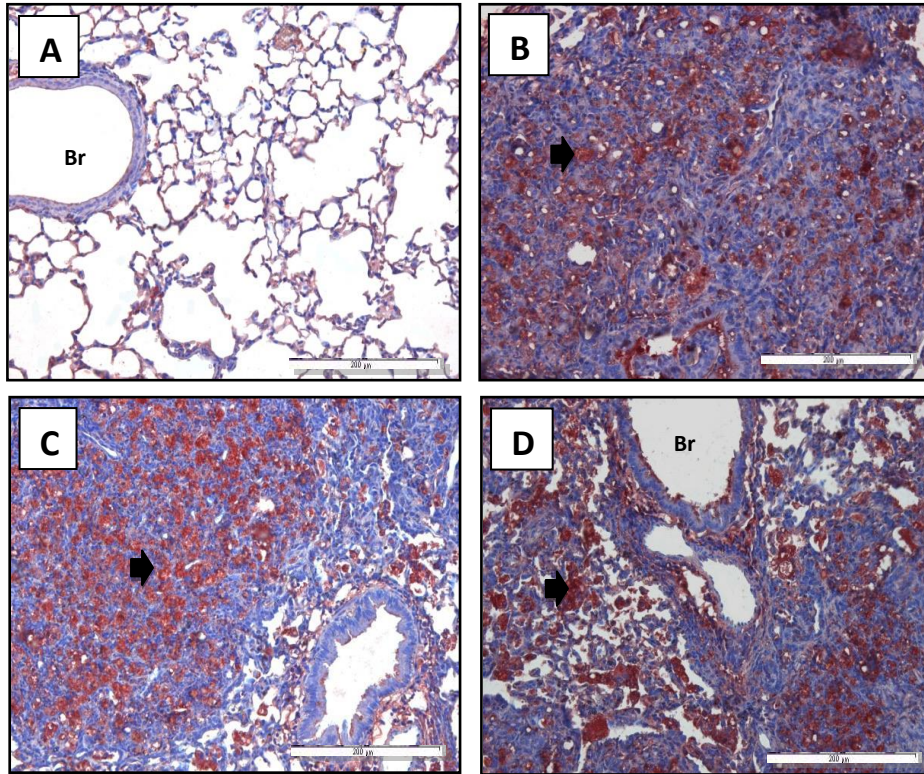


**Figura 4.13: Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre alterações morfológicas no pulmão de camundongos na fase tardia da silicose.** Fotomicrografias do tecido pulmonar, corados com Hematoxilina e Eosina de animais instilados com salina (A); sílica (B); sílica e tratados com lidocaína (1%) (C); sílica e tratados com lidocaína (2%) (D). Br = bronquíolos; \* = granulomas. Análise morfométrica de parênquima pulmonar (E). Análise quantitativa do conteúdo de colágeno tecidual (F). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo. +  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo sílica. Barra = 200  $\mu$ m.



**Figura 4.14:** Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre a geração de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos na fase tardia da silicose. (A) CXCL2/MIP-2, (B) CXCL1/KC; (C) INF- $\gamma$ ; (D) TNF- $\alpha$ . Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo. +  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; \* $p < 0,05$  comparado ao grupo instilado com sílica.

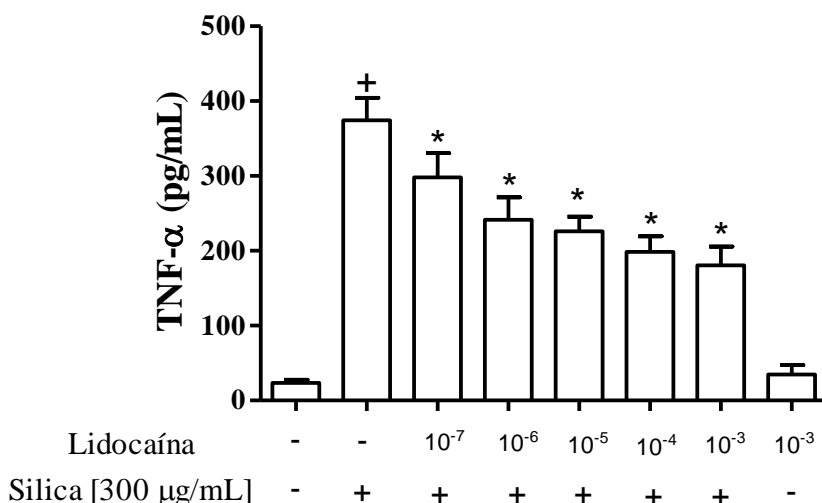
De forma coerente com o observado para os demais parâmetros avaliados, o aumento do infiltrado de macrófagos no pulmão dos animais silicóticos (Figura 4.15B) em relação aos controles (Figura 4.15A) não foi modificado pelo tratamento com lidocaína (Figuras 4.15C e 4.15D). A análise quantitativa confirmou os achados anteriores (Figuras 4.15E). Estes achados em conjunto claramente revelam um efeito supressor diferencial da lidocaína quando administrada na fase inicial ou tardia do quadro silicótico.



**Figura 4.15:** Efeito do tratamento com lidocaína (1 e 2%) sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos na fase tardia da silicose. Fotomicrografias do tecido pulmonar marcadas com anti-F4/80, e contra-coradas com hematoxilina e eosina, de animais instilados com salina (A); sílica (B); sílica e tratados com lidocaína (1%) (C); sílica e tratados com lidocaína (2%) (D). Br = bronquíolos; Seta = células F4/80 positivas. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo (E). +  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; \* $P < 0,05$  comparado ao grupo sílica. Barra = 200  $\mu\text{m}$ .

#### 4.6 - EFEITO DA LIDOCAÍNA SOBRE A ATIVIDADE DE CÉLULAS AMJ2C11

Tomando por base as evidências de que os macrófagos são células cruciais no contexto da silicose e, também, o fato de que o infiltrado de células F4/80 (indicativas de macrófagos) foi reduzido pela lidocaína, partimos para avaliar o seu efeito direto sobre macrófagos alveolares – linhagem AMJ2C11. Como ilustrado na **Figura 4.16**, a estimulação com partículas de sílica ativou os macrófagos conforme atestado pelo marcado aumento na produção de TNF- $\alpha$ , em comparação às células estimuladas apenas com meio. A prévia incubação (1 hora antes) das células com lidocaína ( $10^{-7}$  –  $10^{-3}$ M), reduziu a produção de TNF- $\alpha$  de forma concentração-dependente (**Figura 4.16**). Nenhum efeito da lidocaína sobre células estimuladas com meio foi notado (**Figura 4.16**).



**Figura 4.16: Efeito da lidocaína sobre a ativação de macrófagos alveolares (linhagem AMJ2C11) estimulados com sílica *in vitro*.** A quantificação de TNF- $\alpha$  foi realizada no sobrenadante 24 horas após o estímulo com sílica (300  $\mu$ g/mL). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de cada grupo em quadruplicata. Este gráfico é representativo de dois experimentos. +  $p < 0,05$  comparado ao grupo não-estimulado; \* $p < 0,05$  comparado ao grupo estimulado com sílica.

## **4.7 – EFEITO DA LIDOCAÍNA SOBRE A ATIVAÇÃO DE SUBTIPOS DE MACRÓFAGOS (M1 E M2) MURINOS *IN VITRO***

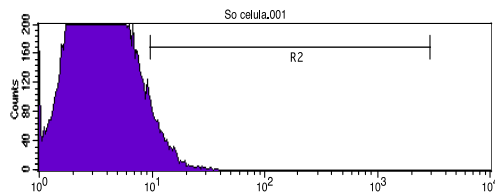
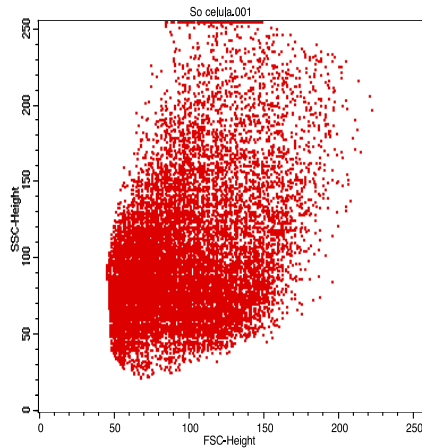
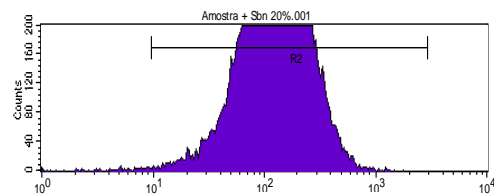
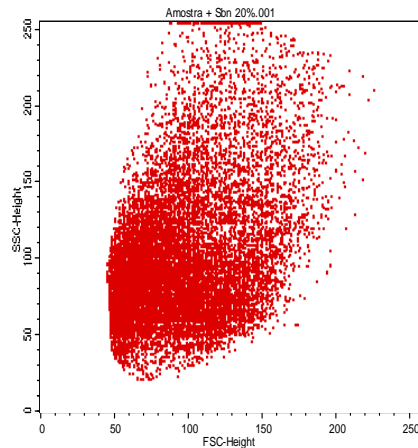
Os macrófagos são células que podem se apresentar fenotipicamente em M1 (clássicos ou pró-inflamatórios) e em M2 (alternativos ou pró-resolutivos) (66). Tomando por base o efeito supressor do tratamento com lidocaína ter sido evidenciado quando de sua administração em tempos iniciais do processo silicótico, porém não tardio, resolvemos investigar a hipótese de que sua atividade pudesse estar relacionada ao subtipo de macrófago predominante na fase inicial (M1) e na tardia (M2) do quadro silicótico. Para tanto, desenvolvemos em nosso laboratório o modelo de macrófagos derivados de medula óssea que nos permite acessar ambos os subtipos de macrófagos.

