

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

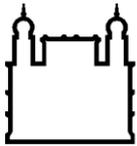
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**EFEITO DO COMPOSTO FTALIMÍDICO LASSBIO-468 SOBRE A
FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR SÍLICA EM CAMUNDONGOS**

THIAGO JOSÉ FIGUEIRA RAMOS

RIO DE JANEIRO

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

THIAGO JOSÉ FIGUEIRA RAMOS

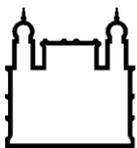
**Efeito do composto ftalimídico LASSBio-468 sobre a fibrose pulmonar induzida
por sílica em camundongos**

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

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva

RIO DE JANEIRO

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

THIAGO JOSÉ FIGUEIRA RAMOS

**Efeito do composto ftalimídico LASSBio-468 sobre a fibrose pulmonar induzida
por sílica em camundongos**

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva

Aprovada em: 10/10/2012

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida - Presidente

Profa. Dra. Lídia Moreira Lima

Prof. Dr. Samuel Santos Valença

Prof. Dr. Hugo Castro Faria Neto

Profa. Dra. Patricia Dias Fernandes

Rio de Janeiro, 10 de outubro de 2012

À minha família,

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, saúde e tantas vitórias;

Aos meus avós por terem cruzado um oceano e, ainda que em terras estrangeiras, partindo apenas da força de trabalho e vontade de vencer, construíram família, sonharam e venceram. Deram-me o mais belo exemplo de luta que certamente terei em toda minha vida;

Aos meus pais e minha irmã, pelo amor, carinho, exemplo, educação e por sempre terem acreditado em mim. Amo muito vocês! Obrigado por me darem a oportunidade de estudar, por tomarem meus sonhos pelos seus e por trabalharem tanto pela nossa família. Que eu um dia eu possa recompensá-los por tudo isso;

À minha esposa Cristiane, pelo amor, companheirismo, doçura, paciência e por tantas risadas que damos juntos. Amo muito você! Obrigado por fazer parte da minha vida, por alegrar os meus dias e por se dedicar tanto a nós, a nossa casa, ao nosso crescimento e a família que estamos construindo;

Aos meus sogros e demais familiares (tios, primos, cunhados, sobrinhos, afilhados) pelo o apoio, incentivo e carinho ao longo de toda esta jornada;

Aos amigos Aline Vieira, Andressa Moraes, Bianca Torres, Davidson Dias, Daniele Matheus, Diana Dalzy, Patrícia Trentin, Priscilla Olsen e Rafael Torres, pelo convívio diário, ideias, risadas, apoio nos ensaios, por me ajudarem até tarde naqueles experimentos mais longos, por me aconselharem na pesquisa e, também, na vida. Obrigado por estarem ao meu lado!

Aos amigos Francisco Alves e Sabrina Lucena pelo incentivo e apoio ao longo de toda caminhada. No momento em que precisei, lutaram comigo e me ajudaram a superar os desafios;

Aos amigos Bruno Arruda, Diogo Ismaia e demais amigos de ensino fundamental e médio, por participarem da minha formação pessoal e profissional com incentivo, diversão, apoio e críticas;

Aos professores e amigos da Faculdade de Farmácia (UFRJ) por terem contribuído de forma determinante na minha formação profissional;

Aos amigos, professores e companheiros de trabalho na UERJ, em especial à Sra. Cemília e Sr. Leonardo, pelo apoio e incentivo aos estudos;

A todos do Laboratório de Inflamação e Pavilhão Osório de Almeida, em especial a Ana Lúcia Pires, Ana Carolina Arantes, Nathália Andrade, Rafaele Almeida, Rodrigo Bandeira e Tatiana Paula Ferreira pelo o apoio constante na realização dos ensaios, e a Sra. Osirene Loureiro pelo apoio administrativo;

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Inflamação, em especial à Ana Paula D'Almeida, Lívia Lacerda e Yago Pinho que, com energia e questionamentos, me ajudaram a aprender mais junto deles;

Aos funcionários do Biotério do Pavilhão Osório de Almeida, em especial aos Srs. Edson e Nelson, pelo trato e cuidado com os animais, imprescindíveis para a realização deste trabalho;

À Dra. Sandra Aurora Perez por me ajudar nos passos iniciais da minha caminhada científica e ao Dr. Vinicius Carvalho, pela amizade, atenção com minhas dúvidas, incentivo e críticas ao longo desta caminhada;

Ao Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio/Faculdade de Farmácia - UFRJ), em especial a Profa. Dra Lídia Moreira Lima, pela colaboração, síntese e cessão do composto LASSBio-468, protagonista de nosso estudo;

Ao Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto pela leitura prévia, e aos demais membros da Banca de avaliação por terem aceito o convite para integrá-la, pelo tempo cedido e atenção com as sugestões, certamente valiosas para o ajuste deste trabalho;

À minha orientadora, Dra. Patrícia M. R. e Silva, pelos ensinamentos, pelo vasto conhecimento e experiência na vida científica. Da minha iniciação científica até aqui, obrigado por me receber, pelo apoio, presença e atenção em todos os momentos. Sua ajuda e seus conselhos foram essenciais na construção deste trabalho;

Ao Dr. Marco Aurélio Martins e Dr. Renato Sérgio Balão Cordeiro pela avaliação e críticas do trabalho ao longo de sua construção, e pelo exemplo de dedicação e sucesso na vida científica;

A todos os membros da Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (IOC) pela organização, estrutura, professores e aulas, e a FIOCRUZ pelo exemplo de instituição voltada a saúde pública nacional;

Ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico, Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro e Instituto Nacional de Fármacos (INCT-INOVAR) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de abreviações -----	pág.ix
Lista de figuras -----	pág.x
Resumo -----	pág.xi
Abstract -----	pág.xii
1 - Introdução -----	pág.1
1.1 - Sistema respiratório – Estrutura e Função -----	pág.1
1.1.1 - Mecânica da Respiração -----	pág.2
1.1.1.1 - Resistência das vias aéreas -----	pág.2
1.1.1.2 - Elastância tecidual -----	pág.3
1.1.1.3 -Hiperreatividade -----	pág.3
1.2 - Disfunções pulmonares -----	pág.4
1.2.1 –Sílica -----	pág.5
1.3 –Silicose -----	pág.6
1.3.1 - Formas de Silicose-----	pág.7
1.3.2 - Alterações na Função Pulmonar-----	pág.8
1.3.3 - Fisiopatologia-----	pág.9
1.3.3.1 - Fibrose pulmonar-----	pág.9
1.3.3.2 - Mediadores Inflamatórios -----	pág.13
1.3.3.2.1 - TNF-alfa -----	pág.15
1.3.4 - Tratamento -----	pág.16
2 - Objetivos -----	pág. 19
2.1 - Objetivos específicos -----	pág.19
3 - Materiais e Métodos -----	pág. 20
3.1 - Animais -----	pág.20
3.2 - Instilação de sílica -----	pág.20
3.3 - Tratamento -----	pág.20
3.4 - Avaliação da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas -----	pág.21
3.5 - Análise histológica -----	pág.21
3.5.1 - Morfometria -----	pág.22
3.6 - Quantificação de colágeno -----	pág.22
3.7 - Imunohistoquímica -----	pág.23
3.8 - Cultura primária de fibroblastos -----	pág.23
3.8.1 - Imunocitoquímica -----	pág.24
3.8.2 - Ensaio de proliferação de miofibroblastos -----	pág.25
3.9 - Cultura de macrófagos alveolares -----	pág.25
3.10 - Cultura de células epiteliais pulmonares -----	pág.25
3.11 - Ensaio de viabilidade celular -----	pág.26

3.12 - Quantificação de mediadores inflamatórios por ELISA -----	pág.26
3.13 - Análise estatística -----	pág.27
4 - Resultados -----	pág.28
4.1 - Análise das alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos tratados com LASSBio-468 ou talidomida -----	pág.28
4.2 - Análise da deposição de colágeno no pulmão de camundongos silicóticos tratados com LASSBio-468 ou talidomida -----	pág.28
4.3 - Análise da produção de quimiocinas e citocinas no tecido pulmonar de camundongos silicóticos tratados com LASSBio-468 -----	pág.30
4.4 - Análise da expressão da proteína alfa-actina no pulmão de camundongos silicóticos tratados com LASSBio-468 -----	pág.30
4.5 - Análise da função pulmonar de camundongos silicóticos tratados com LASSBio-468 e talidomida <i>in vivo</i> -----	pág.32
4.6 - Análise da expressão da proteína alfa-actina por miofibroblastos pulmonares <i>in vitro</i> -----	pág.33
4.7 - Avaliação da proliferação de miofibroblastos pulmonares pré-tratados com LASSBio-468 ou talidomida e estimulados com IL-13 <i>in vitro</i> -----	pág.33
4.8 - Avaliação da viabilidade de miofibroblastos pulmonares incubados com LASSBio-468 ou talidomida <i>in vitro</i> -----	pág.35
4.9 - Avaliação da produção de TNF- α por macrófagos alveolares AMJ2C11 pré-tratados com LASSBio-468 ou talidomida, e estimulados com sílica <i>in vitro</i> -----	pág.35
4.10 - Avaliação da produção de IL-8 por células epiteliais A549 pré-tratados com LASSBio-468 ou talidomida, e estimulados com sílica <i>in vitro</i> -----	pág.36
4.11 - Avaliação da viabilidade de células epiteliais A549 incubadas com LASSBio-468 ou talidomida <i>in vitro</i> -----	pág.36
5 - Discussão -----	pág.49
6 - Conclusão -----	pág.55
7 - Referências -----	pág.56

LISTA DE ABREVIACOES

α -SMA – α -actina de músculo liso

μ L – microlitro

μ g – micrograma

CPM – Contagem por minuto

EDTA – Etileno-diamino-tricloro-acético

EPM – Erro padrão da média

H&E – Hematoxilina e Eosina

IL-1 β – Interleucina-1 β

IL-8 – Interleucina-8

IL-13 – Interleucina-13

MAPK – Cinase ativadora de proteína mitognica

MCP-1 – Proteína quimiotática para monócitos-1

mg – miligrama

ml – mililitro

NF- κ B – Fator nuclear kappa de aumento de cadeia leve de linfócitos B ativados

SBF – Soro fetal bovino

TACE – Enzima conversora de TNF- α

TGF- β – Fator de transformao de crescimento- β

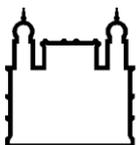
TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

TNFR^{-/-} - Deficientes para o receptor de TNF;

TRADD – Proteína do domínio de morte associado ao receptor 1 do fator de necrose tumoral;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura molecular do LASSBio-468 -----	pág. 18
Figura 1.2 - Estrutura molecular da talidomida -----	pág. 18
Figura 3.1 - Esquema de indução de silicose e administração do tratamento -----	pág. 21
Figura 4.1 - Alterações morfológicas no pulmão de camundongos instilados com salina ou sílica, tratados ou não com LASSBio-468 ou talidomida -----	pág. 29
Figura 4.2 - Análise morfométrica do pulmão de camundongos instilados com salina ou sílica, tratados ou não com LASSBio-468 ou talidomida -----	pág. 31
Figura 4.3 - Análise da deposição de colágeno no pulmão de camundongos instilados com salina ou sílica, tratados ou não com LASSBio-468 ou talidomida -----	pág. 34
Figura 4.4 - Quantificação do conteúdo de colágeno no pulmão de camundongos instilados com salina ou sílica, tratados ou não com LASSBio-468 ou talidomida -----	pág. 36
Figura 4.5 - Análise da produção de quimiocinas KC e MCP-1 no pulmão de camundongos instilados com salina ou sílica, tratados ou não com LASSBio-468 -----	pág. 37
Figura 4.6 - Análise da produção de citocinas TNF- α e TGF- β no pulmão de camundongos instilados com salina ou sílica, tratados ou não com LASSBio-468 -----	pág. 38
Figura 4.7 - Análise da expressão da proteína alfa-actina no pulmão de camundongos instilados com salina ou sílica, tratados ou não com LASSBio-468 -----	pág. 39
Figura 4.8 - Análise da quantificação de pixels em fotomicrografias do pulmão de camundongos instilados com salina ou sílica, tratados ou não com LASSBio-468 -----	pág. 40
Figura 4.9 - Análise da função pulmonar de camundongos instilados com salina ou sílica, tratados ou não com LASSBio-468 ou talidomida -----	pág. 41
Figura 4.10 - Análise imunocitoquímica de miofibroblastos pulmonares de animais normais ou silicóticos marcados para α -SMA e citoqueratina <i>in vitro</i> -----	pág. 42
Figura 4.11 - Análise da proliferação de miofibroblastos pulmonares provenientes de camundongos normais ou silicóticos, frente à estimulação com rmIL-13 <i>in vitro</i> (24h) -----	pág. 43
Figura 4.12 - Avaliação da proliferação de miofibroblastos pulmonares provenientes de camundongos normais e silicóticos pré-tratados com LASSBio-468 ou talidomida, frente à estimulação com rmIL-13 <i>in vitro</i> (24h) -----	pág. 44
Figura 4.13 - Avaliação da viabilidade de miofibroblastos provenientes de camundongos normais ou silicóticos incubados com LASSBio-468 ou talidomida <i>in vitro</i> (24h) -----	pág. 45
Figura 4.14 - Análise da produção de TNF- α por macrófagos alveolares AMJ2C11 pré-tratados com LASSBio-468 ou talidomida, frente à estimulação com sílica <i>in vitro</i> (24h) -----	pág. 46
Figura 4.15 - Avaliação da produção de IL-8 por células epiteliais A549 pré-tratadas com LASSBio-468 ou talidomida, frente à estimulação com sílica <i>in vitro</i> (24h) -----	pág. 47
Figura 4.16 - Avaliação da viabilidade de células epiteliais A549 incubadas com LASSBio-468 ou talidomida <i>in vitro</i> (24h) -----	pág. 48



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFEITO DO COMPOSTO FTALIMÍDICO LASSBIO-468 SOBRE A FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR SÍLICA EM CAMUNDONGOS

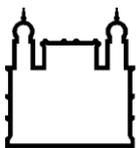
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thiago José Figueira Ramos

A silicose é uma doença ocupacional causada pela inalação de sílica em sua forma livre e cristalina. A inflamação e fibrose pulmonar constituem as principais características da patologia, que envolve uma variedade de mediadores inflamatórios, como o TNF- α , um mediador de ações amplas e que exerce seus efeitos em um grande número de tipos celulares. LASSBio-468 é um análogo da talidomida já descrito como capaz de modular a produção de TNF- α e inibir o choque endotóxico e artrite reumatóide em modelos animais. Neste estudo, nós investigamos o potencial efeito do LASSBio-468 em modelo de silicose experimental em camundongos. Animais Swiss-webster machos (18 – 20g) foram instilados intranasalmente com uma suspensão de sílica (10 mg/50 μ L) e veículo (salina). O tratamento consistiu na administração por via oral de LASSBio-468 (12,5 – 100 mg/kg) e talidomida (50 mg/Kg) durante 7 dias consecutivos, do vigésimo primeiro ao vigésimo oitavo dia após a instilação de sílica. Foram analisadas a função pulmonar (resistência e elastância) e hiperreatividade das vias aéreas à aerolização de metacolina (3 – 27 mg/mL), através de pletismógrafo invasivo de corpo inteiro (Finepoint, Buxco System), além de análises morfológicas e morfométricas do tecido pulmonar. A produção de colágeno tecidual foi acessada pelo método de sircol, enquanto que a quantificação de citocinas/quimiocinas foi realizada pelo ensaio de ELISA. A técnica de imunohistoquímica permitiu a identificação da população de miofibroblastos no pulmão. Através de uma digestão mecânica e enzimática do tecido pulmonar, obtivemos uma cultura primária de miofibroblastos que, assim como macrófagos alveolares AMJ2C11 e células epiteliais A549, foram pré-tratados com diferentes concentrações de LASSBio-468 e talidomida, estimulados com IL-13 ou sílica e avaliados quanto a proliferação celular, viabilidade e produção de mediadores inflamatórios *in vitro*. Demonstramos que animais silicóticos apresentaram níveis basais elevados de resistência pulmonar e elastância, bem como hiperreatividade frente à aerolização de metacolina. Resposta inflamatória tecidual, extensiva deposição de colágeno, formação de granuloma e produção de quimiocinas (KC and MCP-1) e citocinas (TNF- α and TGF- β) também foram detectadas em pulmões de animais silicóticos, assim como o aumento do número de miofibroblastos no tecido. O tratamento com LASSBio-468 reduziu o comprometimento da função pulmonar e hiperreatividade, formação de granulomas, expressão de miofibroblastos e deposição de colágeno no tecido pulmonar de animais doentes. Miofibroblastos oriundos de animais silicóticos apresentaram basal de proliferação superior, sendo responsivos também ao estímulo mitogênico da IL-13, que foi atenuado frente ao pré-tratamento com LASSBio-468. A estimulação de macrófagos alveolares e células epiteliais com sílica promoveu a liberação de TNF- α e IL-8, respectivamente, sendo o LASSBio-468 capaz de inibir de forma significativa esta produção. Em conjunto, nossos resultados mostraram que o tratamento com LASSBio-468 foi capaz de reduzir de forma curativa o comprometimento da função pulmonar e resposta granulomatosa, através de ações sobre células específicas, indicando que o composto em questão parece constituir uma promissora ferramenta para o tratamento de doenças pulmonares fibróticas crônicas como a silicose.

Palavras chave: Silicose, fibrose, TNF- α , terapia, LASSBio-468.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFFECT OF PHTALIMIDIC COMPOUND LASSBio-468 ON PULMONARY FIBROSIS INDUCED BY SILICA IN MICE.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thiago José Figueira Ramos

Silicosis, one of the oldest occupational diseases in the world, is a consequence of long-term exposure to inhaled dust containing silica in its free and crystalline form. Lung interstitial inflammation and fibrosis are the main features of the disease, involving a wide range of chemical mediators such as TNF- α . This is a pleiotropic molecule which exerts its effects on many cell types. LASSBio-468 is a thalidomide analogue which modulates TNF- α production and inhibits endotoxic shock and arthritis in animal models. In this study we investigated the effect of LASSBio-468 on experimental silicosis in mice. Anesthetized male Swiss-Webster mice (18-20g) received intranasal (i.n.) instillation of silica (10 mg/50 μ L) and vehicle (saline). Treatment consisted of oral administration of the LASSBio-468 (12,5 - 100 mg/kg) and thalidomide (50 mg/Kg) during 7 consecutive days, from day 21 to 28 post-silica. The analyses included lung function (resistance and elastance) and airways hyperreactivity to aerosolized metacholine (3 -27 mg/mL) measured by whole body invasive plethymography (Finepoint, Buxco System). Morphological and morphometrical analyses included classical dyes such as Hematoxylin-Eosin and Picrus-Sirius. Collagen content and cytokine/chemokine generation were quantified by Sircol technique and ELISA, respectively. Immunohistochemistry was employed to identify the lung myofibroblastic population. Primary murine myofibroblasts cells were obtained after a mechanical and enzymatic digestion of the lung from saline and silicotic mice. Myofibroblasts, AMJ2C11 alveolar macrophages and A549 epithelial cells were pre-treated with LASSBio-468 and Thalidomide, stimulated with IL-13 or silica and evaluated through proliferation, viability and production of inflammatory mediators *in vitro*. We showed that silicotic mice exhibited increased basal levels of lung resistance and elastance as well as airways hyperreactivity to methacholine aerosolization. Tissue inflammatory response, extensive collagen deposition, granuloma formation and chemokine (KC and MCP-1)/cytokine (TNF- α and TGF- β) generation were also detected in the silicotic lungs, as well as an increasing of myofibroblasts expression in the lung. Administration of LASSBio-468 into silicotic mice reduced the decline lung function and airways hyperreactivity, myofibroblasts numbers, tissue collagen deposition and granulomatous area. The generation of cytokines and chemokines was also suppressed by the drug. The primary lung myofibroblasts obtained from silicotic mice showed a superior basal proliferation and IL-13, a pro-fibrotic cytokine, stimulated the (³H) incorporation *in vitro*, which was diminished by the treatment with LASSBio-468. Stimulation of alveolar macrophages and epithelial cells by silica *in vitro* increased the release of TNF- α and IL-8, respectively, and LASSBio-468 was able to reduce these inflammatory mediators production. The compound modulated key cells functions without decline in cell death. Altogether our findings show that the treatment of silicotic mice with LASSBio-468 reduced curatively the decline in lung function and granulomatous response, through actions on myofibroblasts, macrophages and epithelial cells, indicating that this compound constitutes a promising tool for the treatment of chronic fibrotic pulmonary diseases such as silicosis.

Keywords: Silicosis, fibrosis, TNF- α , therapy, LASSBio-468.

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

R175 Ramos, Thiago José Figueira

Efeito do composto ftalimídico LASSBio-468 sobre a fibrose pulmonar induzida por sílica em camundongos / Thiago José Figueira Ramos. – Rio de Janeiro, 2012.

xii, 67 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012.

Bibliografia: f. 56-67

1. Silicose. 2. Fibrose. 3 . TNF- α . 4 . Terapia. 5 . LASSBio-468 . I. Título.

CDD 616.244

1. Introdução

1.1 Sistema respiratório – Estrutura e Função

O sistema respiratório é composto pelos pulmões, vias aéreas condutoras, as partes do sistema nervoso central envolvidas no controle dos músculos respiratórios e a parede torácica que, por sua vez, compreende os músculos respiratórios e a caixa torácica (1).

A porção condutora consiste na cavidade nasal, nasofaringe, laringe e traquéia que, ao ramificar-se origina dois brônquios conhecidos como brônquios primários. Estes últimos se interiorizam para os pulmões e dão origem aos bronquíolos lobares. Após divisões, estes formam estruturas cada vez menores dando origem aos bronquíolos terminais que, ao próximo nível, compõem os bronquíolos respiratórios integrando a porção respiratória constituída por ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos (2).

