

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

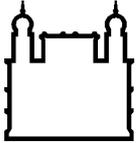
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**Participação do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF)
no processo inflamatório pulmonar induzido por sílica em
camundongos.**

Kene Dique Gallois

RIO DE JANEIRO

2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Kene Dique Gallois

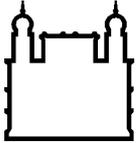
Participação do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) no processo inflamatório pulmonar induzido por sílica em camundongos.

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 Imunologia e Farmacologia.

Orientadora: Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva.

RIO DE JANEIRO

2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Kene Dique Gallois

Participação do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) no processo inflamatório pulmonar induzido por sílica em camundongos.

ORIENTADORA: Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva.

EXAMINADORES:

Dr. Dumith Chequer Bou-Habib – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

Dr. Marcelo Torres Bozza – Instituto de Microbiologia – UFRJ.

Dra. Thereza Fonseca Quírico-Santos – Instituto de Biologia – UFF.

Rio de Janeiro, 16 de março de 2009.

DEDICATÓRIA

À MINHA FAMÍLIA

Ao meu pai Emilio Caldas Gallois
À minha mãe Sandra Montano Dique Gallois.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Emilio e Sandra, pela constante preocupação com meus estudos, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, por toda a compreensão e apoio incondicionais em minhas decisões e principalmente, por vibrarem com minhas conquistas;

À minha orientadora Dra. Patrícia M. R. e Silva, que acreditou no meu potencial e contribui através de seus ensinamentos, para a ampliação de meus conhecimentos acerca da pesquisa científica. Agradeço pelo carinho, por tentar me acalmar nos momentos tensos e pelo constante apoio e elogios na fase da escrita. Sua total disponibilidade em debater os resultados obtidos foi de extrema importância na confecção desta dissertação;

Ao colaborador do projeto, Dr. Marcelo Bozza, por todas as idéias sugeridas para enriquecer o trabalho. Além do suporte fornecido com animais e anticorpos, suas conversas descontraídas sobre ciência e assuntos em geral, assim como seu entusiasmo serviram como incentivo para prosseguir e elaborar novos experimentos;

À minha ex-orientadora Dra. Thereza Quírico, por guiar meus primeiros passos nesta carreira, ensinando conceitos básicos e construindo meu pensamento científico;

À Dra Magda Serra pela leitura atenta e revisão criteriosa desta dissertação, as quais resultaram em sugestões valiosas. Seu jeito calmo e detalhista é essencial nas excelentes explicações a respeito de técnicas e esclarecimentos sobre temas da Imunologia;

Ao Dr. Dumith Bou-Habib e Dra. Claudia Benjamin por aceitarem prontamente o convite de participação na banca de defesa;

Ao Dr. Marco Aurélio Martins, por fornecer a devida infra-estrutura ao laboratório de Inflamação e permitir, a viabilização dos projetos de pesquisa;

Às minhas amigas Carol, Grazi e Tati Paula, por toda a ajuda fornecida nos experimentos, pelo espírito coletivo de madrugar em dias de Buxco e tornar o trabalho mais fácil e animado com nossas crises de risos, pelas diversas idéias de restaurantes apetitosos na hora do almoço e pelos brownies na Casa de Chá nos intervalos da Imunohistoquímica. Tenho certeza que fiz amizades sólidas e que a confiança e cumplicidade que criamos foram fundamentais para superarmos os obstáculos. E que venham outros finais de semana de diversão e descanso na casa da Tati!

À Edna Valotta, pelo enorme interesse na fase de elaboração da dissertação, pelas conversas e boas risadas no decorrer do dia;

Aos companheiros do Laboratório de Inflamação, pelo constante auxílio e suporte nas horas de trabalho. Dentre eles, gostaria de fazer um agradecimento muito especial para a nossa secretária Dadá, por todas as vezes que me emprestou sua calculadora e caneta de retroprojetor e por sua agilidade em resolver tanta coisa ao mesmo tempo com um bom humor contagiante;

Às amigas Luisa e Roberta que participaram, por um tempo, da rotina do laboratório e estiveram presentes nos momentos de descontração e alegria, incluindo passeios, viagens e nos muito bate papos madrugada adentro;

Aos meus amigos, Clarissa, Tatiana e Guilherme, que apesar de não vivenciarem o meio científico, torceram e estimularam o meu trabalho;

Ao amigo Aydamari, primeiramente por todo o incentivo e palavras positivas e que, apesar da distância territorial, se fez presente em todas as horas, demonstrando grande satisfação pela conclusão do trabalho;

Aos meus queridos amigos biólogos, Marcelle e Diego, por todos os momentos que passamos juntos desde a época da faculdade, por compartilharem momentos de alegria e dúvidas e acima de tudo, pela motivação que me deram na reta final do mestrado;

Ao Daniel Feijó, do laboratório de Inflamação & Imunidade da UFRJ, por ser prestativo nos experimentos e pela troca de informações acerca do MIF;

À Daniele, secretária da Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, por atender aos pedidos e esclarecer as diversas dúvidas que surgiram nos dois anos de mestrado;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica da FIOCRUZ, incluindo as meninas da secretaria, Sr. Antônio e Nelson do biotério, pelos favores prestados e a atenção que me deram;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

O presente trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva, no Laboratório de Inflamação do Instituto Oswaldo Cruz, na Fundação Oswaldo Cruz, com o apoio financeiro da entidade de fomento científica: CNPq.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA.....	ii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Pulmão.....	1
1.2 Pneumoconioses.....	2
1.3 Dióxido de Silício.....	2
1.4 Silicose.....	4
1.4.1 Epidemiologia.....	4
1.4.2 Formas de Manifestações Clínicas.....	6
1.4.3 Diagnóstico e Tratamento.....	7
1.4.4 Modelos Experimentais de Silicose.....	7
1.4.5 Resposta Celular na Silicose.....	8
1.4.5.1 Macrófagos Pulmonares.....	9
1.4.6 Fibrose Pulmonar.....	12
1.4.7 Mediadores Inflamatórios da Resposta Silicótica	14
1.5 Fator Inibidor da Migração de Macrófagos.....	17
1.5.1 Estrutura Gênica e Protéica.....	17
1.5.2 Expressão Celular e Distribuição Tecidual.....	17
1.5.3 Modo de Ação.....	20
1.5.4 MIF e Doenças pulmonares.....	22
1.6 Hipótese.....	23
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivos Específicos.....	24
3. METODOLOGIA.....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Protocolo de Indução de Silicose.....	25
3.3 Avaliação de Parâmetros Inflamatórios.....	25
3.3.1 Avaliação da Função Pulmonar.....	26
3.3.2 Lavado Broncoalveolar.....	27

3.3.3 Obtenção do Tecido Pulmonar.....	27
3.3.4 Análise Histológica.....	27
3.3.4.1 Desidratação.....	27
3.3.4.2 Clarificação.....	28
3.3.4.3 Inclusão.....	28
3.3.4.4 Microtomia.....	28
3.3.4.5 Coloração.....	28
3.3.5 Análise Morfométrica.....	28
3.3.6 Análise por Imunohistoquímica.....	29
3.3.7 Quantificação de Citocinas e Quimiocinas.....	30
3.3.8 Deposição de Colágeno.....	30
3.3.9 Imunoneutralização do MIF.....	30
3.3.10 Análise Estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	32
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES.....	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

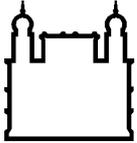
- α -SMA - “ α -Smooth-muscle Actin” ou α -Actina de Músculo Liso.
ACTH - “Adrenocorticotropic Hormone” ou Hormônio Adrenocorticotrópico.
ARDS - “Acute Respiratory Distress Syndrome” ou Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo.
ASC - “Apoptosis-associated Speck-like Protein”.
AP-1 - “Activator Protein-1” ou Proteína Ativadora 1.
BAL - “Bronchoalveolar Lavage” ou Lavado Broncoalveolar.
BSA - “Bovine Serum Albumin” ou Albumina de Soro Bovino.
cDNA - Ácido Desoxirribonucleico complementar.
CXCR - Receptor de Quimiocina.
COX-2 - “Cyclooxygenase” ou Ciclooxygenase-2.
DNA - “Deoxyribonucleic Acid” ou Ácido Desoxirribonucleico.
ECM - “Extracellular Matrix” ou Matriz Extracelular.
EDTA - “Ethylenediamine Tetraacetic Acid” ou Ácido Etilenodiamino Tetra-acético.
ELISA - “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” ou Ensaio Imunoenzimático.
ERK - “Extracellular Signal-Regulated Kinase” ou Quinase Regulada por Sinal Extracelular.
FasL - “Fas-ligand” ou Fas ligante.
GR - “Glucocorticoid Receptor” ou Receptor de Glicocorticóide.
GRE - “Glucocorticoid Response Element” ou Elementos de Resposta aos Glicocorticóides.
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio.
H₂SO₄ - Ácido Sulfúrico.
H&E - Hematoxilina-Eosina.
HPA - “Hypothalamic-Pituitary-Adrenal” ou Hipotálamo-Pituitária-Adrenal.
IARC - “International Agency for Research on Cancer” ou Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer.
I κ B - “Inhibitor of NF- κ B” ou Inibidor de NF- κ B.
IFN- γ - Interferon – γ .
IgG - “Immunoglobulin G” ou Imunoglobulina G.
IL-1 β - “Interleukin -1 β ” ou Interleucina -1 β .
IL-8 - “Interleukin - 8” ou Interleucina - 8.
JAB1 - “Jun activation domain-binding protein-1”.
LPS - “Lipopolysaccharide” ou Lipopolissacarídeo.
MAPK - “Mitogen-activated Protein Kinase” ou Proteína-Quinase Ativada por Mitógeno.
MHC - “Major Histocompatibility Complex” ou Complexo Principal de Histocompatibilidade.
MIF - “Macrophage Migration Inhibitory Factor” ou Fator Inibidor da Migração de Macrófagos.
MIP - “Macrophage Inflammatory Protein” ou Proteína Inflamatória de Macrófagos.
MMAD - “Mass Median Aerodynamic Diameter” ou Massa Média de Diâmetro Aerodinâmico.
MMP - “Matrix Metaloproteinase” ou Metaloproteinase de Matriz.
Nalp3 - “Pyrin domain-containing Protein 3”.
NF- κ B - “Nuclear Factor-kappa B” ou Fator de Transcrição Nuclear- kappa B.
NLR - “Nod-like receptor” ou Receptor Nod-like.
O₂⁻ - Ânion Superóxido.
OH - Radical Hidroxila.
PBS - “Phosphate Buffered Saline” ou Salina Fosfatada Tamponada.

PGE₂ - “Prostaglandin E₂” ou Prostaglandina E₂.
PLA₂ - “Phospholipase A₂” ou Fosfolipase A₂ Citosólica.
RNS - “Reactive Nitrogen Species” ou Espécies Reativas de Nitrogênio.
ROS - “Reactive Oxygen Species” ou Espécies Reativas de Oxigênio.
SiO₂ - Dióxido de Silício.
SOD - “Superoxide Dismutase” Superóxido Dismutase.
p53 - Gene Supressor Tumoral.
PS - Proteína Surfactante.
TIMP - “Tissue Inhibitor of Metalloproteinase” ou Inibidor Tecidual de Metaloproteinase.
TGF - “Transforming Growth Factor” ou Fator Transformador de Crescimento.
TLR - “Toll-like Receptor” ou Receptor Toll-like.
TNF - “Tumor Necrosis Factor” ou Fator de Necrose Tumoral.
WT - “Wild Type” ou Selvagem.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Ilustração da árvore respiratória após inalação de partículas de sílica.....	9
Figura 1.2: Esquema de internalização das partículas de sílica.....	12
Figura 1.3: Sítios de expressão do MIF.....	19
Figura 1.4: Modo de Ação do MIF.....	22
Figura 3.1: Esquema do modelo não-invasivo de silicose murina.....	26
Figura 3.2: Imagem do retículo utilizado para análise morfométrica.....	29
Figura 3.3: Esquema do protocolo referente ao tratamento com o anti-soro neutralizante para o MIF.....	31
Figura 4.1: Análise da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de camundongos WT e MIF ^{-/-} frente à aerolização de metacolina.....	33
Figura 4.2: Leucócitos no lavado broncoalveolar de camundongos WT e MIF ^{-/-} , 7 e 28 dias após instilação intranasal de sílica.....	35
Figura 4.3: Avaliação morfológica de cortes histológicos do pulmão de camundongos WT e MIF ^{-/-} , 7 dias após instilação intranasal de salina ou sílica.....	38
Figura 4.4: Avaliação morfológica de cortes histológicos do pulmão de camundongos WT e MIF ^{-/-} , 28 dias após instilação intranasal de salina ou sílica.....	39
Figura 4.5: Avaliação da deposição de fibras colágenas no tecido pulmonar de camundongos WT e MIF ^{-/-} , 7 dias após instilação intranasal de salina ou sílica.....	40
Figura 4.6: Avaliação da deposição de fibras colágenas no tecido pulmonar de camundongos WT e MIF ^{-/-} , 28 dias após instilação intranasal de salina ou sílica.....	41
Figura 4.7: Geração de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar de camundongos WT e MIF ^{-/-} , 7 dias após instilação intranasal de salina ou sílica.....	43
Figura 4.8: Geração de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar de camundongos WT e MIF ^{-/-} , 28 dias após instilação intranasal de salina ou sílica.....	44
Figura 4.9: Avaliação da expressão de F4/80 em cortes histológicos do pulmão de camundongos WT e MIF ^{-/-} , 7 dias após instilação intranasal de salina ou sílica.....	46

Figura 4.10: Avaliação da expressão de F4/80 em cortes histológicos do pulmão de camundongos WT e MIF ^{-/-} , 28 dias após instilação intranasal de salina ou sílica.....	47
Figura 4.11: Avaliação da expressão de α -SMA em cortes histológicos do pulmão de camundongos WT e MIF ^{-/-} , 7 dias após instilação intranasal de salina ou sílica.....	49
Figura 4.12: Avaliação da expressão de α -SMA em cortes histológicos do pulmão de camundongos WT e MIF ^{-/-} , 28 dias após instilação intranasal de salina ou sílica.....	50
Figura 4.13: Efeito do tratamento com anticorpo anti-MIF sobre a função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas frente à aerolização de metacolina.....	52
Figura 4.14: Efeito do tratamento com anticorpo anti-MIF sobre as alterações morfológicas no pulmão, 7 dias após instilação intranasal de salina ou sílica.....	54



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

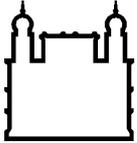
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Participação do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) no processo inflamatório pulmonar induzido por sílica em camundongos.

RESUMO

A silicose é a pneumoconiose de maior prevalência no Brasil e resulta da exposição às partículas de sílica cristalina, sendo caracterizada por infiltrado inflamatório, deposição de colágeno e formação de granulomas, em um contexto dependente de uma gama de mediadores. O fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) é uma citocina pró-inflamatória atuante em diferentes tipos de patologias, sendo importante em respostas imunes e nos mecanismos decorrentes do dano tecidual. Neste trabalho, investigamos a participação do MIF no modelo experimental de silicose murina. Camundongos “wild-type” (BALB/c) e MIF “knockout” (MIF^{-/-}) foram submetidos à instilação intranasal com 10 mg de sílica, sendo as análises realizadas 7 (fase aguda) e 28 dias (fase crônica) pós-sílica. Verificamos a existência de um aumento significativo no número de leucócitos totais no lavado broncoalveolar de camundongos silicóticos em 7 dias. O mesmo perfil foi observado no caso de células mononucleares e neutrófilos, enquanto que o número destes últimos permaneceu elevado por pelo menos 28 dias. A análise tecidual revelou a presença de um intenso infiltrado de células inflamatórias 7 dias pós-sílica, seguido de progressão da resposta fibrótica com formação de granulomas peribronquiolares em 28 dias. Vimos, também, que os camundongos silicóticos exibiram um aumento na deposição de colágeno nos pulmões, quando comparados aos controles, juntamente com elevação significativa nos níveis das quimiocinas MIP-1 α e MIP-2 e das citocinas fibrogênicas TNF- α e TGF- β , em ambos os tempos analisados. Esse fenômeno apresentou correlação direta com o quadro de comprometimento da função pulmonar (aumento de resistência e elastância) e de hiperreatividade das vias aéreas ao agente broncoconstrictor metacolina. Os camundongos MIF^{-/-} sílica apresentaram, ainda, na fase aguda, redução nos níveis de MIP-1 α e MIP-2, em paralelo a um menor infiltrado leucocitário, expressão diminuída do marcador F4/80 e de menor proporção dos granulomas, acompanhado por redução da resposta de hiperreatividade das vias aéreas. Em contraste, foi verificado processo exacerbado de granulomas no pulmão dos camundongos sílica MIF^{-/-} 28 dias pós-sílica, através da detecção de marcado aumento na área tecidual ocupada por granulomas, menor deposição de colágeno e níveis elevados de TNF- α e TGF- β , quando comparados aos camundongos “wild-type”. Além disso, foi detectada, na fase crônica da doença, uma expressão elevada de α -SMA no pulmão de camundongos sílica MIF^{-/-}, refletindo a presença de miofibroblastos. Observamos, ainda, que camundongos silicóticos tratados com anticorpo neutralizante anti-MIF apresentaram comprometimento da função pulmonar e alterações morfológicas no tecido pulmonar reduzidos, indicando a participação do MIF como mediador pró-inflamatório de fase aguda da silicose. Em conclusão, nossos resultados indicam que o MIF coloca-se como um mediador atuante na modulação do quadro silicótico, constituindo um potencial alvo para intervenção terapêutica no caso da doença humana.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Participação do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) no processo inflamatório pulmonar induzido por sílica em camundongos.

ABSTRACT

Silicosis is the pneumoconiosis of highest prevalence in Brazil and is caused by the inhalation of crystalline silica particles, being characterized by inflammation, collagen deposition and granuloma formation, in a way dependent on a wide range of mediators. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a proinflammatory cytokine postulated to participate in several inflammatory diseases and in immune responses. This study was undertaken in order to investigate the potential role of MIF in a model of experimental silicosis in mice. Wild-type (BALB/c) and MIF knockout (MIF^{-/-}) mice were injected intranasally with 10mg of silica, and the analyses made on day 7 (acute phase) and 28 (chronic phase). We showed that there is an increase in the number of total leukocytes in the bronchoalveolar lavage of silica-exposed mice, on day 7 after silicosis induction. A similar profile was noted in the case of mononuclear cells and neutrophil, under conditions where the latter remained elevated for at least 28 days. Tissue analyses revealed that there is a marked inflammatory cell infiltration on day 7, followed by fibrotic response progression with peribronchiolar granuloma formation on day 28. We also noted that silicotic mice exhibited an increase in the collagen deposition and a marked increase in the levels of MIP-1 α and MIP-2 in the lung tissue, in parallel to an increase in the levels of fibrogenic cytokines TNF- α e TGF- β at both time-points analyzed. These phenomena directly correlated with the reduced in the pulmonary function (increased resistance and elastance) and the airways hyperreactivity to methacholine. At the acute phase, MIF^{-/-} silicotic mice showed suppression of lung function reduction and airway hyperreactivity to methacholine. They also exhibited less leukocyte infiltration, lower levels of MIP-1 α and MIP-2 and F4/80 expression and granuloma area. In contrast, at the chronic phase, a marked increased in granuloma tissue area was detected MIF^{-/-} silicotic mice, as compared to WT mice, together with lower collagen deposition and higher levels of TNF- α and TGF- β . An increase in the expression of α -SMA in the lungs of MIF^{-/-} silicotic mice was also noted. When silicotic mice were treated with anti-MIF antibody significant inhibition of the reduced pulmonary function and tissue damage were noted, indicating a role for MIF as a proinflammatory mediator in silicosis. In conclusion, our results clearly show that MIF seems to play a relevant modulatory role in the physiopathology of silicosis and could be considered as a potential therapeutic target in human disease.