### **4.7.1 – ESTABELECIMENTO DO MODELO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA (MDMO)**

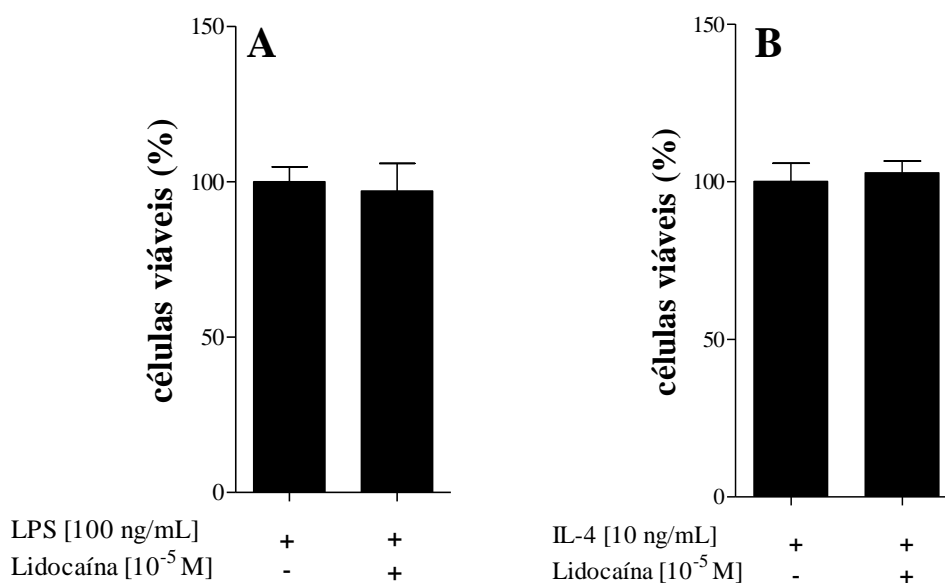
Como já descrito na literatura (67), a partir da obtenção de medula óssea de ambos os fêmures de camundongos, as células recuperadas são incubadas com sobrenadante proveniente de células da linhagem L929, produtoras de fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF). Como ilustrado na figura (**Figura 4.17**), através da utilização do anticorpo que reconhece o antígeno F4/80 (FITC) verificamos que a incubação de células totais recuperadas da medula óssea (**parte A**) com meio condicionado rico em M-CSF (20%) (**parte B**) levou a um enriquecimento para macrófagos em torno 99,57% de acordo com a representação mostrada nos histogramas.

### **4.7.2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LIDOCAÍNA SOBRE A ATIVAÇÃO DE MDMO**

A partir desta população de macrófagos obtidos da medula, considerados na condição de células indiferenciadas (M0), passamos à etapa de indução de diferenciação ou polarização. Para tanto, os macrófagos M0 foram incubados com LPS (para fenótipo M1) e IL-4 (para fenótipo M2). Inicialmente analisamos o parâmetro de viabilidade celular e vimos que a incubação com LPS (**Figura 4.18A**) ou IL-4 (**Figura 4.18B**), na presença ou ausência de lidocaína, não interferiu com a viabilidade das células. Na etapa seguinte, avaliamos a liberação de citocinas que caracteristicamente estão associadas com os fenótipos de macrófagos: M1 (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e M2 (CCL17/TARC e CCL22/MDC).

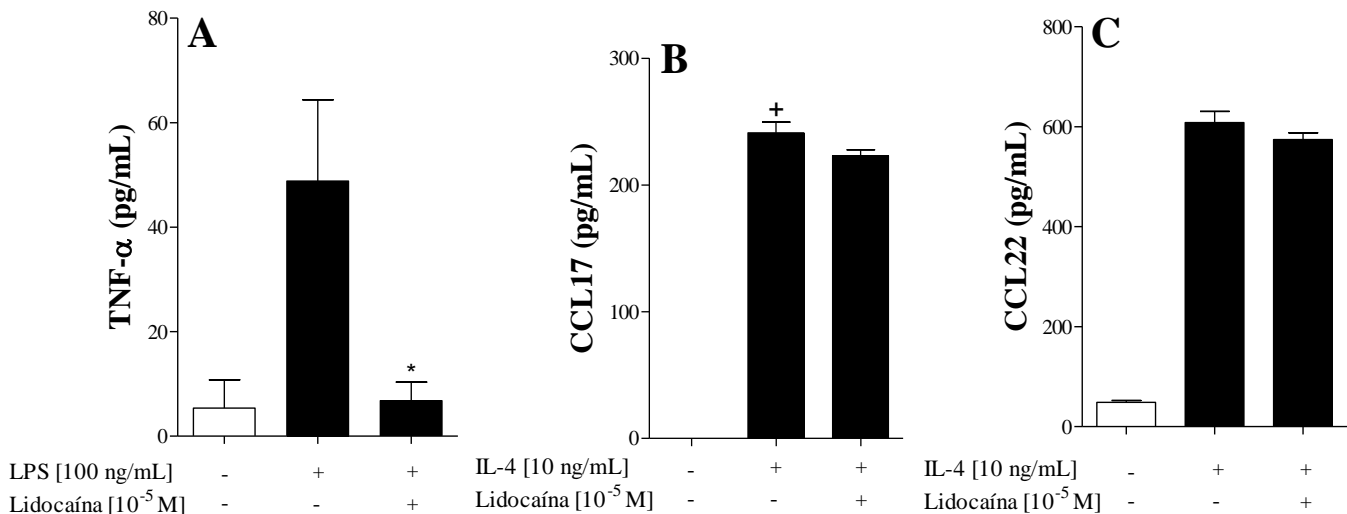
**A****Células de medula + meio****F 4/80 FITC****B****Células de medula + meio  
condicionado com M-CSF  
(20%)****F 4/80 FITC**

**Figura 4.17: Avaliação da diferenciação de células derivadas da medula óssea de camundongos em macrófagos. (A) Células totais e (B) células que foram incubadas com meio condicionado contendo M-CSF (20%).** A análise da população enriquecida de macrófagos foi realizada, após 7 dias de manutenção em cultivo, através da técnica de citometria de fluxo e utilização de anticorpo identificador F4/80. Ensaio representativo de 3 experimentos independentes.

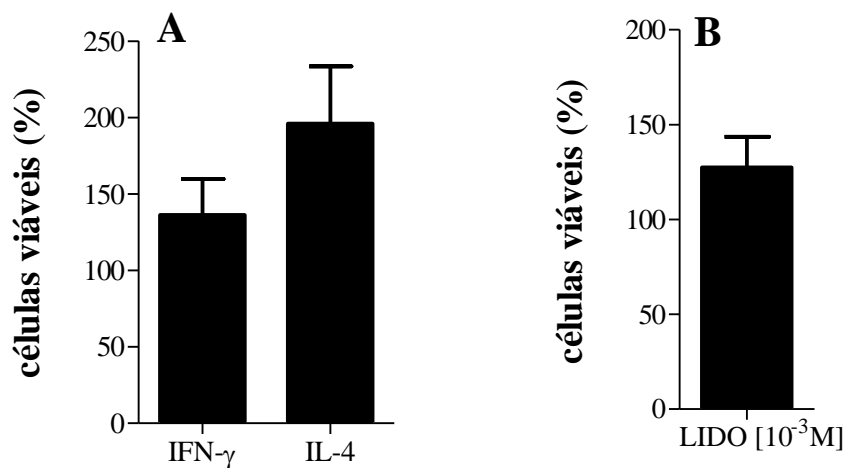


**Figura 4.18: Avaliação da viabilidade celular (%) de macrófagos derivados de medula óssea.** As células foram incubadas com LPS (A) e IL-4 (B), na ausência ou presença de lidocaína  $10^{-3}$ M. A avaliação foi realizada 48 horas após estimulação. Ensaio representativo de  $n=2$  (quadruplicata). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M.