O pulmão é o órgão responsável pela troca entre o oxigênio, necessário para a geração de energia nas células, e o dióxido de carbono, subproduto do metabolismo aeróbico. O ar contendo oxigênio é inspirado para o interior dos pulmões pelas vias aéreas condutoras. A força necessária para fazer com que o ar flua é gerada pelos músculos respiratórios, os quais atuam sob comandos iniciados pelo sistema nervoso central (3). Ao mesmo tempo, o sangue venoso que retorna dos vários tecidos do corpo é bombeado para os pulmões pelo ventrículo direito do coração. O sangue venoso possui uma alta concentração de dióxido de carbono e uma baixa concentração de oxigênio. Nos capilares pulmonares, o dióxido de carbono é trocado pelo oxigênio. O sangue que deixa os pulmões possuindo alta concentração de oxigênio e uma concentração relativamente baixa de dióxido de carbono é distribuído aos tecidos do corpo. Durante a expiração, o gás com uma alta concentração de dióxido de carbono é expelido do corpo (3). Cada respiração leva para o interior dos pulmões uma pequena amostra do ambiente atmosférico local, que pode incluir microorganismos como bactérias, gases tóxicos, fumaça, outros poluentes, além de poeira, partículas de sílica ou asbesto (1).

1.1.1 Mecânica da Respiração

O ar move-se de uma região de maior pressão para uma de menor pressão. Conseqüentemente, para que o ar se mova de dentro ou pra fora dos pulmões, deve ser estabelecida uma diferença de pressão entre a atmosfera e os alvéolos. Assim que estabelecido um gradiente de pressão entre a atmosfera e os alvéolos suficiente pra superar a resistência do fluxo aéreo oferecida pelas vias aéreas de condução, o ar flui para o interior dos pulmões (1).

Inicialmente, a pressão alveolar é igual à pressão atmosférica e, conseqüentemente, não ocorre fluxo de ar para o interior dos pulmões. A contração dos músculos inspiratórios faz a pressão intrapleural se tornar mais negativa na proporção que os pulmões são tracionados abertos e os alvéolos distendidos. Quando os alvéolos são distendidos, a pressão em seu interior cai em relação à pressão atmosférica e o ar flui para o interior dos alvéolos, a pressão alveolar retorna a condição original e o fluxo aéreo para o interior dos pulmões cessa. O esforço inspiratório cessa e os músculos inspiratórios se relaxam. A pressão intrapleural torna-se menos negativa, permitindo que a retração elástica das paredes alveolares comprima o gás alveolar. Isso eleva a pressão alveolar em relação à pressão atmosférica, o que faz o ar fluir para fora dos pulmões até que seja restaurada a pressão alveolar original. Neste ponto, o fluxo aéreo cessa até o próximo esforço inspiratório (1).

A expiração é passiva durante a respiração normal e nenhum músculo respiratório contrai-se. Quando os músculos inspiratórios relaxam, a retração elástica aumentada dos alvéolos distendidos é suficiente para reduzir o volume alveolar e aumentar a pressão alveolar em relação à pressão atmosférica (1).

A expiração ativa ocorre durante o exercício, a fala, a fase expiratória da tosse e do espirro e em estados de patologias pulmonares. Desta forma, a condição fisiológica do pulmão implica diretamente na função pulmonar de um indivíduo. Esta condição fisiológica pode ser avaliada por dois diferentes parâmetros: a resistência das vias aéreas e a elastância tecidual (2).

1.1.1.1 Resistência das vias aéreas

Dentre os fatores a serem superados para a movimentação do ar durante a inspiração e expiração, é possível destacar a inércia do sistema respiratório, a resistência

de atrito dos tecidos do pulmão e da parede torácica e a resistência de atrito das vias aéreas ao fluxo de ar. A resistência das vias aéreas é o principal componente da resistência total do tecido pulmonar, sendo definida pela diferença de pressão entre os alvéolos e a entrada de ar, dividida pelo fluxo aéreo. A resistência também sofre influência do tamanho da via aérea, da frequência respiratória e do volume pulmonar (2). O fato do sistema de vias aéreas ser ramificado, expansível, compressível e que se estreita progressivamente contribui para a complexidade do acesso a esta medida (1).

Em patologias de caráter inflamatório e fibrótico, a presença de regiões fibrosas no tecido pulmonar leva a uma redução do calibre das vias aéreas, culminando num aumento dos níveis de resistência pulmonar (1).

1.1.1.2 Elastância tecidual

A elastância é o inverso da complacência, segundo os conceitos de mecânica respiratória, e corresponde à tendência de um objeto a se opor a um estresse ou distorção, assim como sua habilidade de retorno ao estágio original após a retirada da força que antes atuava (4). Em outras palavras, este conceito avalia a distensibilidade do tecido pulmonar bem como a dificuldade de acomodação dos volumes de ar pelo órgão (5).

Algumas situações podem conduzir ao aumento da elastância tecidual como o edema alveolar, a ventilação insuficiente durante um longo período de tempo, o aumento da pressão venosa pulmonar e a fibrose pulmonar (2, 6). Em pacientes portadores de fibrose pulmonar, os pulmões apresentam menor capacidade de distensão e esta alteração pode ser claramente correlacionada ao nível de fibrose tissular associada (7).

1.1.1.3 Hiper-reatividade

Em condições normais, a reatividade, a habilidade reversível de alterar o tamanho das vias aéreas frente a um dado estímulo, é um componente essencial da homeostasia (8). A hiper-reatividade é uma característica comum a algumas doenças inflamatórias pulmonares e é definida como uma resposta exagerada de contração da musculatura lisa das vias aéreas a agentes diversos, como a estímulos não-específicos, agentes broncoconstritores e ao frio.

Dois tipos de estímulos indutores da contração das vias aéreas são úteis na avaliação deste tipo de resposta: os que atuam de forma indireta, como aqueles capazes de provocar a liberação de histamina por mastócitos e assim induzir uma ação contrátil da musculatura das vias aéreas, e aqueles que atuam de forma direta, como os agonistas colinérgicos que atuam nos receptores muscarínicos (9).

A fibrose tecidual é um dos fatores já descritos como contribuintes para o desenvolvimento de uma resposta de hiper-reatividade do tecido pulmonar (10). Geralmente, a evolução do quadro patológico provoca um aumento da hiper-reatividade das vias aéreas e a participação de certos mediadores inflamatórios parece estar intimamente relacionada com o início e manutenção deste processo (8).

1.2 Disfunções pulmonares

Um indivíduo inspira, diariamente, um grande volume de oxigênio para os pulmões fazendo com que o ar entre em contato com uma extensa área do que pode ser o tecido mais delicado do corpo. Esse ar inspirado pode conter poeira, pólen, esporos, cinzas, microorganismos e outros materiais tóxicos (1).

Desta forma, alguns mecanismos protegem os pulmões, como a filtração e remoção de partículas inspiradas. O trato respiratório possui um sistema elaborado de filtração do ar inspirado e remoção de matérias particuladas das vias aéreas. Partículas inaladas podem depositar-se no trato respiratório como consequência do impacto, da sedimentação, do movimento browniano e de outros mecanismos importantes. Estes materiais que chegam as vias aéreas e superam os mecanismos de defesa, especialmente o aprisionamento no muco e os movimentos ciliares, podem induzir o desenvolvimento de patologias (2).

As doenças pulmonares são didaticamente classificadas em dois principais tipos: obstrutivas e restritivas. No primeiro caso, observa-se um aumento na resistência ao fluxo de ar que resulta em obstrução parcial ou substancial em diferentes níveis da árvore brônquica, como na asma (11). No caso das restritivas, foi observada redução da expansão do parênquima pulmonar e queda da funcionalidade do órgão. De forma geral, grande parte destas patologias encontra-se associada ao processo de remodelamento tissular incluindo-se como principal exemplo as pneumoconioses. Atualmente, este termo inclui doenças induzidas por partículas orgânicas e inorgânicas bem como por fumos e vapores químicos, porém, originalmente, foi cunhado para descrever uma

reação pulmonar não-neoplásica à inalação de poeiras minerais encontradas no ambiente de trabalho (12).

1.2.1 Sílica

A sílica ou dióxido de silício é um composto natural formado por dois dos elementos químicos mais abundantes na crosta terrestre: o oxigênio e o silício. É encontrada na natureza nas formas amorfa e cristalina, que quando combinadas com metais e óxidos dão origem a silicatos como o talco, feldspato, caulim e mica (13).

A sílica cristalina que se encontra na areia e em diversas rochas, como o arenito, o granito e o síliex, apresenta variado polimorfismo e é caracterizada por apresentar uma estrutura de padrão regular. A forma mais comum, e que corresponde à cerca de 12% da crosta terrestre, é o quartzo. A forma amorfa, apesar de não inerte, é menos tóxica do que a sílica cristalina (14). A diferença entre as injúrias causadas pela sílica amorfa e sílica cristalina provavelmente está associada a propriedades físicas divergentes entre as duas formas (15).

As aplicações da sílica no comércio e indústria são variadas, sendo utilizada como componente de semicondutores, aplicada como material básico na construção, indústrias de vidros, cerâmicas e refratários (14). A sílica em sua forma amorfa também possui fins econômicos, sendo utilizada como dessecante e adsorvente (14).

As partículas de poeira inaladas depositam-se em vários locais do sistema respiratório dependendo do tamanho, forma, massa, características aerodinâmicas e outras propriedades físicas. O diâmetro aerodinâmico determina onde as partículas inaladas se depositarão no pulmão. Partículas maiores do que 15 μm ficam retidas na região nasal. As intermediárias, entre 5 a 10 μm depositam-se nos brônquios e bronquíolos, sendo removidas através do mecanismo mucociliar. Por sua vez, as partículas menores penetram nos bronquíolos terminais e alvéolos, sendo parcialmente removidas pelos macrófagos alveolares. No pulmão humano verificou-se que as partículas de sílica retidas têm diâmetros que variam entre 0,5 a 0,7 μm . O desenvolvimento da silicose depende justamente da quantidade de partículas retidas no pulmão e nas vias aéreas, do tamanho, formato e do poder de flutuação das partículas e da reatividade físico-química (13, 14).

1.3 Silicose

A silicose é uma doença crônica, de caráter tipicamente ocupacional, que resulta da exposição prolongada à poeira inalada que contenha partículas de dióxido de silício ou sílica, sob a forma livre e cristalina (13). Esta patologia apresenta em geral uma evolução bastante lenta, progressiva e irreversível, levando à insuficiência respiratória (16). Em humanos caracteriza-se por nódulos fibróticos causados por uma inflamação persistente no tecido pulmonar que leva à proliferação de fibroblastos e acúmulo exagerado de colágeno (12). É considerada, por muitos como a mais grave das pneumopatias ocupacionais, sendo descrita desde a Antiguidade, tendo sido já no período do Renascimento adotadas as primeiras medidas preventivas, como o uso de máscaras (17).

Na União Européia, a partícula de sílica foi considerada o terceiro maior agente cancerígeno para trabalhadores, atrás apenas da radiação solar e da exposição ao tabaco. Ainda na Europa, estima-se que cerca de 3,2 milhões de trabalhadores estão submetidos a ambientes de trabalho que contenham sílica passível de ser inalada (18). Nos Estados Unidos, cerca de 2 milhões de trabalhadores estão potencialmente expostos a sílica (19).

No Brasil, estimativas apontam para cerca de 6 milhões de trabalhadores sujeitos aos efeitos nocivos da sílica como consequência das inúmeras atividades extrativistas e industriais (13). Os trabalhos sobre a doença realizados no país, até o momento, evidenciam variações na prevalência de silicose entre os indivíduos que integravam os respectivos estudos, com destaque para o registro de frequência de cerca de 40% em cavadores de poço no Ceará (20), prevalência de 53% em escultores de pedra (21) e 16% de indivíduos ligados a atividades profissionais em Pedreiras (14). Considerando trabalhadores legais expostos a sílica no Brasil e classificados por região, é possível afirmar que a maioria dos expostos concentra-se na região sudeste, liderados pelos estados de Minas Gerais e Espírito Santo que juntos somam cerca de 650.000 trabalhadores submetidos ao perigoso potencial de inalação diário de tais partículas em seus ambientes de trabalho (14). No Rio de Janeiro, os números apontam para cerca de 235.000 trabalhadores ligados formalmente a atividades que exponham os trabalhadores aos efeitos nocivos da sílica, sendo a maior parte deles ligados a construção civil (14).

As atividades que envolvem os maiores riscos de exposição à partícula de sílica são: indústria extrativa, perfuração de rochas em mineração, construção civil, jateamento de areia, fundição de metais, indústrias cerâmicas, fabricação de vidros,

moagem de quartzo e pedras, artesanato e acabamento em pedras, fabricação de material abrasivo, escavação de poços, atividades de protético, atividade agrícola de aragem (14).

A exposição à sílica associa-se também ao câncer de pulmão, à tuberculose, à insuficiência renal e a diversas doenças autoimunes (22). A persistência da inflamação com a geração de espécies altamente reativas pode ser responsável pelas atividades genotóxicas no tecido pulmonar que contribuem para o desenvolvimento de câncer (23).

A ocorrência de tuberculose em pacientes silicóticos também é freqüente e isto pode ser resultado de vários fatores, dentre eles, a permanência dos bacilos no tecido pulmonar por dificuldade na drenagem linfática (24). Outras patologias também parecem ter seu desenvolvimento favorecido diante do quadro clínico de silicose, como a artrite reumatóide, esclerodermia e bronquite crônica (25). Desta forma, a silicose configura-se como um grave problema de saúde pública, em especial no campo da saúde do trabalhador e do meio ambiente, sendo atrelada a um custo sócio-econômico expressivo, por forçar a retirada de inúmeros indivíduos do mercado de trabalho em plena idade produtiva e por causar o aumento do número de internações devido às complicações associadas ao quadro (13).

O diagnóstico da silicose se baseia na investigação clínica, histórico ocupacional de exposição à partícula e radiografia simples de tórax (24). O advento da tomografia computadorizada permitiu a identificação de alterações mais precoces do que o observado na radiografia de tórax simples. No geral, a radiografia simples de tórax é suficiente para a identificação dos nódulos silicóticos característicos desta patologia. A tomografia computadorizada fica reservada aos casos em que exista dúvida quanto ao quadro clínico ou radiológico, devido a sua maior sensibilidade (17).

A sintomatologia segundo os relatos clínicos e observações consiste na dispnéia aos esforços com astenia, em função da redução da complacência pulmonar e da restrição das trocas gasosas por conta da reação fibrótica em curso no tecido. Com a evolução do quadro, pode aparecer dispnéia em repouso e tosse, que pode ser acompanhada de secreção (13).

1.3.1 Formas de Silicose

A doença pode ser classificada em crônica, acelerada e aguda, de forma dependente da quantidade de poeira inalada e do tempo de exposição (13, 17).

A forma crônica caracteriza-se por apresentar nódulos silicóticos disseminados em ambos os pulmões e, geralmente, se apresenta após dez anos de exposição. Na forma mais avançada pode apresentar conglomerados ou massas que coalescem e pode evoluir para fibrose maciça progressiva, mesmo depois de cessada a exposição (17). As alterações radiológicas (opacidades nodulares) tendem a surgir antes dos sintomas clínicos e evoluem com a progressão da doença. Os sintomas aparecem nas fases tardias (17).

A forma acelerada apresenta grande quantidade de nódulos em vários estágios de desenvolvimento, com forte tendência a confluir formando conglomerados. As queixas surgem entre cinco e dez anos de exposição intensa à poeira e as alterações radiológicas são de rápida evolução. O aparecimento de falta de ar e tosse é precoce e limitante. Associa-se a um risco aumentado de co-morbidades, notadamente a tuberculose e doenças autoimunes (13).

A fase aguda da silicose foi descrita pela primeira vez em 1929, em trabalhadores da indústria de sabões abrasivos (26). É normalmente relacionada à exposição maciça de sílica livre como nas operações de jateamento de areia ou moagem de quartzo. Nesta forma, o aspecto radiológico é de preenchimento alveolar por um material protéico, rico em lipídios e corado fortemente pelo ácido periódico de Shiff (PAS positivo) (13). A fase aguda da silicose surge nos cinco primeiros anos de exposição, e os sintomas aparecem mais precocemente, em especial uma intensa dispnéia, perda de peso e hipoxemia. É caracterizada por uma alveolite severa e um quadro clínico progressivo que, frequentemente, resulta na morte do paciente (27).

1.3.2 Alterações na Função Pulmonar

Assim como já documentado em modelos experimentais (28), a silicose é responsável pelo declínio na função pulmonar dos indivíduos portadores, sendo esta redução proporcional ao grau de extensão das lesões provocadas pela doença (29). Geralmente, o quadro de fibrose pulmonar está vinculado à função pulmonar deficiente e incapacidade funcional (30). Em sua forma mais severa, dois principais eventos acometem a função pulmonar: a restrição causada por fibrose e a redução do fluxo de ar (31).

O aumento da resistência das vias aéreas, detectado em indivíduos silicóticos submetidos à espirometria, é dependente da progressão da doença. Nos casos mais

graves há redução da capacidade de difusão e do volume pulmonar, além do aumento da elastância tecidual (31). A dispnéia de esforço é também relatada mesmo quando as medidas cardiopulmonares obtidas em repouso estão dentro dos limites da normalidade (32).

1.3.3 Fisiopatologia

As alterações patológicas associadas à silicose são representadas pela presença de granulomas ou nódulos inflamatórios nos locais onde as partículas se acumulam (33, 34). De forma frequente, as partículas depositam-se nos bronquíolos respiratórios e alvéolos (35). Se o “clearance” mucociliar ascendente e linfático não for capaz de remover estas partículas, elas acabam por induzir um processo inflamatório, inicialmente classificado como uma alveolite (13).

A sílica induz a formação de radicais livres por contato direto de sua superfície com a água e lipoproteínas da camada do revestimento bronquíolo-alveolar ou pela ativação de macrófagos e de células epiteliais (36). A produção destas espécies reativas, quando superior a capacidade de contenção pelos mecanismos de defesa antioxidante, pode levar a lesão de células epiteliais I, ativação de macrófagos e proliferação de células epiteliais tipo II (13).

Este processo, se mantido pela persistência da inalação de partículas, amplia-se com a liberação de enzimas proteolíticas, geração de mais espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, e pela liberação de citocinas inflamatórias incluindo o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e o fator de transformação e crescimento – β (TGF- β) (37, 38). Estas substâncias recrutam macrófagos, neutrófilos e linfócitos, além de ações sobre outros tipos celulares (13, 39). Este cenário contribui para a intersticialização da sílica que favorece a interação das partículas com células inflamatórias e estruturais, ampliando o processo inflamatório no tecido (16). O resultado final é o progressivo aumento da proliferação de fibroblastos e da produção de colágeno, que conduz a um quadro de fibrose tecidual (38, 40).

1.3.3.1 Fibrose pulmonar

O potencial de resposta do pulmão aos diferentes agentes causadores de danos é relativamente limitado. Ainda que um processo de reparo possa restaurar a arquitetura

tecidual pré-existente em determinados órgãos, como nos ossos e no fígado, o pulmão e a maioria dos demais órgãos não são capazes de regeneração e o dano tecidual acaba por conduzir a uma reação fibrótica (41).

A fibrose pulmonar é caracterizada pela deposição de um tecido fibroso no compartimento alveolar onde ocorrem as trocas gasosas (42). Esta reação é fruto da interação do tecido com agentes lesivos de etiologias diversas, como infecções por bactérias e outros microorganismos, processos alérgicos, toxinas, radiação e, também, pela inalação de partículas minerais (42). Tipicamente, quando a fibrose pulmonar é extensa e difusa origina-se um quadro de deficiência na ventilação, acompanhado de hipóxia e, em alguns casos, hipertensão pulmonar e morte (43).

A patogênese da fibrose em pacientes portadores de doenças difusas do parênquima pulmonar, como a silicose, envolve a perda de células epiteliais do tipo I e células endoteliais (44); a perda da integridade da barreira hemato-alveolar, incluindo o colapso de estruturas alveolares (45); a proliferação de células epiteliais do tipo II e o recrutamento e proliferação de fibroblastos e miofibroblastos, com a deposição de componentes de matriz extracelular (46). Esta última caracteriza a fase de reparo que sucede a fase inflamatória da silicose, na qual fatores de crescimento estimulam o recrutamento e proliferação de células mesenquimais, bem como a vascularização e a reestruturação do epitélio lesado no tecido pulmonar. Este processo de reparo é acompanhado pela deposição de matriz extracelular, especialmente de fibronectina, proteoglicanos, colágeno tipo I e III e do remodelamento tecidual (38).

Em condições fisiológicas normais, a manutenção da matriz extracelular é um processo dinâmico, no qual há a síntese de proteínas como colágeno fibrilar, fibronectina e proteoglicanas, sempre balanceada por uma taxa equivalente de proteólise (47). Como reguladores destaca-se uma classe de proteases conhecida como metaloproteinases de matriz (MMP) que sofrem, por sua vez, regulação de sua atividade enzimática por ação de uma família de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Na fase de reparo associado à silicose ocorre um desequilíbrio entre a síntese e deposição de proteínas de matriz extracelular com alteração na expressão de MMPs e TIMPs (35). Isto acarreta, em um primeiro momento, no aumento da degradação da matriz danificada e síntese excessiva de colágeno, com destaque para o papel dos fibroblastos que são claramente necessários a homeostase tecidual e fundamentais no processo normal de reparo e produção de matriz extracelular (48).

O processo fibrótico, na realidade, parece resultar de uma interação complexa entre macrófagos e fibroblastos onde os últimos, ao atuarem nas áreas lesadas, são estimulados a secretar colágeno e outras proteínas de matriz. Inicialmente, há a deposição de colágeno tipo III, que é mais flexível e susceptível a quebra, porém, mais tardiamente, estas fibras são substituídas por colágeno tipo I que confere um padrão mais rígido ao tecido pulmonar (35).

Os macrófagos alveolares participam ativamente desta fase de reparo, pois expressam MMPs e, quando devidamente ativados, liberam mediadores que atuam em células mesenquimais (49). Estes fatores incluem citocinas como o TGF- β , TNF- α e IL-1, além de fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) (50), que irão atuar na manutenção da resposta fibrótica em curso (38). Caracterizam-se por serem grandes células amebóides mononucleares que habitam a superfície alveolar. Partículas inaladas absorvidas pelos macrófagos alveolares podem ser destruídas por seus mediadores presentes nos lisossomos. No entanto, alguns materiais fagocitados por macrófagos, como as partículas de sílica por exemplo, não são digeridos e geram toxicidade (1, 16).