1. Introdução

1.1 Pulmão

Um diversificado conjunto de patologias acomete o trato respiratório ocasionando o aparecimento de uma resposta inflamatória pulmonar aguda, a qual é seguida em tempos mais tardios, pelo desencadeamento de um processo fisiológico de reparo, conhecido como remodelamento tecidual. Em conjunto, esses eventos levam a uma progressiva alteração da arquitetura das vias aéreas, reduzindo o processo de trocas gasosas e conseqüente perda funcional do órgão (Caramori and Adcock, 2003, Rimal *et al.*, 2005).

As respostas do trato respiratório à agressão e os padrões resultantes de doenças são determinados, principalmente, pela complexidade estrutural e funcional do sistema. O pulmão é um órgão que apresenta contato permanente com o meio externo, e dessa maneira, a maioria das doenças é causada por agentes potencialmente lesivos que chegam com o ar inspirado, como microorganismos, partículas tóxicas e gases do ar ambiental. Apesar da constante aspiração diária de secreções orofaríngeas, a árvore respiratória é dotada de um apurado sistema de detoxicação e defesa que incluem barreiras anatômicas e mecânicas, atividade humoral, função imune celular e atividade fagocítica.

O pulmão é um órgão que atua de forma efetiva no fenômeno vital de trocas gasosas. Seu sistema de condução representado pela árvore respiratória consiste na traquéia, que se ramifica em dois tubos denominados brônquios (brônquio direito e esquerdo) e estes, subdividem-se em vias aéreas menores à medida que penetram no pulmão, constituindo os bronquíolos e terminando em uma estrutura sacular conhecida como alvéolo, sítio para a realização da função primordial de trocas gasosas (Kobzik *et al.*, 1999). As paredes alveolares não são sólidas, isto é, são constituídas por poros (poros de Kohn), e dessa maneira, encontram-se freqüentemente susceptíveis a respostas de natureza inflamatória.

As disfunções pulmonares podem ser classificadas em termos de sua topologia, etiologia ou de acordo com o distúrbio fisiopatológico por elas desencadeado. Doenças respiratórias que acometem as trocas gasosas podem ser divididas principalmente em obstrutivas e restritivas, sendo as primeiras caracterizadas pela redução do fluxo aéreo, causada pelo estreitamento ou obstrução das vias aéreas e exemplificada pela asma; e as

últimas que afetam a capacidade pulmonar pelo limite na expansibilidade, como observado nas pneumoconioses (Gillissen *et al.*, 2006).

1.2 Pneumoconioses

O termo pneumoconiose deriva do grego *pneumon*, que significa pulmão, e *conion*, que significa poeira, e foi proposto por Zenker em 1866, para designar um grupo de doenças que se originam de exposição às poeiras minerais. Em 1971, esse termo foi redefinido como sendo "o acúmulo de poeiras nos pulmões e a reação tecidual à sua presença" e define como poeira, um aerossol composto de partículas sólidas (Saúde, 1997).

As pneumoconioses podem ser classificadas em fibrogênicas e não-fibrogênicas de acordo com a toxicologia específica dos agentes inalados e do grau de comprometimento estrutural e funcional da lesão pulmonar. As pneumoconioses fibrogênicas como o termo sugere, englobam as reações pulmonares à inalação de material particulado (como por exemplo, partículas de sílica) que acarretam processo de fibrose intersticial do parênquima pulmonar.

A característica comum deste grupo de doença é a restrição funcional (patologia pulmonar restritiva), com conseqüente diminuição da expansibilidade do parênquima pulmonar, interferindo no curso dinâmico das trocas gasosas no pulmão.

1.3 Dióxido de Silício

O termo sílica refere-se ao composto químico de dióxido de silício, SiO_2 , presente nas formas cristalina e amorfa, sendo a primeira de maior importância no contexto ocupacional, já que a forma amorfa é considerada praticamente atóxica para os pulmões (Balaan *et al.*, 1993).

O dióxido de silício é um composto binário formado por oxigênio e silício, sendo esses dois elementos os mais abundantes na crosta da Terra (constituindo em cerca de 60% do seu peso total). Na sílica cristalina, esses elementos encontram-se agrupados dentro de um padrão regular que abrange todo o cristal, formando uma rede de tetraedros, cujo centro é ocupado pelo silício e os vértices por átomos de oxigênio. Os três arranjos estruturais mais importantes da sílica cristalina, sob o ponto de vista da saúde ocupacional são o quartzo, a tridimita e a cristobalita, que são chamadas de sílica livre ou sílica não combinada para distingui-las dos demais silicatos. Essas três formas diferem em suas distribuições atômicas, embora apresentem as mesmas composições químicas. O quartzo, mineral de natureza dura encontrado em rochas sedimentares e componente principal da areia, é a forma

termodinamicamente estável da sílica cristalina, já que os outros arranjos são formados sob condições de alta temperatura. Pela sua abundância e por ser proveniente de várias eras geológicas, a sílica é o principal constituinte dos materiais de construção, além de apresentar numerosas aplicações especializadas. Dessa forma, os trabalhadores podem ser expostos à sílica cristalina em uma grande variedade de atividades que incluem:

- Escavação de poços
- Fabricação de material abrasivo
- Indústria Extrativista (mineração e perfuração de rochas)
- Jateamento de areia
- Indústria de Transformação: cerâmicas
- Produção e uso de tijolos refratários

Na sua forma amorfa, a sílica é utilizada basicamente como dessecante, conhecida como sílica gel. Alguns estudos sugerem que poeiras contendo sílica livre cristalina, geradas recentemente, como em operações envolvendo jateamento de areia e perfuração de rochas, possuem maior toxicidade para as células do pulmão, quando comparadas com poeiras geradas há mais tempo (Castranova *et al.*, 1996, Fubini *et al.*, 2001). Isso se deve principalmente, a geração de radicais livres na superfície da poeira, sendo formados radicais de oxigênio livre como o ânion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxilas (OH^-), altamente reativos na presença de metais. Dessa maneira, as características de clivagem e as propriedades de superfície da sílica podem influenciar sua atividade biológica nos organismos.

A deposição das partículas de sílica no pulmão depende de suas características aerodinâmicas, como tamanho e massa. Enquanto as partículas com tamanho maior que 10 μm de massa média de diâmetro aerodinâmico (MMAD) ficam retidas na cavidade nasal, as partículas entre 5 a 10 μm se depositam nos brônquios e bronquíolos. As partículas menores, variando entre 0,5 – 5 μm penetram nos bronquíolos terminais e nos alvéolos, provocando progressiva falência respiratória. No pulmão humano, tem sido verificado que as partículas de sílica retidas apresentam diâmetros entre 0,5 – 0,7 μm .

Em 1994, Parkes descreveu a associação entre o carcinoma broncogênico e pacientes com silicose. A Organização Mundial de Saúde afirmou que não há risco de câncer de pulmão em exposições ocupacionais até $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (OMS, 1986). No entanto, o parecer publicado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer da OMS - “International Agency for Research on Cancer” (IARC, 1997) relata haver evidências suficientes em humanos e em animais de experimentação de que a sílica cristalina inalada na forma de quartzo ou cristobalita, provenientes de fontes ocupacionais, é carcinogênica, sendo classificada como substância do grupo 1.

1.4 Silicose

Pneumoconiose de maior prevalência no Brasil, a silicose é uma doença do parênquima pulmonar causada pela inalação de poeiras contendo partículas de sílica cristalina. É conhecida desde a época da Antiguidade, em civilizações como Grécia, Roma e Egito, onde se destacavam atividades como a mineração e produção de pedras decorativas e logo no período do Renascimento foram adotadas as primeiras medidas preventivas, como por exemplo, o uso de máscaras de proteção (Fujimura, 2000). Após a Revolução Industrial (século XVIII), período de intensa transformação de recursos naturais e mecanização dos sistemas de produção, o índice de expressão de silicose aumentou de forma significativa, afetando principalmente países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

Em geral, a silicose é diagnosticada por radiografia de tórax simples, revelando a presença de nódulos nas regiões superiores dos pulmões. Uma vez exposto à sílica, o paciente apresenta progressão contínua e irreversível da doença, acarretando insuficiência respiratória crônica, decorrente da alteração na ventilação pulmonar, o que torna um fator limitante para as atividades cotidianas (Godleski, 1994). São estabelecidas crescentes regulamentações e normas de segurança quanto ao limite de exposição ocupacional à sílica (Chen *et al.*, 2001, Greaves, 2000), visto que a ocorrência da silicose depende de fatores como: a susceptibilidade individual, o tamanho das partículas, o tempo de exposição (volume/minuto) e a concentração de sílica livre respirável.

1.4.1 Epidemiologia

A silicose representa um sério problema de saúde pública, uma vez que, apesar da crescente conscientização de empresas e trabalhadores e aplicação de medidas de controle à exposição de poeiras, dados epidemiológicos mostram que os índices de incidência e

prevalência continuam altos, principalmente em países com condições de trabalho precárias, o que leva a um risco maior de manifestação/ocorrência.

No Vietnã, a silicose é considerada uma das doenças ocupacionais mais prevalentes, sendo também uma das maiores causas de concessão de benefícios previdenciários aos trabalhadores (90%). Dados recentes mostram que o número de casos acumulados até o momento é de aproximadamente 9.000. Na China, em 1990, houve o registro de aproximadamente 360.000 casos de pneumoconioses. Durante o período de 1991-1995, documentou-se mais de 500.000 casos de silicose, com quase 6.000 casos novos ocorrendo a cada ano e mais de 24.000 mortes por ano, a maior parte entre trabalhadores idosos. Na Índia, uma prevalência de silicose de 55% foi encontrada entre os trabalhadores, muitos deles jovens, trabalhando em pedreiras de rochas sedimentárias de xisto em locais pequenos e mal ventilados. Estudos na Malásia mostram uma prevalência de silicose de 25% em trabalhadores em pedreiras e de 36% em trabalhadores de lápides funerárias.

Nos EUA, o “National Institute for Occupational Safety and Health” (NIOSH, 1974) estimava em 1.200.000 o número de trabalhadores expostos a poeiras de sílica-livre, e dados recentes sugerem ainda que mais de um milhão de trabalhadores seja ocupacionalmente exposto e cerca de 100.000 desses, correm o risco de desenvolver silicose. Na África do Sul, a mineração subterrânea do ouro emprega cerca de 350.000 pessoas, com estudos mostrando prevalências de silicose de 12,8 a 31%.

Na América Latina, notadamente nos países de expressiva atividade extrativa mineral, a silicose constitui-se como problema de saúde pública de graves dimensões. Nos países Peru, Chile e Bolívia, eram conhecidos em 1967, mais de 4.500 casos.

Não existem estudos publicados que permitam quantificar a situação real dos ambientes de trabalho no Brasil, no que se refere à exposição à sílica. Em 1978, verificou-se a existência de aproximadamente 30.000 portadores de silicose. No período de 1999 e 2000, foi realizado um estudo de exposição à sílica segundo as atividades econômicas, onde a maior prevalência de ocorrência foi observada na construção civil com 62% de expostos (Ribeiro, 2003). Uma publicação mais recente estimou em cerca de seis milhões o número de trabalhadores potencialmente expostos às poeiras contendo sílica em todo o país, sendo cerca de 4 milhões na construção civil, 500.000 em mineração e garimpo e acima de 2 milhões em indústrias de transformação de minerais, metalurgia, química, de borracha, cerâmicas e

vidros. Dados nacionais sugerem ser Minas Gerais o Estado com maior número de casos de silicose, a maior parte proveniente da mineração de ouro (Ribeiro, 2003).

1.4.2 Formas de Manifestações Clínicas

Classicamente, existem três formas clínicas distintas da doença, com diferentes expressões radiológicas e histopatológicas: crônica, acelerada e aguda.

A silicose crônica é a apresentação mais comum da doença. Ocorre geralmente após mais de dez a quinze anos de exposição a níveis relativamente baixos de poeira. Inicialmente apresenta-se de maneira assintomática, podendo evoluir com quadros de dispnéia progressiva. Através do exame de imagem detecta-se, nos estágios iniciais, infiltrado nodular bilateral, com predomínio nas zonas pulmonares superiores. Com a evolução da doença, pode ocorrer coalescência dos nódulos, formando conglomerados maiores em uma condição denominada fibrose maciça progressiva. Na tomografia estão presentes micronódulos subpleurais com distribuição nos lobos superiores e aumento dos linfonodos. A alteração morfológica típica é o nódulo silicótico encontrado no interstício pulmonar, ao redor de bronquíolos e dos vasos. É caracterizado por uma estrutura central acelular formada por tecido fibroso hialino, circundado por fibras colágenas, infiltrado linfocitário e por macrófagos. Através da microscopia de luz é possível observar as partículas de sílica birrefringentes, mais frequentes na periferia do nódulo, com distribuição difusa no interstício ou no interior de macrófagos. Essa forma de silicose pode ser evidenciada em trabalhadores das indústrias de cerâmica e abrasivos no Brasil.

A forma de silicose acelerada constitui exposição à sílica, após um período médio de cinco anos. As manifestações clínicas e por imagem são semelhantes às observadas na forma crônica da doença, porém em estágios mais iniciais de desenvolvimento. As alterações patológicas são caracterizadas por presença de granulomas ou nódulos silicóticos e pode facilmente evoluir para a forma mais complicada da doença. É o caso da silicose observada em cavadores de poços.

A forma aguda, mais rara, ocorre geralmente após meses ou poucos anos de exposição elevada às partículas de sílica, finamente divididas e recém-clivadas, a exemplo do que ocorre no jateamento de areia e moagem de pedras. Esse tipo de manifestação normalmente evolui de forma rápida, levando ao óbito. Os sintomas incluem: dispnéia, perda de peso e astenia, com achados radiológicos constituídos de infiltrado alveolar bilateral de distribuição difusa e, na

tomografia, espessamento septal liso nas áreas afetadas. As alterações patológicas são: lesão de células epiteliais tipo I (pneumócitos tipo I), presença de exsudado constituído por material lipoproteínico na luz alveolar e proliferação de células epiteliais tipo II (pneumócitos tipo II). Pode ocorrer presença de fibrose, entretanto, esta não é de grande intensidade podendo ou não evidenciar a presença de granulomas (Webb *et al.*, 1993).

1.4.3 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da silicose baseia-se não só no histórico ocupacional do paciente, como nos hábitos de uso de equipamentos de proteção no local de trabalho, nos achados de radiografia de tórax e, finalmente, de acordo com testes de função pulmonar. São de grande valia o levantamento rigoroso sobre profissão, ramo industrial e atividade específica detalhada, quando se trata de avaliar doenças respiratórias ambientais e ocupacionais. Com o advento da tomografia computadorizada tornou-se possível a identificação de alterações mais precoces para diagnóstico (Antao *et al.*, 2004, Gamsu and Aberle, 1995).

Até o momento não há um tratamento efetivo para a silicose e sim, a aplicação de medidas paliativas como o uso de glicocorticóides e a lavagem broncoalveolar como método para remoção de partículas do pulmão. Contudo, esse último procedimento não apresenta particular relevância, já que as partículas que se encontram no interstício pulmonar são pouco alcançáveis.

1.4.4 Modelos Experimentais de Silicose

Alguns modelos foram descritos no intuito de induzir silicose em animais de forma a reproduzir a seqüência de eventos da silicose humana. A rigor, um modelo ideal de silicose deve preencher certos requisitos, como ter características histológicas semelhantes às observadas na patologia humana, ser de fácil indução, boa reprodutibilidade, ter confiabilidade quanto à incidência e avaliação da gravidade das alterações, responder a agentes terapêuticos de forma semelhante à clínica e acima de tudo, ter parâmetros de alterações imunológicas e de atividades mensuráveis.

Os modelos animais de silicose têm sido cada vez mais explorados com a finalidade de melhor compreender os mecanismos celulares e moleculares disparados na doença.

1.4.5 Resposta Celular na Silicose

Uma vez inaladas, as partículas de sílica penetram nas vias aéreas e são encontradas no espaço alveolar e no parênquima pulmonar. Para que se desenvolva um processo inflamatório característico de uma pneumoconiose, o material particulado inalado deve atingir as vias aéreas inferiores de modo a superar os mecanismos de depuração constituintes do sistema de filtração pulmonar: o transporte mucociliar e a drenagem linfática. O primeiro é predominantemente realizado pelo sistema mucociliar ascendente, a partir dos bronquíolos terminais, enquanto que o sistema linfático recebe as partículas livres, sendo responsável por parte do transporte pulmonar.

Inicialmente, no espaço alveolar, as partículas de sílica induzem por contato direto de sua superfície com a água e lipoproteínas da camada de revestimento bronquioalveolar, a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), conhecidas como radicais livres. No organismo, existe um sistema de defesa antioxidante, formado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase, catalase e transferrina. Caso ocorra a geração de radicais livres em quantidade suficiente para superar os mecanismos de defesa antioxidante, pode ocorrer lesão de células epiteliais tipo I e indução da proliferação de células epiteliais tipo II, caracterizando o processo de alveolite (Figura 1.1). As células epiteliais são responsáveis pelo revestimento de diferentes locais do organismo, dentre eles, a árvore respiratória, participando de forma ativa no processo de trocas gasosas e neste sentido, são importantes para o estabelecimento do quadro inflamatório.

A inalação de sílica está associada ao aumento de proteínas surfactantes (PS) no pulmão (Rehn *et al.*, 2003, Seiler *et al.*, 2001) a partir de células epiteliais tipo II, com a finalidade de promover um mecanismo protetor, no qual a partícula de sílica é recoberta antes do contato com células fagocíticas, na tentativa de neutralizar a sua toxicidade (Patzold *et al.*, 1993, Schimmelpfeng *et al.*, 1992) (Figura 1.1).

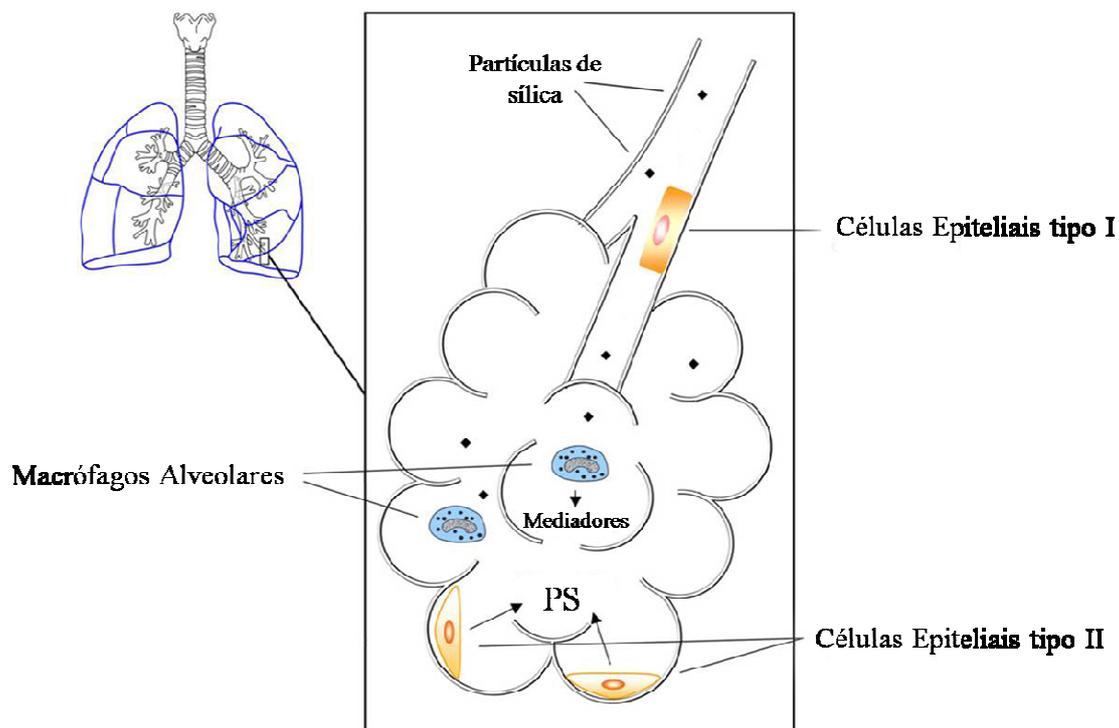


Figura 1.1: Ilustração da árvore respiratória após inalação de partículas de sílica. No espaço alveolar interno, localizam-se macrófagos alveolares e células epiteliais tipo I e tipo II, sendo as últimas responsáveis pela produção de proteína surfactante (PS). Adaptado de Hamilton *et al.*, 2008.