Verificamos que a incubação dos MDMO com LPS levou à produção de TNF $\alpha$  (**Figura 4.19A**) e com IL-4 à produção de CCL17/TARC (**Figura 4.19B**) e CCL22/MDC (**Figura 4.19C**). O tratamento dos macrófagos com lidocaína, realizado 1 hora antes da incubação com as citocinas, foi capaz de interferir somente com as células estimuladas com LPS e não com IL-4, sugerindo um efeito seletivo sobre os macrófagos polarizados em M1. Em outro grupo de experimentos, as células foram incubadas com IFN- $\gamma$  (também reconhecido por sua propriedade em induzir diferenciação de macrófagos no subtipo M1) e com IL-4. Após a incubação com ambas as citocinas, isoladamente, as células foram ativadas com LPS. A análise da viabilidade celular revelou que IFN- $\gamma$  (**Figura 4.20A**) e IL-4, (**Figura 4.20A**), assim como a lidocaína (**Figura 4.20B**), não interferiram com a viabilidade das células.



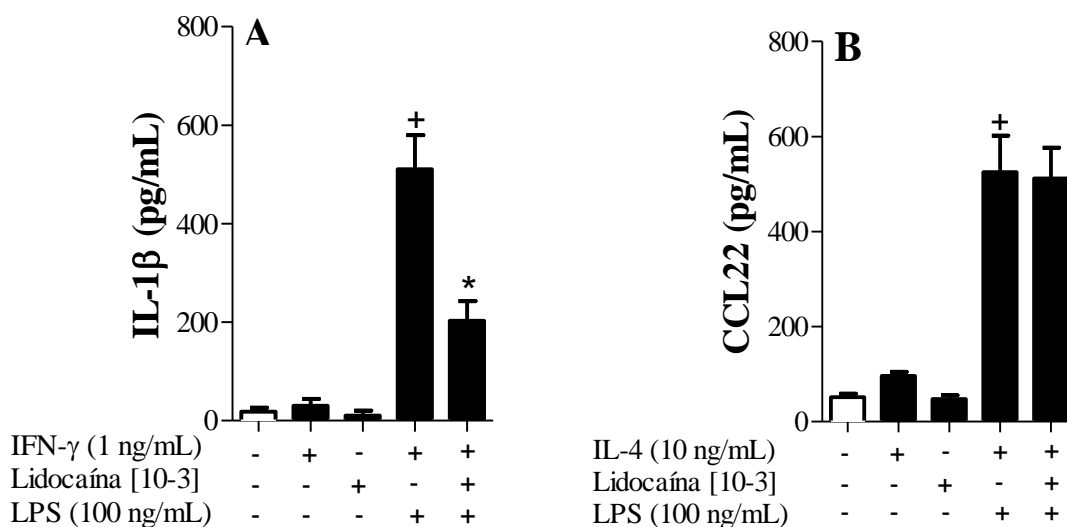
**Figura 4.19: Efeito da lidocaína sobre a produção de citocinas por macrófagos derivados de medula incubados com LPS (100 mg/mL) e IL-4 (10 ng/mL).** As células foram tratadas com lidocaína ( $10^{-5}$ M), 1 hora antes da estimulação com LPS (A) ou IL-4 (B e C), e as análises realizadas 48 horas após. Foram quantificados (A) TNF- $\alpha$ , (B) CCL17/TARC, (C) CCL22/MDC. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de cada grupo em triplicata. +  $p < 0,05$  comparado ao grupo não-estimulado. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo estimulado.



**Figura 4.20: Avaliação da viabilidade celular (%) de macrófagos derivados de medula óssea.** As células foram incubadas com IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B) e lidocaína ( $10^{-3}$ M). A avaliação foi realizada 48 horas após estimulação. Os resultados representam  $n=5$  e foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M.



Verificamos que macrófagos incubados com IFN- $\gamma$  produziram IL-1 $\beta$  (Figura 4.21A) e aqueles incubados com IL-4 produziram CCL22/MDC (Figura 4.21B). O tratamento das células com lidocaína, 1 h antes da ativação com LPS, inibiu apenas os macrófagos previamente incubados com IFN- $\gamma$  (Figura 4.21A), porém não com IL4 (Figura 4.21B), reforçando os achados anteriores que sugerem um efeito mais seletivo da lidocaína em modular a ativação de macrófagos com fenótipo M1.



**Figura 4.21: Efeito da lidocaína sobre a produção de citocinas por macrófagos derivados de medula incubados com IFN- $\gamma$  (1 ng/mL) e IL-4 (10 ng/mL).** As células foram tratadas com lidocaína (10<sup>-3</sup>M), 1 hora antes da estimulação com LPS (A) ou IL-4 (B), e as análises realizadas 48 horas após. Foram quantificados (A) TNF- $\alpha$ , (B) CCL22/MDC. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de cada grupo em triplicata. <sup>†</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo não-estimulado. <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo estimulado.

## 5.0 DISCUSSÃO

A fisiopatologia da silicose está associada a alterações morfológicas e intensa reação inflamatória nos pulmões, como resultado da toxicidade da sílica inalada, recrutamento de células inflamatórias e produção de mediadores. Esta condição de inflamação crônica pode resultar no desenvolvimento de fibrose pulmonar (12). As exposições às partículas de sílica podem ocorrer em diversas ocupações como mineração, jateamento de areia, construção civil, fabricação de cerâmica, dentre outras. Apesar do risco, e de estarem disponíveis equipamentos de proteção individual que ajudam a prevenir a doença, as taxas de exposição ocupacional à sílica permanecem altas, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil (43).

Os indivíduos com silicose apresentam alterações na função pulmonar, que evoluem para um padrão obstrutivo, restritivo ou misto, sendo os sintomas predominantes a tosse crônica e a dispnéia de esforço (68). É importante ressaltar que a silicose é uma doença extremamente incapacitante, para qual até o presente momento não há terapia efetiva, e os mecanismos imunológicos que conduzem ao seu agravamento não estão completamente elucidados (69).

A lidocaína é uma molécula utilizada na prática médica como anestésico local e agente anti-arrítmico (47). Entretanto, atualmente está bem descrito na literatura que a lidocaína possui atividade anti-inflamatória, sendo capaz de inibir uma gama de células inflamatórias como neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e macrófagos, sugerindo uma potencial aplicabilidade no controle de doenças inflamatórias (70)(71)(72). Chama atenção o fato de que o mecanismo anti-inflamatório da lidocaína parece não estar associado ao bloqueio reversível de canais de sódio na membrana plasmática das células, visto que células polimorfonucleares não expressam canais de sódio, e os efeitos anti-inflamatórios observados da lidocaína ocorrem em concentrações inferiores às necessárias para bloquear os canais de sódio nas células (51). Estudos têm mostrado que o mecanismo anti-inflamatório da lidocaína pode estar associado à inibição de canais potássio, de cálcio e até mesmo à inibição de determinados receptores acoplados à proteína G (59)(73)(74).

Na literatura encontramos diferentes modelos experimentais de silicose, que buscam reproduzir as alterações morfológicas e funcionais encontradas na silicose humana. Muitos grupos de pesquisa utilizam a instilação intratraqueal de sílica (75), enquanto outros preferem a exposição de partículas de sílica por aerolização (76). Em nosso laboratório desenvolvemos um modelo murino de silicose experimental, que reproduziu de maneira bastante similar o quadro observado na silicose humana, onde se verifica quadro mais agudo e intenso de infiltrado inflamatório seguido por formação de extensa área de fibrose e formação de

granulomas dispersos no tecido pulmonar, bem como de deposição de fibras colágenas, e alterações funcionais do trato respiratório (44).

Através da instilação de sílica intranasal em camundongos, conseguimos reproduzir de maneira satisfatória os eventos observados na silicose humana. Essencialmente, este modelo experimental nos permitiu acessar alterações morfológicas e funcionais características da fase inicial e tardia da doença. É bem descrito na literatura que doenças ocupacionais pulmonares estão associadas a uma redução da capacidade respiratória, com aprisionamento do ar, espessamento da parede brônquica e disfunção em pequenas vias aéreas (77)(78). Sabendo que a deficiência respiratória é um ponto chave na silicose humana, buscamos avaliar o efeito na mecânica respiratória em camundongos da linhagem Swiss-Webster. Inicialmente, foram monitorados, em diferentes tempos ao curso da doença, os parâmetros de resistência das vias aéreas, que é uma medida da capacidade das vias aéreas resistirem à entrada de ar, e a elastância tecidual, que avalia o grau de distensibilidade do pulmão (79). Observamos que os animais silicóticos apresentaram alteração nos parâmetros de função pulmonar (aumento de resistência e elastância) quando comparados aos animais controles, em todos os tempos analisados. Para avaliar a responsividade das vias aéreas, administramos doses crescentes de metacolina, um agente broncoconstrictor colinérgico. Os resultados indicaram um aumento expressivo nos níveis de resistência e elastância, verificado em todos os tempos de análise, assinalando um quadro de hiper-reatividade. Vale ser destacado que estudo anterior mostrou um fenômeno similar em trabalhadores da indústria de mineração que apresentaram sintomas de penumonoconiose. O estudo revelou que os indivíduos apresentaram expressiva redução da capacidade respiratória e hiper-reatividade das vias aéreas (77).