Estas células desempenham um papel central no desenvolvimento da inflamação e fibrose associada à silicose (51) e, considerando suas características funcionais, pode-se assumir que estas são uma das primeiras células a interagir com a sílica (16). Sua importância reside no reconhecimento, fagocitose e tentativa de eliminação das partículas inaladas, onde o balanço de eliminação e retenção da sílica no tecido pulmonar se mostra importante para a progressão da patologia. Os mediadores liberados por macrófagos, a partir da interação destas células com as partículas de sílica, são considerados um dos maiores contribuintes para a resposta fibrótica na silicose (40, 52).

Após atingirem os alvéolos, as partículas de sílica são fagocitadas por macrófagos pulmonares que assumem um fenótipo ativado e liberam mediadores inflamatórios, como espécies reativas de oxigênio, metabólitos do ácido araquidônico, quimiocinas e citocinas (53, 54). Estas células ativadas atraem neutrófilos para o local da lesão e produzem MMPs que atuam na degradação do tecido pulmonar (17). A ingestão de sílica por macrófagos alveolares conduz a morte celular e a liberação de novas partículas no meio, sendo as mesmas fagocitadas por outros macrófagos (16). Este ciclo recorrente de fagocitose das partículas de sílica por macrófagos perpetua o processo de injúria e fibrose (55) uma vez que, a falha na tentativa de eliminação da

partícula resulta numa prolongada interação da sílica com outros diferentes tipos celulares, como neutrófilos, fibroblastos, células dendríticas e células epiteliais (56).

Outro importante tipo celular envolvido no contexto da silicose, são as células epiteliais que encontram-se particularmente bem adaptadas para desempenhar a função de proteção da mucosa local contra os mais variados tipos de agentes, como a poluição, tabagismo, vírus, bactérias e outros materiais passíveis de inalação, como as próprias partículas de sílica (57). Estas células desempenham funções importantes no processo de defesa inata e seus mecanismos incluem a eliminação dos corpos estranhos através da ação do muco, substâncias bactericidas, antioxidantes e anti-proteases, além da barreira física formada pela própria camada de células e junções intercelulares (58). Todas estas funções são fundamentais para a proteção e manutenção da integridade do epitélio das vias aéreas o qual pode ser rapidamente desequilibrado após uma infecção ou injúria provocada por uma reação inflamatória, como em doenças pulmonares crônicas (59).

Após a injúria, o epitélio respiratório inicia um processo de reparo para a restauração da integridade da barreira. Imediatamente após a lesão, as células remanescentes se diferenciam e migram rapidamente para que possam cobrir a área anteriormente afetada (60). Os fatores celulares envolvidos neste processo são metaloproteinases, citocinas e fatores de crescimento liberados por células mesenquimais, endoteliais, macrófagos e também por células epiteliais (60, 61).

Durante o processo de migração e proliferação após lesão, células epiteliais passam a expressar elevados níveis da quimiocina IL-8 (61), importante no recrutamento de neutrófilos, e que possui destaque em algumas condições patológicas, como na inflamação crônica, fibrose e câncer (62). Em resposta a injúrias, as células epiteliais podem secretar outros mediadores inflamatórios, como o TGF- β , IL-1 e o TNF- α (63, 64), criando um ambiente propício ao desenvolvimento da fibrose pulmonar, principalmente por estimularem a migração, proliferação e mudança de fenótipo de fibroblastos para miofibroblastos (65).

No contexto da fibrose, os fibroblastos constituem um tipo celular crucial, sendo caracteristicamente células de origem mesenquimal que se encontram dispersas no tecido conjuntivo de todo o organismo e secretam componentes da matriz extracelular não rígida - rica em colágeno tipo I e/ou tipo III. Quando ativados, fibroblastos exibem retículo endoplasmático abundante e complexo de Golgi proeminente, estes associados à síntese e secreção de componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno,

fibronectina, laminina e proteoglicanos, bem como, proteases capazes de degradar a matriz extracelular. Proteínas de citoesqueleto em associação com integrinas da superfície celular e proteínas de matriz facilitam a motilidade celular e a geração de uma força contrátil que é importante para a homeostasia tecidual e reparo de lesão (66).

Quando um tecido é lesado, semelhante ao que ocorre na silicose, os fibroblastos proliferam, migram e produzem grandes quantidades de matriz rica em colágeno, que auxilia no reparo do tecido lesado. Além disto, fibroblastos pulmonares atuam também como células sentinelas que orquestram e amplificam a resposta inflamatória (67). Essa população apresenta fenótipos diferentes, sendo assim heterogênea, e ocupa grande parte da lesão durante o período ativo do processo de fibrose. Um desses fenótipos corresponde ao miofibroblasto que é comumente identificado pela expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) e apresenta características intermediárias entre a célula muscular lisa e fibroblasto propriamente dito (68, 69). A presença de miofibroblastos em pacientes portadores de fibrose no tecido pulmonar é amplamente documentada (70-72). Essa variedade celular é considerada fonte de muitas citocinas, incluindo o TGF- β e o proteína quimiotática para monócito (MCP-1) (73, 74). Desta forma, os miofibroblastos são também considerados cruciais contribuintes para o recrutamento de células inflamatórias, intensificando ou prolongando a inflamação que está frequentemente associada ao processo fibrótico (69, 75).

1.3.3.2 Mediadores Inflamatórios

No estabelecimento da fibrose tecidual, tanto células epiteliais e fibroblastos, quanto neutrófilos, macrófagos e outros tipos celulares secretam uma grande variedade de quimiocinas, como o MCP-1 e IL-8, e citocinas, como a IL-1 β , IL-13, TGF- β que amplificam a resposta inflamatória e conduzem à proliferação de fibroblastos e recrutamento de outras células inflamatórias (42, 45).

O MCP-1 ou CCL2 é uma quimiocina que tem como alvo, principalmente, monócitos e células T, além de outras células que podem expressar o receptor CCR2. De forma marcante, MCP-1 não somente participa da quimiotaxia de células-alvo, mas também contribui para a ativação de monócitos e para o estresse oxidativo (76). Miofibroblastos também respondem a estimulação por MCP-1 aumentando a produção de TGF- β (77).

O KC, um dos correspondentes murino da IL-8 humana, pertence à família de quimiocinas CXC que está envolvida na promoção do tráfico de leucócitos, na regulação da angiogênese e no remodelamento vascular, além de atuar no recrutamento de progenitores de células mesenquimais (78). Este mediador é liberado rapidamente em resposta a exposição a partículas de sílica, sendo importante na quimiotaxia de neutrófilos, e têm sua regulação vinculada a outras citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (62, 79, 80). Modelos de ativação de células *in vitro* vêm sendo utilizados no sentido de explorar a resposta funcional de células específicas quanto à produção de IL-8 frente à estimulação com sílica (57).

O TGF- β é um mediador produzido por células inflamatórias e também por células estruturais, possuindo papel de destaque na patogênese da fibrose pulmonar promovendo a ativação, proliferação e diferenciação de células epiteliais e miofibroblastos (81). Este aumento na ativação de fibroblastos também está vinculado ao poderio do TGF- β em estimular a expressão de genes responsáveis pela síntese de proteínas de matriz extracelular, que se acumulam durante a resposta fibrótica, e suprimindo aqueles genes responsáveis pela degradação da matriz (81). Para reafirmar a importância do TGF- β nos processos de reparo, estudos com camundongos deficientes para este mediador mostraram que tais animais apresentaram deficiências na correção de lesões, diminuição da produção de colágeno e falhas na reconstrução do epitélio (82). Mais ainda, pacientes portadores de fibrose pulmonar apresentavam níveis elevados de TGF- β no tecido e isto se relacionava com a severidade do comprometimento do órgão (83).

Outra importante citocina no contexto da fibrose pulmonar é a IL-13, mediador este relacionado a diversas patologias, como a fibrose hepática, asma e esclerose sistêmica, cujas ações pró-fibróticas são apoiadas por seu potencial indutor de proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e síntese de mediadores pró-inflamatórios (84-86). Em modelos experimentais que utilizaram animais que expressavam altos níveis de IL-13, foram também encontrados índices elevados de produção de TGF- β , indicando uma relação importante entre estes dois mediadores envolvidos em patologias de natureza fibrótica (87, 88).

De forma direta ou indireta, outro mediador inflamatório de suma importância na fisiopatologia de doenças fibróticas está relacionado com os demais mediadores abordados acima e presente em níveis elevados no tecido pulmonar de pacientes portadores de silicose: O TNF- α (89).

1.3.3.2.1 TNF-alfa

O TNF- α é um mediador pleiotrópico produzido por diversos tipos celulares como macrófagos, fibroblastos, células epiteliais, linfócitos T, células musculares lisas, eosinófilos, mastócitos, dentre outros (90). Apresenta inquestionável importância nos mecanismos de imunidade inata (91), porém, níveis elevados de tal mediador estão vinculados a fisiopatologia de diversas doenças pulmonares, incluindo a manutenção de uma resposta inflamatória e ampliação de lesões teciduais (92, 93).

O TNF-alfa é uma proteína de 185 aminoácidos glicosilados nas posições 73 e 172. É sintetizada como um precursor inativo de 212 aminoácidos que é convertido a sua forma ativa através da atuação da enzima conversora de TNF- α (TACE). Esta citocina existe sob duas formas: Uma forma solúvel e uma associada à membrana. O TNF solúvel é um homotrímero originado a partir da clivagem da forma associada à membrana, liberando um polipeptídeo de 17KDa. Três destas cadeias polipeptídicas reúnem-se para formar o TNF circulante. Tanto a forma solúvel quanto a forma membrana são capazes de ativar os receptores de TNF: o TNFR1 (p55, CD120a) e o TNFR2 (p75, CD 120b). Enquanto que a expressão de TNFR2 é regulada e ocorre tipicamente em células do sistema imune, o TNFR1 é constitutivamente expresso na maioria dos tecidos de mamíferos e sinaliza através de NF- κ B e MAPK para iniciar a transcrição de genes pró-inflamatórios (94).

A ligação de TNF- α com o domínio extracelular do TNFR1 em macrófagos resulta, por exemplo, no recrutamento e interação de proteínas adaptadoras como TRADD, RIP-1 e TRAF2 (95, 96). Este complexo está envolvido na ativação de vias de sinalização específicas, com destaque para ativação do fator de transcrição NF- κ B e sua translocação para o núcleo onde regulará a expressão gênica (97). A ativação do TNFR1 também pode disparar o mecanismo de morte celular programada através da interação da proteína adaptadora TRADD diretamente com o domínio de morte do TNFR1, envolvimento de FADD e consequente ativação de pró-caspase 8, culminando em apoptose (98).

Dentre as principais ações do TNF- α , destacam-se a sua capacidade de estimular a produção de outros mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-8), a expressão de moléculas de adesão celular, a capacidade de modular negativamente processos anti-oxidantes (99) e o potencial estimulatório sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (100, 101).

Outro aspecto importante em relação às ações do TNF- α é o fato de que a administração desta citocina por via inalatória desencadeou o quadro de hiperreatividade das vias aéreas em pacientes normais (102, 103). Outros estudos destacam que, em modelo murino, anéis de traquéia pré-incubados com TNF- α apresentaram uma resposta de hiperreatividade quando os fragmentos foram estimulados com agentes broncoconstritores como carbacol, bradicinina e serotonina (104-106). Estas evidências destacam o TNF- α como capaz de ações moduladoras sobre a função respiratória, quando implicado em patologias de natureza inflamatória das vias aéreas.

Ações pró-fibrogênicas também foram atribuídas ao TNF- α , como a estimulação da proliferação de fibroblastos e a diferenciação destas células em seu fenótipo ativado de miofibroblastos, além da promoção da expressão de TGF- β por este tipo celular (107, 108).

O envolvimento do TNF- α na silicose se torna evidente no estudo publicado por Piguet e colaboradores, onde o mesmo destaca a importância da participação do TNF- α no desenvolvimento da resposta fibrótica associada a esta patologia. Mais tarde, a adoção de estratégia terapêutica anti-TNF- α revelou resultados promissores quanto à contenção da fibrose pulmonar induzida por bleomicina e sílica (109). Esta última torna nítida e interessante a tentativa de modular negativamente as ações desta citocina em patologias de natureza fibrótica, como a silicose.

1.3.4 Tratamento

As terapias com anti-inflamatórios disponíveis até o presente momento, como o uso de corticóides clássicos por exemplo, não são eficazes em pacientes silicóticos crônicos (27), o que determina muitas vezes a necessidade de intervenções de alta complexidade, como o transplante de pulmão. Apenas tratamentos de suporte com antitussígenos e broncodilatadores, assim como oxigênio, são disponíveis para pacientes silicóticos. Desta forma, fica clara a relevância da constante busca pela identificação de novos compostos dotados de ação anti-inflamatória e antifibrótica para o emprego terapêutico na silicose.

Considerando ser o TNF um alvo terapêutico importante no contexto de doenças inflamatórias, ênfase foi dada na busca por compostos com propriedade supressora sobre a geração deste fator (92, 110). Dentre os compostos capazes de modular as ações do TNF- α , destaca-se a talidomida um fármaco que apresenta uso limitado em função

de uma ampla gama de efeitos adversos, com destaque para a teratogênese (111), porém dotado de destacada ação supressora sobre a produção de TNF- α (112-114).

De forma particular no contexto da silicose, foi demonstrado em modelo murino que animais TNFR1^{-/-} silicóticos apresentaram clara redução de infiltrado inflamatório, resposta fibrogênica e formação de granulomas no tecido pulmonar, o que evidencia a importância da adoção de ferramentas terapêuticas que atuem minimizando as ações do TNF-alfa na silicose (115).

Dentro deste contexto, foram sintetizados pelo laboratório de Síntese e Avaliação de Substâncias Bioativas (LASSBio) da UFRJ, compostos com vistas à aplicabilidade em doenças inflamatórias crônicas. Dentre os análogos obtidos, destacou-se o composto LASSBio-468, denominado simbiótico por ter sido planejado com o objetivo de reunir grupos farmacofóricos de diferentes moléculas capazes de modular eventos distintos, porém complementares, visando destacar um potencial anti-inflamatório (116). Através de técnica de hibridação molecular, reuniu-se nesta molécula grupamentos importantes, previamente identificados, no que diz respeito à modulação das ações do TNF- α e inibição de fosfodiesterase do tipo 4 (PDE-4), tendo como base a conjugação da porção ftalimídica da talidomida com um grupamento fenilsulfonamídico oriundo de aril-sulfonamida, descrita como inibidor seletivo de fosfodiesterase tipo 4. A eficácia deste derivado foi comprovada em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS (116), bem como em outros modelos experimentais como de artrite reumatóide e choque endotóxico, modulando ações anti-fibrogênicas no tecido hepático, de forma vinculada a inibição da produção de TNF- α (117).

Desta forma, estratégias que visem à modulação da produção/ação do TNF- α se tornam imprescindíveis na busca por uma ferramenta terapêutica de aplicabilidade em doenças inflamatórias de caráter fibrótico como a silicose.

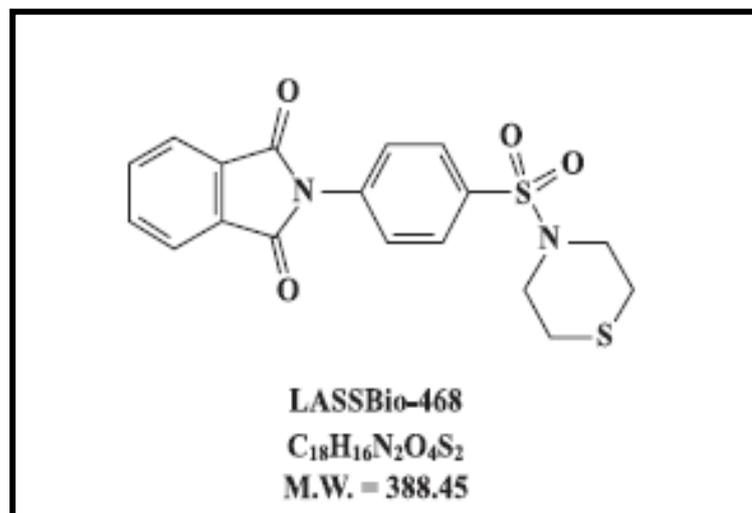


Figura 1.1: Estrutura química do LASSBio-468.

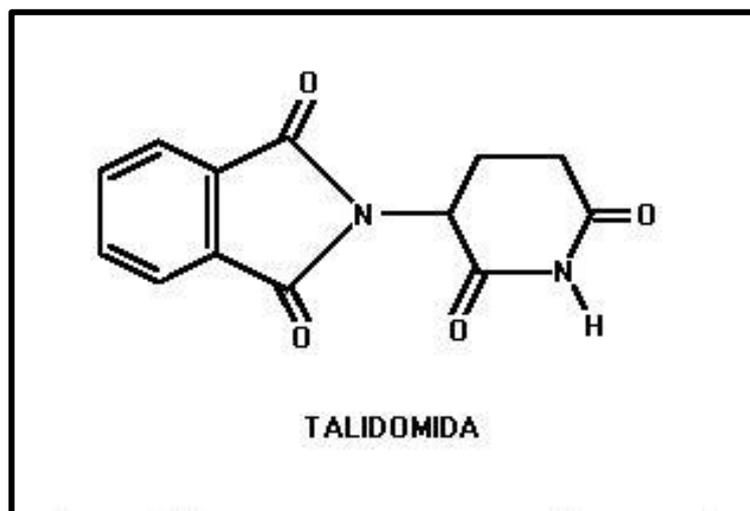


Figura 1.2: Estrutura química da talidomida.

2. Objetivos:

Considerando-se a importância da busca por uma terapia eficiente para doenças fibróticas como a silicose e o envolvimento do TNF- α na doença, neste estudo tivemos por objetivo avaliar o potencial efeito curativo do composto LASSBio-468 sobre os componentes inflamatório e fibrótico no modelo de silicose experimental murina. O composto talidomida foi utilizado para fins de comparação.

2.1 Objetivos específicos:

- i) Avaliar o efeito do tratamento com LASSBio-468 sobre a função pulmonar (resistência e elastância) e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos;
- ii) Avaliar o efeito do tratamento com LASSBio-468 sobre alterações morfológicas no parênquima pulmonar de camundongos;
- iii) Avaliar o efeito do tratamento com LASSBio-468 sobre o conteúdo de matriz extracelular (colágeno) no tecido pulmonar de camundongos;
- iv) Avaliar o efeito do tratamento com LASSBio-468 sobre a produção de mediadores pró-inflamatórios e prófibróticos no tecido pulmonar de camundongos;
- v) Avaliar o efeito do tratamento com LASSBio-468 sobre miofibroblastos no tecido pulmonar de camundongos;
Avaliar o efeito da incubação de miofibroblastos pulmonares, macrófagos e células epiteliais com LASSBio-468 *in vitro*.

3. Materiais e Métodos:

3.1 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho utilizamos camundongos Swiss-Webster machos (18 – 20 g), provenientes do Centro de Criação de Animais (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz, e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) (L-O34/09). Os animais foram mantidos em estantes aclimatizadas com temperatura e umidade controladas ($21 \pm 2^\circ\text{C}$ e $50 \pm 10\%$, respectivamente), sendo submetidos ao ciclo de claro e escuro de 12 horas e livre acesso à água e ração.

3.2 Instilação de sílica

Previamente, os camundongos foram anestesiados com aerolização de halotano até a sedação. Em seguida, para a indução de silicose, foram instilados por via intranasal 10 mg de sílica (SiO_2 ; Partícula: $0,5 - 10 \mu\text{m} \sim 80\%$ - $1 - 5 \mu\text{m}$; Sigma) em um volume final de 50 μl de salina (0,9%) estéril. Este procedimento foi realizado com a utilização de pipeta automática que auxiliou na instilação da suspensão de sílica em ambas as narinas dos animais. Os animais do grupo controle receberam igual volume de salina estéril.

3.3 Tratamento

A partir do 21º dia após a única instilação intranasal com a suspensão de sílica, os animais foram submetidos ao tratamento em esquema terapêutico que constou da administração de LASSBio-468 (12,5 - 100 mg/Kg) ou talidomida (50 mg/Kg), por via oral, uma vez ao dia. Este tratamento prosseguiu até o 27º dia, com as análises sendo iniciadas 24 horas após a última administração dos fármacos. As substâncias foram dissolvidas em Tween 80 (0,5 %) e os animais controles receberam igual volume do veículo.

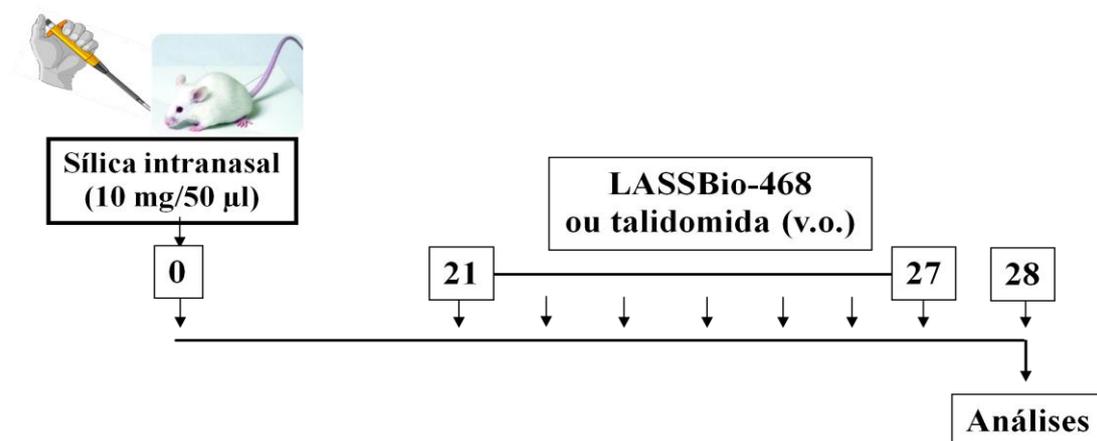


Figura 3.1: Esquema de indução de silicose, por instilação intranasal de suspensão de sílica, e administração dos compostos LASSBio-468 ou talidomida, por via oral. O tratamento teve início a partir do dia 21, pós-indução de silicose, e foi concluído no dia 27, com as análises sendo realizadas 24 horas após a última administração.