1.4.5.1 Macrófagos Pulmonares

Os macrófagos pulmonares têm um papel importante na defesa inespecífica do hospedeiro assim como nas respostas imunes específicas do pulmão, mediante suas funções fagocítica e secretora. Duas subpopulações de macrófagos estão localizadas em compartimentos anatômicos diferentes, os macrófagos intersticiais e alveolares, situados respectivamente no tecido conjuntivo pulmonar e nos espaços aéreos (Crowell *et al.*, 1992). Os macrófagos intersticiais estão em contato direto com a matriz extracelular e com outros componentes do tecido conjuntivo. Por outro lado, os macrófagos alveolares são células residentes dos alvéolos pulmonares, e recebem a denominação de células de alarme, sendo responsáveis pelo o início da mobilização de neutrófilos da microcirculação para a região com injúria e desencadeamento de outros eventos inflamatórios, como edema e dor (Ferreira,

1980). A maioria dos macrófagos residentes deriva de monócitos circulantes, os quais são provenientes da divisão de células precursoras, os monoblastos, na medula óssea. Quando os monócitos deixam o sangue e migram para os tecidos, recebem a denominação de macrófagos. (Naito, 2008).

Os macrófagos alveolares são o tipo celular evidente no que se refere aos mecanismos celulares envolvidos no reconhecimento das partículas de sílica. Ocupam uma posição de defesa primária no pulmão, visto que, exibem grande atividade funcional relativa à inflamação e defesa antimicrobiana. Estudos sugerem a interação com receptores de superfície presentes nessas células, receptores denominados “scavenger” (Hamilton *et al.*, 2006, Palecanda *et al.*, 1999), como passo inicial no reconhecimento das partículas de sílica. São conhecidas oito classes desses receptores, designadas por letras (A a H) e recebendo destaque na patologia da silicose, o receptor MARCO, constituinte da classe A (Palecanda and Kobzik, 2001). Evidências na literatura atribuem sua ligação às partículas ambientais inaladas não-opsonizadas, através de seu domínio semelhante ao colágeno dotado de carga positiva, o que possibilitaria a interação com partículas de carga negativa, como a sílica (Iyer *et al.*, 1996). A partir do contato via receptor “scavenger”, o processo de fagocitose mediado por macrófagos alveolares é iniciado imediatamente. A partícula de sílica é então, internalizada e mantida no compartimento lisossomal sob condições de pH reduzidas, propiciando a ativação de enzimas digestivas na tentativa de degradar o material ali presente ou caso contrário, os macrófagos alveolares tornam-se ativados apresentando função altamente secretora, liberando diferentes mediadores inflamatórios a partir de transcrição gênica (Barbarin *et al.*, 2005). Participam, também, da liberação de radicais livres, assim como, são ativados pelos mesmos (Blackford *et al.*, 1994, Castranova and Vallyathan, 2000) (Figura 1.2). Espécies reativas de oxigênio apresentam ação deletéria sobre constituintes celulares, em um fenômeno conhecido como estresse oxidativo, ocasionando peroxidação lipídica e desnaturação protéica (Daniel *et al.*, 1995, Shi *et al.*, 1994).

Muitos estudos buscam entender a interação da partícula de sílica com o tipo celular chave na silicose, o macrófago. Sabe-se que o processo de degradação de sílica por essas células, acarreta a ativação de proteases (caspases 3 e 9) e apoptose (Thibodeau *et al.*, 2004) (Figura 1.2). A apoptose é uma forma distinta de morte celular, denominada de morte celular programada, sendo caracterizada por condensação de cromatina e fragmentação do DNA. Mecanismos celulares a respeito da indução de apoptose por sílica têm dado ênfase no papel de interações Fas/Fas-L (Fas ligante), bem descritos em patologias inflamatórias pulmonares

(Neff *et al.*, 2005). A proteína Fas está presente em várias células, promove interação a partir de seu domínio extracelular com outra proteína, Fas ligante, presente na membrana de linfócitos T citotóxicos. Essa interação permite a ativação da cascata de caspases, culminando em apoptose celular. Borges *et al.* (2001) notaram que camundongos deficientes de Fas-L apresentavam diminuição do influxo de neutrófilos e por sua vez, da inflamação pulmonar. A relevância biológica da apoptose induzida por sílica na resolução da injúria pulmonar relaciona-se com a eliminação de células envolvidas no dano tecidual, de modo a promover a manutenção da homeostase pulmonar (Shen *et al.*, 2001).

Todavia, dependendo das características de superfície das partículas de sílica, o processo de apoptose promove liberação destas a partir de células fagocíticas, induzindo o recrutamento de mais macrófagos para o local de injúria, em um ciclo de ingestão/reingestão de sílica, e de outras células do sistema imunológico, como os neutrófilos e linfócitos (Rimal *et al.*, 2005). Esse cenário contribui para a proliferação de fibroblastos, acarretando perda da integridade da barreira epitelial, e por sua vez, intersticialização das partículas, ampliando assim, a resposta inflamatória no interstício. Apesar do processo de injúria ser majoritariamente desencadeado devido às propriedades de superfície das partículas de sílica, o influxo de células inflamatórias também contribui para a resposta inflamatória (Albrecht *et al.*, 2005). Como resultado final, há um aumento descontrolado da proliferação de fibroblastos e da produção de colágeno caracterizando o processo tardio de fibrose.

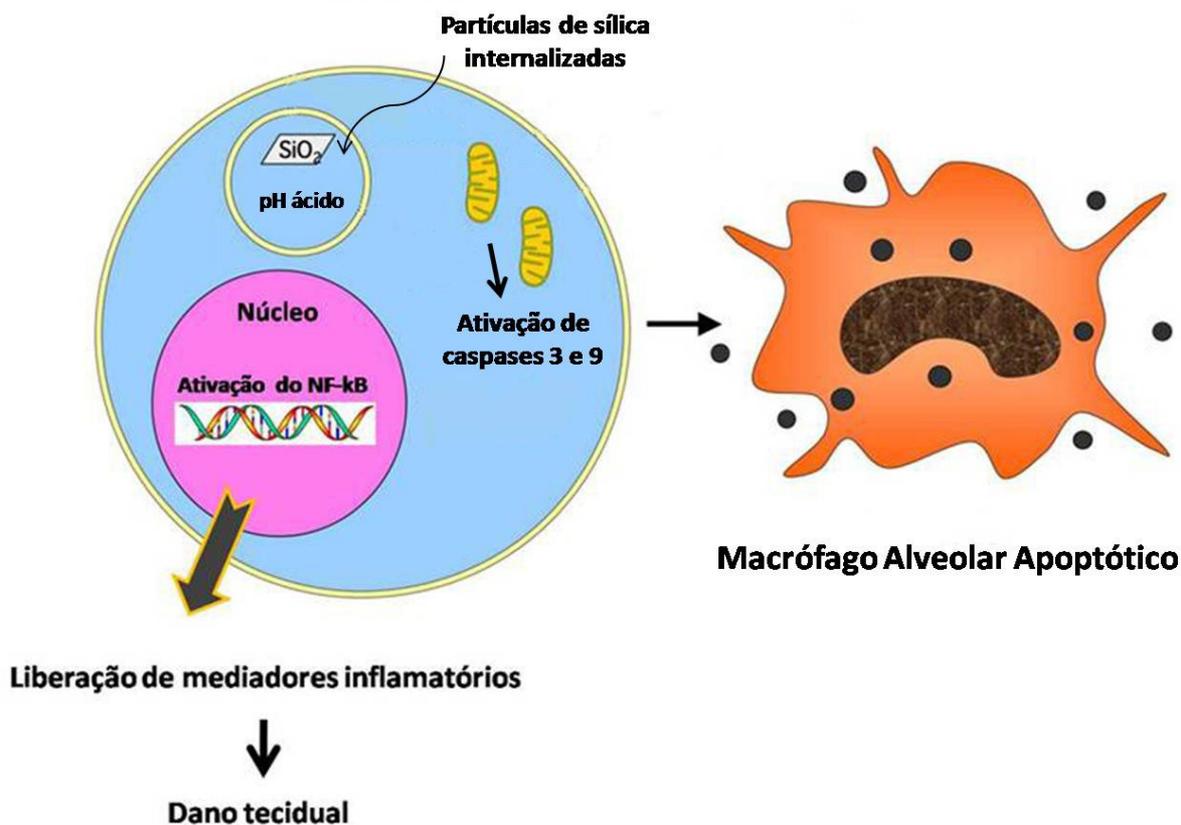


Figura 1.2: Esquema de internalização das partículas de sílica. Após fagocitose, os macrófagos alveolares tornam-se ativados e liberam diferentes mediadores inflamatórios a partir de transcrição gênica. O processo de degradação de sílica por essas células, acarreta ainda, a ativação de proteases (caspases 3 e 9) e conseqüentemente, apoptose celular. Adaptado de Hamilton *et al.*, 2008.

1.4.6 Fibrose Pulmonar

Nos últimos anos, o foco dos estudos de diversos grupos tem sido os mecanismos envolvidos na geração de processos inflamatórios crônicos. O conceito de uma reação inflamatória crônica consiste na soma das respostas montadas pelos tecidos contra um agente agressor, sendo caracterizada por grande infiltrado de células mononucleares, como macrófagos, linfócitos e eosinófilos, com predominância de destruição tecidual e processo de remodelamento (Gross and Hunninghake, 2001).

Sabe-se que essa fase inflamatória é seguida por um processo de reparo onde fatores de crescimento polipeptídicos estimulam o recrutamento e a proliferação de células

mesenquimais, assim como regulam a neovascularização e reepitelização do tecido danificado de forma a restaurar a arquitetura tecidual. A fibrose pulmonar tipicamente resulta de inflamação crônica e ocorre simultaneamente ao processo de reparo. Apesar das distintas manifestações clínicas e etiológicas, muitos processos fibróticos apresentam em comum a persistência do estímulo agressor, o que sustenta a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas fibrogênicas, promovendo deposição de elementos do tecido conectivo, os quais remodelam progressivamente a arquitetura tecidual (Friedman, 2004, Tomasek *et al.*, 2002, Wynn, 2007). Apesar de inicialmente benéfico, o processo de reparo se torna patogênico quando não controlado de forma apropriada, resultando em deposição excessiva de componentes da matriz extracelular (principalmente colágeno e fibronectina) (Phan, 2002, Schuppan *et al.*, 2001, White *et al.*, 2003) e perda funcional da unidade alveolocapilar (Sime and O'Reilly, 2001, Thannickal *et al.*, 2004).

O remodelamento, evento normal em pulmões saudáveis, constitui um processo onde a matriz extracelular, responsável pela manutenção da arquitetura tridimensional tecidual, é reciclada. Dessa maneira, o tecido conectivo nos pulmões é substituído por uma nova matriz recém-sintetizada, sob a condição de existência de uma balança entre degradação e síntese de componentes de matriz (Ward and Hunninghake, 1998). Entretanto, um processo desregulado ocorre a partir da inalação de partículas de sílica e, esse equilíbrio presente em pulmões normais parece não existir mais. A modulação das interações entre célula e matriz ocorre por meio da ação de um único sistema proteolítico, responsável pela hidrólise de uma variedade de componentes da matriz extracelular em nódulos fibróticos e na parede alveolar, constituído por metaloproteinases de matriz (MMP) que são endopeptidases zinco dependentes, produzidas por diferentes tipos celulares presentes na região alveolar dos pulmões (Scabilloni *et al.*, 2005). Existem quatro grupos de enzimas, responsáveis pela degradação de diferentes componentes da matriz, recebendo destaque as gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9), as quais apresentam afinidade de substrato por colágeno tipo IV da membrana basal. Por serem dotadas de capacidade de digerir grande quantidade de matriz em pouco tempo, o controle da degradação é mediado através dos inibidores teciduais das MMPs, conhecidos como TIMPs e por um mecanismo de secreção em forma inativa, como pró-enzimas, necessitando a clivagem para o início de suas atividades enzimáticas. Perez-Ramos *et al.* (1999) reportaram que MMPs encontram-se em níveis aumentados durante um processo inflamatório e a sua expressão

desregulada poderia estar implicada no remodelamento e ruptura da membrana basal durante a silicose pulmonar experimental em ratos.

A fibrose pulmonar é caracterizada por proliferação e acúmulo de células mesenquimais no interstício pulmonar (White *et al.*, 2003). É descrito na literatura que após injúria tecidual, os fibroblastos tornam-se ativados por citocinas liberadas localmente a partir de outras células inflamatórias, migrando para o tecido com dano e sintetizando componentes de matriz extracelular (Hinz, 2007, Werner and Grose, 2003). Em resposta ao desafio mecânico, os fibroblastos adquirem fibras contráteis (Tomasek *et al.*, 2002), sendo denominados de protomiofibroblastos. Esse último é considerado o passo intermediário para a diferenciação em miofibroblastos, os quais se caracterizam pela expressão de α -actina de músculo liso, marcador molecular comumente utilizado na sua identificação. A diferenciação em miofibroblastos é dependente do estímulo de TGF- β (Vaughan *et al.*, 2000, White *et al.*, 2003), fator de crescimento intimamente relacionado com a indução de fibrose em diversas patologias (Sato *et al.*, 2003, Sime *et al.*, 1997).

O papel dos miofibroblastos na fibrose pulmonar pode ser extrapolado a partir de observações *in vivo* e *in vitro*. Observações acerca da expressão de α -actina de músculo liso sugeriram um papel na contratibilidade e complacência tecidual (Gabbiani, 2003, Phan *et al.*, 1999). Esse significado parece se estender além de simples propriedades mecânicas, com evidências apontando para funções importantes em transduções de sinais e regulação da expressão gênica, incluindo componentes da matriz extracelular (ECM) (Chaqour *et al.*, 2006, Wang, 2006).

1.4.7 Mediadores Inflamatórios da Resposta Silicótica

O processo inflamatório é caracterizado por aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular e recrutamento de células para o sítio inflamatório. Diversas famílias de moléculas participam como importantes fatores de iniciação e manutenção da inflamação, sendo exemplificadas principalmente, pelas citocinas e quimiocinas.

As citocinas são proteínas de aproximadamente 25 kDa liberadas em resposta a determinado estímulo e promovem ação através da ligação a um receptor específico na membrana da célula alvo. Podem agir de forma autócrina, alterando o comportamento da célula que as liberam; de forma parácrina quando interferem em células adjacentes ou de forma endócrina, afetando células distantes. A ação dessas moléculas é freqüentemente

pleiotrópica, ou seja, a mesma citocina pode atuar em diferentes células induzindo distintos efeitos em contextos biológicos. As citocinas atuam ainda, de forma sinérgica ou de maneira a antagonizar efeitos biológicos. No entanto, no que diz respeito ao recrutamento, mobilização e orientação de células inflamatórias, as quimiocinas são as moléculas de maior interesse. Constituem um grupo particular de citocinas, denominadas citocinas quimiotáticas. São dotadas de baixo peso molecular e atuam sobre o endotélio, tornando-o permissivo à migração de células, notadamente leucócitos circulantes em processos inflamatórios. Nos últimos anos, as quimiocinas têm recebido ênfase na resposta fisiopatológica da silicose. As duas maiores subfamílias estão classificadas em dois grupos, designados como C-X-C ou C-C, de acordo com características funcionais e estruturais (Charo and Ransohoff, 2006). Quimiocinas C-X-C, como a proteína inflamatória de macrófago 2 (MIP-2), atuam principalmente em neutrófilos estimulando a ativação e a quimiotaxia dos mesmos (Driscoll, 1994). Já quimiocinas C-C, exemplificadas pela proteína inflamatória de macrófago 1 α (MIP-1 α), são quimiotáticas para monócitos, apesar de serem capazes de estimular outras células como mastócitos e neutrófilos (Kuna *et al.*, 1992). A ação das quimiocinas é complementada por moléculas de adesão celular e citocinas inflamatórias, de maneira a promover o recrutamento e recirculação de leucócitos para os tecidos alvos.

Apesar da cadeia de eventos celulares e moleculares que leva ao desenvolvimento da silicose ser bastante complexa, sabe-se que a exposição à sílica cristalina induz a produção de quimiocinas, citocinas inflamatórias e fatores de crescimento por macrófagos alveolares e células epiteliais do tipo II, estritamente relacionadas ao início e progressão da doença pulmonar (Castranova and Vallyathan, 2000).

Nesse contexto, recebe destaque a citocina denominada fator de necrose tumoral α (TNF- α), sendo proposta como mediador crítico na patogênese da silicose (Gossart *et al.*, 1996). Driscoll *et al.* (1994) observaram uma relação direta entre a produção de TNF- α induzida por sílica em macrófagos alveolares e o infiltrado de células inflamatórias nos pulmões de ratos expostos à sílica. Essa inflamação dependente de TNF- α tem sido associada à produção de quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos, como MIP-2. Em afirmação aos dados acima, o tratamento com anticorpo anti-TNF- α apresenta não somente diminuição da produção de MIP-2, como da resposta inflamatória e do processo subsequente de reparo tecidual, sendo proposto um papel fibrogênico para essa citocina (Piguet *et al.*, 1990). Outra citocina importante que tem sido proposta como mediador chave na inflamação pulmonar é a interleucina 1 β (IL-1 β). Brieland *et al.* (2001) observaram que a liberação de

TNF- α e IL-1 β como resultado da exposição à sílica pode atuar por vias autócrina e parácrina, de forma a estimular a liberação de MIP-1- α e MIP-2. Além disso, estudos demonstraram que camundongos deficientes dessa citocina apresentaram redução no número e tamanho dos granulomas, e níveis menores de apoptose em comparação ao grupo selvagem (Srivastava *et al.*, 2002).

Recentemente surgiu o conceito bem fundamentado da participação do complexo multiprotéico denominado Nalp3 inflamassoma no desencadeamento da resposta inflamatória após estimulação de sílica. Nalp3 é membro da superfamília de receptores intracelulares: NLRs (Nod-like receptors), e após ativação, recruta a molécula adaptadora ASC que por sua vez, recruta caspase-1 formando o complexo multiprotéico inflamassoma. Dessa maneira, ocorre a clivagem de pró-IL-1 β em IL- β madura (Cassel *et al.*, 2008, Sutterwala *et al.*, 2006). Estudos confirmaram o papel fisiológico do inflamassoma Nalp3 no modelo murino de silicose, visto que, camundongos deficientes da proteína Nalp3 e ASC, após estimulação de sílica, apresentaram redução do infiltrado inflamatório, da área de granuloma e deposição de colágeno (Cassel *et al.*, 2008). Acredita-se que o reconhecimento inicial das partículas de sílica por macrófagos ocorra via receptores “scavenger” (Hamilton e cols., 2006), todavia, a reação ao estímulo exige a posterior ativação do complexo Nalp 3, apresentando papel chave no desencadeamento e síntese de outras citocinas pró-inflamatórias na patogênese de diferentes pneumoconioses (Dostert *et al.*, 2008).

O fator transformador de crescimento beta (TGF- β), liberado principalmente por macrófagos após estimulação de sílica, também tem sido mostrado como importante fator em doenças pulmonares intersticiais induzidas por poeiras inorgânicas (Jagirdar *et al.*, 1996). Apresenta caráter fibrogênico assim como o fator de necrose tumoral, uma vez que induz a proliferação de fibroblastos no pulmão de pacientes com pneumoconioses, interferindo na síntese de colágeno e no processo de fibrose pulmonar (Arcangeli *et al.*, 2001).

A expressão de mediadores inflamatórios é normalmente regulada em diferentes níveis como: transcrição, pós-transcrição, tradução e pós-tradução (Beutler, 1992). É aceitável que essa regulação ocorra, no início, de forma transcripcional, envolvendo a participação de fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1 (Ortiz *et al.*, 1999), os quais ligam-se a regiões promotoras nos genes alvos.