Já foi mostrado que a exposição às partículas de sílica leva a alterações histológicas progressivas em modelo de silicose murina, com influxo de células polimorfonucleares e mononucleares no pulmão, formação de granulomas e aumento no teor de fibras colágenas (80)(81). No nosso estudo, buscamos investigar a evolução do processo inflamatório e fibrótico no pulmão de animais silicóticos. Observamos que quanto maior a cronicidade da doença, maior a resposta fibrótica no parênquima pulmonar. Na fase aguda da silicose observamos a formação de infiltrado inflamatório e formação de pequenos nódulos fibróticos. Ao longo do curso da doença ocorre um aumento no número e tamanho de granulomas no pulmão desses animais, caracterizando uma intensificação da resposta fibrótica.

Os macrófagos são células cruciais na fisiopatologia da silicose, responsáveis pela fagocitose das partículas de sílica no pulmão. Entretanto, essas células também contribuem com a inflamação crônica em um ciclo vicioso, pois ao fagocitarem a sílica, os macrófagos

são ativados. Após a ativação, diversos mecanismos moleculares levam a ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e AP-1, levando à produção de citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e fatores fibrogênicos. Além disso, como os macrófagos são incapazes de destruir as partículas, essas células são danificadas liberando as partículas de volta ao parênquima pulmonar. Em seguida, outros macrófagos fagocitam a mesma sílica, perpetuando o processo inflamatório (81)(82). Em virtude da possível participação dos macrófagos no agravamento das alterações provocadas pela sílica, investigamos a presença de macrófagos no pulmão de animais silicóticos ao longo do curso da doença, através da identificação de células F4/80 positivas. Constatamos a presença de macrófagos em todos os tempos da doença, e um relativo aumento em tempos mais tardios da silicose. Esses dados reforçam a participação dessas células no processo fibrótico provocado pela sílica no pulmão.

Estudos de Takao e cols (1996) mostraram que a lidocaína apresentou um efeito protetor em um modelo agudo de lesão pulmonar induzido por hiperoxia (62). Nessa linha, outros estudos apontam para o mesmo efeito protetor da lidocaína em outros modelos de inflamação pulmonar aguda e sistêmica (83)(84). O efeito protetor da lidocaína em todos os estudos analisados se deveu a uma ação anti-inflamatória da molécula, com redução na produção de mediadores inflamatórios e alterações morfológicas. Um outro estudo interessante mostrou que apesar da lidocaína modular a inflamação local, ela não foi capaz de impedir a cicatrização saudável do tecido epitelial de camundongos (85). Apesar do papel importante da inflamação na fibrogênese, algumas pesquisas sugerem que a inflamação não está necessariamente associada ao processo fibrótico, e que vias adicionais podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da fibrose pulmonar (86). Alguns estudos também demonstraram que a redução da fibrose pulmonar não está associada à redução da resposta inflamatória (87), enquanto que outros mostraram que a inflamação pulmonar nem sempre é seguida por um processo fibrótico (88). Tendo em vista o efeito supressor da lidocaína em modelos de inflamação aguda, neste projeto buscamos investigar o efeito do tratamento com lidocaína em uma fase inicial da silicose sobre a evolução da resposta inflamatória e fibrótica no pulmão de animais silicóticos.

Primeiramente buscamos investigar se a lidocaína seria eficaz em alterar os parâmetros de função e morfologia pulmonar em uma fase inicial da silicose. Utilizamos um primeiro desenho experimental, no qual instilamos sílica nos camundongos no dia 0, e começamos a tratar com lidocaína 6 horas após o estímulo por sete dias consecutivos. As análises foram efetuadas no oitavo dia pós-sílica.

Nossas análises mostraram que em uma fase inicial da silicose a lidocaína foi capaz de inibir os parâmetros de função pulmonar como resistência e elastância pulmonar, bem como reduzir a hiper-reatividade das vias aéreas em ambos os parâmetros. Esses resultados estão alinhados com achados da literatura que demonstram que a lidocaína é capaz de prevenir a hiper-reatividade das vias aéreas em modelos murino e felino de asma brônquica (60)(61). Além disso, estes resultados indicam que a lidocaína ao inibir a resposta inflamatória desencadeada pela sílica é capaz de melhorar expressivamente o quadro respiratório em uma fase inicial da silicose.

A silicose em humanos é caracterizada pela presença de nódulos fibróticos devido a uma inflamação persistente causada pelas partículas de sílica no pulmão. Durante a inflamação ocorre a liberação de fatores fibrogênicos no parênquima pulmonar, com consequente proliferação de fibroblastos e acúmulo exagerado de colágeno nos locais de deposição de sílica (89). Nossos resultados da análise histológica mostraram alterações na arquitetura pulmonar, com presença de infiltrado inflamatório e alguns nódulos fibróticos 7 dias após a instilação de sílica. O tratamento com lidocaína na fase inicial foi capaz de atuar na resposta fibrótica, levando a um menor número de granulomas e área ocupada por estes no pulmão de animais silicóticos. No contexto do processo fibrótico, o acúmulo excessivo de componentes de matriz extracelular se deve a um desbalanço na atividade e expressão de metaloproteinases (MMPs), responsáveis pela quebra de proteínas de matriz como o colágeno, e de seus reguladores os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). A atividade irregular dessas proteínas associada ao aumento na deposição de fibras colágenas por fibroblastos leva a um depósito excessivo desta proteína de matriz no parênquima pulmonar (90). Ao analisarmos o conteúdo de colágeno no pulmão de animais silicóticos crônicos, observamos um intenso aumento na deposição de fibras colágenas quando comparamos aos animais saudáveis. O tratamento com lidocaína, iniciado 6 horas após instilação com sílica, reduziu a quantidade de colágeno total nos pulmões dos animais em uma fase inicial da doença.

As alterações na mecânica ventilatória, inflamação e fibrogênese obtidas pelo tratamento com lidocaína nos 7 primeiros dias após provocação com sílica poderia, pelo menos em parte, estar associado ao bloqueio do recrutamento e função de células inflamatórias como o macrófago.

Como dito anteriormente, os macrófagos são células importantes na fisiopatologia da silicose, atuando diretamente na evolução da resposta inflamatória e fibrótica. Essas células participam ativamente na instalação, evolução e manutenção da resposta fibrótica causada por

sílica no pulmão (24). No nosso estudo, observamos que 7 dias após instilação com sílica, os camundongos apresentaram um número expressivamente maior de macrófagos F4/80<sup>+</sup> no pulmão, principalmente no interior de granulomas. Como esperado, os animais silicóticos mostraram um aumento significativo de macrófagos F4/80<sup>+</sup> no pulmão 7 dias após instilação com sílica, e o tratamento com lidocaína, na fase inicial, em ambas as doses, foi capaz de reduzir significativamente o número dessas células.