3.4 Avaliação da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas

A função pulmonar foi analisada em pletismógrafo barométrico de corpo inteiro invasivo (BuxcoResearch System). Os camundongos foram anestesiados com Nembutal (Pentobarbital) (60 mg/Kg, ip) e curarizados com brometo de pancurônio (1mg/Kg, Pavulon®), sendo em seguida, traqueostomizados para a introdução de uma cânula. Os animais foram colocados em câmaras individualizadas com temperatura controlada a 37°C. Em paralelo, foi introduzida uma cânula preenchida com água por via oral para a captura da pressão esofágica. A cânula traqueal foi conectada a um ventilador mecânico, com fluxo (200 µL) e volume corrente (2 – 5 mL) sendo mantidos constantes para registro dos parâmetros de resistência (cmH₂O/mL/s) e elastância pulmonar (mL/cmH₂O). Os camundongos foram submetidos à aerolização de PBS ou doses crescentes do agonista muscarínico metacolina (3 – 27 mg/mL), por 3 minutos, sendo em seguida feita a avaliação da função pulmonar por um período de 5 minutos). Os valores de resistência e elastância foram registrados e avaliados no software BuxcoBiosystem XA (118).

3.5 Análise histológica

Após o acesso aos parâmetros de função pulmonar, os camundongos foram sacrificados com dose letal de barbitúrico (Tiopental – 500 mg/Kg, i.p) e exanguinados

através de um corte na veia cava abdominal. O tórax foi aberto e, em seguida, realizada a perfusão pulmonar através da inserção de um escalpe no coração e infusão de solução salina (0,9%) e EDTA (10 mM). Após este processo, o tecido pulmonar foi retirado e o lobo esquerdo infundido com solução de formol tamponado sendo mantido imerso em igual solução por 48 horas até o processamento histológico. O lobo direito foi isolado e congelado em nitrogênio líquido para posterior análise.

Após fixação, o pulmão foi desidratado através de banhos sucessivos em soluções com concentrações crescentes de etanol que variaram de 70 a 100 % por aproximadamente 10 minutos em cada etapa. O material foi clarificado em xilol por aproximadamente 15 minutos e submetido a sucessivos banhos de parafina até a sua inclusão e confecção de blocos. Estes últimos foram submetidos a cortes de 5 μ m de espessura em micrótomo (Leica Microsystems). Após a obtenção dos cortes, foi realizada a coloração dos mesmos com hematoxilina e eosina (H&E), bem como com o corante Picrus sirius. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Olympus BX50), acoplado a uma câmera de vídeo (Olympus UC30) e a captura das imagens feita através de uso do Software “Image Pro Plus” versão 6.2.

3.5.1 Morfometria

A análise quantitativa de área do parênquima pulmonar ocupada por granulomas foi realizada através de técnica de contagem de linhas e pontos (119, 120). Para tanto, foi utilizado um retículo contendo 100 pontos e 50 linhas paralelas fixado na ocular do microscópio. Através da utilização da objetiva de 20X, foi realizada a contagem dos pontos que coincidiram com áreas granulomatosas em 10 diferentes campos. O número total de pontos foi dividido pelo número total de pontos do retículo, obtendo-se assim a fração da área do tecido pulmonar ocupado por granuloma expresso sob a forma de percentual.

3.6 Quantificação de colágeno

Para quantificação de colágeno foi utilizada técnica colorimétrica de Sircol[®] (Biocolor, Inglaterra). Para tanto, foi feita homogeneização das amostras de tecido pulmonar em solução contendo Tris-Base (0,05M), NaCl (1M), inibidor de protease Complete[®] (Roche -pH 7.5) e posterior incubação à 4°C. Na sequência, procedeu-se a

centrifugação por 15000 xg à 4°C (1hora). Uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para o início da reação através da adição de 250 μ L do reagente Sircol Dye. A mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente (30 minutos) e foi submetida à nova centrifugação por 12000 xg à 4°C (10 minutos). Na sequência foi adicionado o reagente Alkaline e posterior homogeneização das amostras (10 minutos). Uma alíquota de 200 μ l foi transferida para placas de 96 poços de fundo chato. A análise foi realizada em espectrofotômetro a 555 nm e o resultado expresso em μ g/mg de tecido.

3.7 Imunohistoquímica

As amostras de tecido foram submetidas à desparafinização, hidratação com solução de TBS (Tris/HCl 0,05 M + NaCl 0,5 M, pH 7,6) e bloqueio com peróxido de hidrogênio (3%) e metanol por 15 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes com TBS e realizado bloqueio com Tris-HCl + BSA (5%) por 1 hora. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário (anti- α -SMA - A2547; Sigma) diluído em Tris-HCl + BSA 1% por 12 horas à 4°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas 2 vezes com TBS. Na sequência, procedeu-se a incubação do material com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com HRP (anti-IgG de camundongo - HAF007; R&D), diluído em Tris-HCl (2horas). A revelação foi realizada com 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) por 15 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada, coradas com hematoxilina de Mayer e montadas em meio aquoso contendo gelatina. Imagens capturadas com a câmera digital (Olympus UC30) (no mínimo 8 campos por amostra de tecido) foram analisadas utilizando-se o software “Image Pro Plus” versão 6.2. Nesta análise, foi feita a determinação do número de pixels em cada campo capturado, sendo o resultado expresso como pixels/ μ m².

3.8 Cultura primária de fibroblastos

Os animais instilados com salina e sílica (7 dias) foram sacrificados em câmara de CO₂, os pulmões perfundidos com solução de PBS, cortados em pequenos fragmentos e, em seguida, incubados com uma solução de colagenase tipo I (1mg/mL; GIBCO). A suspensão celular obtida foi mantida sob agitação por 1 hora a 37°C. Em seguida, um volume extra de PBS foi adicionado à suspensão celular e realizada a retirada do líquido livre de restos de tecido. Ao precipitado foi adicionada nova solução de colagenase 1A e

repetido o ciclo de agitação por 1 hora. O material recolhido foi passado através de uma malha fina e centrifugado a $433 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” submetido ao gradiente de concentração de Percoll (60%, GE Healthcare) (NaCl 0,15M), para a eliminação das partículas de sílica. A suspensão celular foi gentilmente adicionada sobre uma banda do gradiente e a centrifugação procedida por $433 \times g$ a 25°C por 25 minutos. A banda localizada no topo do gradiente foi recolhida e as células adicionadas a garrafas de 75cm^2 acrescidas de meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%, Cultilab), penicilina (1×10^6 U/mL) e estreptomicina (0,2g/mL). A cada 7 dias, após atingirem o estado confluência, as células foram submetidas a um processo de tripsinização mediante adição de uma solução de PBS contendo tripsina (1,25 g/L, GIBCO) e EDTA (0,2 g/L, Sigma-Aldrich), em seguida, transferidas para novas garrafas. As células utilizadas nos experimentos foram obtidas entre a quarta e oitava passagem.

3.8.1 Imunocitoquímica

Para caracterização do fenótipo dos fibroblastos mantidos em cultura, foram adicionadas 1×10^5 células/mL sobre lamínulas depositadas em placas de 24 poços, e mantidas “overnight” em meio DMEM (Invitrogen) suplementado com soro fetal bovino (10%) (Cultilab). O meio foi retirado, as células foram lavadas com solução de tampão fosfato e, em seguida, foi adicionado o tampão de fixação contendo paraformaldeído (4%) e sacarose (4%). Após 30 min, as células foram novamente lavadas com solução de PBS e incubadas com solução saponina (0,05%) (Sigma-Aldrich) por 30 minutos. Após retirada da saponina, foi feita adição de nova solução de saponina (0,05%) contendo gelatina (Sigma-Aldrich) (0,2%) e feita incubação por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário (para α -SMA e citoqueratina) e feita incubação “overnight”. As células foram lavadas com solução tampão e feita adição do anticorpo secundário marcado com fluorocromo. Ao término da incubação, as células foram lavadas com solução de tampão fosfato e incubadas com DAPI (4', 6' - diamidino, 2'- fenillindol -. Invitrogen). Na sequência, as células foram lavadas com água destilada e as lamínulas foram montadas em lâminas com N-propilgalato. A análise foi feita em microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera de vídeo (Optronics Engineering, DEI-750), e processamento feito mediante uso do “software” de análise de imagem (Image-Pro Plus 4.0).

3.8.2 Ensaio de proliferação de miofibroblastos

Para análise da taxa de proliferação, $1,25 \times 10^4$ células foram adicionadas a placas de 96 poços e mantidas “overnight” a 37°C. Após este período, foi feita adição do estímulo de rmIL13 (40 ng/mL) (R&D Systems). Quando da realização do tratamento, as células foram pré-tratadas com diferentes concentrações de LASSBio-468 ou Talidomida, 1 hora antes da adição do estímulo. Decorridas 20 horas da estimulação, foram adicionados 0,5 µCi de [³H] timidina por poço. Após 4 horas, as placas foram congeladas à -20°C para posterior análise no sistema “Cell Harvester” (PerkinElmer). Para esta etapa, foram realizadas sucessivas lavagens com água destilada, as amostras foram transferidas para um filtro que foi colocado em recipiente contendo 4,5mL de líquido de cintilação (Invitrogen) e posterior leitura em sistema MicroBeta²™ (PerkinElmer).

3.9 Cultura de macrófagos alveolares

Foi utilizada linhagem celular de macrófagos alveolares murinos (AMJ2C11) adquirida junto ao banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%) e mantidas em garrafas de 75 cm² (37°C / 5% CO₂). Para os ensaios de ativação, foram adicionadas 5×10^5 células/poço a placas de 24 poços (12 horas). Na sequência, as células foram incubadas com LASSBio-468 ou Talidomida em diferentes concentrações (1 hora) e posteriormente estimuladas com sílica (300 µg/mL). Após 24 horas de estimulação, as placas foram centrifugadas a 433 x g por 10 minutos e o sobrenadante recolhido e armazenado em freezer -80°C para posterior quantificação de mediadores inflamatórios pelo método de ELISA.

3.10 Cultura de células epiteliais pulmonares

Foi utilizada a linhagem de células epiteliais alveolares de adenocarcinoma humano (A549), proveniente de banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%) e garrafas de 75 cm² (37°C/5% CO₂). Para os ensaios de ativação, 5×10^4 células/poço foram adicionadas a placas de 24 poços (12 horas). Na sequência, as mesmas foram incubadas com LASSBio-468 ou talidomida em diferentes concentrações

(1 hora) e posteriormente estimuladas com sílica (300 µg/mL). Após 24 horas, as placas foram centrifugadas a 433 x g por 10 minutos e o sobrenadante recolhido e armazenado em freezer -80°C para posterior quantificação de mediadores inflamatórios pelo método de ELISA.

3.11 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade teve como bases a técnica de metabolização celular do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). As células (2 x 10⁴ células/200µL por poço) foram adicionadas a placa de 96 poços e, após 12 horas, foi realizada a adição dos compostos LASSBio-468 ou talidomida em diferentes concentrações, seguida de incubação por 24 horas. Na sequência, foi feita a adição de MTT (5 mg/mL) e após 4 horas as placas foram centrifugada a 800 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e os cristais provenientes da redução do MTT foram solubilizados pela adição de DMSO (Sigma-Aldrich) por um período de 10 a 15 minutos. Após a completa solubilização, a análise espectrofotométrica foi realizada em leitora de placa no comprimento de onda de 450 nm.

3.12 Quantificação de mediadores inflamatórios por ELISA

Os pulmões foram homogeneizados em 1mL de solução de PBS contendo Triton (0,1%) e inibidor de protease (Complete®, Roche). Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 13000 xg por 10 minutos à 4°C, o sobrenadante recolhido e armazenado a -20°C. Para a quantificação foram utilizados kits Duo Set® (R&D System) conforme as especificações do fabricante.

Para a realização do ELISA, placas de 96 poços foram revestidas com anticorpo primário contra as citocinas TNF-α e TGF-β, e as quimiocinas KC e MCP-1, por um período de 12 horas a 25°C. Em seguida, os poços foram lavados 4 vezes com o tampão 1 (KPO4 0,01M, timerosal 0,02% e Tween 20 (0,005 %) (pH 7,5). Após a lavagem foi feito o bloqueio com solução de PBS/albumina sérica bovina (BSA 1%) à 20°C. Após 1 hora, os poços foram lavados quatro vezes com o tampão 1, e foram adicionadas as amostras diluídas em “assay buffer” (Timerosal 0,05%, BSA 0,1% e PBS) (100µL/poço). Após o período de incubação (12horas) à 4 °C, os poços foram lavados 4 vezes com o tampão 2 (NaCl 1 mM, Na₃PO₄ 0,1 mM, KCl 0,027 mM, timerosal 0,02%, Tween 20 0,005%). Em seguida, foi feita a adição de anticorpos biotinizados específicos

(50 µg/mL), sendo mantida a incubação por 1 hora a 20°C. Os poços foram lavados com o tampão 2, seguindo-se a etapa de incubação por 1 hora a 20°C com a mistura neutraavidina-“horseradish peroxidase” (HRP) diluída em “assay buffer”. A última lavagem foi feita com o tampão 2, seguida de adição do substrato (K-blue®) e incubação por um período de 5 a 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ (0,19 M). A análise espectrofotométrica foi realizada em leitora de placa no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.13 Análise estatística

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

4. Resultados:

4.1 Análise das alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos tratados com LASSBio-468 ou talidomida.

Sabendo-se que a silicose é uma doença associada a um importante comprometimento tecidual, a avaliação morfológica e morfométrica do parênquima pulmonar tornou-se fundamental. Assim, com base na análise de cortes histológicos corados por H&E, verificamos que os animais controles apresentaram parênquima pulmonar preservado, com estruturas de vias aéreas e alvéolos íntegras e ausência de infiltrado inflamatório (Figura 4.1A). Os camundongos silicóticos apresentaram pulmões contendo infiltrado inflamatório e extensa área de fibrose com marcada presença de granulomas (Figura 4.1B). O tratamento com LASSBio-468 nas doses de 25 mg/Kg (Figura 4.1D), 50 mg/Kg (Figura 4.1E) e 100 mg/Kg (Figura 4.1F) foi capaz de inibir a resposta inflamatória e fibrótica, exceto na dose de 12,5 mg/Kg (Figura 4.1C). A talidomida também inibiu os componentes inflamatório e fibrogênico em animais silicóticos (Figura 4.1G). Estas observações foram comprovadas pela análise morfométrica que mostrou uma redução significativa da área de parênquima pulmonar ocupada por granulomas quando da administração das três maiores doses de LASSBio-468 (Figura 4.2).

4.2 Análise da deposição de colágeno no pulmão de camundongos silicóticos tratados com LASSBio-468 ou talidomida.

Para uma análise mais aprofundada acerca do mecanismo de ação antifibrótico do composto LASSBio-468 investigamos, inicialmente, a expressão de componentes da matriz extracelular na resposta da fibrose na silicose experimental. Para tanto, utilizamos o corante Picrus sirius que possui maior afinidade por fibras colágenas e verificamos que na condição controle foi detectada uma marcação basal discreta que corresponde ao colágeno presente no tecido conjuntivo em condições fisiológicas e à

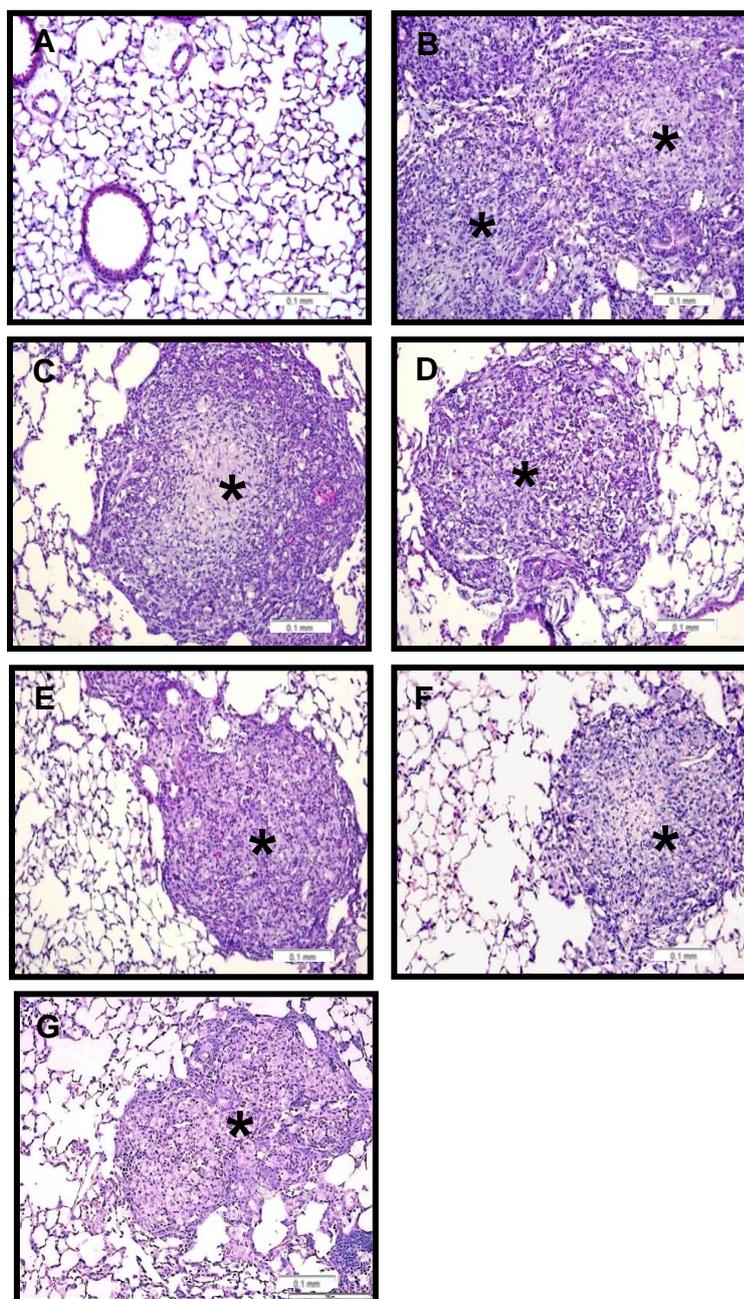


Figura 4.1: Alterações morfológicas no pulmão de camundongos instilados com salina (A) e com sílica (10 mg) (B), tratados ou não com LASSBio-468 (12,5 - 100 mg/Kg, p.o.) (C – F) e talidomida (50 mg/Kg, p.o.) (G). Os compostos foram administrados uma vez ao dia, no período de 21 – 27 dias pós-sílica, e as análises foram realizadas um dia após. As imagens são representativas de n de 6 a 8 animais por grupo. O símbolo * indica a localização dos granulomas. Coloração por H&E. Barra = 100 µm.

membrana basal de vias aéreas e de vasos sanguíneos (Figura 4.3A). No pulmão dos camundongos silicóticos, foi detectada uma intensa marcação de fibras colágenas, correspondente a expressivo quadro de fibrose tecidual (Figura 4.3B). O tratamento dos camundongos silicóticos com LASSBio-468 nas doses de 25 mg/Kg (Figura 4.3D), 50 mg/Kg (Figura 4.3E) e 100 mg/Kg (Figura 4.3F) reduziu a marcação para fibras colágenas, fato não observado quando da utilização da dose de 12,5 mg/Kg (Figura 4.3C). Estes achados foram confirmados quando da quantificação do conteúdo de colágeno tecidual que revelou uma inibição significativa associada ao tratamento com as três maiores doses de LASSBio-468 testadas (Figura 4.4). O tratamento com talidomida (50 mg/Kg) também reduziu a deposição de colágeno no parênquima pulmonar dos animais silicóticos (Figura 4.3G).

4.3 Análise da produção de quimiocinas e citocinas no tecido pulmonar de camundongos silicóticos tratados com LASSBio-468.

De forma a melhor compreender o mecanismo de ação envolvido no efeito supressor do composto LASSBio-468 na silicose experimental, passamos a análise de mediadores gerados neste processo. Verificamos que as quimiocinas KC (Figura 4.5A) e MCP-1 (Figura 4.5B) mostraram-se em níveis aumentados no tecido pulmonar de camundongos silicóticos, bem como as citocinas TNF- α (Figura 4.6A) e TGF- β (Figura 4.6B). O tratamento com a maior dose de LASSBio-468 reduziu de forma significativa os níveis aumentados de KC (Figura 4.5A) e MCP-1 (Figura 4.5B), assim como de TNF- α (Figura 4.6A) e TGF- β (Figura 4.6B) no tecido pulmonar dos animais silicóticos. As doses de 25 mg/Kg e 50 mg/Kg também inibiram a produção de KC (Figura 4.5A), TNF- α (Figura 4.6A) e TGF- β (Figura 4.6B). A menor dose testada de LASSBio-468 apenas demonstrou atividade inibitória sobre a produção de KC (Figura 4.5A).

4.4 Análise da expressão da proteína alfa-actina no pulmão de camundongos silicóticos tratados com LASSBio-468.

Visando investigar o envolvimento de miofibroblastos no modelo adotado, bem como o potencial efeito modulador do LASSBio-468 sobre este tipo celular, avaliamos

a expressão da proteína α -actina de músculo liso (α -SMA) no tecido pulmonar. Verificamos que os animais controles apresentaram somente uma marcação basal

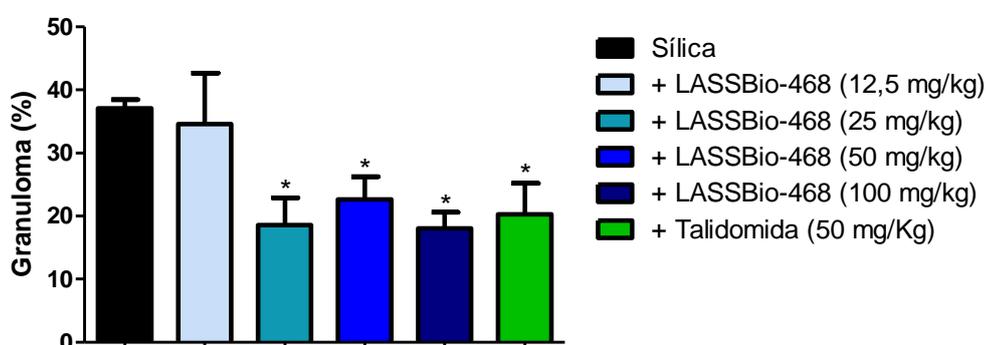


Figura 4.2: Análise morfológica do pulmão de camundongos instilados com salina ou sílica (10 mg), tratados ou não com LASSBio-468 (12,5 - 100 mg/Kg, p.o.) e talidomida (50 mg/Kg, p.o.). Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (n = 6 a 8 animais). +p<0,05 em comparação com o grupo salina; *p<0,05 em comparação com o grupo sílica.

referente à presença de células musculares lisas das vias aéreas (Figura 4.7A). No entanto, foi constatada intensa marcação para a proteína no pulmão de animais silicóticos (Figura 4.7B). A análise qualitativa inicial indicou que o tratamento com as doses de 50 mg/Kg (Figura 4.7C) e 100 mg/Kg (Figura 4.7D) de LASSBio-468 reduziram a expressão de α -SMA no tecido pulmonar. Posteriormente, esta avaliação foi comprovada por uma análise quantitativa da marcação apresentada no pulmão dos referidos grupos estudados, através da contagem de “pixels” por um software analisador de imagem (Figura 4.8). O controle negativo do ensaio, que constou na omissão da incubação de amostra de tecido com o anticorpo primário, garantiu especificidade a reação, uma vez que não houve sinais de marcação (Figura 4.7B – “Inset”).