1.5 Fator Inibidor da Migração de Macrófagos

O fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) foi inicialmente descoberto como um produto derivado de linfócitos T, e que na presença de antígeno exibia a capacidade de prevenir o movimento de monócitos *in vitro* (Bloom and Bennett, 1966, David, 1966). Apesar de ter sido uma das primeiras citocinas a serem descobertas (Nguyen *et al.*, 2003), as dificuldades na época em produzir um produto protéico recombinante impossibilitaram a continuação dos estudos a respeito de seus aspectos funcionais.

Anos depois, precisamente em 1989, as atividades biológicas do MIF foram desvendadas a partir da clonagem do DNA complementar (cDNA) do MIF humano (Weiser *et al.*, 1989), permitindo a sua “re-descoberta” como uma importante citocina pró-inflamatória (Bernhagen *et al.*, 1993, Bucala, 1996). Os primeiros camundongos MIF “knockout” foram gerados em 1999 através de deleção do éxon 3 do gene do MIF (Bozza *et al.*, 1999), possibilitando estudos com a finalidade de clarificar o seu papel na cascata de mediadores inflamatórios constituinte da resposta imune inata (Calandra and Roger, 2003, Leng *et al.*, 2003, Rossi *et al.*, 1998).

1.5.1 Estrutura Gênica e Protéica

O fator inibidor da migração de macrófagos é considerado uma proteína única, isto é, não apresenta homologia com nenhuma outra citocina pró-inflamatória (Donn and Ray, 2004). Há um único gene do MIF no genoma humano, localizado no cromossomo 22 (22q11.2) e compreendendo 3 éxons separados por pequenos íntrons.

Após mecanismos de tradução, o gene do MIF produz apenas um RNA mensageiro de aproximadamente 0,8 kb, encontrado em humanos, camundongos e ratos, e que codifica por sua vez, uma proteína não-glicosilada de 114 aminoácidos, com um peso molecular de 12,5 kDa (Denkinger *et al.*, 2003). Estudos cristalográficos indicam a proteína do MIF como um trîmero de 3 monômeros idênticos, consistindo em α hélices e folhas β (Sugimoto *et al.*, 1996, Sun *et al.*, 1996, Taylor *et al.*, 1999). Sua seqüência de aminoácidos apresenta alta homologia (aproximadamente 90%) em todos os mamíferos. Dessa maneira, a conservação através das espécies sugere importantes funções biológicas do MIF.

1.5.2 Expressão Celular e Distribuição Tecidual

Apesar da primeira atividade biológica atribuída ao MIF ter sido descrita na década de 60, informações acerca do papel preciso do MIF no que diz respeito à imunidade e a fisiologia

celular, ocorreu nos últimos anos. Dentre esses achados determinaram-se os tipos celulares que expressam MIF, onde se podem destacar os monócitos/macrófagos, células dendríticas, eosinófilos e mastócitos, células essas, componentes da resposta imunológica (Baugh and Bucala, 2002, Calandra *et al.*, 1994, Lue *et al.*, 2002, Martin, 2000). Em contraste às citocinas pró-inflamatórias clássicas como IL-1 β e TNF- α , onde é necessária a transcrição gênica e síntese protéica para liberação das mesmas, o MIF encontra-se pré-formado em “pools” intracelulares, sendo rapidamente liberado após estimulação. Apresenta efeitos de ativação parácrina/autócrina (Bacher *et al.*, 1996, Calandra *et al.*, 1994), promovendo a expressão de mediadores pró-inflamatórios como: TNF- α (Calandra *et al.*, 2000), IL-8 (Benigni *et al.*, 2000), IFN- γ (Abe *et al.*, 2001), MMP's (Meyer-Siegler, 2000) e indução da via de ciclooxigenase-2 (COX-2) (Mitchell *et al.*, 1999).

O MIF apresenta ampla distribuição no organismo, sendo especialmente expresso em tecidos e órgãos que se encontram em contato direto com o ambiente natural do hospedeiro, como: pulmão, pele e trato gastrointestinal (figura 1.3). Outra característica distintiva é sua expressão em tecidos do sistema endócrino, em órgãos diretamente envolvidos com a resposta de estresse como: hipotálamo e glândulas pituitária e adrenal (Bernhagen *et al.*, 1993, Fingerle-Rowson *et al.*, 2003).

A expressão do fator inibidor da migração de macrófagos no sistema endócrino como parte da resposta ao estresse sistêmico no hospedeiro, foi evidenciada a partir da descoberta do MIF como produto de células da glândula pituitária responsáveis pela produção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), relacionado à linha central do estresse no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Bacher *et al.*, 1998, Nishino *et al.*, 1995) e indutor da secreção de glicocorticóide pela glândula adrenal. Os glicocorticóides representam uma classe de drogas antiinflamatória frequentemente aplicada na prática clínica (Barnes, 2006, Schacke *et al.*, 2002). Seus efeitos se dão quando atravessam a membrana celular por difusão e ligam-se ao receptor de glicocorticóide no citoplasma, denominado GR. Após interação com glicocorticóide, o receptor é ativado, sofrendo modificação conformacional e expondo um domínio ligante ao DNA. O complexo GR-glicocorticóide migra para o núcleo e liga-se a sequências regulatórias específicas no DNA, denominadas elementos de resposta aos glicocorticóides (GRE), suprimindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios ou aumentando a expressão de proteínas anti-inflamatórias dependendo do gene específico e do tecido afetado (Belvisi, 2004, Rhen and Cidlowski, 2005). A transrepressão é obtida através da inibição de fatores como o fator de transcrição nuclear, NF- κ B.

Bernhagen *et al.* (1993) observaram que camundongos injetados com LPS apresentavam queda significativa do conteúdo de MIF na glândula pituitária e de forma concomitante a isso, aumento nos níveis plasmáticos de MIF. Além disso, a intercomunicação do MIF com a linha central do eixo HPA tem conseqüências funcionais diretas, visto que diversos estudos sugerem que o MIF e os glicocorticóides funcionam como antagonistas fisiológicos.

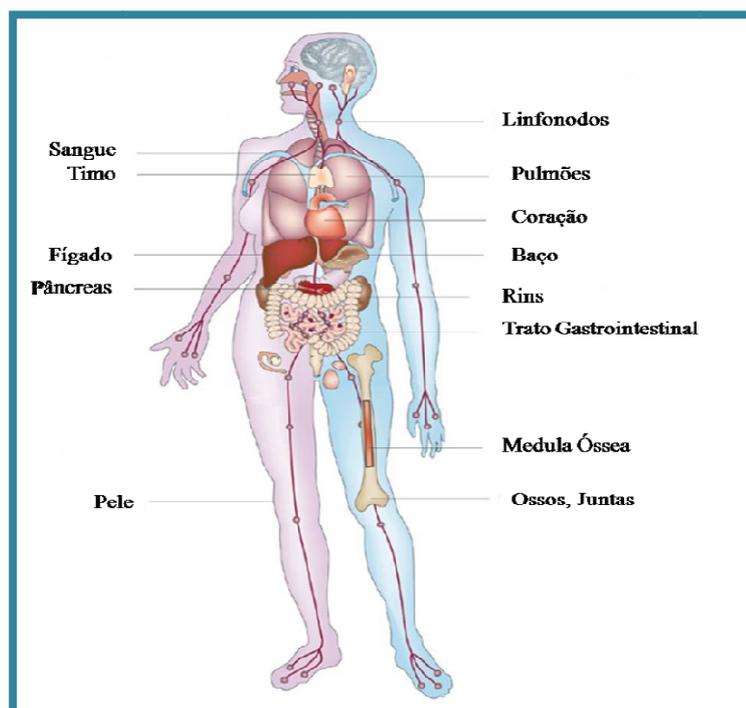


Figura 1.3: Sítios de expressão do MIF. Distribuição tecidual e fontes celulares do fator inibidor de macrófagos: no sistema imune (linfonodos, timo, baço, sangue e medula óssea) por monócitos/macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos, células B, células T e mastócitos; nos pulmões por macrófagos e células epiteliais; no coração por células endoteliais; no sistema endócrino (pâncreas) por células β – pancreáticas; fígado por hepatócitos e células endoteliais; nos rins por células epiteliais e endoteliais; no trato gastrointestinal por células epiteliais do estômago; na pele por queratinócitos e nos ossos e articulações por osteoclastos e fibroblastos. Adaptado de Calandra & Roger, 2003.

1.5.3 Modo de Ação

O mecanismo molecular de ação do MIF parece ser único dentre as famílias de citocinas pró-inflamatórias, porque além de estar expresso de forma constitutiva não apresenta sequência-sinal N-terminal para secreção via retículo endoplasmático e complexo de Golgi, sendo a sua secreção feita de maneira não convencional (Hudson *et al.*, 1999, Mitchell *et al.*, 1999).

Um elemento-chave nas vias de sinalização intracelular é a via de transdução de sinal conhecida como a via da proteína-quinase ativada por mitógeno: MAPK (Owens and Keyse, 2007). O fator inibidor da migração de macrófagos induz ativação de membros da família de MAPK, as quinases reguladas por sinais extracelulares, ERK 1/2. Essa cascata leva por sua vez, à ativação de fosfolipase A2 citosólica (PLA2), mediador crítico em respostas inflamatórias (Akiba and Sato, 2004, Mitchell *et al.*, 1999) e responsável pela hidrólise de ácido graxo da membrana, liberando assim ácido aracdônico, o qual é precursor dos mediadores lipídicos conhecidos como eicosanóides: os leucotrienos e as prostaglandinas. Esses produtos apresentam papel em vários sistemas, incluindo o respiratório e imune (Figura 1.4).

Na ausência de evidências a respeito de um possível receptor celular de ligação ao MIF, Leng *et al.* foram os primeiros a sugerir em 2003, a interação de alta afinidade do MIF com o domínio extracelular de CD74, forma de superfície celular da cadeia invariante associada ao complexo MHC de classe II. Esse processo seria então requerido para a fosforilação de ERK 1/2 mencionada acima (Leng *et al.*, 2003). O CD74, no entanto, apenas integra um complexo envolvido no reconhecimento dessa citocina, já que o mesmo não apresenta porção intracitoplasmática dotada de capacidade de interagir com moléculas transdutoras de sinais. Essa função é exercida pela proteína transmembrana com propriedades de ativação tirosino-quinase: CD44 (Naujokas *et al.*, 1993). O recrutamento de CD44 para o complexo MIF-CD74 parece ser crucial para a transdução de sinal e produção de prostaglandina E2 (PGE₂) mediada por MIF (Figura 1.4). Essa citocina interage também com proteínas fundamentais do ciclo celular, JAB1, além de promover a manutenção da característica pró-inflamatória da imunidade inata através da inibição da apoptose mediada por p53 (gene supressor tumoral) e regulação do receptor Toll-like 4 (TLR-4) (Hudson *et al.*, 1999; Mitchell *et al.*, 2002). Além da relação de atividades promovidas pelo fator inibidor da migração de macrófagos, adicionalmente foi demonstrada a sua capacidade em promover

quimiotaxia de monócitos e neutrófilos através da interação com receptores de quimiocinas: CXCR2 e CXCR4, respectivamente (Bernhagen *et al.*, 2007, Gregory *et al.*, 2006). A atividade do receptor de quimiocina induzida por MIF requer a ligação a proteína CD74, acoplamento a proteína G e sinalização de cálcio (Bernhagen *et al.*, 2007). Esses estudos foram importantes no sentido de determinar o processo migratório de diferentes células do sistema imune induzido por MIF.

Tem sido proposta a cascata de sinalização do fator de transcrição nuclear NF- κ B como via de interferência do MIF nos mecanismos de ação dos glicocorticóides (Figura 1.4). Como exposto anteriormente, a patogênese da silicose envolve a expressão de uma série de proteínas inflamatórias, que incluem citocinas, quimiocinas, enzimas que produzem mediadores inflamatórios, receptores para mediadores inflamatórios e moléculas de adesão. O aumento da expressão da maioria dessas proteínas é resultado da intensa transcrição gênica. Vários destes genes não são expressos em células normais sob condições habituais, porém têm sua produção aumentada sob um mecanismo celular específico, nas doenças inflamatórias. O padrão de expressão da citocina determina em grande parte a natureza e a persistência da resposta inflamatória (Barnes, 2003).

O NF- κ B constitui um fator de transcrição que encontra-se sob forma inativa citoplasmática através da formação do complexo NF- κ B: I κ B (Gwinn and Vallyathan, 2006). Após ativação por diferentes estímulos, esse complexo sofre fosforilação, com conseqüente degradação de I κ B, permitindo a translocação do fator nuclear para o núcleo, onde exerce suas funções. O MIF tem sido reportado em interferir na transativação de I κ B- α , subunidade de I κ B, em células mononucleares humanas (Daun and Cannon, 2000). Outros dados na literatura (Fingerle-Rowson *et al.*, 2003, Leech *et al.*, 2000) baseados em modelos experimentais envolvendo doenças autoimunes e doenças inflamatórias agudas e crônicas, apóiam a idéia de que o MIF pode atuar antagonizando as ações de glicocorticóides e dessa maneira, modular a resposta imune inata e adquirida.

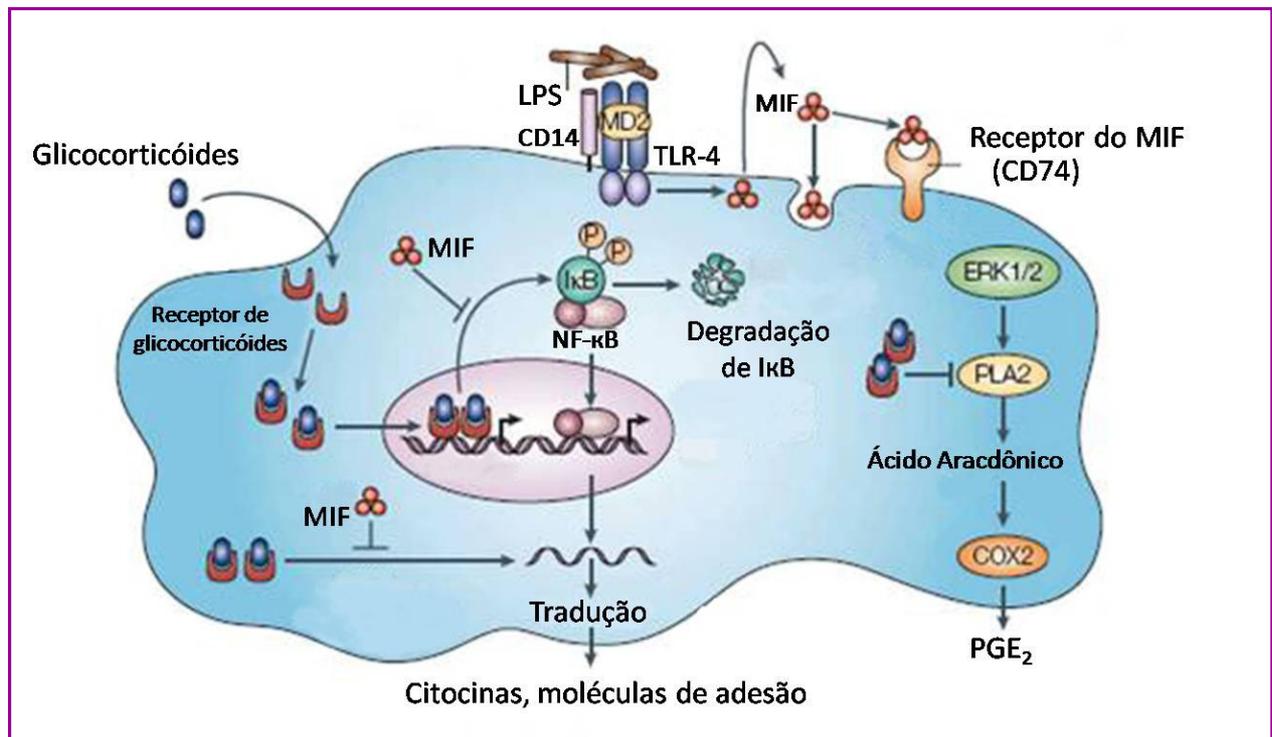


Figura 1.4: Modo de Ação do MIF. O fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) exerce suas atividades biológicas através da ligação ao receptor CD74, promovendo a fosforilação de proteínas ERK1/2, indução de fosfolipase A2 (PLA2) e posterior síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂). MIF contra-regula os efeitos imunossupressores dos glicocorticóides através da inibição da síntese do inibidor do fator de transcrição nuclear κ B (I κ B). MIF induz também, respostas inflamatórias de células do sistema imune inato, a partir da regulação da expressão do receptor Toll-like 4 (TLR-4) e rápido reconhecimento de LPS, culminando na produção de mediadores pró-inflamatórios. Adaptado de Calandra & Roger, 2003.

1.5.4 MIF e Doenças inflamatórias

Em indivíduos saudáveis, o fator inibidor da migração de macrófagos circula em concentrações séricas relativamente altas (2 - 6 ng/mL) (Petrovsky *et al.*, 2003). Contudo, dados na literatura indicam a presença de níveis aumentados dessa citocina em diferentes patologias inflamatórias (Mizue *et al.*, 2005, Powell *et al.*, 2005).

Nos pulmões normais, o MIF é expresso pelo epitélio brônquico, endotélio capilar e por macrófagos alveolares (Bacher *et al.*, 1997). Donnelly *et al.* (1997) demonstraram que em pacientes com Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (“Acute Respiratory Distress Syndrome” ou ARDS), o fator inibidor da migração de macrófagos estava presente nos pulmões, e macrófagos alveolares não só constituíam fonte celular dessa citocina como secretavam citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 8 (IL-8). Em modelos experimentais de asma, camundongos deficientes de MIF apresentaram atenuação significativa da inflamação pulmonar e redução da hiperreatividade das vias aéreas (Magalhaes *et al.*, 2007).

1.6 Hipótese

Por ser um importante modulador de respostas imunes, o fator inibidor da migração de macrófagos tem sido descrito em diferentes patologias incluindo: asma, artrite reumatóide (Amin *et al.*, 2003, Mikulowska *et al.*, 1997, Rossi *et al.*, 1998, Santos *et al.*, 2001) e sepse, onde no último modelo, Bozza *et al.* (1999) observaram que camundongos “knockout” para MIF (MIF^{-/-}) apresentavam atividade pró-inflamatória reduzida e aumento na taxa de sobrevivência.

Considerando-se a expressão do MIF por células importantes no reconhecimento e interação com partículas de sílica, e que níveis aumentados dessa citocina encontram-se presentes em situações inflamatórias, estabelecemos a hipótese de que a ausência desse fator acarretaria atenuação da resposta pulmonar murina, frente à estimulação com sílica, modulando a secreção de mediadores inflamatórios presentes na fisiopatologia da silicose.

2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi investigar a potencial participação do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) na resposta inflamatória pulmonar induzida por partículas de sílica. Para tanto, foi utilizado o modelo experimental de silicose murina, com as análises sendo realizadas tanto na fase aguda (7 dias) como na crônica (28 dias). Como ferramenta de estudo foram utilizados camundongos “knockout” para MIF (MIF^{-/-}) e tratamento com anticorpo anti-MIF.

2.1 Objetivos Específicos

- ❖ Avaliação das alterações da função pulmonar (resistência e elastância) e hiperreatividade das vias aéreas através do sistema de pletismografia de corpo inteiro invasiva;
- ❖ Avaliação do perfil de células inflamatórias componentes do lavado broncoalveolar (BAL);
- ❖ Avaliação das alterações morfológicas no parênquima pulmonar mediante utilização de técnicas clássicas de histologia e imunohistoquímica;
- ❖ Quantificação de mediadores inflamatórios incluindo citocinas (TNF- α , TGF- β) e quimiocinas (MIP-1 α e MIP-2) no tecido pulmonar;
- ❖ Avaliação do efeito neutralizante do anticorpo anti-MIF sobre o desenvolvimento do processo silicótico.

3. Metodologia

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c separados por grupos distintos e mantidos em caixas no biotério de manutenção do Laboratório de Inflamação, com temperatura controlada (entre 25-28°C), submetidos aos ciclos de luz invertidos claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à ração e água. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz, sendo todos os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) sob a licença de nº 0213-4. Os camundongos “knockout” para MIF foram gentilmente fornecidos pelo Dr. Marcelo T. Bozza (Instituto de Microbiologia, CCS, UFRJ).