As citocinas e quimiocinas, tais como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CXCL2/MIP-2 e CXCL1/KC são produzidos e secretados por macrófagos residentes e células estruturais, e estão diretamente envolvidos na cascata de sinalização que recrutam monócitos, neutrófilos, linfócitos, e estimulam a proliferação e ativação de fibroblastos (15). Há evidências na literatura que mostram o aumento na produção de todas as citocinas e quimiocinas, acima destacadas, no pulmão de pacientes silicóticos e modelos experimentais de silicose (91)(92). A produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos alveolares é um importante mediador no início da resposta inflamatória após exposição à sílica, sendo um mediador pró-inflamatório e pró-fibrótico fundamental na silicose, podendo aumentar o poder de fagocitose de macrófagos, e produção de citocinas (93). Já o IFN- $\gamma$  é tido como um importante mediador para a diferenciação de linfócitos e ativação de macrófagos na silicose (94). Na silicose aguda é visto um grande influxo de neutrófilos no pulmão de camundongos silicóticos, e os mediadores envolvidos na quimioatração dessas células, como CXCL2/MIP-2 e CXCL1/KC, são consideradas as quimiocinas de maior importância na formação de granulomas no pulmão durante uma inflamação crônica (95)(96). Em nossos resultados, observamos um aumento significativo na produção de citocinas e quimiocinas no pulmão de camundongos silicóticos, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CXCL2/MIP-2 e CXCL1/KC. A liberação de citocinas no local de lesão coordena a resposta inflamatória no local, e induz a quimiotaxia de células inflamatórias. De forma interessante, o tratamento com lidocaína na fase inicial, nas doses de (1 e 2%), inibiu a produção de todos os mediadores inflamatórios analisados. Já foi demonstrado que a lidocaína é capaz de inibir a produção de mediadores inflamatórios no lavado broncoalveolar em modelos experimentais de injúria pulmonar (62), bem como é capaz de inibir a produção de citocinas em diferentes tipos celulares, e essa inibição se mostrou estar associada à inibição do fator de transcrição NF- $\kappa$ b e a fosforilação da p38 MAPK (55)(54)(97). Desta forma, é provável que o efeito anti-inflamatório da lidocaína seja resultado da inibição dessas vias em células inflamatórias e estruturais no pulmão. É interessante notar, que o controle inicial da resposta inflamatória pela lidocaína resultou em uma diminuição expressiva na quantidade de

citocinas e quimiocinas na fase aguda da silicose, destacando-se assim, a importância do controle inicial da inflamação em uma doença de caráter inflamatório crônico.

Em seguida avaliamos o efeito do tratamento na fase inicial com lidocaína sobre os parâmetros de função pulmonar em animais silicóticos crônicos. De maneira interessante, constatamos que o tratamento diário com lidocaína (1 - 2%) por 7 dias consecutivos, iniciado 6 horas após a instilação de sílica inibiu, em ambas as concentrações, os valores de elastância tecidual no vigésimo oitavo dia após estímulo com sílica. Ademais, a lidocaína foi capaz de reduzir a hiper-reatividade à metacolina em ambos os parâmetros analisados.

Em um processo de cicatrização após uma lesão pulmonar, a proliferação de pneumócitos do tipo II é benéfica para a restauração do epitélio pulmonar, enquanto que a inibição da proliferação de fibroblastos é provavelmente vantajosa após a lesão. Na fisiopatologia da silicose ocorre a proliferação de fibroblastos, e diferenciação para um fenótipo mais ativo, com excessiva produção de colágeno (24)(98). Na literatura, é visto que a lidocaína é capaz de inibir a proliferação de fibroblastos, sem impedir a proliferação de pneumócitos do tipo II (99)(100)(101). Levando em consideração os achados da literatura, podemos sugerir que o efeito benéfico observado sob as alterações morfológicas nos pulmões de camundongos silicóticos tratados com lidocaína, se deve à inibição da proliferação de fibroblastos, com redução na produção do conteúdo de colágeno e um menor número de granulomas no pulmão desses animais. Além disso, sem a inibição da proliferação de pneumócitos do tipo II pela lidocaína, lesões pulmonares provocadas pela sílica podem ser revertidas pela re-epitelização do tecido pulmonar.

Nossos dados mostram, claramente, que a administração de lidocaína, iniciado 6 horas após instilação de sílica por 7 dias consecutivos, foi capaz de limitar o desenvolvimento da resposta fibrótica na fase crônica da silicose. Entretanto, uma vez instalado o processo fibrótico, seria a lidocaína capaz de reverter esse quadro? Para avaliar essa hipótese utilizamos um segundo desenho experimental, no qual instilamos sílica no dia 0 e começamos o tratamento com lidocaína do vigésimo primeiro dia, sendo as análises feitas 28 dias pós-sílica.

Observamos que o tratamento com lidocaína, iniciado 21 dias após estímulo com sílica, foi incapaz de alterar os parâmetros de resistência e elastância pulmonar, quando comparamos com os animais saudáveis, bem como não inibiu a resposta de hiper-reatividade das vias aéreas nesses animais. Nas análises histológicas, identificamos alterações na arquitetura pulmonar e formação de extensos granulomas, e intensa deposição de fibras colágenas comparado ao grupo de animais salina. A lidocaína não alterou o quadro fibrótico instalado no pulmão dos animais silicóticos. De forma similar, a lidocaína não se mostrou eficaz em

reduzir a expressão de F4/80 no pulmão dos animais silicóticos, bem como não reduziu a produção de citocinas e quimiocinas no pulmão desses animais. Dessa forma, podemos afirmar que os efeitos benéficos da lidocaína parecem não se fazerem presentes quando os componentes de fibrose e de inflamação crônica estão instalados nos pulmões de camundongos silicóticos. Mais ainda, parecem ser pequenas as chances de que um tratamento administrado tardiamente com lidocaína venha a ser bem sucedido em pacientes silicóticos crônicos. Entretanto, a utilização da lidocaína parece ser útil na determinação dos mecanismos celulares que induzem o quadro de silicose.

Como foi dito anteriormente, os macrófagos exercem importante papel no processo inflamatório e fibrótico provocado pela sílica no pulmão, e já está bem descrito na literatura que a lidocaína exerce ação inibitória sobre diversos macrófagos (97)(102)(71). Baseado nisso, buscamos verificar o efeito da lidocaína sobre macrófagos alveolares (linhagem AMJ11) de camundongo, pois este é o tipo celular que mais se assemelha àquele de nosso modelo. Como esperado, a lidocaína foi capaz de inibir a produção de TNF- $\alpha$  nessas células induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS). Já foi observada a produção elevada de TNF- $\alpha$  no lavado broncoalveolar de pacientes silicóticos (103), e esse mediador parece estar envolvido principalmente na fase inicial da doença, uma vez que a produção deste precede a inflamação crônica e fibrose no pulmão (104)(82). Desta forma, a ação inibitória da lidocaína sobre a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos alveolares pode ser o mecanismo pelo qual essa molécula controla a exacerbação da resposta inflamatória no pulmão provocado pela inalação de partículas de sílica.

Sob diferentes estímulos os macrófagos podem assumir estados de ativação distintos, por exemplo, a ativação “clássica”, chamado macrófago M1, é induzido por estímulos a partir de citocinas de perfil Th1, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e componentes bacterianos, como LPS. Em contraste, macrófagos com fenótipo “alternativo”, também chamado M2, são induzidos a partir de citocinas de perfil Th2 como IL-4 e IL-13. Os macrófagos com polarização M1 são considerados pró-inflamatórios, e são caracterizados pela expressão de genes relevantes para a inflamação e imunidade mediada por células, e expressam a enzima óxido nítrico sintase (iNOS), responsável pela metabolização da arginina em óxido nítrico. Enquanto que os macrófagos de perfil M2 são considerados de perfil anti-inflamatórios, e caracterizados pela produção de citocinas anti-inflamatórias e moléculas implicadas na remodelação tecidual, e expressam a enzima arginase, responsável pela metabolização da arginina em ornitina e uréia (105)(66).



Buscando avaliar o efeito da lidocaína sobre diferentes fenótipos de macrófagos, implementamos uma técnica em nosso laboratório para diferenciação e polarização de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos. Este sistema consta da adição de células recuperadas da medula óssea que são cultivadas em placas de petri na presença de M-CSF, que é secretado por células L929, e é usado na forma de meio condicionado de L929. Sob estas condições, as células progenitoras da medula óssea irão proliferar e diferenciar em uma população homogênea de macrófagos derivados de medula óssea. O fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), também conhecido como fator estimulador de colônia 1 (CSF1), é um fator de crescimento, responsável pela proliferação e diferenciação de células progenitoras mielóides em macrófagos/monócitos (106). Este protocolo de diferenciação é bastante utilizado na literatura para avaliar diferentes fenótipos de macrófagos (67), e procuramos acessar a eficiência da diferenciação por meio de análise da expressão de F4/80 por citometria de fluxo.

Primeiramente, procuramos avaliar se a lidocaína seria capaz de influenciar a polarização de macrófagos para um perfil M1 ou M2. Para tanto, utilizamos LPS para polarização de macrófagos para um perfil M1, e IL-4 para polarização de macrófagos para um perfil M2. Sabe-se que a capacidade dos macrófagos derivados da medula óssea em diferenciar para subtipos M1 e M2 está associada à secreção aumentada de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  para M1, e CCL22/MDC para M2 (107). De forma satisfatória, a estimulação com LPS levou ao aumento na produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, enquanto que a estimulação por IL-4 induziu um aumento na produção de CCL22/MDC e CCL17/TARC nas células. O TNF- $\alpha$ , como dito anteriormente, se destaca por ser um dos primeiros mediadores na fase inicial da resposta inflamatória, e é produzido em grande escala por macrófagos alveolares estimulados por sílica. A quimiocina CCL22/MDC é descrita como um potente quimioatraente de monócitos e linfócitos Th2, e tem seus níveis aumentados em modelos de inflamação e fibrose pulmonar (108)(109). A quimiocina CCL17, juntamente com a CCL22/MDC, é importante para o recrutamento de linfócitos e macrófagos, e já foi descrito na literatura por ter um importante papel para o desenvolvimento da fibrose pulmonar (110). O tratamento com lidocaína, antes do estímulo com LPS, inibiu a produção de TNF- $\alpha$ , enquanto que foi ineficaz em inibir a produção elevada de CCL22/MDC e CCL17/TARC em macrófagos estimulados com IL-4. Esses resultados sugerem que a lidocaína foi capaz de inibir a polarização de macrófagos para um perfil M1, sem afetar a polarização para um perfil M2. Ademais, a lidocaína foi capaz de exercer sua ação inibitória sem afetar a viabilidade celular dos macrófagos.