4.5 Análise da função pulmonar de camundongos silicóticos tratados com LASSBio-468 ou talidomida.

A avaliação da função pulmonar revelou que os animais controles apresentaram níveis de resistência basal compatíveis com aqueles esperados, e que na condição de estimulação com o agente broncoconstritor colinérgico metacolina (3 – 27 mg/mL), sob a forma de aerossol, houve um aumento progressivo da resposta de resistência pulmonar (figura 4.9A).

No caso dos camundongos silicóticos, verificamos um aumento significativo nos níveis basais de resistência em relação ao dos animais controles (Figura 4.9A). Quando os animais silicóticos foram submetidos à estimulação com metacolina, detectamos uma exacerbação da resposta, indicando um estado claro de hiper-reatividade das vias aéreas. A administração curativa do composto LASSBio-468 (25 – 100 mg/Kg) aos animais silicóticos não modificou o nível basal aumentado, porém inibiu a resposta à metacolina (Figura 4.9A). A análise do parâmetro de elastância revelou que os animais controles mostraram-se igualmente reativos quando expostos à aerolização com metacolina (figura 4.9B) e que os silicóticos responderam igualmente de forma exacerbada. O composto LASSBio-468 (25 – 100 mg/Kg) inibiu de forma significativa o aumento da elastância tecidual verificada nos camundongos silicóticos (Figura 4.9B). Para fins de comparação, foi utilizado tratamento com talidomida (50 mg/Kg), seguindo-se mesmo protocolo experimental, e verificamos que o composto foi capaz de inibir o aumento dos parâmetros de resistência (Figura 4.9A) e elastância pulmonares (Figura 4.9B) nos

animais silicóticos, com principal efeito sendo notado nas maiores concentrações de metacolina.

4.6 Análise da expressão da proteína alfa-actina por miofibroblastos pulmonares *in vitro*.

Buscando avaliar o potencial efeito direto do composto LASSBio-468 sobre fibroblastos, desenvolvemos um sistema de cultura de fibroblastos pulmonares com material proveniente de camundongos instilados com salina (controles) e com sílica.. Iniciamos pela caracterização fenotípica da população de células obtidas após digestão mecânica e enzimática do pulmão de animais controles e silicóticos (7 dias). Para tanto, foram utilizados os anticorpos anti- α -SMA, uma proteína constitutiva da população de células miofibroblásticas, e para citoqueratina, uma proteína marcadora de células epiteliais. Como pode ser observado na figura 10, as células provenientes do pulmão de animais normais (Figura 4.10A) e silicóticos (Figura 4.10B) apresentaram marcação positiva para α -SMA e negativa para citoqueratina, indicando tratarem-se de fibroblastos.

4.7 Avaliação da proliferação de miofibroblastos pulmonares pré-tratados com LASSBio-468 ou talidomida e estimulados com IL-13 *in vitro*.

Na sequência, decidimos por avaliar comparativamente a resposta de ambas as populações celulares frente à estimulação com IL-13, uma citocina implicada em uma série de processos fisiopatológicos de natureza crônica, em função da sua atividade pró-fibrótica. Observamos que tanto fibroblastos provenientes de animais normais (Figura 4.11A), bem como aqueles de animais silicóticos (Figura 4.11B), proliferaram na presença de rmIL-13 (40 ng/mL), muito embora estes últimos tenham se mostrado mais

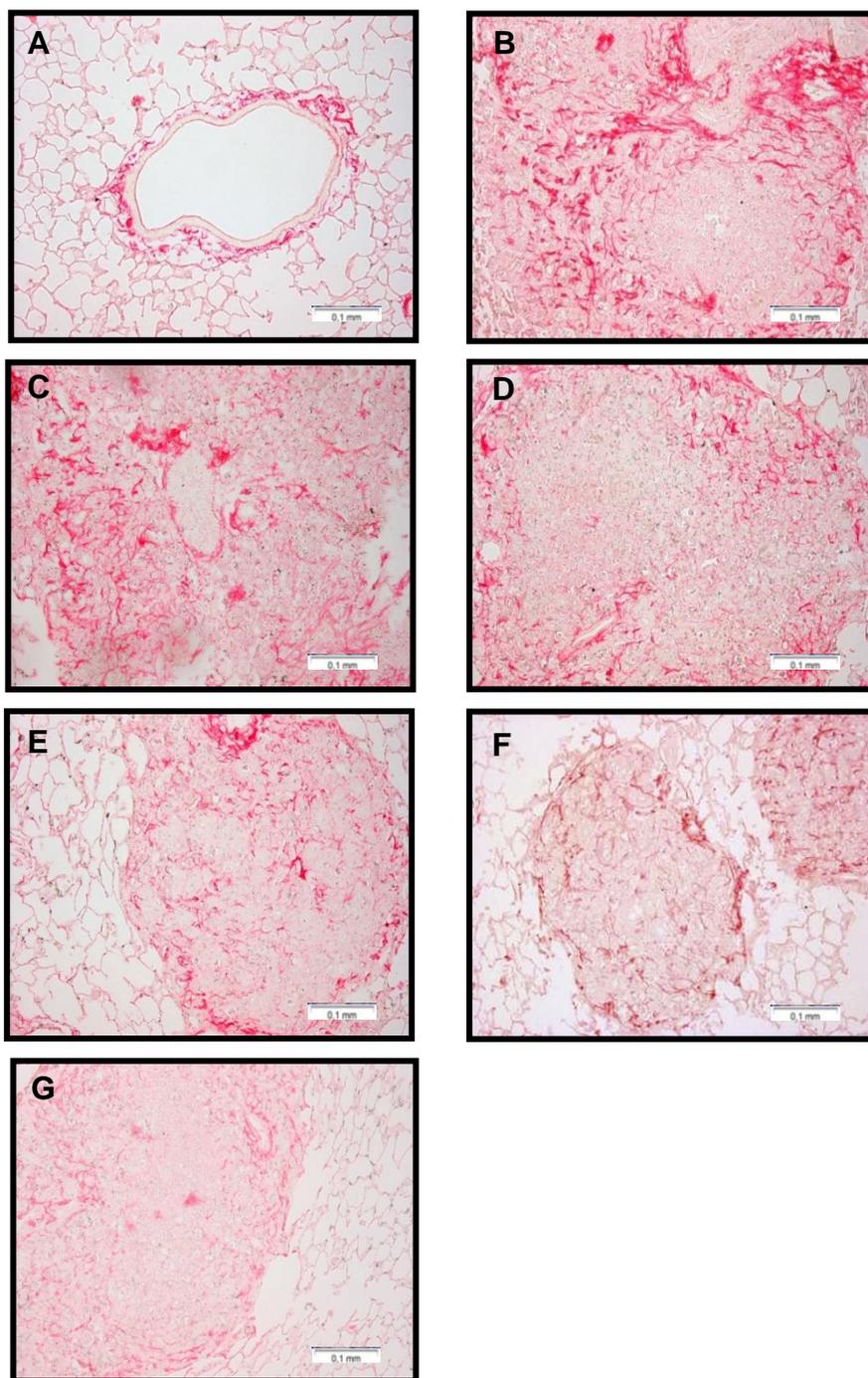


Figura 4.3: Análise da deposição de colágeno no pulmão de camundongos instilados com salina ou sílica (10 mg), tratados ou não com LASSBio-468 (12,5 - 100 mg/Kg, p.o.) e talidomida (50 mg/Kg, p.o.). O composto foi administrado uma vez ao dia, no período de 21 – 27 dias pós-sílica, e as análises foram realizadas um dia após. As imagens são representativas de n de 6 a 8 animais por grupo. Coloração por Picrosirius. Barra = 100 μ m.

responsivos. De forma interessante, foi possível observar, também, um basal de resposta de proliferação maior das células de animais silicóticos em comparação com fibroblastos normais.

Investigando, então, o efeito do LASSBio-468, verificamos que tanto as células normais (Figura 4.12A), quanto as células de animais silicóticos (Figura 4.12B) mostraram-se responsivas à estimulação com a IL-13. Enquanto o tratamento com LASSBio-468 (Figura 4.12A) e talidomida (Figura 4.12C) não inibiram o aumento da proliferação induzida por IL-13 em células de animais normais, observamos importante atividade inibitória do LASSBio-468 (10^{-6}M – 10^{-4}M) sobre a proliferação de células de animais silicóticos (Figura 4.12B). A talidomida apresentou atividade inibitória sobre a proliferação de células de animais silicóticos somente nas maiores concentrações testadas (10^{-5}M e 10^{-4}M) (Figura 4.12D).

4.8 Avaliação da viabilidade de miofibroblastos pulmonares incubados com LASSBio-468 e talidomida *in vitro*.

Na tentativa de avaliar o efeito dos compostos LASSBio-468 e talidomida sobre a taxa de viabilidade celular, foi realizada incubação com os referidos compostos por 24 horas e, posteriormente utilizado o ensaio de MTT. Verificamos que não houve variação significativa no percentual de viabilidade de células de animais normais (Figura 4.13A e Figura 4.13C) e células de animais silicóticos (Figura 4.13B e Figura 4.13D) tratadas com LASSBio-468 ou talidomida nas diferentes concentrações testadas.

4.9 Avaliação da produção de TNF- α por macrófagos alveolares AMJ2C11 pré-tratados com LASSBio-468 ou talidomida e estimulados com sílica *in vitro*.

Seguindo com a investigação acerca do efeito do LASSBio-468 sobre células alvos importantes no contexto da silicose, nesta etapa avaliamos a população de macrófagos alveolares murinos (linhagem AMJ2C11) estimulados com sílica *in vitro*. Na figura 4.14, pode ser observado que as células estimuladas com sílica ($300\ \mu\text{g}/\text{mL}$) responderam com aumento na produção de TNF- α . O tratamento com LASSBio-468 (10^{-6}M – 10^{-4}M) foi capaz de inibir a produção de TNF- α induzida por sílica nos macrófagos alveolares (Figura 4.14).

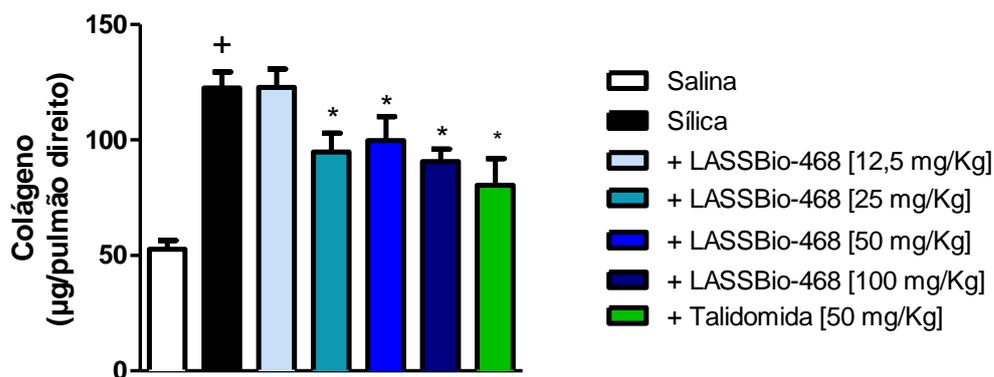


Figura 4.4: Quantificação do conteúdo de colágeno no pulmão de camundongos instilados com salina ou sílica (10 mg), tratados ou não com LASSBio-468 (12,5 - 100 mg/Kg, p.o.) ou talidomida (50 mg/Kg, p.o.). O tratamento foi feito uma vez ao dia, no período de 21 – 27 dias pós-sílica, e as análises foram realizadas um dia após. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (n = 6 a 8 animais). +p<0,05 em comparação com o grupo salina; *p<0,05 em comparação com o grupo sílica.

4.10 Avaliação da produção de IL-8 por células epiteliais A549 pré-tratados com LASSBio-468 ou talidomida e estimulados com sílica *in vitro*.

Por último, porém não menos importante, avaliamos o efeito dos compostos sobre células epiteliais alveolares humanas (linhagem A549). Verificamos que a estimulação com sílica (300 µg/mL) foi capaz de promover o aumento da produção de IL-8 por estas células (Figura 4.15A e Figura 4.15B), e que o tratamento com LASSBio-468 (Figura 4.15A) ou talidomida (Figura 4.15B) foi capaz de inibir a produção desta quimiocina.

4.11 Avaliação da viabilidade de células epiteliais A549 incubadas com LASSBio-468 ou talidomida *in vitro*.

A análise do efeito de tais compostos sobre a metabolização de MTT pelas células A549 mostrou que LASSBio-468 (Figura 4.16A) e talidomida (Figura 4.16B) não foram capazes de alterar de forma significativa viabilidade das células testadas.

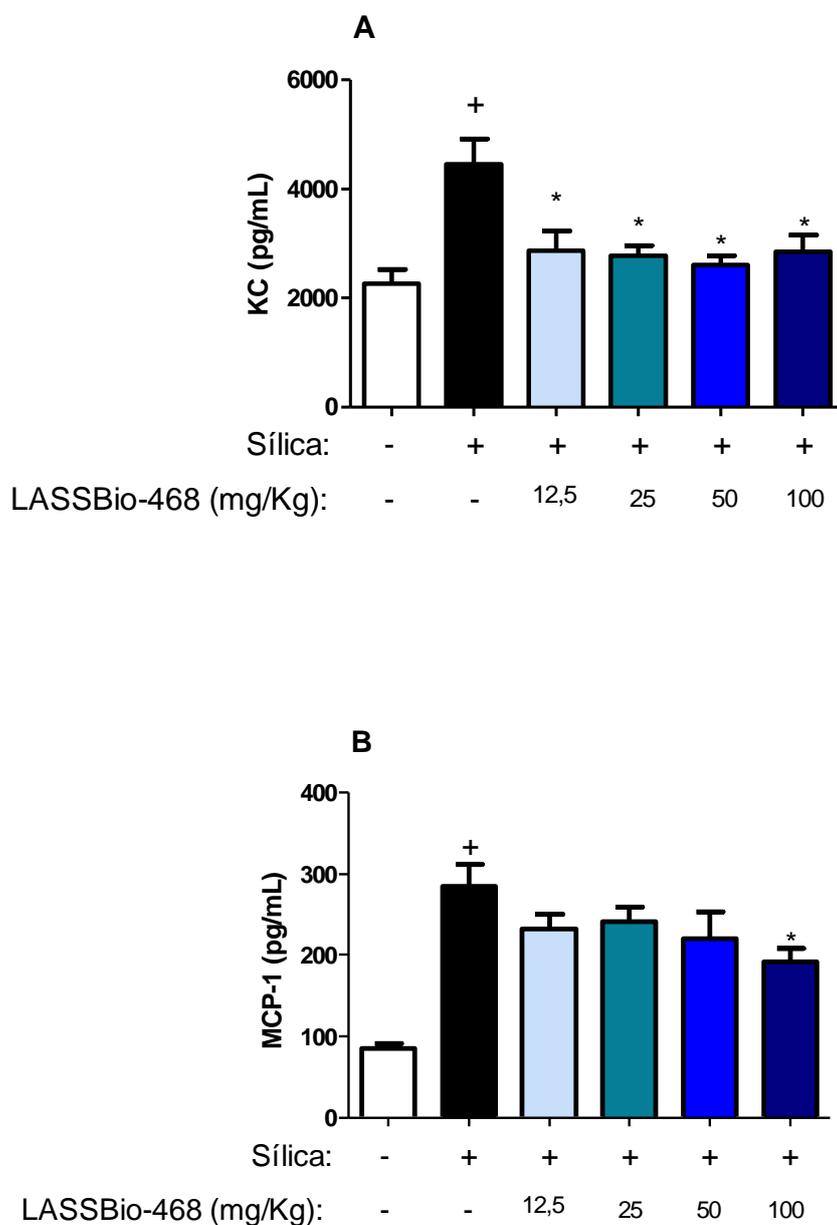


Figura 4.5: Análise da produção de quimiocinas KC (A) e MCP-1 (B) no pulmão de camundongos instilados com salina ou sílica (10 mg), tratados ou não com LASSBio-468 (12,5 - 100 mg/Kg, p.o.). O composto foi administrado uma vez ao dia, no período de 21 – 27 dias pós-sílica, e as análises foram realizadas um dia após. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (n = 6 a 8 animais). +p<0,05 em comparação com o grupo salina; *p<0,05 em comparação com o grupo sílica.

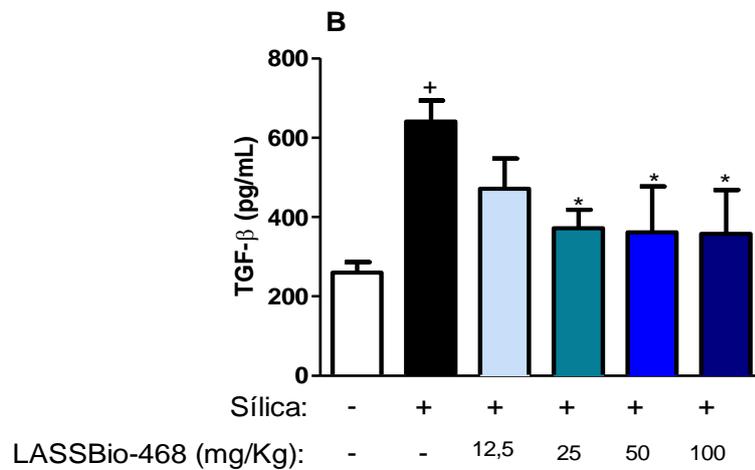
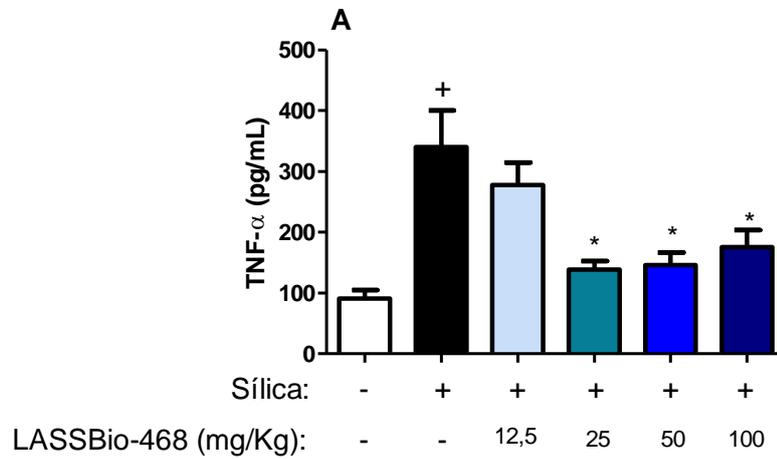


Figura 4.6: Análise da produção de citocinas TNF- α (A) e TGF- β (B) no pulmão de camundongos instilados com salina ou sílica (10 mg), tratados ou não com LASSBio-468 (12,5 - 100 mg/Kg, p.o.). O tratamento foi feito uma vez ao dia, no período de 21 – 27 dias pós-sílica, e as análises foram realizadas um dia após. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (n = 6 a 8 animais). +p<0,05 em comparação com o grupo salina; *p<0,05 em comparação com o grupo sílica.

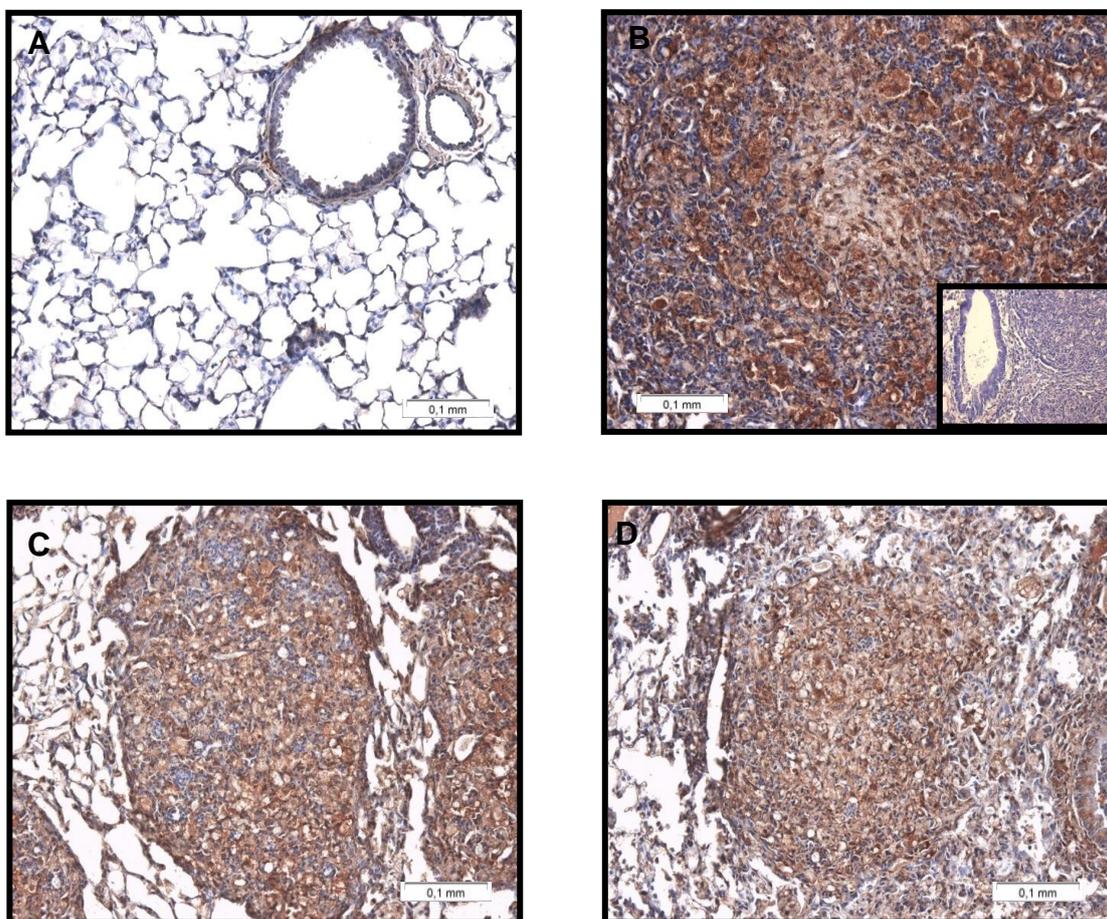


Figura 4.7: Análise da expressão da proteína alfa-actina no pulmão de camundongos instilados com salina (A) ou sílica (10 mg) (B), tratados ou não com LASSBio-468 (50 mg/Kg, p.o.) (C) e (100 mg/Kg, p.o.) (D). O composto foi administrado uma vez ao dia, no período de 21 – 27 dias pós-sílica, e as análises foram realizadas um dia após. As imagens são representativas de n de 6 a 8 animais por grupo.