3.2 Protocolo de Indução de Silicose

Para indução de silicose os camundongos foram anestesiados mediante aerossolização de halotano, sendo em seguida submetidos à instilação intranasal de 10 mg de sílica (tamanho da partícula: 0,5 - 10 µm) (Sigma) em 50 µl de solução salina estéril (NaCl 0,9%). O grupo controle foi representado por animais instilados com igual volume de salina estéril.

3.3 Avaliação dos parâmetros inflamatórios

Após 7 e 28 dias, os camundongos foram sacrificados por injeção de dose letal de tiopental (500mg/kg) (Figura 3.1).



Figura 3.1: Esquema do modelo não-invasivo de silicose murina. Camundongos BALB/c (WT) e “knockout” para MIF (MIF^{-/-}) foram instilados por via intranasal no dia 0 com sílica (10mg/50µL). Os animais controles foram instilados com igual volume de salina. As análises foram feitas 7 e 28 dias após a indução da silicose.

3.3.1 Avaliação da Função Pulmonar

A avaliação da função pulmonar foi realizada através do método de pletismografia de corpo inteiro. Sete e vinte e oito dias pós-instilação de sílica, os camundongos foram anestesiados com nembutal (60 mg/kg) e em seguida, foi realizada uma pequena incisão na região anterior do pescoço do animal, de modo a expor a traquéia para introdução de uma cânula de traqueostomia para pequenos animais. Os camundongos receberam uma dose (1 mg/kg) do bloqueador neuromuscular, brometo de pancurônio, e posteriormente, foram colocados em uma câmara pletismográfica. Neste momento, conectou-se a cânula ao pneumotacógrafo, submetendo os animais a uma determinada pressão constante, a qual foi registrada, por um sensor individual acoplado a um computador. Após a estabilização dos parâmetros de função pulmonar, concentrações crescentes (3, 9 e 27 mg/mL) do agente broncoconstritor metacolina foram aerossolizadas por um período de 5 minutos cada. Os parâmetros analisados foram: resistência (cmH₂O/mL/s) e elastância pulmonar (cmH₂O/mL).

3.3.2 Lavado Broncoalveolar

Os camundongos foram canulados e o lavado broncoalveolar foi realizado com um volume total de 1,0 mL de solução salina tamponada (PBS) contendo EDTA (10mM), sendo as amostras centrifugadas a $110 \times g$ por 10 minutos. O “pellet” foi ressuspensão em 0,25 mL para que fosse realizada a avaliação da celularidade. A análise dos leucócitos totais incluiu: diluição das amostras em líquido de Türk (1:10) e contagem em câmara de Neubauer em microscópio de luz (Olympus – U-TV1X) . Para análise diferencial, neutrófilos e células mononucleares foram diferenciados através de citocentrifugados corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa, com avaliação feita em objetiva de imersão em óleo.

3.3.3 Obtenção de Tecido Pulmonar

O pulmão dos camundongos foi perfundido com solução salina através do coração, sendo removido em seguida. O lobo esquerdo foi recuperado e imerso em fixador Milloning (formol tamponado), para posterior processamento para a análise histológica. O lobo direito foi retirado e mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para quantificação de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar.

3.3.4 Análise Histológica

Para o estudo das características histopatológicas das lesões, o lobo esquerdo mantido no fixador Milloning, passou por etapas de desidratação, clarificação, inclusão, microtomia e coloração conforme descrito abaixo.

3.3.4.1 Desidratação

Esta etapa compreendeu a imersão do material em gradientes crescentes de etanol:

- Álcool 70 % por 30 minutos
- Álcool 80 % por 30 minutos
- Álcool 90 % por 30 minutos
- Álcool 100 % (1) por 30 minutos
- Álcool 100 % (2) por 30 minutos
- Álcool 100% (3) por 30 minutos.

3.3.4.2 Clarificação

O material foi imerso em soluções de Xilol (xilol 1, xilol 2 e xilol 3) por um período de 30 minutos.

3.3.4.3 Inclusão

O material foi submetido a 3 sucessivos banhos de parafina durante 40, 60 e 30 minutos respectivamente, em estufa mantida aproximadamente a 60 °C.

3.3.4.4 Microtomia

Foram realizados cortes finos (5 µM de espessura) em micrótomo (Leica – RM 2125RT).

3.3.4.5 Coloração

Por último, o material passou por processos de coloração com a utilização dos seguintes corantes: i) Hematoxilina-Eosina (H&E) a fim de possibilitar a visualização dos componentes pulmonares estruturais e ii) Picro Sirius convencional, para visualização de fibras colágenas.

A visualização das lâminas foi realizada em microscópio de luz (Olympus – U-TV1X), acoplado a uma câmera (Olympus Q Color 3 – 0044C-194) e a captura da imagem feita mediante o uso de um “software” de análise (Q Capture).

3.3.5 Análise Morfométrica

Com a finalidade de determinar a área ocupada por granulomas/pulmão foi feita uma contagem mediante utilização de um retículo de 100 pontos (figura 3.2), em um total de 20 campos/pulmão (aumento de 200x), para todos os pulmões de cada grupo experimental. Os valores encontrados, isto é, a quantidade de pontos que coincidiu em granulomas, foi submetida a tabelas para cálculo específico das médias e dessa maneira, obteve-se a área ocupada por granulomas no pulmão dos camundongos. Os valores foram expressos em fração de granuloma (%).

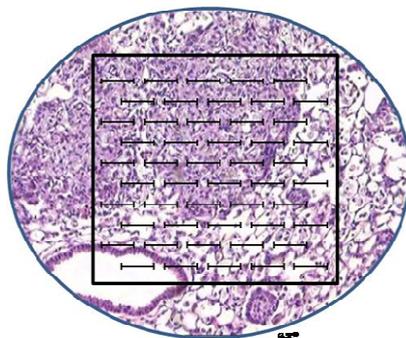


Figura 3.2: Imagem do retículo utilizado para análise morfológica.

3.3.6 Análise por Imunohistoquímica

Inicialmente, as lâminas contendo os cortes histológicos foram processadas em xilol (5 min) e passaram por uma seqüência de etanol nas respectivas concentrações: 100%, 90%, 80% e 70%, por 3 minutos cada. Em seguida, foi utilizada uréia para promover recuperação antigênica. Posteriormente foi realizada uma lavagem em solução de salina Tris (TBS) por 10 minutos e feita a inativação da peroxidase endógena (H_2O_2 3% - 10 minutos) seguida pelo bloqueio de sítios inespecíficos com Tris – HCl 0,05M + BSA 5%. O próximo passo constituiu-se da incubação com o anticorpo primário anti- α - SMA (1:400) (A2547, Sigma, USA), anti- F4/80 (1:100) (MCAP497, Serotec, USA) diluídos em Tris – HCl 0,05M, “overnight”. O controle negativo foi realizado omitindo-se o anticorpo primário e em seu lugar, adicionando Tris – HCl 0,05M. Após incubação, foram feitas 3 lavagens consecutivas com TBS (5 minutos cada) seguida da incubação por 1 hora do anticorpo secundário (1:80) (anti-IgG de camundongo, HAF007, R&D, USA; anti-IgG de cabra, STAT72, Serotec, USA, respectivamente) diluído em solução Tris – HCl 0,05M. Após mais 3 lavagens com TBS, a atividade da peroxidase foi revelada através da utilização do substrato AEC (10 – 30 minutos). A contracoloração com hematoxilina de Mayer (50 segundos) seguida de lavagem em água corrente permitiu a melhor visualização do tecido. As análises foram realizadas por meio de um microscópio de luz, acoplado a uma câmera de vídeo conforme descrito no item 3.3.4.5. A quantificação de pixel foi feita através do “software” Image Pro-plus, sendo os valores expressos por $pixel/\mu m^2$.

3.3.7 Quantificação de Citocinas e Quimiocinas

O processamento do tecido pulmonar foi realizado mediante a homogeneização em 1 mL de PBS contendo um coquetel de inibidores de proteases (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suíça), seguido de centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante recuperado para posterior quantificação de mediadores.

A produção de citocinas (TNF- α e TGF- β) e quimiocinas (MIP-1 α e MIP-2) foi analisada através da técnica “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA). Para recobrir a placa de 96 poços foi utilizado o anticorpo capturador (nas concentrações indicadas nos kits), processo feito por 18 horas à temperatura ambiente. A placa foi lavada em tampão “Coat Buffer” e bloqueada com PBS-BSA 1% (250 μ l por poço), permanecendo em contato com o anticorpo capturador durante 1 hora. Após esta incubação ocorreu outra lavagem, seguida da aplicação das amostras e dos padrões com diluição seriada nas concentrações indicadas nos kits (R&D Systems), permanecendo durante 18 horas na temperatura de 4°C. A placa foi então lavada com tampão “Assay Buffer” para posterior adição do anticorpo de detecção, permanecendo incubado por 1 hora. Após esse tempo, a placa foi novamente lavada com o mesmo tampão e adicionou-se a enzima (estreptoavidina por 1 hora). O substrato (K-Blue) foi adicionado e a reação foi interrompida com H₂SO₄ (0,19 M). A leitura da placa foi realizada com a utilização de um espectrofotômetro (450 nm). Os resultados obtidos foram expressos por ng/mg de proteína.

3.3.8 Deposição de Colágeno

A análise quantitativa de fibras colágenas foi realizada por meio da técnica de Sircol. O tecido pulmonar foi processado em solução de Tris 0,05M + NaCl 1M, e mantido por 18 horas a 4°C. O material foi posteriormente centrifugado a 10.000 x g por 1h a 4°C, o sobrenadante aliqotado e a ele adicionado o reagente Sirius Red (Biocolor, UK). Após 30 min de reação, o material foi novamente centrifugado, o sobrenadante por sua vez descartado, e adicionado ao “pellet” o reagente Alkaline, por 10 minutos, nas concentrações indicadas no kit (Biocolor, UK). As amostras foram colocadas em placas de 96 poços, onde a absorbância foi determinada em 540 nm e o resultado expresso em μ g de colágeno/ pulmão direito.

3.3.9 Imunoneutralização do MIF

Esse experimento foi realizado de modo a analisar o efeito do anticorpo anti- MIF na injúria pulmonar aguda induzida por sílica. Camundongos BALB/c foram separados em

quatro grupos distintos, a saber: i) salina, ii) sílica, iii) IgG e iv) anti-MIF. Os três últimos foram submetidos, no dia 0, à instilação intranasal de sílica (10 mg em 50 µl de solução salina estéril) enquanto que o primeiro grupo, recebeu igual volume de salina estéril. Os camundongos dos grupos IgG e anti-MIF receberam injeções, via intraperitoneal (200 µg/animal), de IgG não-imune de camundongo (Sigma) e anticorpo anti-MIF monoclonal respectivamente, 2 horas antes da instilação de sílica e subsequentemente, 3 vezes durante o período de 7 dias (Figura 3.3). No último dia, os camundongos de todos os grupos foram sacrificados e o efeito do anticorpo foi investigado a partir dos seguintes parâmetros descritos anteriormente: análise da função pulmonar, histologia pulmonar e análise morfométrica.

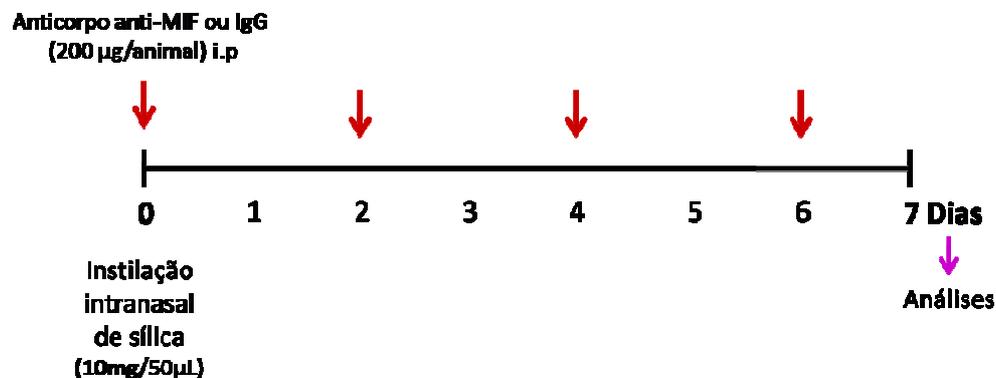


Figura 3.3: Esquema do protocolo referente ao tratamento com o anti-soro neutralizante para o MIF.

3.3.10 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de Newman-Keuls-Student. Para comparação entre dois grupos experimentais, foi utilizado o teste “t” de Student para amostras não-pareadas. Os parâmetros apresentados em forma percentual foram submetidos à transformação arcoseno, a fim de tornar sua distribuição próxima ao normal, permitindo, assim, a realização dos testes de variância (Zar, 1996). Os valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

4. Resultados

4.1 Análise da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas após instilação de sílica

Tendo em vista a progressiva alteração da arquitetura das vias aéreas e principalmente o caráter restritivo característico da silicose, buscamos analisar como primeiro passo, a função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de animais submetidos à exposição de sílica. Para tanto, utilizamos um modelo experimental murino não-invasivo de indução de silicose, previamente estabelecido em nosso laboratório.

A análise da função pulmonar em camundongos silicóticos (WT e MIF^{-/-}) 7 dias pós-sílica, indicou alteração basal do parâmetro de resistência pulmonar (Figura 4.1A), constituída de níveis aumentados em relação aos respectivos controles. O grupo de animais deficiente de MIF apresentou redução significativa nos níveis de resistência pulmonar quando comparado ao grupo WT sílica (Figura 4.1A). Após aerolização de concentrações crescentes (3 – 27 mg/mL) do agente broncoconstrictor metacolina, observamos um aumento concentração-dependente nos níveis de resistência pulmonar no grupo WT sílica em relação ao seu controle (Figura 4.1A), fenômeno que mostrou-se marcadamente reduzido nos animais MIF^{-/-} sílica (Figura 4.1A). O mesmo perfil foi visualizado no que diz respeito à elastância pulmonar na fase aguda da doença, onde o grupo MIF^{-/-} sílica apresentou redução significativa comparado ao grupo WT sílica (Figura 4.1B), indicando supressão do quadro de hiperreatividade das vias aéreas em resposta à provocação com metacolina.

No tempo de 28 dias, verificamos que os camundongos de ambos os grupos silicóticos apresentaram níveis elevados de resistência pulmonar na condição basal em comparação aos seus respectivos controles (Figura 4.1C). A aerolização de concentrações crescentes de metacolina induziu broncoconstrição das vias aéreas nos grupos silicóticos, e mais ainda, o grupo MIF^{-/-} sílica apresentou aumento significativo nos níveis de resistência pulmonar quando comparado ao grupo WT sílica (Figura 4.1C). Esse fenômeno também se fez presente ao analisarmos o parâmetro de elastância pulmonar (Figura 4.1D).

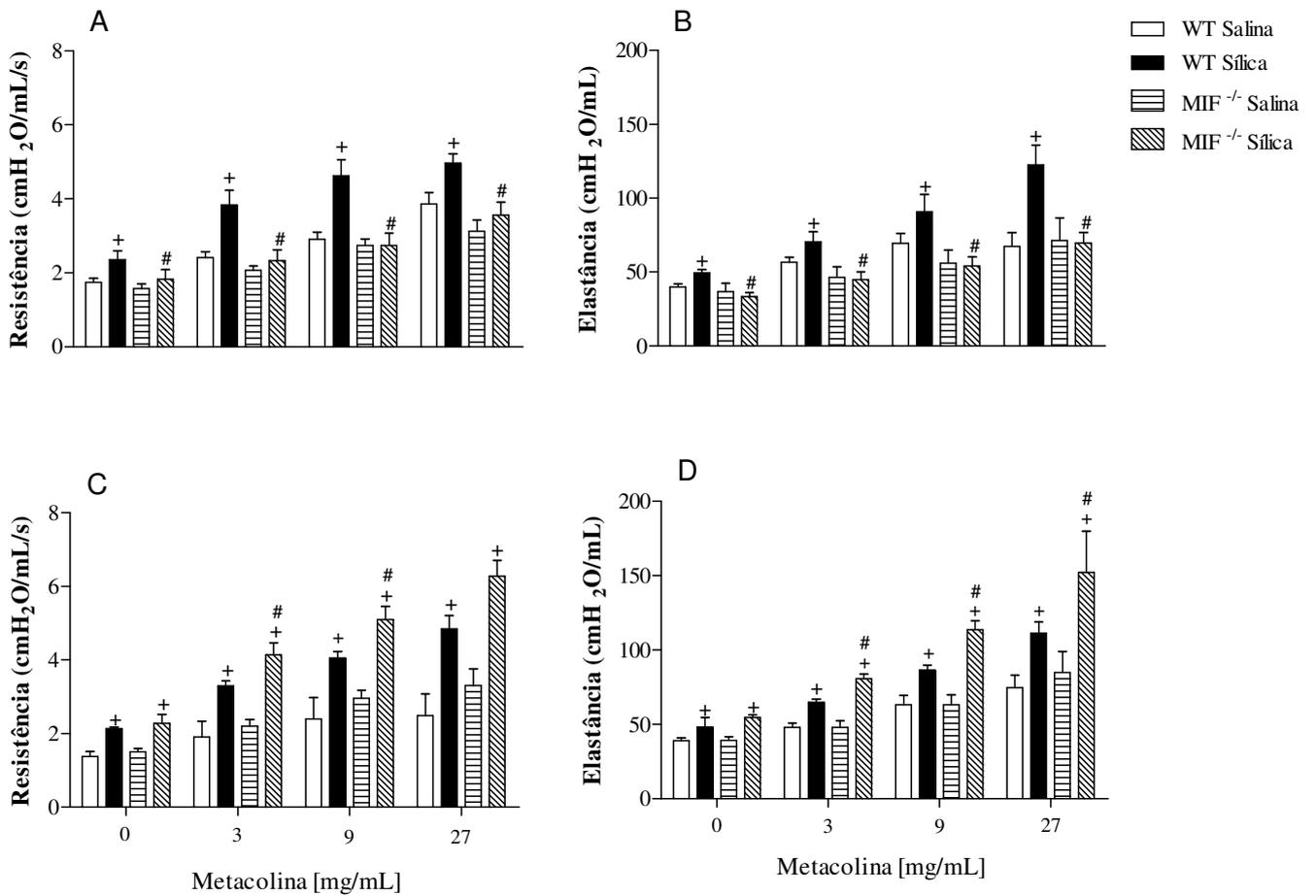


Figura 4.1: Análise da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de camundongos WT e MIF^{-/-} frente à aerossolização de metacolina (3 - 27 mg/mL). Resistência (A, C) e elastância pulmonar (B, D), 7 (painéis superiores) e 28 dias (painéis inferiores) após instilação de sílica (10 mg/50 μ L). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (n=5). ⁺ $p < 0,05$ comparado aos respectivos grupos salina; [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo WT sílica.

4.2 Análise do infiltrado leucocitário no lavado broncoalveolar após instilação de sílica

O evento inicial predominante na silicose consiste em um processo de injúria tecidual estritamente associado ao aumento de permeabilidade vascular e influxo de células inflamatórias (Huaux, 2007). Sabendo da importância do estabelecimento do quadro inflamatório na fisiopatologia da silicose, avaliamos o infiltrado leucocitário presente no lavado broncoalveolar dos camundongos após instilação de sílica.

No tempo correspondente à fase aguda da doença, 7 dias pós-sílica, observamos nos grupos de camundongos silicóticos (WT e MIF^{-/-}) um aumento significativo no número de leucócitos totais presentes no lavado broncoalveolar, quando comparado ao detectado nos camundongos instilados com salina (Figura 4.2A). O grupo MIF^{-/-} sílica apresentou redução do número de leucócitos totais quando comparado ao grupo WT sílica. (Figura 4.2A).