Na sequência, utilizando um outro protocolo experimental, buscamos investigar se a lidocaína seria capaz de inibir a ativação de macrófagos já polarizados para os perfis M1 e M2. Utilizamos para tanto um segundo protocolo de polarização, no qual estimulamos as células com IFN- $\gamma$  para fenótipo M1 e IL-4 para fenótipo M2, e após 24 horas estimulamos as células com LPS para induzir a produção de citocinas. De forma surpreendente a lidocaína foi capaz de inibir a produção de IL-1 $\beta$  de macrófagos M1, sem alterar a produção de CCL22/MDC de macrófagos M2. A lidocaína foi capaz de suprimir a ativação dos macrófagos sem afetar a viabilidade das células.

Esses achados sugerem que a lidocaína foi capaz de atuar seletivamente sobre subtipos diferentes de macrófago, preferencialmente suprimindo macrófagos com perfil pró-inflamatório. O mecanismo pelo qual a lidocaína poderia estar inibindo a ativação dos macrófagos pode estar atrelado a uma inibição seletiva de vias de transcrição distintas, que contribuem preferencialmente para produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em macrófagos.

Os macrófagos com uma ativação “alternativa” ou de perfil M2 são considerados cruciais no remodelamento tecidual e fibrose, contribuindo com a produção de uma série de mediadores pró-fibróticos (66). Seria um tanto surpreendente ver que ao não suprimir a polarização de macrófagos M2, a lidocaína estaria contribuindo para uma redução na fibrose pulmonar. Entretanto, é importante notar que a inibição de macrófagos M1 no início da inflamação e, a promoção do perfil M2, pode de fato contribuir para uma promoção da resolução antecipada da resposta inflamatória. E apesar do perfil de macrófago M2 estar quase sempre associado à promoção da fibrose, um estudo mostrou que macrófagos M2 não são necessários para o desenvolvimento de uma resposta Th2 e fibrose, e de modo surpreendente foi capaz de inibir ambas as respostas em um modelo murino de esquistossomose (111). No caso da silicose, ainda é necessário saber qual a real contribuição de cada subtipo de macrófago no desenvolvimento da resposta fibrótica.

## **6.0 CONCLUSÃO**

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com lidocaína, na fase aguda da silicose, foi capaz de limitar o desenvolvimento de uma resposta fibrótica 7 dias e 28 dias após provocação com sílica, inibindo efetivamente o conjunto de alterações morfológicas e funcionais característicos do quadro silicótico. Entretanto, a lidocaína não se mostrou eficaz em uma fase crônica da silicose. Os mecanismos pelos quais a lidocaína parece suprimir as respostas inflamatória e fibrótica parecem estar, pelo menos em parte, associados ao bloqueio do recrutamento e/ou ativação de macrófagos M1, de perfil pró-inflamatórios, presentes na fase inicial da doença. No entanto, parece pouco provável que o tratamento com lidocaína pudesse trazer benefício clínico para pacientes com silicose pré-instalada, uma vez que nada foi revertido no quadro fisiopatológico da silicose quando de sua administração após o processo ter sido disparado.

## 7.0 REFERÊNCIAS

1. Who. World Health Organization. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach. Geneva, Switzerland. *Chron Respir Dis*. 2007;1–146.
2. Bousquet J, Kiley J, Bateman ED, Viegi G, Cruz a a, Khaltaev N, et al. Prioritised research agenda for prevention and control of chronic respiratory diseases. *Eur Respir J* [Internet]. 2010 Nov [cited 2014 May 16];36(5):995–1001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223919>
3. Bousquet J, Dahl R, Khaltaev N. Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2007;62(3):216–23.
4. Sirajuddin A, Kanne JP. Occupational lung disease. *J Thorac Imaging* [Internet]. 2009 Nov;24(4):310–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19935227>
5. Rawlins EL. The building blocks of mammalian lung development. *Dev Dyn* [Internet]. 2011 Mar [cited 2014 May 16];240(3):463–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21337459>
6. Holgate ST, Lackie P, Wilson S, Roche W, Davies D. Bronchial Epithelium as a Key Regulator of Airway Allergen Sensitization and Remodeling in Asthma. 2000;162(9):113–7.
7. Ware LB. Pathophysiology of Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. 2006;1(212):337–49.
8. Beckett WS. Occupational Respiratory Diseases. *N Engl J Med*. 2000;342:406–13.
9. Farzaneh MR, Jamshidiha F, Kowsarian S. Inhalational lung disease. *Int J Occup Environ Med* [Internet]. 2010 Jan;1(1):11–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022777>
10. J PCR, Cullinan P, Reid P. Pneumoconiosis. 2013;22(2):249–52.
11. Driscoll T, Bs MB, Nelson ãDI, Steenland K, Leigh J, Concha-barrientos M, et al. The Global Burden of Non-Malignant Respiratory Disease Due to Occupational Airborne Exposures. 2005;445:432–45.
12. Seaman DM, Meyer C a., Kanne JP. Occupational and Environmental Lung Disease. *Clin Chest Med* [Internet]. Elsevier Inc; 2015;36(2):249–68. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272523115000283>
13. de Capitani EM, Algranti E. [Other pneumoconioses]. *J Bras Pneumol publicação Of da Soc Bras Pneumol e Tisiologia* [Internet]. 2006 Jan;32 Suppl 2(Supl 1):S54–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17273600>

14. Han J, Kwon OJ, Kim TS. Pneumoconiosis : Comparison of Imaging and Pathologic Findings 1 OBJECTIVES. 2006;59–78.
15. Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the Pathogenesis of Asbestosis and Silicosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1666–80.
16. Lee S, Matsuzaki H, Kei NK. Silica exposure and altered regulation of autoimmunity. *Env Heal Prev Med*. 2014;322–9.
17. Leung CC, Yu ITS, Chen W. Silicosis. *Lancet* [Internet]. 2012 May 26 [cited 2014 Apr 30];379(9830):2008–18. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22534002>
18. Martínez C, Prieto A, García L, Quero A, González S, Casan P. Silicosis: a disease with an active present. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2010 Feb;46(2):97–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19818543>
19. Thomas CR, Kelley TR. A brief review of silicosis in the United States. *Environ Health Insights* [Internet]. 2010 Jan;4:21–6. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2879610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Jindal SK. Silicosis in India: past and present. *Curr Opin Pulm Med* [Internet]. 2013 Mar [cited 2015 Jan 2];19(2):163–8. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23254775>
21. Luz FDF, Stüker VC, Trevisan MB, Letícia S, Bacchi M. Silicose em ex-mineiros de extração de cobre Silicosis among former copper mine workers. *Cien Saude Colet*. 2011;16:3421–6.
22. Rimal B, Greenberg AK, Rom WN. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Curr Opin Pulm Med* [Internet]. 2005 Mar;11(2):169–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15699791>
23. Rees D, Murray J. Silica , silicosis and tuberculosis. *INT J TUBERC LUNG DIS*. 2007;11(5):474–84.
24. Castranova V, Vallyathan V, Virginia W. Silicosis and Coal Workers ' Pneumoconiosis. 2000;108(August 1999):675–84.
25. Haux F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7:168–73.
26. Wick G, Grundtman C, Mayerl C, Wimpissinger T-F, Feichtinger J, Zelger B, et al. The immunology of fibrosis. [Internet]. *Annual review of immunology*. 2013. 107-35 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23516981>