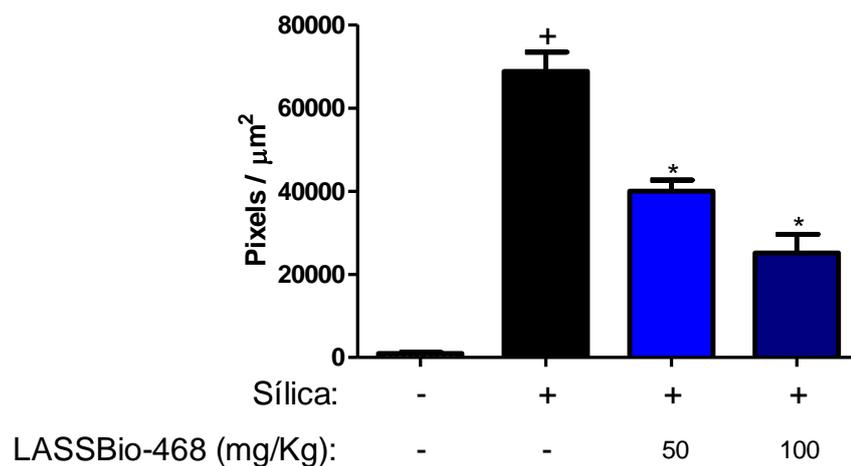


Figura 4.8: Análise da quantificação de pixels das fotomicrografias do pulmão de camundongos instilados com salina ou sílica (10 mg), tratados ou não com LASSBio-468 (12,5 - 100 mg/Kg, p.o.). O composto foi administrado uma vez ao dia, no período de 21 – 27 dias pós-sílica, e as análises foram realizadas um dia após. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (n = 6 a 8 animais). +p<0,05 em comparação com o grupo salina; *p<0,05 em comparação com o grupo sílica.

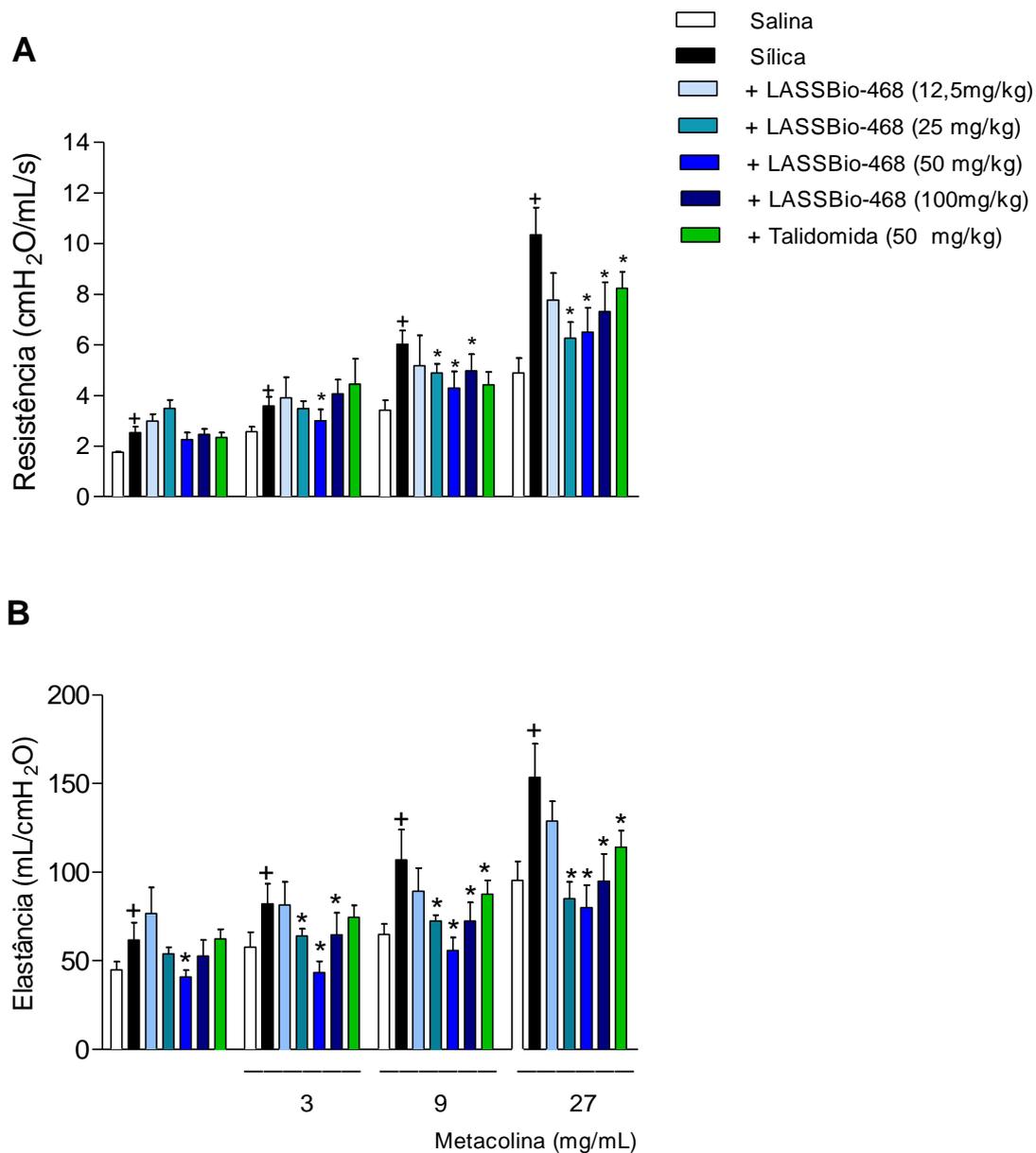


Figura 4.9: Análise da função pulmonar de camundongos instilados com salina ou sílica (10 mg), tratados ou não com LASSBio-468 (12,5 - 100 mg/Kg, p.o.) ou talidomida (50 mg/Kg, p.o.). Os compostos foram administrados uma vez ao dia, no período de 21 – 27 dias pós-sílica, e as análises foram realizadas 1 dia após. As colunas representam média \pm erro padrão da média (n = 6 a 8 animais por grupo). +p<0,05 em comparação com o grupo salina; *p<0,05 em comparação com o grupo sílica

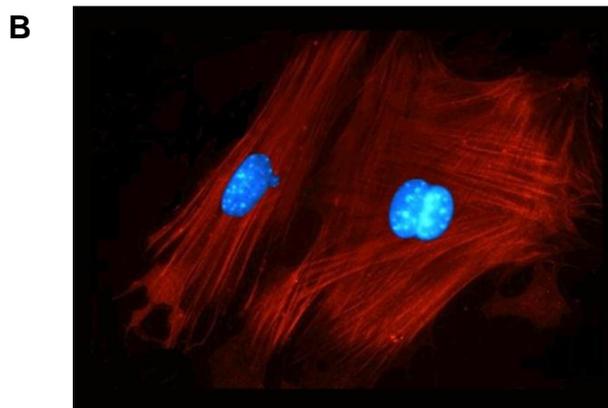
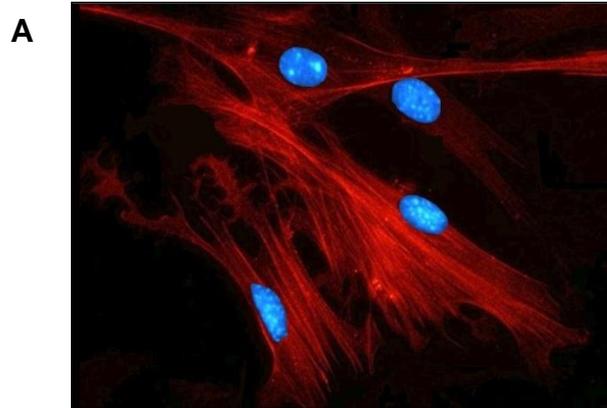


Figura 4.10: Análise imunocitoquímica de miofibroblastos pulmonares de animais normais (A) ou silicóticos (7 dias) (B) marcados para α -SMA (vermelho) e citoqueratina (verde) (negativo) *in vitro*. (x40)

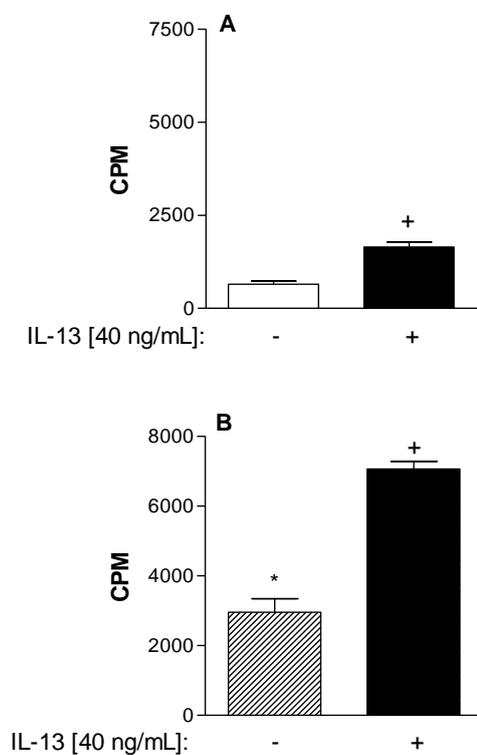
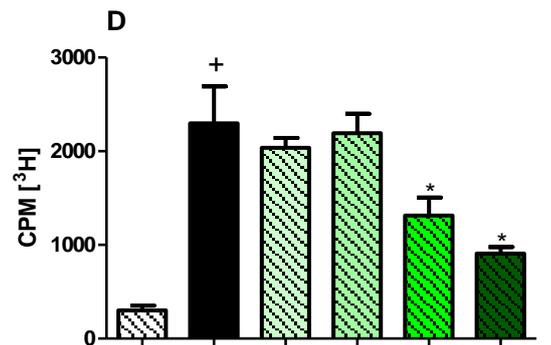
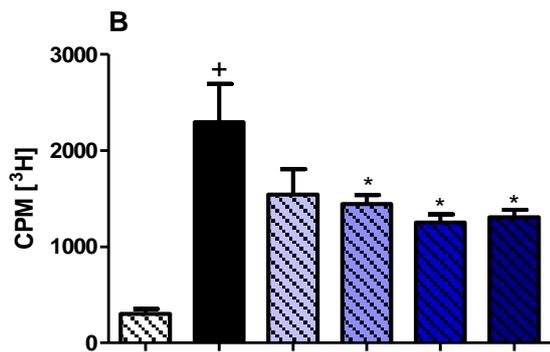
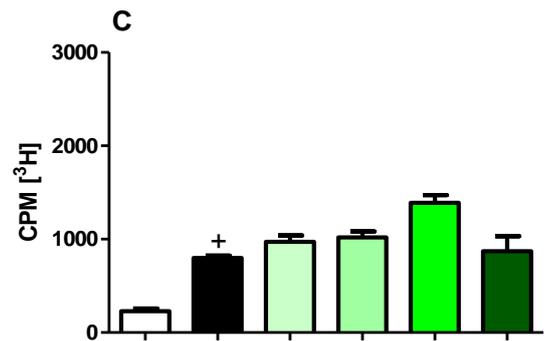
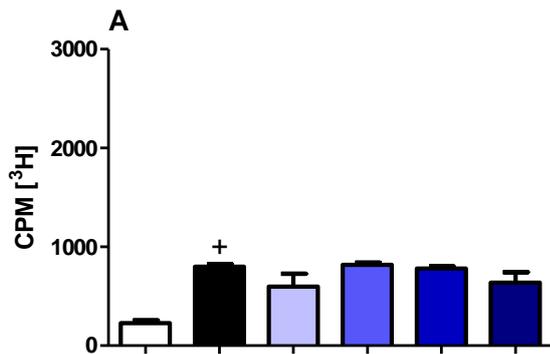


Figura 4.11: Avaliação da proliferação de miofibroblastos pulmonares provenientes de camundongos normais (A) e silicóticos (7 dias) (B), frente à estimulação com rmIL-13 *in vitro* (24h). Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (representativo de 3 ensaios). +p<0,05 em comparação com o grupo salina; *p<0,05 em comparação com o grupo salina de animais normais.



IL-13 (40 ng/mL): - + + + + +
 LASSBio-468 (M): - - 10⁻⁷ 10⁻⁶ 10⁻⁵ 10⁻⁴

IL-13 (40 ng/mL): - + + + + +
 Talidomida (M): - - 10⁻⁷ 10⁻⁶ 10⁻⁵ 10⁻⁴

Figura 4.12: Avaliação da proliferação de miofibroblastos pulmonares provenientes de camundongos normais (A) (C) e silicóticos (B) (D) pré-tratados com LASSBio-468 (10⁻⁷M – 10⁻⁴M) (A) (B) ou talidomida (10⁻⁷M – 10⁻⁴M) (C) (D) (1h), frente à estimulação com rmIL-13 *in vitro* (24h). Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (representativo de 3 ensaios). +p<0,05 em comparação com o grupo salina; *p<0,05 em comparação com o grupo sílica das respectivas condições celulares.

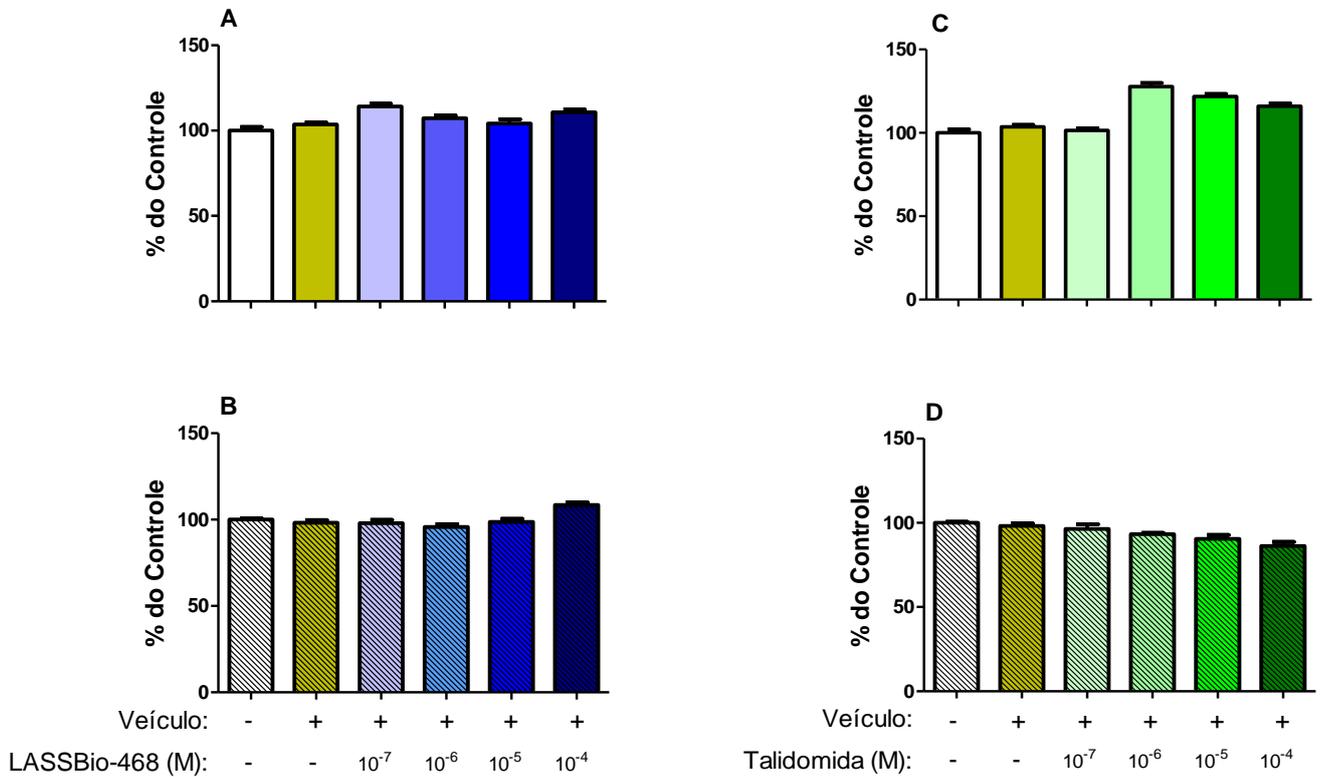


Figura 4.13: Avaliação da viabilidade de miofibroblastos provenientes de camundongos normais (A) (C) e silicóticos (B) (D) incubados com LASSBio-468 (10^{-7} M – 10^{-4} M) (A) (B) e com talidomida (10^{-7} M – 10^{-4} M) (C) (D) *in vitro* (24h). Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (representativo de 3 ensaios).

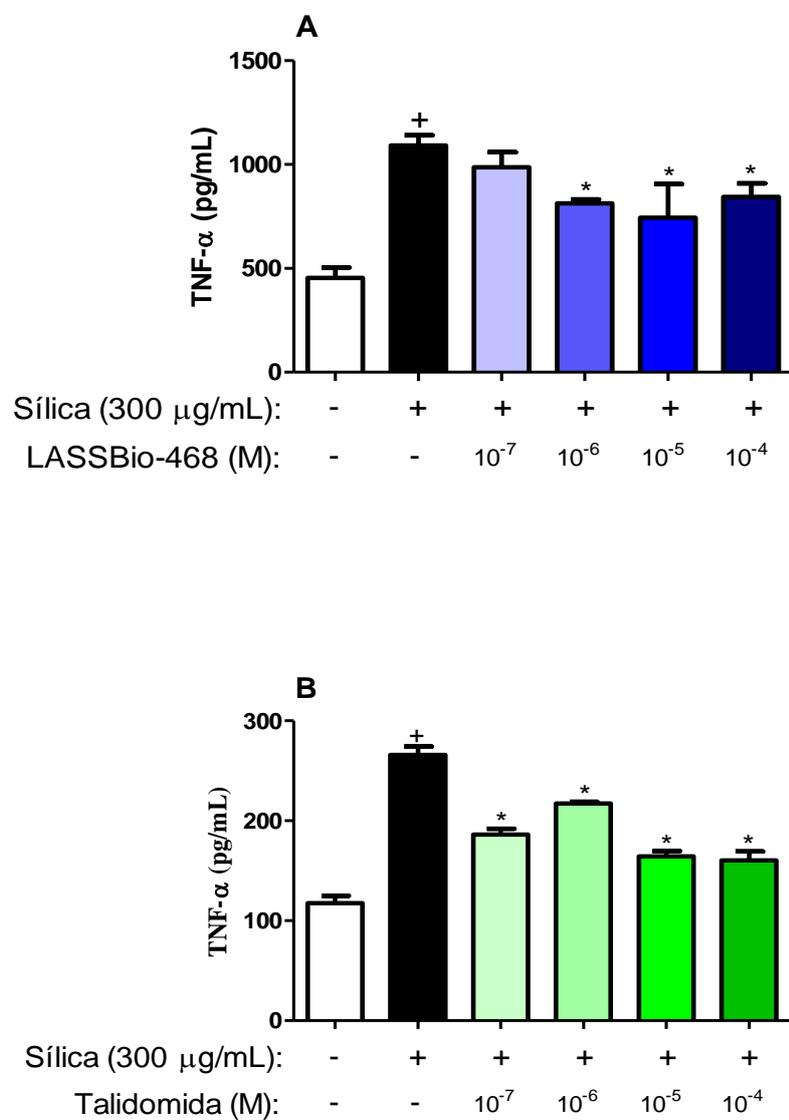


Figura 4.14: Avaliação da produção de TNF- α por macrófagos alveolares AMJ2C11 pré-tratados com LASSBio-468 (10^{-7}M – 10^{-4}M) (A) ou talidomida (10^{-7}M – 10^{-4}M) (B) (1 horas), frente à estimulação com sílica *in vitro* (24h). Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (representativo de 2 ensaios). ⁺ $p < 0,05$ em comparação com o grupo não-estimulado; * $p < 0,05$ em comparação com o grupo estimulado com sílica.