Como perfil leucocitário encontrado no lavado broncoalveolar no grupo experimental de camundongos salina observamos um alto percentual de células mononucleares (98-99%) (Figura 4.2C) e um número bastante reduzido de poliformonucleares neutrófilos (0-1%) (Figura 4.2E). Na condição da silicose, notamos alteração desse perfil, onde o grupo WT sílica apresentou um percentual (23-24%) de células mononucleares (Figura 4.2C) e um número maior de polimormonucleares (76%) (Figura 4.2E). O grupo MIF^{-/-} sílica apresentou aumento no número de células mononucleares (em torno de 43%) (Figura 4.2C) e número reduzido de neutrófilos (Figura 4.2E), onde esses últimos se encontraram diminuídos de forma significativa quando comparado ao grupo WT sílica (Figura 4.2E).

Na fase crônica da doença, observamos o mesmo perfil de celularidade no lavado broncoalveolar nos grupos de animais controles (Figura 4.2D e F) em relação ao detectado em 7 dias. Contudo, a cinética do infiltrado leucocitário revelou um maior número de leucócitos totais (Figura 4.2B), tanto no grupo WT sílica (64-65%) como no grupo deficiente de MIF (72%), atestado principalmente pelo elevado número de células mononucleares (Figura 4.2 D). O grupo MIF^{-/-} sílica apresentou redução significativa no número de leucócitos totais (Figura 4.2B) e de células mononucleares (Figura 4.2D) quando comparado ao grupo WT sílica. Observamos aumento no número de neutrófilos (Figura 4.2F) em ambos os grupos de camundongos silicóticos (WT e MIF^{-/-}). Notamos uma tendência de redução no número de neutrófilos do grupo deficiente de MIF em relação ao grupo WT sílica, porém não de forma significativa (Figura 4.2F).

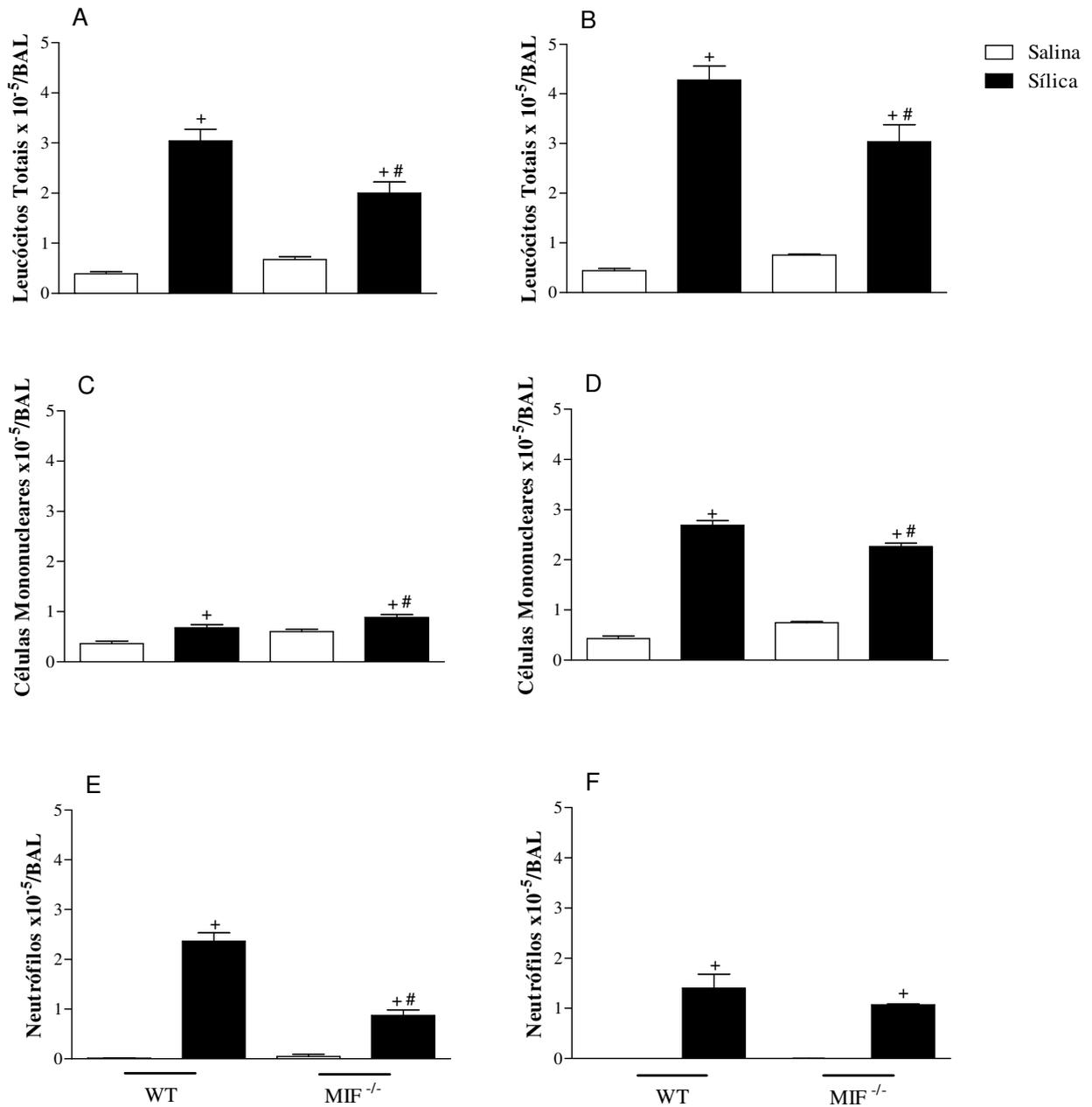


Figura 4.2: Leucócitos no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos WT e MIF^{-/-}, 7 (painéis à esquerda) e 28 dias (painéis à direita) após instilação intranasal de sílica (10 mg/50 μ L). Número de leucócitos totais (A, B), células mononucleares (C, D) e neutrófilos (E, F). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. Salina (n= 6) e sílica (n= 8). + $p < 0,05$ comparado aos respectivos grupos salina; # $p < 0,05$ comparado ao grupo WT sílica.

4.3 Análise das alterações morfológicas no parênquima pulmonar após instilação de sílica

Considerando que a silicose é uma patologia inflamatória crônica com predominância de inflamação granulomatosa e resposta fibronodular (Delgado *et al.*, 2006), partimos para avaliar as possíveis alterações morfológicas no tecido pulmonar.

Conforme pode ser observado na Figura 4.3A e C, os pulmões dos animais instilados com salina exibiram a estrutura do parênquima pulmonar preservada, com espaços alveolares livres da presença de infiltrado inflamatório e septos alveolares dotados de espessura normal. Como ilustrado na Figura 4.3B, o grupo WT sílica, em 7 dias, exibiu alteração difusa do parênquima pulmonar refletida por espessamento septal e presença de células inflamatórias. Em contrapartida, o grupo MIF^{-/-} sílica apresentou atenuação do infiltrado inflamatório tecidual (Figura 4.3D) e nódulos silicóticos de menor proporção no pulmão, quando comparado ao grupo de camundongos WT sílica (Figura 4.3E).

Na fase crônica, 28 dias após instilação de sílica (10 mg/50 µL), constatamos que o parênquima pulmonar dos animais salina se manteve preservado, sem indício de alteração morfológica (Figuras 4.4A e C). Por outro lado, notamos nesse momento, a progressão da resposta inflamatória no grupo de animais silicóticos, caracterizada pela formação de granulomas peribronquiolares constituídos por células inflamatórias em meio às partículas de sílica (Figuras 4.4B e D). Verificamos ainda, de forma interessante, que o grupo MIF^{-/-} sílica (Figura 4.4D) apresentou um comprometimento maior da resposta inflamatória em comparação ao grupo WT sílica, com formação de granulomas extensos, por vezes coalescentes, e com características diferentes, onde a região central nodular destacou-se pela tonalidade rosada e presença de menor infiltrado celular, fenômeno sugestivo de natureza necrótica e intensa degradação de colágeno. Foi observado que esse tipo de granuloma presente no grupo deficiente de MIF, em 28 dias, ocupou não somente uma área maior no tecido pulmonar em comparação ao grupo WT sílica (Figura 4.4E), como se encontrou exacerbado em aproximadamente 5 vezes em relação ao verificado na fase aguda do modelo experimental.

Sabendo que a fibrose pulmonar observada histologicamente envolve um processo de reparo da arquitetura pulmonar (Zhang *et al.*, 1993), buscamos analisar no pulmão de camundongos silicóticos a deposição de colágeno, componente de matriz extracelular importante no curso da regeneração tecidual.

Através da coloração com Picro Sirius foi possível identificar em 7 dias, a presença de uma pequena quantidade basal de fibras colágenas, localizada próxima aos brônquios, no parênquima pulmonar dos animais controles (Figuras 4.5A e C). Nos animais silicóticos, foi detectado um aumento significativo no depósito de fibras colágenas (Figuras 4.5B e D). Nos cortes histológicos do grupo deficiente de MIF, notamos uma atenuação na quantidade de colágeno no parênquima pulmonar (Figura 4.5D) em comparação ao conteúdo detectado no pulmão dos animais WT, o qual se mostrou de forma significativa quando realizada a análise quantitativa do material através da técnica de Sircol (Figura 4.5E). No tempo correspondente à fase crônica, observamos uma pequena quantidade basal de colágeno no pulmão dos animais controle (Figuras 4.6A e C). Contudo, a marcação de fibras colágenas dentro dos nódulos silicóticos, no grupo WT, mostrou-se dotada de maior intensidade (Figura 4.6B) em relação ao observado em 7 dias, apresentando-se de forma difusa nos granulomas e demonstrando claramente a ocorrência de um processo fibrótico nos pulmões dos animais expostos à sílica. O grupo MIF^{-/-} sílica apresentou redução do conteúdo de colágeno em comparação ao grupo WT sílica, como observado na Figura 4.6D e confirmado por análise quantitativa (Figura 4.6E).

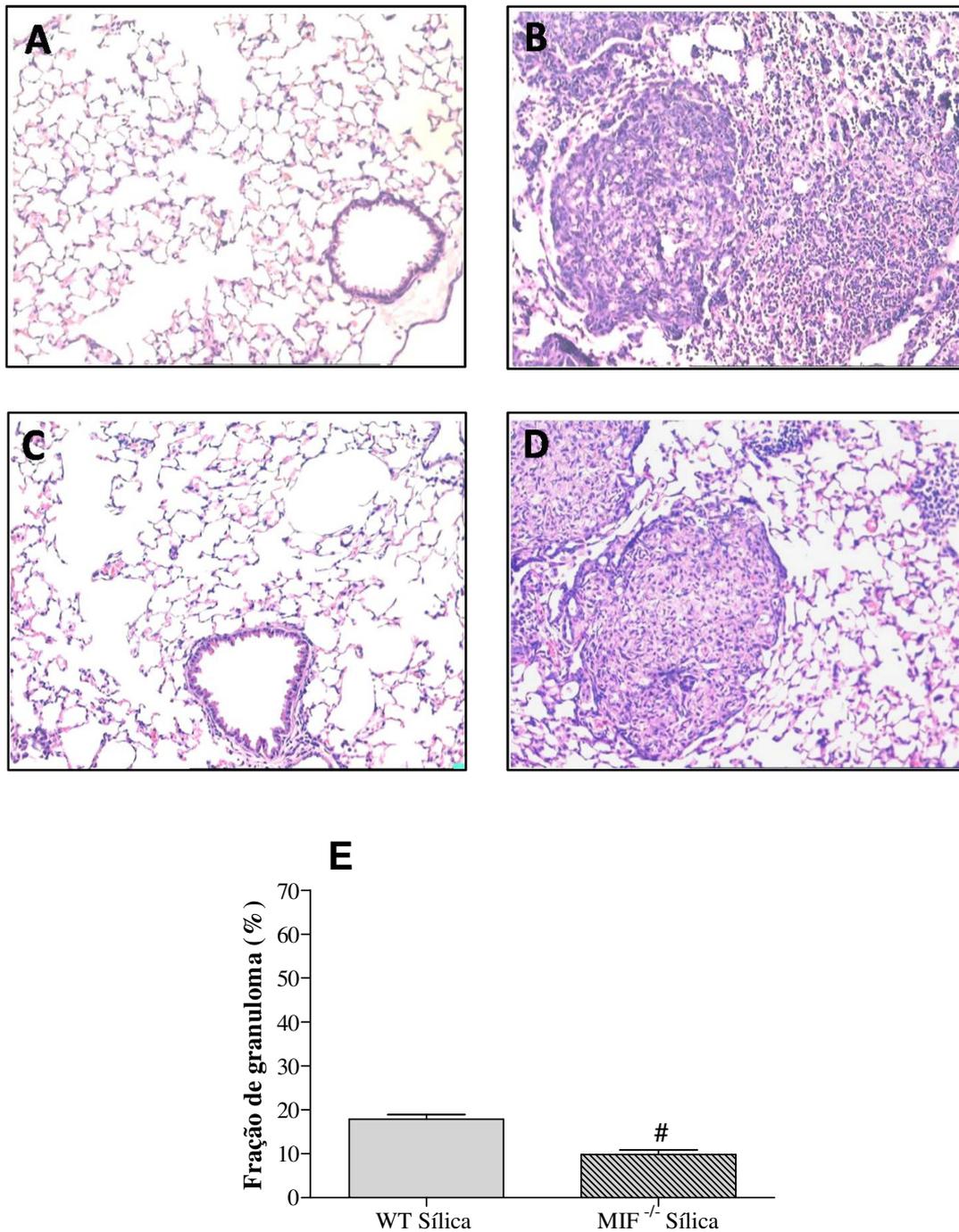


Figura 4.3: Avaliação morfológica de cortes histológicos do pulmão de camundongos WT (painéis superiores) e MIF^{-/-} (painéis inferiores), 7 dias após instilação intranasal de salina (A, C) ou sílica (10 mg/50 μ L) (B, D). Avaliação quantitativa da área de granuloma no pulmão através da técnica de morfometria (E). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. Salina (n= 6) e sílica (n= 8). [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo WT sílica. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Aumento de 200x.

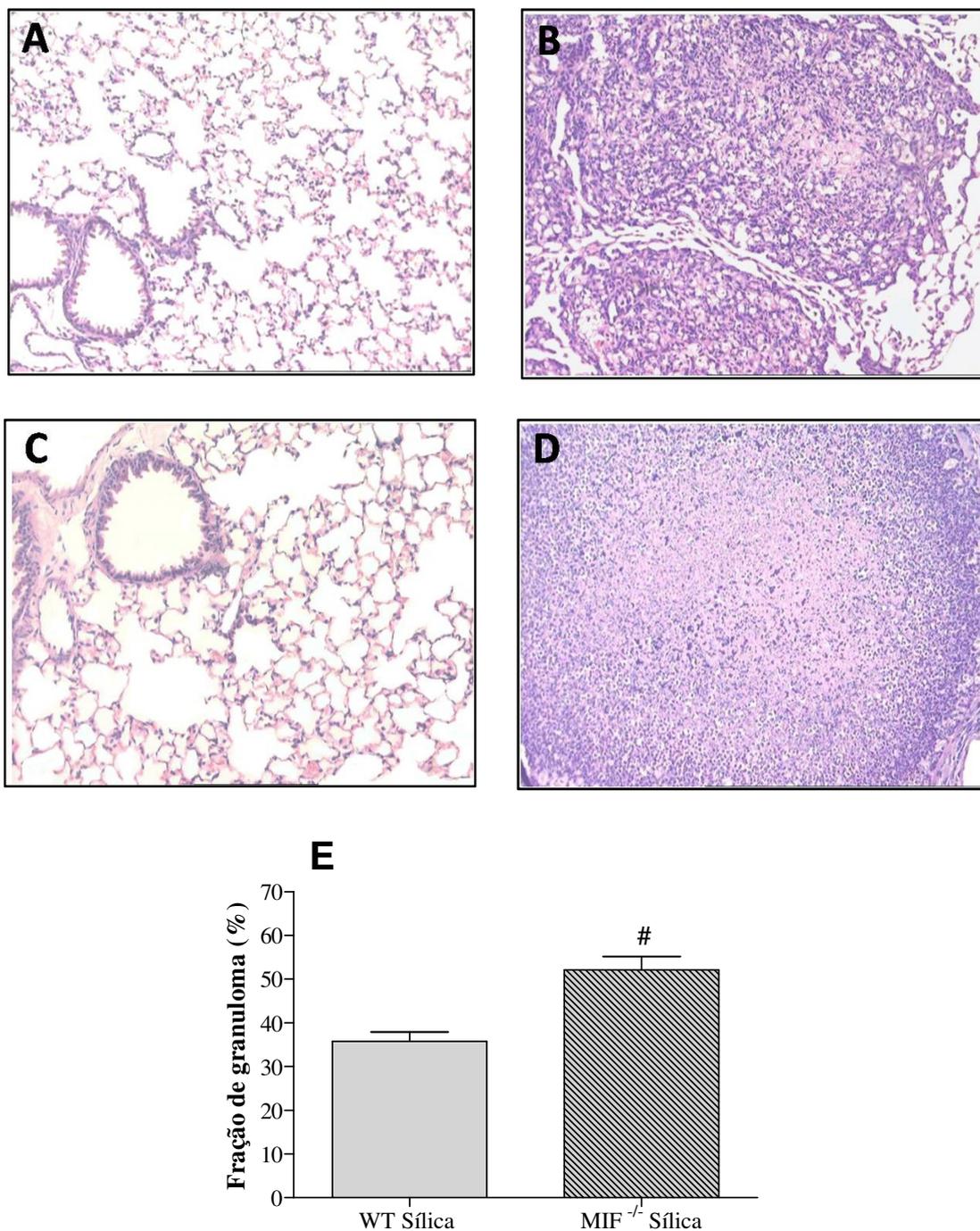


Figura 4.4: Avaliação morfológica de cortes histológicos do pulmão de camundongos WT (painéis superiores) e MIF^{-/-} (painéis inferiores), 28 dias após instilação intranasal de salina (A, C) ou sílica (10 mg/50 μ L) (B, D). Avaliação quantitativa da área de granuloma no pulmão através da técnica de morfometria (E). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. Salina (n= 6) e sílica (n= 8). [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo WT sílica. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Aumento de 200x.

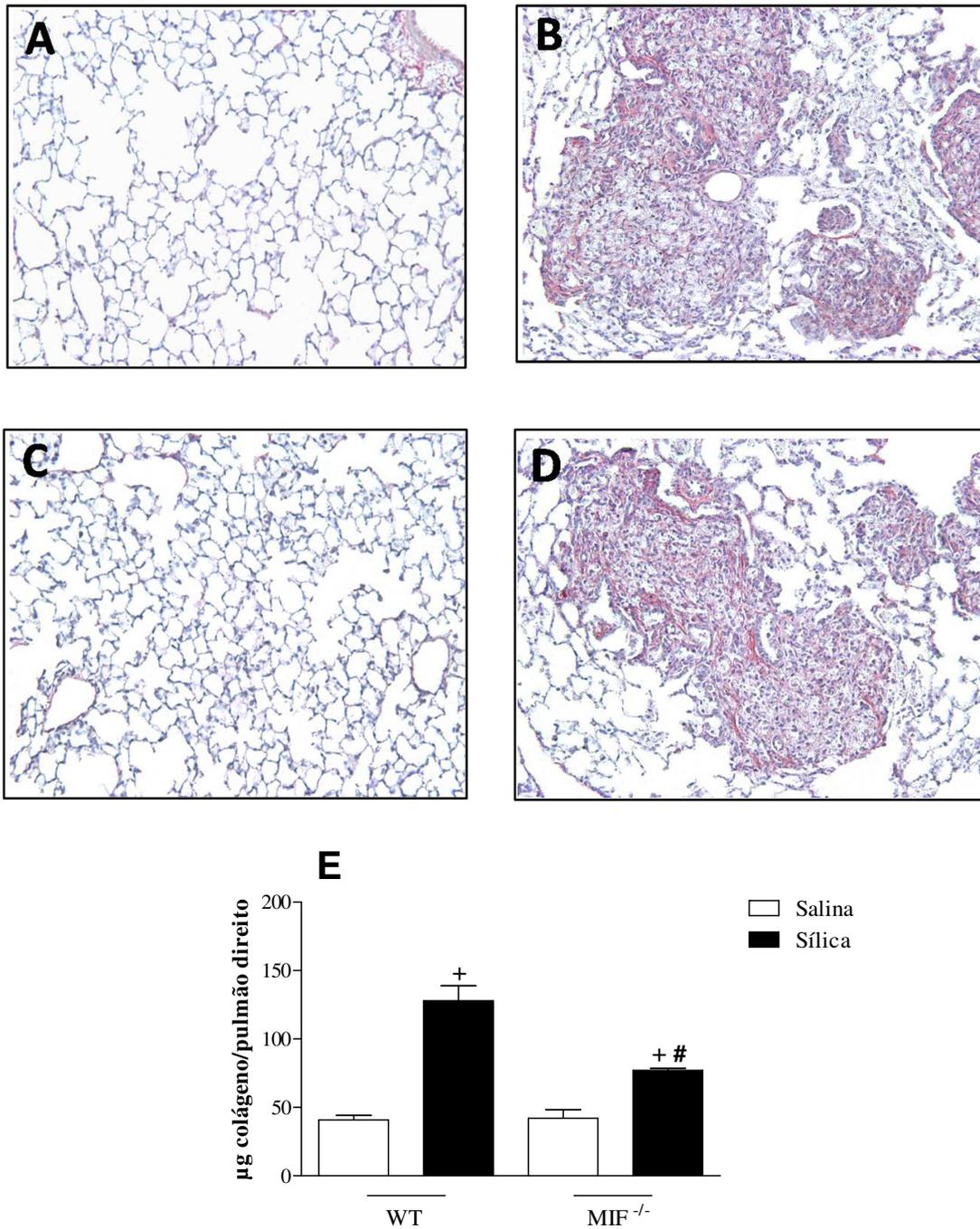


Figura 4.5: Avaliação da deposição de fibras colágenas no tecido pulmonar de camundongos WT (painéis superiores) e MIF^{-/-} (painéis inferiores), 7 dias após instilação intranasal de salina (A, C) ou sílica (10 mg/50 µL) (B, D). Avaliação quantitativa do depósito de colágeno no pulmão através da técnica de Sircol (E). Os resultados representam a média ± erro padrão da média. Salina (n= 6) e sílica (n= 8). ⁺ *p* <0,05 comparado aos respectivos grupos salina; [#] *p* <0,05 comparado ao grupo WT sílica. Os cortes histológicos foram corados com Picro Sirius e contracorados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Aumento de 200x.