27. Finigan JH, Downey GP, Kern J a. Human epidermal growth factor receptor signaling in acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2014 May 16];47(4):395–404. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3488630&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
28. Li Y, Wang Y, Liu X. The role of airway epithelial cells in response to mycobacteria infection. *Clin Dev Immunol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Apr 30];2012:791392. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3337601&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. B. Rivas-Santiago, J. C. L. Contreras ES& RH-P. The Potential Role of Lung Epithelial Cells and b -defensins in Experimental Latent Tuberculosis. *Scand J Immunol*. 2008;549:448–52.
30. Aggarwal NR, King LS, Alessio FRD. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;21224.
31. Byeon SE, Yi Y, Oh J, Yoo BC, Hong S, Cho JY. The Role of Src Kinase in Macrophage-Mediated Inflammatory Responses. *Mediators Inflamm*. 2012;2012.
32. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity*. 2003;19:71–82.
33. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages : developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Publ Gr* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;14(6):392–404. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3671>
34. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation : time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;13(March):1–13.
35. Sica A, Mantovani A. Science in medicine Macrophage plasticity and polarization : in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122(3):787–95.
36. Pollard KM, Pollard KM. Silica, Silicosis, and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2016;7(March):1–7.
37. Marsh T, Pietras K, Mcallister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Mol Basis Dis* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;1832(7):1070–8. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.10.013>
38. Hardie WD, Glasser SW, Hagood JS. Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Pathol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2014 May 16];175(1):3–16. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2708789&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
39. Zhang H, Maric I, Diprima MJ, Khan J, Orentas RJ, Kaplan RN, et al. Fibrocytes represent a novel MDSC subset circulating in patients with metastatic cancer. *Blood*. 2016;122(7):1105–14.
  40. Strieter RM, Mehrad B. New mechanisms of pulmonary fibrosis. *Chest* [Internet]. 2009 Nov [cited 2014 May 16];136(5):1364–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2773361&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  41. Ki Moon Bang et al. Morbidity and Mortality Weekly Report Silicosis Mortality Trends and New Exposures to Respirable Crystalline Silica. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2015;64(5).
  42. Álvarez RF, González CM, Martínez Q, Jesús J, Pérez B, Fernández C, et al. Guidelines for the Diagnosis and Monitoring of Silicosis. *Arch Bronconeumol* [Internet]. SEPAR; 2015;51(2):86–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arbr.2014.07.002>
  43. Greenberg MI, Waksman J, Curtis J. Silicosis : A Review. 2007;(August):394–416.
  44. Ferreira TPT, de Arantes ACS, do Nascimento CVMF, Olsen PC, Trentin PG, Rocco PRM, et al. IL-13 immunotoxin accelerates resolution of lung pathological changes triggered by silica particles in mice. *J Immunol* [Internet]. 2013 Nov 15 [cited 2014 Nov 6];191(10):5220–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24133168>
  45. Liu WW, Wang HX, Yu W, Bi XY, Chen JY, Chen LZ, et al. Treatment of silicosis with hepatocyte growth factor-modified autologous bone marrow stromal cells : a non-randomized study with follow-up. *Genet Mol Res*. 2015;14(3):10672–81.
  46. Lopes-pacheco M, Xisto G, Ornellas M. Repeated Administration of Bone Marrow – Derived Cells Prevents Disease Progression in Experimental Silicosis. *Cell Physiol Biochem*. 2013;32:1681–94.
  47. Tetzlaff JE. THE PHARMACOLOGY OF LOCAL ANESTHETICS. *Anesthesiol Clin North America*. 2000;18(June):217–33.
  48. Costa L, Paiva DA, Cavalcanti AL. ANESTÉSICOS LOCAIS EM ODONTOLOGIA : UMA REVISÃO DE LITERATURA LOCAL ANESTHETICS IN DENTISTRY : A LITERATURE REVIEW. 2005;11(2):35–42.
  49. Nau C, Wang GK. Interactions of Local Anesthetics with Voltage-gated Na +

- Channels. *J Membr Biol.* 2004;8:1–8.
50. Hahnenkamp K, Theilmeyer G, Hoenemann CW, Aken HK Van. The Effects of Local Anesthetics on Perioperative. *Anesth Analg.* 2002;94.
  51. Markus W. Hollmann and Marcel E. Durieux. Local Anesthetics and the Inflammatory Response A New Therapeutic Indication ? *Anesthesiology.* 2000;93(3):858–75.
  52. Terrance A Mackenzie and Young ER. Local Anesthetic Update. *Anesth Prog.* 1993;40:29–34.
  53. Harris KL, Bainbridge NJ, Jordan NR, Sharpe JR. The effect of topical analgesics on ex vivo skin growth and human keratinocyte and fibroblast behavior. *Wound Repair Regen* [Internet]. 2009 [cited 2014 May 16];17(3):340–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19660041>
  54. Lang A, Ben Horin S, Picard O, Fudim E, Amariglio N, Chowers Y. Lidocaine inhibits epithelial chemokine secretion via inhibition of nuclear factor kappa B activation. *Immunobiology* [Internet]. Elsevier; 2010 Apr [cited 2014 May 16];215(4):304–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559500>
  55. Lahav M, Levite M, Bassani L, Lang a, Fidder H, Tal R, et al. Lidocaine inhibits secretion of IL-8 and IL-1beta and stimulates secretion of IL-1 receptor antagonist by epithelial cells. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2002 Feb;127(2):226–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1906346&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  56. Berger C, Rossaint J, Van Aken H, Westphal M, Hahnenkamp K, Zarbock A. Lidocaine reduces neutrophil recruitment by abolishing chemokine-induced arrest and transendothelial migration in septic patients. *J Immunol* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2015 Jan 9];192(1):367–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24293632>
  57. MacGregor RR, Thorner RE, Wright DM. Lidocaine inhibits granulocyte adherence and prevents granulocyte delivery to inflammatory sites. *Blood* [Internet]. 1980 Aug;56(2):203–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7397378>
  58. Shiga M, Nishina K, Mikawa K, Obara H. The effects of lidocaine on nitric oxide production from an activated murine macrophage cell line. *Anesth Analg* [Internet]. 2001 Jan;92(1):128–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133614>
  59. Lahat a, Ben-Horin S, Horin SB, Lang a, Fudim E, Picard O, et al. Lidocaine down-regulates nuclear factor-kappaB signalling and inhibits cytokine production and T cell



- proliferation. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2008 May [cited 2014 May 16];152(2):320–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2384107&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
60. Serra MF, Anjos-Valotta E a, Olsen PC, Couto GC, Jurgilas PB, Cotias AC, et al. Nebulized lidocaine prevents airway inflammation, peribronchial fibrosis, and mucus production in a murine model of asthma. *Anesthesiology* [Internet]. 2012 Sep;117(3):580–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22846675>
  61. Nafe L a, Guntur VP, Dodam JR, Lee-Fowler TM, Cohn L a, Reinero CR. Nebulized lidocaine blunts airway hyper-responsiveness in experimental feline asthma. *J Feline Med Surg* [Internet]. 2013 Aug [cited 2015 Jan 9];15(8):712–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23392613>
  62. Nishina K, Maekawa N, Obara H. Lidocaine attenuates hyperoxic lung injury in rabbits. *Actn Anesthesiol Scand*. 1996;40:318–25.
  63. Medicine E, Meeting A, Ernst AA, Marvez-valls E, Patterson J. 1 % Lidocaine Versus 0.5 % Diphenhydramine for Local Anesthesia in Minor Laceration Repair. *Ann Emerg Med*. 1994;23(June):1328–32.
  64. Pendleton J, Costa J, Wludyka P, Carvin DM, Rosser CJ. Combination of Oral Tramadol, Acetaminophen and 1% Lidocaine Induced Periprostatic Nerve Block for Pain Control During Transrectal Ultrasound Guided Biopsy of the Prostate: A Prospective, Randomized, Controlled Trial. *J Urol*. 2006;176(October):1372–5.
  65. Vanhée D, Gosset P, Boitelle A, Wallaert B, Tonnel AB. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Eur Respir J*. 1995;8:834–42.
  66. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *Mediators Inflamm*. 2013;(November 2012):176–85.
  67. Weischenfeldt J, Porse B. Bone Marrow-Derived Macrophages ( BMM ): Isolation and Applications. *Cold Spring Harb Protoc*. 2008;3(12):1–7.
  68. 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.
  69. Gutierrez TM, Sousa C, Baez N, Morales MM, Rieken P, Rocco M. Entendendo a fisiopatologia da silicose. *Pulmão RJ*. 2008;17(1):33–7.
  70. Cesar H, Marques P, Martins S, Maria M, Souza G De. The use of lidocaine as an anti-