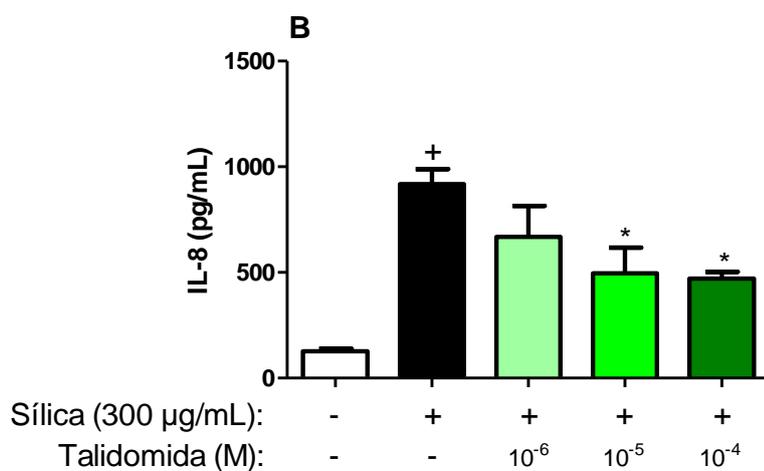
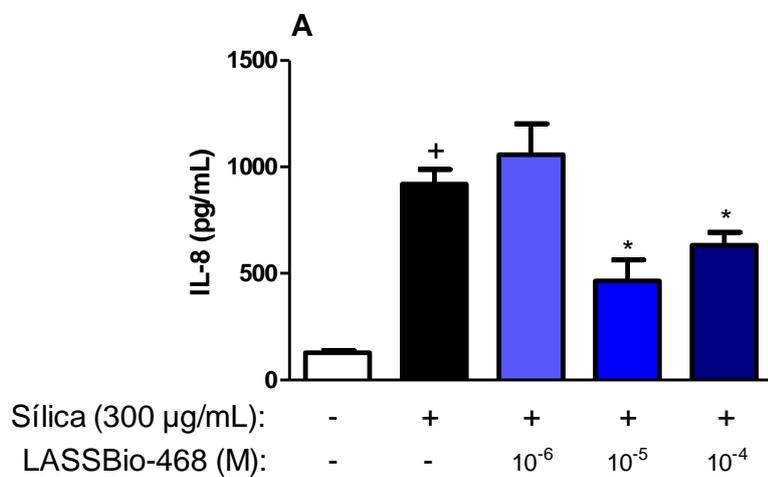


Figura 4.15: Avaliação da produção de IL-8 por células epiteliais A549 pré-tratadas com LASSBio-468 ($10^{-7}\text{M} - 10^{-4}\text{M}$) (A) ou talidomida ($10^{-7}\text{M} - 10^{-4}\text{M}$) (B) (1h), frente à estimulação com sílica *in vitro* (24h). Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (representativo de 3 ensaios). $+p < 0,05$ em comparação com o grupo não-estimulado; $*p < 0,05$ em comparação com o grupo estimulado com sílica.

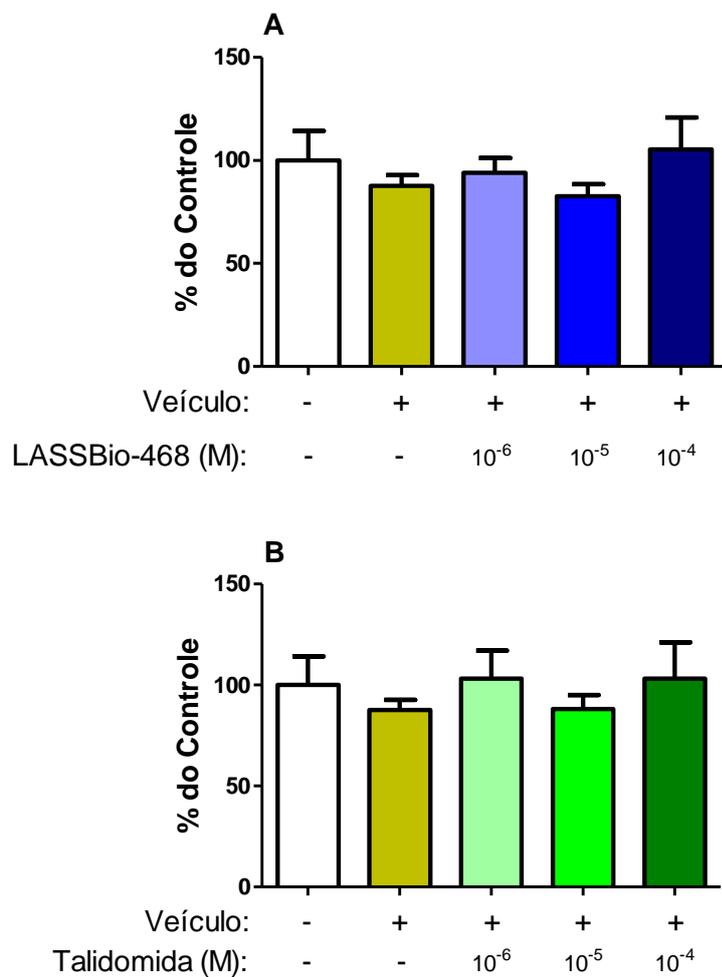


Figura 4.16: Avaliação da viabilidade de células epiteliais A549 incubadas com LASSBio-468 (10^{-6} M – 10^{-4} M) (A) e com talidomida (10^{-6} M – 10^{-4} M) (B) *in vitro* (24h). Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (representativo de 3 ensaios).

5. Discussão

A silicose é uma doença de caráter ocupacional causada pela inalação de partículas de sílica e que pode ser prevenida pelo uso de equipamentos de proteção apropriados, porém continua a ser, dentre as pneumoconioses, uma importante causa de morbidade e mortalidade ao redor do mundo (121). O principal agravante é o fato de que, até o presente momento, não existe uma terapia verdadeiramente efetiva para a doença em questão (12).

Considerando as diversas células envolvidas e os mediadores liberados na fisiopatologia da silicose, podemos destacar o TNF- α como um contribuinte central para a manutenção e ampliação das lesões causadas pela sílica no tecido pulmonar, tanto em humanos, como em modelos experimentais. A amplitude destas ações estabelece este mediador como um dos principais alvos terapêuticos nesta patologia.

Diversas são as estratégias farmacológicas existentes que objetivam, em determinadas patologias, a minimização as ações do TNF- α , como o uso de anticorpos neutralizadores. Com aplicabilidade e respostas benéficas variáveis, a busca por compostos que sejam seguros e efetivos nesta intervenção permanece um desafio. Um dos mais antigos fármacos dotados de ação sobre o TNF- α é a talidomida (112). Apesar do uso terapêutico em patologias específicas, como no eritema nodoso leproso, e de seu papel imunomodulador, a terapia com talidomida está atrelada a uma série de efeitos adversos como constipação, vertigem, edema, fadiga, mudanças emocionais, neuropatia periférica, além da teratogênese extensivamente documentada a partir da década de 60 do século XX (122, 123). Apesar de raros, já foram também reportados casos de embolia pulmonar e pneumonia intersticial relacionados ao uso da talidomida (124). Estes fatos justificam a busca por compostos dotados de ações semelhantes à talidomida, porém livres das limitações associadas ao uso terapêutico da mesma (110, 125). Tomando por base as observações acima, no presente trabalho investigamos o potencial efeito de um composto ftalimídico derivado da talidomida sobre o modelo de silicose experimental murina.

Nossos resultados mostraram a existência de alterações na mecânica respiratória de animais silicóticos, em relação aos controles, evidenciadas pelo aumento da resistência e elastância teciduais, assim como pela existência de hiper-reatividade das vias aéreas. Estes achados estão em concordância com o observado em humanos,

quando foi verificado que a evolução da doença de fato implicou no desenvolvimento de graves limitações na função respiratória (126, 127), inclusive com a apresentação de um quadro de hiper-reatividade (128). Apesar de alguns trabalhos apontarem para as alterações nos parâmetros de função respiratória em pacientes portadores de doenças fibróticas pulmonares, mais estudos são ainda necessários para o entendimento da gênese do quadro e dos principais fatores a ele relacionados.

As partículas de sílica são de difícil remoção do parênquima pulmonar, o que faz com que o mineral permaneça no tecido, estimulando células residentes e inflamatórias, direcionando a resposta inflamatória e orquestrando a formação de nódulos silicóticos (129). A resposta fibrótica, sucessora e/ou co-existente à reação inflamatória inicial, contribui para as alterações na função pulmonar dos animais silicóticos através de eventos como a proliferação de células mesenquimais e da deposição de elementos de matriz extracelular que promovem mudanças na arquitetura e funcionalidade do órgão (130) (131). Nossos resultados mostraram que as alterações na mecânica respiratória dos animais silicóticos foram acompanhadas por um importante infiltrado inflamatório e pelo aumento na deposição de colágeno no parênquima pulmonar, como evidenciado nas análises histológicas e morfométricas, bem como pela quantificação do conteúdo de colágeno pulmonar.

A progressão da inflamação e fibrose envolve a participação de uma ampla gama de mediadores com destaque para as quimiocinas e citocinas (39, 54). Em nosso modelo experimental de silicose, verificamos o aumento nos níveis das quimiocinas KC e MCP-1, bem como das citocinas TNF- α e TGF- β no tecido pulmonar. A participação de KC e MCP-1 reflete a ação de ambas no processo de recrutamento celular com especial foco em neutrófilos e em monócitos, respectivamente (49, 54). A amplitude das ações das citocinas agrega complexidade aos eventos tissulares que sucedem à inalação das partículas de sílica. Previamente foi demonstrado que os macrófagos obtidos de animais silicóticos ou de pacientes com fibrose pulmonar produzem TNF- α e TGF- β , citocinas detentoras de potentes ações pró-inflamatórias e fibróticas (132, 133). O TNF- α possui um amplo espectro de ações e tem seus receptores expressos na maioria das células inflamatórias, o que certamente auxilia na finalização do efeito (134).

Os altos níveis de TNF- α detectados no tecido pulmonar de animais silicóticos estão associados a marcos da resposta fibrogênica pulmonar em questão. Esta citocina, assim como já documentado na literatura, é capaz de estimular a diferenciação de fibroblastos em seu fenótipo ativado de miofibroblastos (90). O surgimento deste perfil

celular no curso de uma resposta patológica comumente está vinculado a processos de reparo que envolvem a proliferação celular e a síntese de proteínas de matriz (69). Os resultados obtidos neste trabalho reafirmam esta relação uma vez que, animais silicóticos apresentaram expressiva marcação para a proteína α -SMA no tecido pulmonar. Trata-se de um indicativo indireto da presença de miofibroblastos neste processo, que podem estar sendo municiados pelos altos níveis de TNF- α circulante.

A presença maciça de células com características de miofibroblastos no pulmão de animais silicóticos justifica também a elevada deposição de colágeno tissular encontrada, uma vez que estas células apresentam destacado perfil produtor de elementos de matriz extracelular (69). Além disso, conforme comprovado pela quantificação de mediadores presentes no tecido pulmonar, o aumento dos níveis de TGF- β no pulmão de animais silicóticos certamente está associado a esta ativação, uma vez que, além de atuar em outros tipos celulares importantes, este mediador é capaz de estimular a proliferação e liberação de colágeno e/ou mediadores inflamatórios por miofibroblastos (131, 135).

Visando melhor detalhar a participação deste perfil celular em nosso modelo experimental de silicose, realizamos uma abordagem de análise *in vitro* da funcionalidade de miofibroblastos pulmonares com foco sobre a proliferação celular. Estabelecemos uma cultura primária de miofibroblastos e comprovamos, através de imunocitoquímica, a expressão de α -SMA nestas células recuperadas de animais normais e silicóticos de fase aguda. Verificamos também que as células, tanto de animais normais, quanto de animais silicóticos, mostraram-se responsivas a estimulação com IL-13, no que diz respeito à proliferação celular. De forma original, constatamos também neste trabalho que os miofibroblastos silicóticos apresentaram níveis basais de proliferação aumentados, o que reforça o fato de exposição destas células a um ambiente de índices elevados de mediadores inflamatórios e pró-fibróticos circulantes, justificando a condição de maior reatividade apresentada.

A reação inflamatória associada à silicose é caracterizada pelo envolvimento de outros tipos celulares importantes, como macrófagos e células epiteliais, que contribuem para o quadro patológico secretando enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio e mediadores inflamatórios que, em conjunto, auxiliam na ativação de outros tipos celulares (136). Cientes desta importância, avaliamos a resposta *in vitro* de macrófagos alveolares de linhagem ao estímulo direto com partículas de sílica. A partir desta análise, verificamos que os macrófagos responderam a esta estimulação

aumentando a taxa de produção de TNF- α . Trata-se de uma abordagem interessante e explicativa em relação ao início de resposta do sistema imune a presença das partículas de sílica, uma vez que macrófagos correspondem a uma das primeiras células a interagirem com estas partículas após a sua inalação (56). Estes dados são corroborados por outros que apontam a ativação de macrófagos por sílica e reafirmam o TNF- α como um dos protagonistas do disparo da resposta inflamatória e fibrótica inicial na silicose (16, 50, 121).

Em relação às células epiteliais, a adoção de cultura de células específicas e a posterior estimulação com sílica *in vitro* nos evidenciou a capacidade das mesmas em produzir IL-8, um mediador responsável pelo recrutamento de neutrófilos (137). Esta resposta de quimioatração de neutrófilos para o foco da lesão ilustra, além de sua função estrutural, a habilidade de resposta destas células a um estímulo lesivo, além de justificar como neutrófilos possam estar chegando ao tecido pulmonar na silicose (59, 138, 139).

Os achados expostos neste trabalho em relação ao modelo de silicose murina experimental adotado, bem como as análises *in vitro* de células isoladas, nos garantiu recursos suficientes para explorarmos a ação do LASSBio-468 no contexto de uma patologia órfã de ferramentas terapêuticas eficazes. O fato do composto em questão derivar também da talidomida e apresentar resultados interessantes em trabalhos anteriores no que diz respeito à inibição das ações do TNF- α , nos fez apostar nesta abordagem (116, 117).

Nas nossas condições experimentais, verificamos que o tratamento curativo com o LASSBio-468 foi capaz de promover substancial melhora da função pulmonar de animais silicóticos, com significativa redução do quadro de aumento de resistência e elastância pulmonares, bem como da hiper-reatividade das vias aéreas revelada na condição de estimulação com metacolina, inclusive em doses menores do que a utilizada para a talidomida. Tomando por base os achados prévios indicativos do efeito inibitório do composto sobre a geração de TNF- α , poderíamos implicar este mediador na resposta de comprometimento da função pulmonar nos animais silicóticos. Estes achados são suportados por outros anteriormente obtidos por nosso grupo que mostraram a capacidade do TNF- α , quando instilado intranasalmente, em induzir hiper-reatividade das vias aéreas (115).

O tratamento com LASSBio-468 também se mostrou eficaz em diminuir o infiltrado inflamatório presente no tecido pulmonar de animais silicóticos, além de atuar

reduzindo a resposta fibrogênica e a formação de granulomas. A redução do infiltrado inflamatório, além de uma maior preservação do parênquima pulmonar dos animais silicóticos tratados com o composto LASSBio-468, provavelmente, contribuiu para a melhora na função pulmonar acessada. Estes eventos podem estar relacionados também a uma redução nas ações do TNF- α , uma vez que já foi demonstrado que camundongos nocautes para o receptor TNFR1 quando estimulados com sílica apresentaram resposta inflamatória e fibrótica marcadamente reduzida em comparação aos animais selvagens (115).

A redução na presença de células inflamatórias no pulmão de animais silicóticos tratados com LASSBio-468 pode ser justificada pela diminuição da produção das quimiocinas MCP-1 e KC, importantes no recrutamento de células inflamatórias atuantes na silicose (78). Níveis menores de TNF- α também são fundamentais neste contexto uma vez que este mediador modula positivamente a expressão de moléculas de adesão importantes nos processos quimiotáticos (90, 140).

A inibição da deposição de colágeno induzida pelo composto e revelada em nossos resultados parece intimamente relacionada à diminuição da presença de células com marcação positiva para α -SMA, correspondendo ao fenótipo celular de fibroblastos ativados. Graças ao grande potencial secretório de mediadores por fibroblastos e, principalmente, de componentes de matriz extracelular, a redução da ação destas células acarreta na maior preservação da arquitetura pulmonar, com menor acúmulo de tecido granulomatoso e conseqüente melhora da função pulmonar dos animais silicóticos tratados com LASSBio-468. Mais ainda, a inibição da deposição de colágeno pelo composto teste pode ser também atribuída à redução nos níveis de TGF- β e TNF- α detectados no tecido pulmonar, reconhecidos fatores prófibróticos (81, 141). Estes pontos estão em concordância com dados já verificados na literatura destacando, inclusive, o potencial inibitório do LASSBio-468 sobre a formação de granulomas no tecido hepático em um modelo experimental de artrite reumatóide, que também envolve níveis elevados de TNF- α (117).

Buscando aprofundar a compreensão sobre as ações do LASSBio-468 em células-chaves no contexto da silicose, utilizamos o composto, bem como a talidomida, nos ensaios em cultura celular previamente estabelecidos. Em miofibroblastos pulmonares, o LASSBio-468 destacou-se por apresentar atividade inibitória sobre a proliferação destas células induzida pela citocina pró-fibrótica IL-13. Ainda que a

talidomida também tenha reduzido a proliferação de miofibroblastos nestes ensaios, LASSBio-468 foi capaz de ação semelhante em concentração ainda menor.

Em relação a macrófagos alveolares estimulados diretamente com sílica, verificamos que o composto LASSBio-468 foi capaz de inibir a produção de TNF- α por estas células. Trata-se de um resultado interessante uma vez que a modulação negativa da produção de TNF- α por macrófagos corresponde a um evento terapeuticamente valioso no contexto da silicose, pela importância do TNF- α na fisiopatologia e por macrófagos serem considerados um dos principais produtores deste mediador (16, 98).

Analisando a ação do composto sobre células epiteliais, demonstramos que o tratamento com LASSBio-468 foi capaz de inibir a produção de IL-8 por células A549 estimuladas com sílica *in vitro*, assim como a talidomida também o fez. A produção de IL-8 em resposta a sílica, ainda que compondo uma análise *in vitro*, explica e pode contribuir para a ocorrência de intenso infiltrado celular, com composição expressiva de neutrófilos, encontrado no curso de resposta patológica associada à silicose (22, 138).

Ainda não há uma definição exata a respeito do mecanismo de ação do LASSBio-468 sobre as ações do TNF- α . Preliminarmente, verificamos que o LASSBio-468 desempenhou seu papel farmacológico sobre miofibroblastos pulmonares e células epiteliais sem conduzir as mesmas a morte celular, sugerindo que o composto atuou por mecanismos outros capazes de reduzir a proliferação celular e secreção de IL-8, respectivamente. O fato do composto teste também derivar de um inibidor de PDE-4, poderia nos levar a acreditar que suas ações antiinflamatórias e anti-fibróticas estariam vinculadas a este ponto, também conhecido por limitar a atuação do TNF- α (142). No entanto, dados preliminares revelaram que o potencial inibitório do LASSBio-468 sobre PDE-4 é muitíssimo limitado (116). O mais plausível é que o composto avaliado neste trabalho desempenhe suas ações através de outro mecanismo.

Por derivar da talidomida, poderíamos especular ações farmacológicas semelhantes para o LASSBio-468, como aumentar a instabilidade de transcritos de TNF- α , culminando na sua degradação (143). Outro ponto que poderia estar ligado as ações do LASSBio-468, seria o fator nuclear Kappa B (NF- κ B), um fator de transcrição diretamente envolvido em processos inflamatórios, o qual também já foi demonstrado que a talidomida é capaz de modular (144). No entanto, especialmente em nosso modelo experimental de silicose, mais ensaios necessitam ser realizados para o acesso preciso a esta informação.

6. Conclusão:

Nossos resultados mostram que:

- A administração terapêutica do composto ftalimídico LASSBio-468 foi capaz de inibir o componente inflamatório e fibrótico associado à silicose murina, conforme atestado pela diminuição do infiltrado celular, formação de granulomas e deposição de colágeno no tecido pulmonar;
- O composto LASSBio-468 atenuou o comprometimento da função pulmonar de animais silicóticos (resistência e elastância), bem como a resposta de hiperreatividade das vias aéreas à metacolina. Verificamos também inibição pelo composto LASSBio-468 sobre a geração de quimiocinas (KC e MCP-1) e citocinas (TGF- β e TNF α) no tecido pulmonar de animais silicóticos.
- A presença de células positivas para α -SMA no pulmão de animais silicóticos foi sensível ao tratamento com o composto;
- Fibroblastos pulmonares provenientes de animais silicóticos mostraram nível de proliferação basal superior ao observado no caso de células controles, enquanto que ambas as populações celulares foram estimuladas pela citocina IL-13. O composto LASSBio-468 inibiu a resposta das primeiras células dos animais silicóticos, porém falhou no caso das células controles.
- A geração de TNF- α e IL-8 por macrófagos alveolares e células epiteliais, respectivamente, foi sensível ao tratamento com LASSBio-468;
- A talidomida apresentou perfil inibitório similar ao composto LASSBio-468 em ambos os sistemas *in vivo* e *in vitro*.

Em conjunto, nossos resultados mostram que o tratamento terapêutico com o composto LASSBio-468 foi efetivo em inibir o comprometimento da função pulmonar e a resposta fibrótica granulomatosa em camundongos silicóticos, reduzindo a deposição de material fibroso nos pulmões e modulando farmacologicamente as ações de diferentes tipos celulares, o que em conjunto sugere que o referido composto pode constituir uma ferramenta com potencial de aplicação na terapia da silicose.

7. Referências:

1. Levitzky MG. Pulmonary physiology. 2004;6th ed.
2. West JB. Fisiologia Respiratória. 2002;6ª edição.
3. Guyton A.C. HJE. Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Elsevier. 2006;11ª ed:471 - 82.
4. An SS, Fredberg JJ. Biophysical basis for airway hyperresponsiveness. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007 Jul;85(7):700-14.
5. Qutayba Hamid JSJM. Physiologic Basis of Respiratory Disease. 2005:70 - 5.
6. Manali ED, Moschos C, Triantafillidou C, Kotanidou A, Psallidas I, Karabela SP, et al. Static and dynamic mechanics of the murine lung after intratracheal bleomycin. *BMC Pulm Med.* 2011;11:33.
7. Nava S, Rubini F. Lung and chest wall mechanics in ventilated patients with end stage idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* 1999 May;54(5):390-5.
8. Kate Blease NWL, Cory H Hogaboam and Steven L Kunkel. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respiratory Research.* 2000;1:54 - 61.
9. Cookcroft D W DBE. Mechanism of airway hyperresponsiveness. *Journal of Allergy Clinical Immunology.* 2006;118:551 - 9.
10. Boulet LP LM, Turcotte H, Cartier A, Dugas M, Malo JL, M B. Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. *Chest.* 1997;112:45 - 52.
11. Chung KF, Marwick JA. Molecular mechanisms of oxidative stress in airways and lungs with reference to asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Aug;1203:85-91.
12. Castranova V, Vallyathan V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environ Health Perspect.* 2000 Aug;108 Suppl 4:675-84.
13. Terra Filho M, Santos Ude P. [Silicosis]. *J Bras Pneumol.* 2006;32 Suppl 2:S41-7.
14. Ribeiro FSN. O mapa da exposição à sílica no Brasil. UERJ, Ministério da Saúde. 2010:1 - 94.