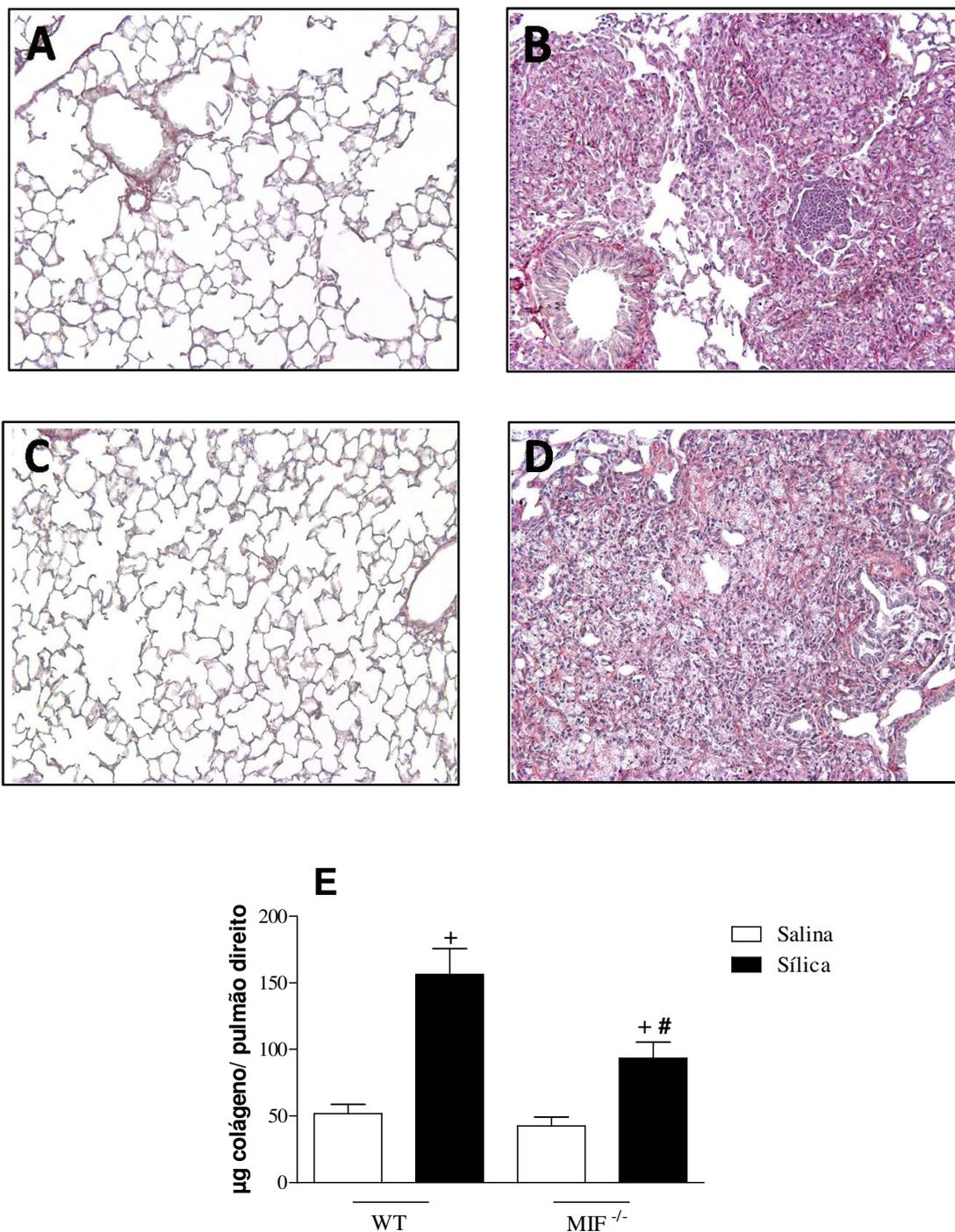


Figura 4.6: Avaliação da deposição de fibras colágenas no tecido pulmonar de camundongos WT (painéis superiores) e MIF^{-/-} (painéis inferiores), 28 dias após instilação intranasal de salina (A, C) ou sílica (10 mg/50 µL) (B, D). Avaliação quantitativa do depósito de colágeno no pulmão através da técnica de Sircol (E). Os resultados representam a média ± erro padrão da média. Salina (n= 6) e sílica (n= 8). + $p < 0,05$ comparado ao grupo WT salina; # $p < 0,05$ comparado ao grupo WT sílica. Os cortes histológicos foram corados com Pícrus Sirius e contracolorados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Aumento de 200x.

4.5 Análise de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar de camundongos silicóticos

A partir da fagocitose de partículas de sílica, macrófagos liberam uma gama de mediadores inflamatórios responsáveis pelo recrutamento de outras células do sistema imune, amplificando a cascata da resposta inflamatória (Sato *et al.*, 2008).

Resolvemos então, investigar primeiramente o perfil de quimiocinas importantes no recrutamento de neutrófilos para o sítio com injúria. Constatamos que, no tecido pulmonar de animais expostos à sílica, houve uma elevada produção das quimiocinas C-C (MIP-1 α) e C-X-C (MIP-2) (Figuras 4.7A e B, respectivamente) quando comparado aos seus respectivos controles. Entretanto, notamos uma redução em torno de 50% nos níveis de MIP-1 α e MIP-2 no grupo MIF^{-/-} sílica em comparação ao grupo WT sílica. A produção de citocinas relevantes no processo silicótico e reconhecidamente dotadas de potencial fibrogênico, TNF- α e TGF- β , apresentou-se elevada em ambos os grupos de animais silicóticos quando comparados aos seus respectivos controles (Figuras 4.7C e D). O grupo silicótico deficiente de MIF não apresentou diferença na produção de TNF- α (Figura 4.7C), 7 dias após instilação de sílica, entretanto, observamos elevação nos níveis de TGF- β , quando comparado ao grupo selvagem (Figura 4.7D).

Na fase crônica, observamos que os animais silicóticos apresentaram níveis elevados de produção das quimiocinas analisadas, em relação aos respectivos controles (Figuras 4.8A e B). Notamos no grupo MIF^{-/-} sílica, níveis menores de MIP-1 α e MIP-2 em comparação ao grupo WT e vale ressaltar que a redução nos níveis de MIP-2 foi ainda maior (em torno de 65%) 28 dias pós-sílica (Figuras 4.8B), quando comparado ao detectado na fase aguda da silicose. Este resultado sugere a redução da migração de células inflamatórias na ausência de MIF.

Em relação às citocinas fibrogênicas, em 28 dias, a resposta encontrada foi um aumento significativo da produção de TNF- α e TGF- β no grupo MIF^{-/-}, quando comparada à resposta observada no grupo WT sílica (Figuras 4.8C e D).

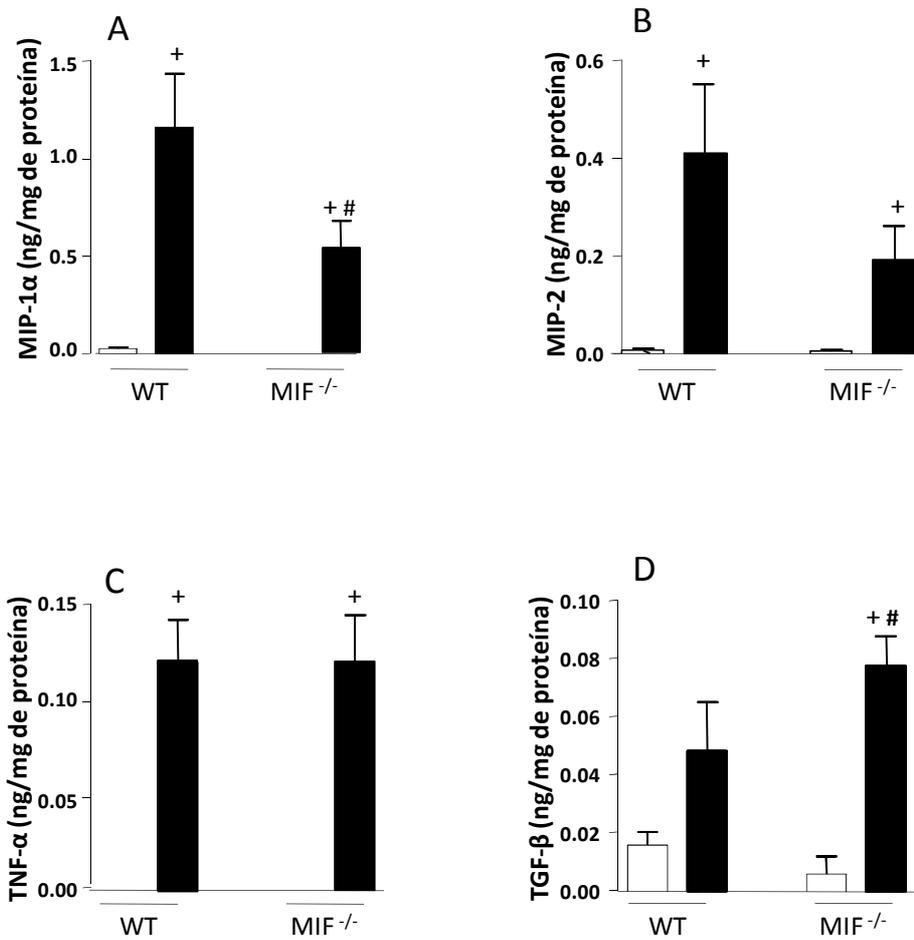


Figura 4.7: Geração de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar de camundongos WT e MIF^{-/-}, 7 dias após instilação intranasal de salina (colunas brancas) ou sílica (10 mg/50 μL) (colunas pretas). Quimiocinas MIP-1α e MIP-2 em A e B; e citocinas TNF-α e TGF-β em C e D, respectivamente. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais. + $p < 0,05$ comparado aos respectivos grupos salina; # $p < 0,05$ comparado ao grupo WT sílica.

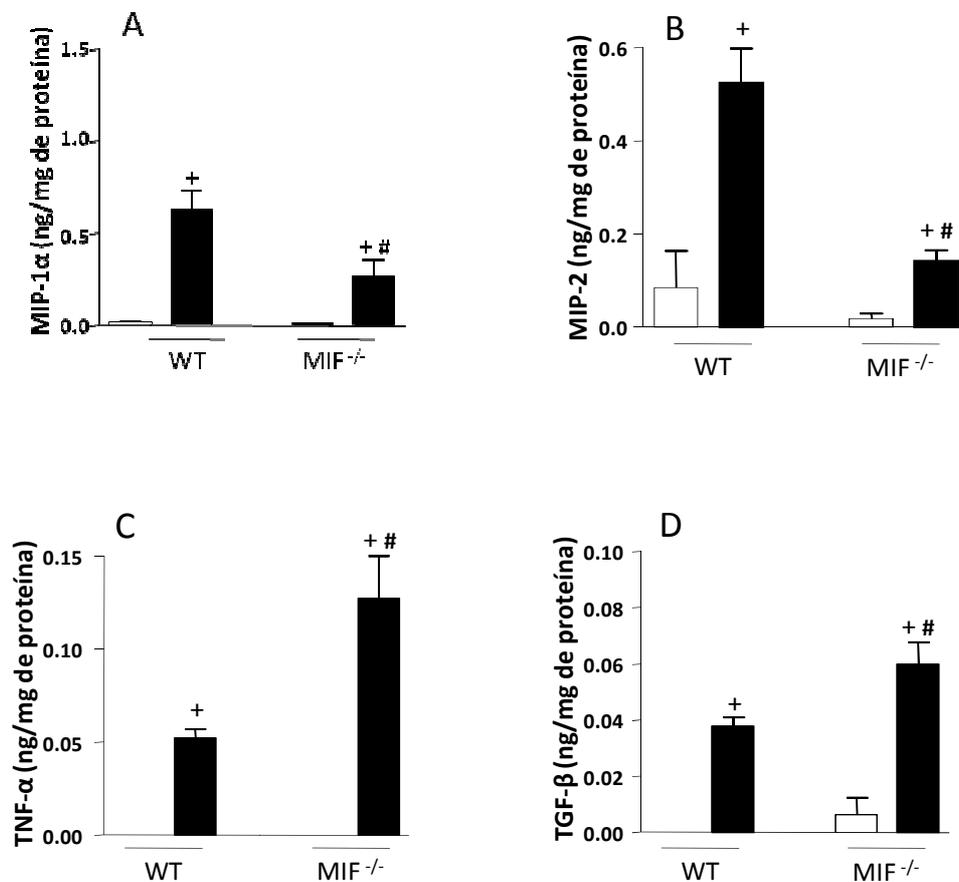


Figura 4.8: Geração de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar de camundongos WT e MIF^{-/-}, 28 dias após instilação intranasal de salina (colunas brancas) ou sílica (10 mg/50 μ L) (colunas pretas). Quimiocinas MIP-1 α e MIP-2 em A e B; e citocinas TNF- α e TGF- β em C e D, respectivamente. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de no mínimo 6 animais. ⁺ $p < 0,05$ comparado aos respectivos grupos salina; [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo WT sílica.

4.6 Análise da expressão de F4/80 no tecido pulmonar de camundongos silicóticos

Dando continuidade ao trabalho e tendo em vista a importância das células inflamatórias no contexto da silicose, resolvemos investigar a expressão de F4/80, um reconhecido marcador de macrófagos ativados, através de imunohistoquímica.

Vimos, na fase aguda, uma intensa marcação no tecido pulmonar dos grupos de animais silicóticos (WT e MIF^{-/-}) quando comparados aos grupos de animais instilados com salina (Figuras 4.9B e D; Figuras 4.9A e C, respectivamente). O grupo MIF^{-/-} sílica (Figura 4.9D) apresentou redução significativa da expressão de F4/80 em relação ao grupo WT sílica (Figura 4.9B). A avaliação quantitativa por meio da contagem de pixels ratificou os achados descritos acima, indicando um menor infiltrado de macrófagos no pulmão dos animais knockout para MIF (Figura 4.9E).

Perfil semelhante foi observado em 28 dias, onde a marcação no grupo WT sílica se manteve elevada em relação ao grupo WT salina (Figuras 4.10B), assim como o grupo MIF^{-/-} sílica em relação ao seu respectivo controle (Figuras 4.10D). Adicionalmente, a marcação que evidencia macrófagos ativados manteve-se reduzida no grupo silicótico deficiente de MIF (Figura 4.10D e Figura 4.10E), condição essa, possivelmente relacionada à presença de granulomas dotados de menor infiltrado inflamatório.

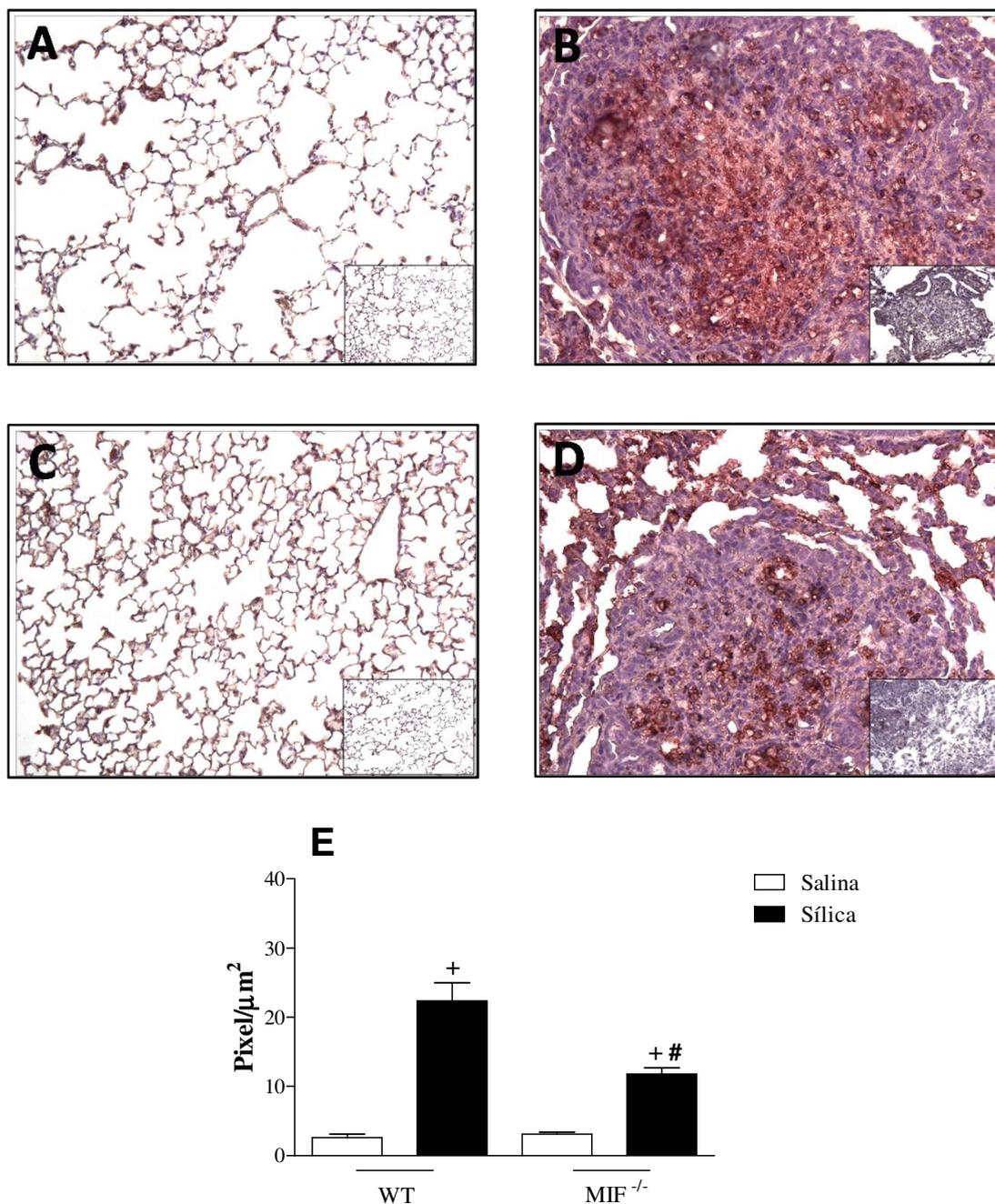


Figura 4.9: Avaliação da expressão de F4/80 em cortes histológicos do pulmão de camundongos WT (painéis superiores) e MIF^{-/-} (painéis inferiores), 7 dias após instilação intranasal de salina (A, C) ou sílica (10 mg/50 μL) (B, D). Análise quantitativa da expressão de F4/80 no pulmão através da contagem por pixels (E). As figuras inseridas representam o controle negativo do ensaio, ou seja, sem a adição do anticorpo primário. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. Salina (n= 6) e sílica (n= 8). ⁺ $p < 0,05$ comparado aos respectivos grupos salina; [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo WT sílica. Os cortes histológicos foram contracolorados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Aumento de 200x.