- inflammatory substance : A systematic review. 2009;37:93–7.
71. Shiga M, Nishina K, Mikawa K, Obara H. The Effects of Lidocaine on Nitric Oxide Production from an Activated Murine Macrophage Cell Line. *Anesth Analg*. 2001;92:128–33.
  72. Hollmann MW, Gross a, Jelacin N, Durieux ME. Local anesthetic effects on priming and activation of human neutrophils. *Anesthesiology* [Internet]. 2001 Jul;95(1):113–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11465548>
  73. Su D, Gu Y, Wang Z, Wang X. Lidocaine attenuates proinflammatory cytokine production induced by extracellular adenosine triphosphate in cultured rat microglia. *Anesth Analg* [Internet]. 2010 Sep [cited 2014 May 16];111(3):768–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20686009>
  74. Hollmann MW, Wieczorek KS, Berger a, Durieux ME. Local anesthetic inhibition of G protein-coupled receptor signaling by interference with Galpha(q) protein function. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2001 Feb;59(2):294–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160866>
  75. Borges VM, Falcão H, Leite-Júnior JH, Alvim L, Teixeira GP, Russo M, et al. Fas ligand triggers pulmonary silicosis. *J Exp Med* [Internet]. 2001 Jul 16;194(2):155–64. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193452&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  76. Gerald S. Davis DRH, John N. Evans, Don J. Lapenas A, Brody AR. Alveolar Macrophage Stimulation and Population Changes in Silica Exposed Rats. *Chest*. 1981;1–3.
  77. Stansbury RC, Wang M, Hogg JP, Petsonk EL. Rapid Decline in Lung Function in Coal Miners : Evidence of Disease in Small Airways. *Am J Industrial Med*. 2013;56:1107–12.
  78. Diaz-guzman E, Aryal S, Mannino DM. Occupational Chronic Obstructive Pulmonary Disease An Update. *Clin Chest Med* [Internet]. Elsevier Inc; 2012;33(4):625–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2012.07.004>
  79. Vianna EO, Barbieri MA, Rona RJ. Asthma definitions, relative validity and impact on known risk factors in young Brazilians. *Allergy*. 2007;(1):1146–51.
  80. Faffe DS, Silva GH, Kurtz PM, Negri EM, Capelozzi VL, Rocco PR, et al. Lung tissue mechanics and extracellular matrix composition in a murine model of silicosis. *J Appl Physiol* [Internet]. 2001 Apr;90(4):1400–6. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11247940>
81. Machado MN, Schmidt AC, Saldiva PHN, Faffe DS, Zin WA. Pulmonary functional and morphological damage after exposure to tripoli dust. *Respir Physiol Neurobiol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014 Jun 1 [cited 2015 Feb 23];196:17–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24582717>
  82. Marco T. New developments in the understanding of immunology in silicosis *Franc*. 2007;168–73.
  83. Howlett T, Lerman J. Effects of lidocaine and steroids on breast milk-induced lung injury in rabbits. *Paediatr Anaesth* [Internet]. 2006 May [cited 2014 May 16];16(5):523–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16677261>
  84. Flondor M, Listle H, Kemming GI, Zwissler B, Hofstetter C. Effect of inhaled and intravenous lidocaine on inflammatory reaction in endotoxaemic rats. *Eur J Anaesthesiol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 May 16];27(1):53–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19444124>
  85. Waite a, Gilliver SC, Masterson GR, Hardman MJ, Ashcroft GS. Clinically relevant doses of lidocaine and bupivacaine do not impair cutaneous wound healing in mice. *Br J Anaesth* [Internet]. 2010 Jun [cited 2014 May 16];104(6):768–73. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2867659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  86. Re S Lo, Yakoub Y, Devosse R, Uwambayinema F, Couillin I, Ryffel B, et al. Uncoupling between inflammatory and fibrotic responses to silica: evidence from MyD88 knockout mice. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Feb 23];9(7):e99383. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4106757&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  87. Lopes-Pacheco M, Ventura TG, de Oliveira HD, Monção-Ribeiro LC, Gutfilen B, de Souza S a L, et al. Infusion of bone marrow mononuclear cells reduces lung fibrosis but not inflammation in the late stages of murine silicosis. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Feb 23];9(10):e109982. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4192548&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  88. Sakamoto H, Zhao L-H, Jain F, Kradin R. IL-12p40(-/-) mice treated with intratracheal bleomycin exhibit decreased pulmonary inflammation and increased fibrosis. *Exp Mol Pathol*. 2002;72(1):1–9.

89. Otsuki T, Maeda M, Murakami S, Hayashi H, Miura Y, Kusaka M, et al. Immunological Effects of Silica and Asbestos. 2007;4(4):261–8.
90. Corbel M, Belleguic C, Boichot E, Lagente V, Pneumologie S De. Involvement of gelatinases ( MMP-2 and MMP-9 ) in the development of airway in £ ammation and pulmonary fibrosis. Cell Biol Toxicol. 2002;51–61.
91. Lee EH, Lee E, Kim HJ, Jang AS, Koh ES, Uh S, et al. Overexpression of apolipoprotein A1 in the lung abrogates fibrosis in experimental silicosis. PLoS One [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 May 16];8(2):e55827. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3568133&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
92. Yucesoy B, Vallyathan V, Landsittel DP, Simeonova P, Luster MI. Cytokine polymorphisms in silicosis and other pneumoconioses. Mol Cell Biochem. 2002;234/235:219–24.
93. Slavov E, Miteva L, Prakova G, Gidikova P, Stanilova S. Correlation between TNF- $\alpha$  and IL-12p40-containing cytokines in silicosis. Toxicol Ind Health [Internet]. 2010 Sep [cited 2014 May 16];26(8):479–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20529962>
94. Davis GS, Pfeiffer LM, Hemenway DR. Interferon-gamma production by specific lung lymphocyte phenotypes in silicosis in mice. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 2000 Apr;22(4):491–501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10745030>
95. Borges VM, Lopes MF, Falcão H, Leite-júnior JH, Rocco PRM, Davidson WF, et al. Apoptosis Underlies Immunopathogenic Mechanisms in Acute Silicosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2002;27:78–84.
96. Hata J, Aoki K, Mitsuhashi H, Uno H. Change in location of cytokine-induced neutrophil chemoattractants ( CINC $s$  ) in pulmonary silicosis. Exp Mol Pathol. 2003;75:68–73.
97. Yuan T, Li Z, Li X, Yu G, Wang N, Yang X. Lidocaine attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in microglia. J Surg Res [Internet]. Elsevier Inc; 2014;192(1):150–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2014.05.023>
98. Wynn T a. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. J Exp Med. 2011;208(7):1339–50.
99. Nishina K, Mikawa K, Morikawa O, Obara H, Mason RJ. The effects of intravenous anesthetics and lidocaine on proliferation of cultured type II pneumocytes and lung fibroblasts. Anesth Analg [Internet]. 2002 Feb;94(2):385–8, table of contents.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812704>

100. Immunology E, Fedder C, Aguirre J, Hasler M, Urner M, Kalberer S, et al. In vitro exposure of human fibroblasts to local anaesthetics impairs cell growth. *Clin Exp Immunol.* 2010;280–8.
101. Martinsson T, Haegerstrand A, Dalsgaard C. Ropivacaine and lidocaine inhibit proliferation of non-transformed cultured adult human fibroblasts, endothelial cells and keratinocytes. *Agents Action.* 1993;40.
102. Azuma Y, Ohura K. Comparison of the effect of lidocaine-epinephrine and prilocaine-felypressine to alter macrophage functions. *Int Immunopharmacol.* 2001;1(5):911–23.
103. Slavov E, Miteva L, Prakova G, Gidikova P, Stanilova S. Correlation between TNF-alpha and IL-12p40-containing cytokines in silicosis. *Toxicol Ind Health.* 2010;26(8).
104. Driscoll KE, Hassenbein DG, Cartera JM, Kunkelb SL, Quinlan TR, Mossman BT. TNF-alpha and increased chemokine expression in rat lung after particle exposure. *Toxicol Lett.* 1995;Toxicology:483–9.
105. Hiraiwa K, Eeden SF Van. Contribution of Lung Macrophages to the Inflammatory Responses Induced by Exposure to Air Pollutants. *Mediators Inflamm.* 2013;2013.
106. Frederic Geissmann, Markus G. Manz, Steffen Jung MHS, Miriam Merad KL. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science (80-).* 2010;327(656).
107. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol [Internet]. Elsevier Inc.;* 2013;281(1):51–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.010>
108. Ritter M, Go R, Chaudhary N, Wiedenmann A, Jung B, Weith A, et al. Elevated expression of TARC (CCL17) and MDC (CCL22) in models of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334:254–62.
109. Inoue T, Fujishima S, Ikeda E, Yoshie O, Tsukamoto N, Aiso S, et al. CCL22 and CCL17 in rat radiation pneumonitis and in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2004;24:49–56.
110. Belperio JA, Dy M, Murray L, Marie D, Xue YY, Strieter RM, et al. The Role of the Th2 CC Chemokine Ligand CCL17 in Pulmonary Fibrosis. *J Immunol.* 2004;173:4692–8.
111. Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-kane MM, Wilson MS, El KC, Smith AM, et al. Arginase-1 Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine Driven Inflammation and

Fibrosis. PLoS Pathog. 2009;5(4).