15. Johnston CJ, Driscoll KE, Finkelstein JN, Baggs R, O'Reilly MA, Carter J, et al. Pulmonary chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica. *Toxicol Sci.* 2000 Aug;56(2):405-13.
16. Hamilton RF, Jr., Thakur SA, Holian A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2008 Apr 1;44(7):1246-58.
17. Greenberg MI, Waksman J, Curtis J. Silicosis: a review. *Dis Mon.* 2007 Aug;53(8):394-416.
18. Kauppinen T, Toikkanen J, Pedersen D, Young R, Ahrens W, Boffetta P, et al. Occupational exposure to carcinogens in the European Union. *Occup Environ Med.* 2000 Jan;57(1):10-8.
19. Kelley CRTaTR. A Brief Review of Silicosis in the United States. *Environmental Health Insights.* 2010;4:21 - 6.
20. Holanda MA, Martins MP, Felismino PH, Pinheiro VG. Silicosis in Brazilian pit diggers: relationship between dust exposure and radiologic findings. *Am J Ind Med.* 1995 Mar;27(3):367-78.
21. Antao VC, Pinheiro GA, Kavakama J, Terra-Filho M. High prevalence of silicosis among stone carvers in Brazil. *Am J Ind Med.* 2004 Feb;45(2):194-201.
22. Ding M, Chen F, Shi X, Yucesoy B, Mossman B, Vallyathan V. Diseases caused by silica: mechanisms of injury and disease development. *Int Immunopharmacol.* 2002 Feb;2(2-3):173-82.
23. Straif K, Benbrahim-Tallaa L, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *Lancet Oncol.* 2009 May;10(5):453-4.
24. Ferreira AS, Moreira VB, Ricardo HM, Coutinho R, Gabetto JM, Marchiori E. Progressive massive fibrosis in silica-exposed workers. High-resolution computed tomography findings. *J Bras Pneumol.* 2006 Nov-Dec;32(6):523-8.
25. Barboza CE, Winter DH, Seiscento M, Santos Ude P, Terra Filho M. Tuberculosis and silicosis: epidemiology, diagnosis and chemoprophylaxis. *J Bras Pneumol.* 2008 Nov;34(11):959-66.
26. Middleton EL. The Present Position of Silicosis in Industry in Britain. *Br Med J.* 1929 Sep 14;2(3584):485-9.
27. Chong S LK, Chung MJ, Han J, Kwon OJ, Kim TS. Pneumoconiosis: comparison of imaging and pathologic findings. *Radiographics.* 2006;26:59 - 77.

28. 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*. 2001 Apr;90(4):1400-6.
29. Ross J, Ehrlich RI, Hnizdo E, White N, Churchyard GJ. Excess lung function decline in gold miners following pulmonary tuberculosis. *Thorax*. 2010 Nov;65(11):1010-5.
30. Ng TP, Chan SL. Factors associated with massive fibrosis in silicosis. *Thorax*. 1991 Apr;46(4):229-32.
31. de Mesquita Junior JA, Lopes AJ, Jansen JM, de Melo PL. Using the forced oscillation technique to evaluate respiratory resistance in individuals with silicosis. *J Bras Pneumol*. 2006 May-Jun;32(3):213-20.
32. Lopes AJ, Costa W, Thomaz Mafort T, de Sa Ferreira A, Silveira de Menezes SL, Silva Guimaraes F. Silicosis in sandblasters of shipyard versus silicosis in stone carvers in Brazil: A comparison of imaging findings, lung function variables and cardiopulmonary exercise testing parameters. *Rev Port Pneumol*. 2012 Jun 18.
33. Hnizdo E S-CG. Risk of silicosis in a cohort of white South African gold miners. *American Journal of Ind Medicine*. 1993;24:447 - 57.
34. Langley RJ KR, Mishra NC, Hahn FF, Razani-Boroujerdi S, Singh SP, Benson JM, Pena-Philippides, JC BE, Sopori ML. A biphasic response to silica: Immunostimulation is restricted to the early stage of silicosis in Lewis rats. *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology*. 2004;30:823 - 9.
35. Scabilloni JF WL, Antonini JM, Roberts JR, Castranova V, Mercer RR. Matrix metalloproteinase induction in fibrosis and fibrotic nodule formation due to silica inhalation. *American Journal of Physiology and Lung Cell Molecular Physiology*. 2005;288(4):709 - 17.
36. Rimal B, Greenberg AK, Rom WN. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Curr Opin Pulm Med*. 2005 Mar;11(2):169-73.
37. Ke Q, Li J, Ding J, Ding M, Wang L, Liu B, et al. Essential role of ROS-mediated NFAT activation in TNF-alpha induction by crystalline silica exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Aug;291(2):L257-64.
38. Huaux F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2007.

39. Brown JM, Swindle EJ, Kushnir-Sukhov NM, Holian A, Metcalfe DD. Silica-directed mast cell activation is enhanced by scavenger receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Jan;36(1):43-52.
40. Huaux F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007 Apr;7(2):168-73.
41. Kumar V. AAK, Fausto N. . Tissue renewal and repair: regeneration, healing and fibrosis. *Pathological Basis of Disease.* 2005(7):87 - 118.
42. Wallace WA, Fitch PM, Simpson AJ, Howie SE. Inflammation-associated remodelling and fibrosis in the lung - a process and an end point. *Int J Exp Pathol.* 2007 Apr;88(2):103-10.
43. Zisman DA, Keane MP, Belperio JA, Strieter RM, Lynch JP, 3rd. Pulmonary fibrosis. *Methods Mol Med.* 2005;117:3-44.
44. William A.H. Wallace PMF, A. John Simpson and Sarah E.M. Howie. Inflammation-associated remodelling and fibrosis in the lung – a process and an end point. *International Journal of Experimental Pathology.* 2006.
45. Strieter RM GB, Keane MP. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation.* 2007.
46. Carlyne D. Cool SDG, Pradeep R. Rai, Peter M. Henson, J. Scott Stewart, and, Brown KK. Fibroblast Foci Are Not Discrete Sites of Lung Injury or Repair. *American Journal of respiratory and critical care medicine.* 2006.
47. Gharaee-Kermani M, Phan SH. Role of cytokines and cytokine therapy in wound healing and fibrotic diseases. *Curr Pharm Des.* 2001 Jul;7(11):1083-103.
48. Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol.* 2001 Apr;22(4):199-204.
49. Chung KF. Cytokines as targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets.* 2006 Jun;7(6):675-81.
50. Binaya Rimal AKGaWNR. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Current Opinion in Pulmonary Medicine.* 2005.
51. Hamilton RF Jr TS, Holian A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free radical biology & medicine.* 2008;44(7):1246 - 58.
52. Adamson IY, Prieditis H, Bowden DH. Instillation of chemotactic factor to silica-injected lungs lowers interstitial particle content and reduces pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 1992 Aug;141(2):319-26.

53. Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 May;157(5 Pt 1):1666-80.
54. Rao KM, Porter DW, Meighan T, Castranova V. The sources of inflammatory mediators in the lung after silica exposure. *Environ Health Perspect.* 2004 Dec;112(17):1679-86.
55. Greenberg MI WJ, Curtis J. Silicosis: a review. *Disease-a-month.* 2007;53(8):394 - 416.
56. Sheetal A, Thakur CAB, Christopher T, Migliaccio, and Andrij Holian. Critical Role of MARCO in Crystalline Silica–Induced Pulmonary Inflammation. *Toxicological Sciences.* 2009;108(2):462 - 71.
57. Ovrevik J, Refsnes M, Namork E, Becher R, Sandnes D, Schwarze PE, et al. Mechanisms of silica-induced IL-8 release from A549 cells: initial kinase-activation does not require EGFR activation or particle uptake. *Toxicology.* 2006 Oct 3;227(1-2):105-16.
58. Molock KE, Lillehoj EP. Biochemical interactions among intercellular adhesion molecules expressed by airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 May 5;343(2):513-9.
59. Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C. Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2006 Nov;3(8):726-33.
60. Legrand C, Gilles C, Zahm JM, Polette M, Buisson AC, Kaplan H, et al. Airway epithelial cell migration dynamics. MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling. *J Cell Biol.* 1999 Jul 26;146(2):517-29.
61. Coraux C, Martinella-Catusse C, Nawrocki-Raby B, Hajj R, Burlet H, Escotte S, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and interleukin-8 during regeneration of human airway epithelium in vivo. *J Pathol.* 2005 Jun;206(2):160-9.
62. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 Apr;284(4):L566-77.
63. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Oct;17(5):548-58.
64. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res.* 2005;6:56.

65. Corvol H, Flamein F, Epaud R, Clement A, Guillot L. Lung alveolar epithelium and interstitial lung disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Aug-Sep;41(8-9):1643-51.
66. McNulty RJ. Fibroblast and myofibroblast: Their source, function and role in disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007;39:666 - 71.
67. Hogan CM, Thatcher TH, Sapinoro RE, Gurell MN, Ferguson HE, Pollock SJ, et al. Electrophilic PPARgamma Ligands Attenuate IL-1beta and Silica-Induced Inflammatory Mediator Production in Human Lung Fibroblasts via a PPARgamma-Independent Mechanism. *PPAR Res.* 2011;2011:318134.
68. Gabbiani G. The biology of the myofibroblast. *Kidney Int.* 1992;41:530 - 2.
69. McNulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(4):666-71.
70. Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest.* 2002 Dec;122(6 Suppl):286S-9S.
71. Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Dec;34(12):1534-8.
72. Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol.* 2007;257:143-79.
73. Zhang HY, Phan SH. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Dec;21(6):658-65.
74. Gharaee-Kermani M, McCullumsmith RE, Charo IF, Kunkel SL, Phan SH. CC-chemokine receptor 2 required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Cytokine.* 2003 Dec 21;24(6):266-76.
75. Buckley CD. Why does chronic inflammation persist: An unexpected role for fibroblasts. *Immunol Lett.* 2011 Jul;138(1):12-4.
76. Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood.* 1991 Aug 15;78(4):1112-6.
77. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem.* 1996 Jul 26;271(30):17779-84.
78. Konrad FM, Reutershan J. CXCR2 in acute lung injury. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:740987.

79. Yucesoy B, Vallyathan V, Landsittel DP, Simeonova P, Luster MI. Cytokine polymorphisms in silicosis and other pneumoconioses. *Mol Cell Biochem.* 2002 May-Jun;234-235(1-2):219-24.
80. Jimenez LA, Drost EM, Gilmour PS, Rahman I, Antonicelli F, Ritchie H, et al. PM(10)-exposed macrophages stimulate a proinflammatory response in lung epithelial cells via TNF-alpha. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002 Feb;282(2):L237-48.
81. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004 May;18(7):816-27.
82. Bottinger EP, Letterio JJ, Roberts AB. Biology of TGF-beta in knockout and transgenic mouse models. *Kidney Int.* 1997 May;51(5):1355-60.
83. Bartram U, Speer CP. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest.* 2004 Feb;125(2):754-65.
84. Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Canonica GW, Jasmin C, Azzarone B. Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. *J Clin Invest.* 1998 May 15;101(10):2129-39.
85. Fallon PG, Richardson EJ, McKenzie GJ, McKenzie AN. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *J Immunol.* 2000 Mar 1;164(5):2585-91.
86. Brightling CE, Saha S, Hollins F. Interleukin-13: prospects for new treatments. *Clin Exp Allergy.* 2010 Jan;40(1):42-9.
87. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Kotliansky V, et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med.* 2001 Sep 17;194(6):809-21.
88. Fulkerson PC, Fischetti CA, Hassman LM, Nikolaidis NM, Rothenberg ME. Persistent effects induced by IL-13 in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 Sep;35(3):337-46.
89. Gulumian M, Borm PJ, Vallyathan V, Castranova V, Donaldson K, Nelson G, et al. Mechanistically identified suitable biomarkers of exposure, effect, and susceptibility for silicosis and coal-worker's pneumoconiosis: a comprehensive review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2006 Sep-Oct;9(5):357-95.
90. Thomas PS. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunol Cell Biol.* 2001 Apr;79(2):132-40.
91. Medzhitov R, et al. Inate Immunity. *New England Journal of Medicine.* 2000;343:338 - 44.

92. Lundblad LK, Thompson-Figueroa J, Leclair T, Sullivan MJ, Poynter ME, Irvin CG, et al. Tumor necrosis factor-alpha overexpression in lung disease: a single cause behind a complex phenotype. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jun 15;171(12):1363-70.
93. Thalayasingam N, Isaacs JD. Anti-TNF therapy. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2011 Aug;25(4):549-67.
94. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 2008 Feb;117(2):244-79.
95. Chan FK. Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine*. 2007 Feb;37(2):101-7.
96. Ermolaeva MA, Michallet MC, Papadopoulou N, Utermohlen O, Kranidioti K, Kollias G, et al. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nat Immunol*. 2008 Sep;9(9):1037-46.
97. Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*. 1998 Mar;8(3):297-303.
98. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res*. 2006;7:125.
99. Witkamp R, Monshouwer M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. *Vet Q*. 2000 Jan;22(1):11-6.
100. Ferro TJ, Hocking DC, Johnson A. Tumor necrosis factor-alpha alters pulmonary vasoreactivity via neutrophil-derived oxidants. *Am J Physiol*. 1993 Nov;265(5 Pt 1):L462-71.
101. Corda S, Laplace C, Vicaut E, Duranteau J. Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Jun;24(6):762-8.
102. Thomas PS YD, Barnes PJ. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *American Journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;152:76 - 80.
103. Thomas PS HG. Effects of inhaled tumor necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. *Thorax*. 2002;57:774 - 8.

104. Chen H TO, Van Besien CR, Panettieri RA Jr, Amrani Y. Selected contribution: TNF- α modulated murine tracheal rings responsiveness to G-protein-coupled receptor agonists and KCl. *Journal Applied Phisiology*. 2003;2003(95):864 - 72.
105. Zhang Y AM, Cardell LO. Up-regulation of bradykinin receptors in a murine in-vitro model chronic airway inflammation. *European Journal of Pharmacology*. 2004;489:117 - 26.
106. Adner M RA, Zhang Y, Sward K, Benson M, Uddman R. An assay to evaluate the long term effects of inflammatory mediators on murine airway smooth muscle: evidence that TNF- α up-regulates 5-HT(2A)-mediated contraction. *Brazilian Journal of Pharmacology*. 2002;137:971 - 82.
107. Pache JC, Christakos PG, Gannon DE, Mitchell JJ, Low RB, Leslie KO. Myofibroblasts in diffuse alveolar damage of the lung. *Mod Pathol*. 1998 Nov;11(11):1064-70.
108. Sullivan DE FM, Pociask D, Brody AR. Tumor necrosis factor alpha induces transforming growth factor-beta-1 in lung fibroblasts thought the extracellular signal-regulated kinase pathway. . *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology*. 2005;32:342 - 9.
109. Piguet PF VC. Treatment by human recombinat soluble TNF receptor of pulmonary fibrosis induced by bleomicin or silica in mice. *European Respiratory Journal*. 1994;7:515 - 8.
110. Taylor PC. Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2010 Jun;10(3):308-15.
111. Toshiaki Asano HK, Fumitaka Taki, Satoru Ito and Yoshinori Hasegawa. Thalidomide Attenuates Airway Hyperresponsiveness and Eosinophilic Inflammation in a Murine Model of Allergic Asthma. *Biol Pharm Bull*. 2010;33(6):1028 - 32.
112. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med*. 1991 Mar 1;173(3):699-703.
113. Moreira AL SE, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exterts its inhibitory action on tumor necrosis factor α by enhancing mRNA degradation. . *Journal of Experimental Medicine*. 1993;177:1675 - 80.
114. Calabrese L, Resztak K. Thalidomide revisited: pharmacology and clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*. 1998 Dec;7(12):2043-60.

115. BT C. Papel do TNF-alfa na resposta inflamatória pulmonar causada por partículas de sílica em camundongos. Dissertação de Mestrado. 2009;Rio de Janeiro (RJ)(Instituto Oswaldo Cruz. Fundação oswaldo Cruz.).
116. Lima LM, Castro P, Machado AL, Fraga CA, Lugnier C, de Moraes VL, et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues. *Bioorg Med Chem*. 2002 Sep;10(9):3067-73.
117. Alexandre-Moreira MS, Takiya CM, de Arruda LB, Pascarelli B, Gomes RN, Castro Faria Neto HC, et al. LASSBio-468: a new achiral thalidomide analogue which modulates TNF-alpha and NO production and inhibits endotoxic shock and arthritis in an animal model. *Int Immunopharmacol*. 2005 Mar;5(3):485-94.
118. HG H. Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents. *Journal of Pharmacology and Toxicology Methods*. 2007;55(1):16 - 26.
119. Cruz-Orive LM WE. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *American Journal of Physiology*. 1990;258(1):148 - 56.
120. Sakae RS LA, Dolhnikoff M, Pereira PM, do Patrocínio M, Warth TN, Zin WA, Saldiva PH, Martins MA. Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacoline. *American Journal of Physiology*. 1994;266(1):23 - 9.
121. Costantini LM, Gilberti RM, Knecht DA. The phagocytosis and toxicity of amorphous silica. *PLoS One*. 2011;6(2):e14647.
122. Joseph MC. Thalidomide and congenital abnormalities. *Dev Med Child Neurol*. 1962 Jun;4:338-9.
123. Figg WD, Dahut W, Duray P, Hamilton M, Tompkins A, Steinberg SM, et al. A randomized phase II trial of thalidomide, an angiogenesis inhibitor, in patients with androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2001 Jul;7(7):1888-93.
124. Kang MH, Ju JH, Kim HG, Kang JH, Jeon KN, Kim HC, et al. Thalidomide induced nonspecific interstitial pneumonia in patient with relapsed multiple myeloma. *Korean J Intern Med*. 2010 Dec;25(4):447-9.
125. Konstan MW, Davis PB. Pharmacological approaches for the discovery and development of new anti-inflammatory agents for the treatment of cystic fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002 Dec 5;54(11):1409-23.
126. Forastiere F, Goldsmith DF, Sperati A, Rapiti E, Miceli M, Cavariani F, et al. Silicosis and lung function decrements among female ceramic workers in Italy. *Am J Epidemiol*. 2002 Nov 1;156(9):851-6.

127. Ehrlich RI, Myers JE, te Water Naude JM, Thompson ML, Churchyard GJ. Lung function loss in relation to silica dust exposure in South African gold miners. *Occup Environ Med.* 2011 Feb;68(2):96-101.
128. Guerrin F, Voisin C. [Bronchial hyperreactivity in miners with pneumoconiosis]. *Rev Inst Hyg Mines (Hasselt).* 1980;35(2):73-84.
129. Ramsgaard L, Englert JM, Tobolewski J, Tomai L, Fattman CL, Leme AS, et al. The role of the receptor for advanced glycation end-products in a murine model of silicosis. *PLoS One.* 2010;5(3):e9604.
130. Tripathi SS, Mishra V, Shukla M, Verma M, Chaudhury BP, Kumar P, et al. IL-6 receptor-mediated lung Th2 cytokine networking in silica-induced pulmonary fibrosis. *Arch Toxicol.* 2010 Dec;84(12):947-55.
131. Arribillaga L, Dotor J, Basagoiti M, Riezu-Boj JI, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ, et al. Therapeutic effect of a peptide inhibitor of TGF-beta on pulmonary fibrosis. *Cytokine.* 2011 Mar;53(3):327-33.
132. Driscoll KE, Lindenschmidt RC, Maurer JK, Higgins JM, Ridder G. Pulmonary response to silica or titanium dioxide: inflammatory cells, alveolar macrophage-derived cytokines, and histopathology. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990 Apr;2(4):381-90.
133. Vanhee D, Gosset P, Marquette CH, Wallaert B, Lafitte JJ, Gosselin B, et al. Secretion and mRNA expression of TNF alpha and IL-6 in the lungs of pneumoconiosis patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Jul;152(1):298-306.
134. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996 Jun 27;334(26):1717-25.
135. Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007 Sep;293(3):L525-34.
136. Misson P, van den Brule S, Barbarin V, Lison D, Huaux F. Markers of macrophage differentiation in experimental silicosis. *J Leukoc Biol.* 2004 Nov;76(5):926-32.
137. Desaki M, Takizawa H, Kasama T, Kobayashi K, Morita Y, Yamamoto K. Nuclear factor-kappa b activation in silica-induced interleukin 8 production by human bronchial epithelial cells. *Cytokine.* 2000 Aug;12(8):1257-60.
138. Cox LA, Jr. An exposure-response threshold for lung diseases and lung cancer caused by crystalline silica. *Risk Anal.* 2011 Oct;31(10):1543-60.

139. Perkins TN, Shukla A, Peeters PM, Steinbacher JL, Landry CC, Lathrop SA, et al. Differences in gene expression and cytokine production by crystalline vs. amorphous silica in human lung epithelial cells. *Part Fibre Toxicol.* 2012;9(1):6.
140. Bertok S, Wilson MR, Dorr AD, Dokpesi JO, O'Dea KP, Marczin N, et al. Characterization of TNF receptor subtype expression and signaling on pulmonary endothelial cells in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011 May;300(5):L781-9.
141. Oikonomou N, Harokopos V, Zalevsky J, Valavanis C, Kotanidou A, Szymkowski DE, et al. Soluble TNF mediates the transition from pulmonary inflammation to fibrosis. *PLoS One.* 2006;1:e108.
142. Udalov S, Dumitrascu R, Pullamsetti SS, Al-tamari HM, Weissmann N, Ghofrani HA, et al. Effects of phosphodiesterase 4 inhibition on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *BMC Pulm Med.* 2010;10:26.
143. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med.* 1993 Jun 1;177(6):1675-80.
144. Majumder S, Sreedhara SR, Banerjee S, Chatterjee S. TNF alpha Signaling Beholds Thalidomide Saga: A Review of Mechanistic Role of TNF-alpha Signaling Under Thalidomide. *Curr Top Med Chem.* 2012 Jul 1;12(13):1456-67.