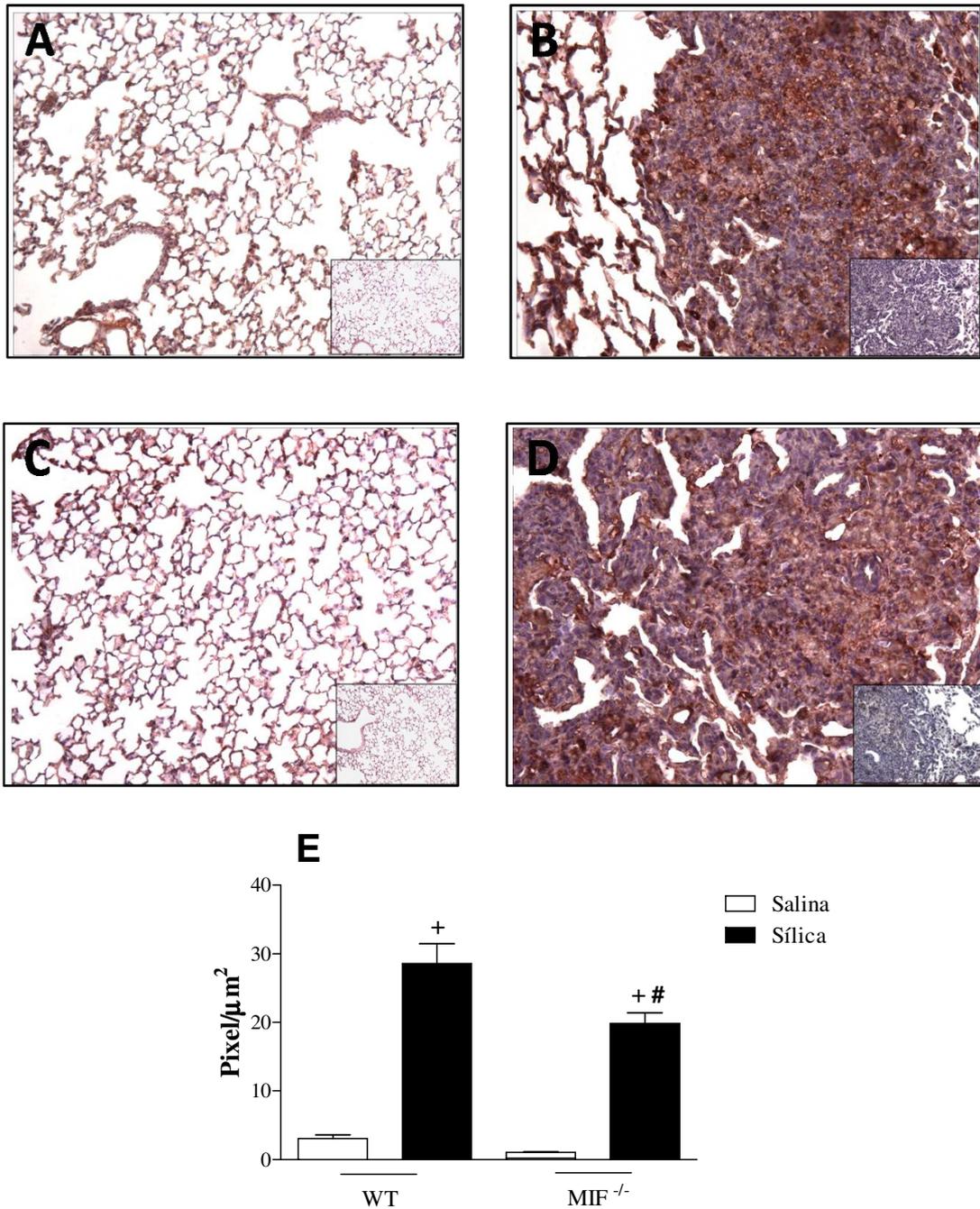


Figura 4.10: Avaliação da expressão de F4/80 em cortes histológicos do tecido pulmonar de camundongos WT (painéis superiores) e MIF^{-/-} (painéis inferiores), 28 dias após instilação intranasal de salina (A, C) ou sílica (10 mg/50 μL) (B, D). Análise quantitativa da expressão de F4/80 no pulmão através da contagem por pixels (E). As figuras inseridas representam o controle negativo do ensaio, ou seja, sem a adição do anticorpo primário. Os resultados representam a média ± erro padrão da média. Salina (n= 6) e sílica (n= 8). ⁺ *p* <0,05 comparado aos respectivos grupos salina; [#] *p* <0,05 comparado ao grupo WT sílica. Os cortes histológicos foram contracolorados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Aumento de 200x.

4.7 Análise da expressão de α -actina de músculo liso no tecido pulmonar de camundongos silicóticos

Outro ponto relevante no que diz respeito ao desenvolvimento de respostas inflamatórias crônicas é a ocorrência de remodelamento, envolvendo a proliferação de células mesenquimais com a finalidade de restaurar a arquitetura do tecido. Sendo assim, buscamos avaliar a presença de células estritamente relacionadas a esse processo, realizando uma imunohistoquímica no tecido pulmonar, com a utilização de anticorpo anti- α -actina de músculo liso (α -SMA), proteína expressa em miofibroblastos diferenciados a partir de fibroblastos ativados durante processo de injúria tecidual.

Verificamos a presença de marcação acentuada em ambos os grupos de camundongos silicóticos (Figuras 4.11B e D) quando comparados aos seus respectivos controles (Figuras 4.11A e C), indicando assim, através da expressão de α -SMA, a identificação de miofibroblastos no tecido pulmonar dos animais expostos à sílica, no tempo de 7 dias. O grupo MIF^{-/-} sílica apresentou redução significativa da expressão desse marcador molecular (Figura 4.11D) em relação ao grupo WT sílica, atestado através da quantificação da intensidade de coloração dos cortes expressa como (pixels/ μm^2) (Figura 4.11E).

Na fase crônica da silicose experimental, observamos acentuada expressão de α -SMA no grupo de animais selvagens (Figura 4.12B), ao passo que, o grupo deficiente de MIF exibiu uma marcação de maior intensidade de miofibroblastos no tecido pulmonar (Figura 4.12D) em relação ao grupo WT sílica (Figura 4.12B), representado em um aumento de aproximadamente 3 vezes em comparação ao observado em 7 dias (Figura 4.11D). Estes resultados corroboram os achados anteriores indicativos de um processo fibrótico exacerbado no pulmão dos animais MIF^{-/-} silicóticos 28 dias pós-sílica, evidenciado por corte histológico, através de técnicas clássicas de coloração (Figura 4.4D).

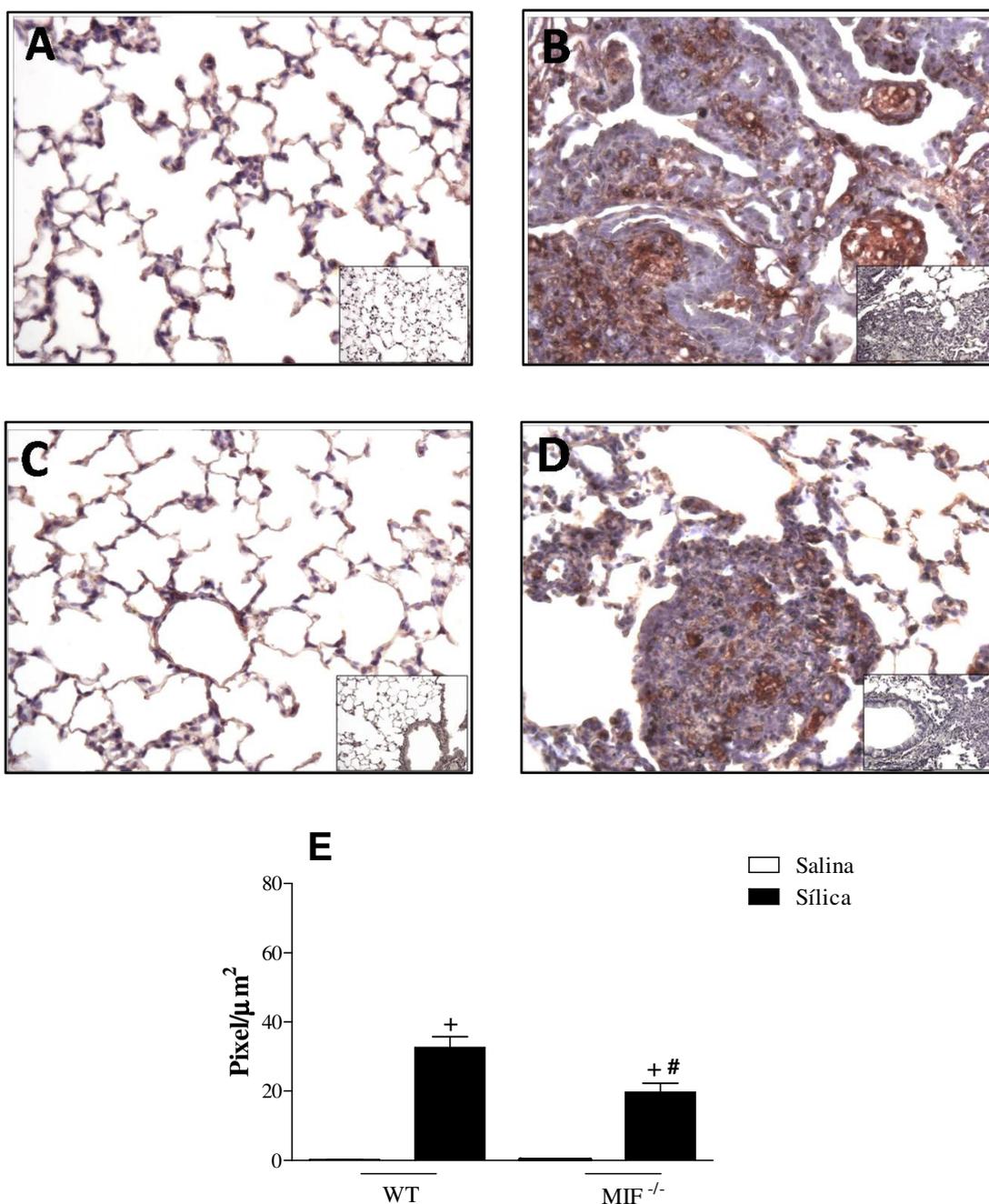


Figura 4.11: Avaliação da expressão de α -SMA em cortes histológicos do pulmão de camundongos WT (painéis superiores) e $MIF^{-/-}$ (painéis inferiores), 7 dias após instilação intranasal de salina (A, C) ou sílica (10 mg/50 μ L) (B, D). Análise quantitativa da expressão de α -SMA no pulmão através da contagem por pixels (E). As figuras inseridas representam o controle negativo do ensaio, ou seja, sem a adição do anticorpo primário. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. Salina (n= 6) e sílica (n= 8). ⁺ $p < 0,05$ comparado aos respectivos grupos salina; [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo WT sílica. Os cortes histológicos foram contracorados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Aumento de 200x.

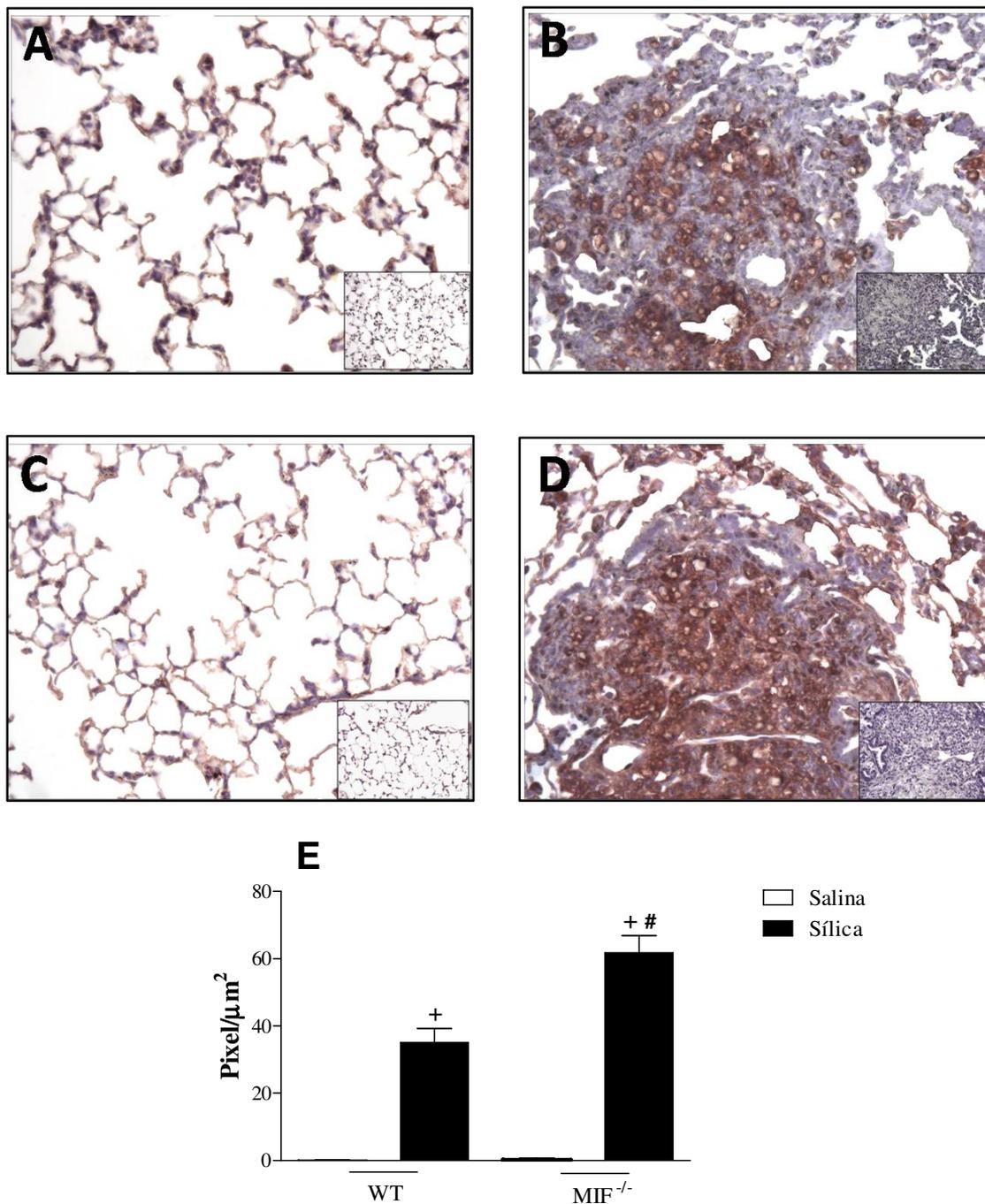


Figura 4.12: Avaliação da expressão de α -SMA em cortes histológicos do pulmão de camundongos WT (painéis superiores) e MIF^{-/-} (painéis inferiores), 28 dias após instilação intranasal de salina (A, C) ou sílica (10 mg/50μL) (B, D). Análise quantitativa da expressão de α -SMA no pulmão através da contagem por pixels (E). As figuras inseridas representam o controle negativo do ensaio, ou seja, sem a adição do anticorpo primário. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. Salina (n= 6) e sílica (n= 8). + $p < 0,05$ comparado aos respectivos grupos salina; # $p < 0,05$ comparado ao grupo WT sílica. Os cortes histológicos foram contracolorados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Aumento de 200x.

4.8 Efeito do tratamento anti-MIF na função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas após instilação de sílica

A fim de validar os dados obtidos a partir da utilização de camundongos deficientes de MIF no modelo experimental de silicose, nesta próxima etapa, realizamos através do tratamento com anticorpo anti-MIF, a neutralização do fator inibidor da migração de macrófagos na injúria pulmonar aguda induzida por sílica.

Primeiramente, a análise da função pulmonar nos camundongos do grupo sílica, indicou alteração basal do parâmetro de resistência pulmonar (Figura 4.13A), constituída de níveis aumentados em relação ao grupo controle. Como esperado, o grupo de animais tratado com soro não-imune (200 µg/animal) não apresentou alteração do parâmetro de resistência em relação ao grupo sílica (Figura 4.13A). Camundongos tratados com anticorpo anti-MIF apresentaram redução significativa na condição basal, com níveis de resistência próximos ao detectado no grupo salina (Figura 4.13A). Após aerolização de concentrações crescentes (3 – 27 mg/mL) do agente broncoconstrictor metacolina, observamos um aumento concentração-dependente nos níveis de resistência pulmonar no grupo sílica em relação ao seu controle (Figura 4.13A), e na condição de neutralização do MIF notamos redução desses níveis (Figura 4.13A) quando comparado ao grupo WT sílica, de forma similar ao detectado anteriormente nos animais MIF^{-/-}.

Quanto ao outro parâmetro em questão, de elastância pulmonar, verificamos uma alteração basal no grupo sílica quando comparado ao grupo salina (Figura 4.13B), enquanto que o grupo tratado com IgG se manteve equiparado ao perfil detectado com o grupo sílica (Figura 4.13B). O tratamento com o anticorpo anti-MIF produziu redução significativa dos níveis de elastância pulmonar na condição basal (Figura 4.13B), assim como após aerolização do agente broncoconstrictor (Figura 4.13B), indicando claramente um menor comprometimento da função pulmonar na fase aguda da silicose.

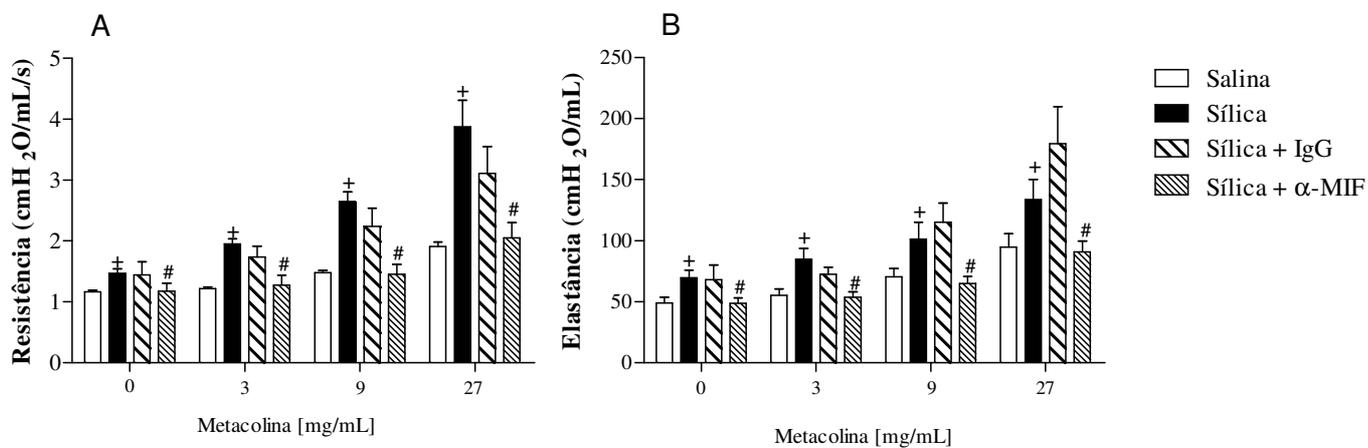


Figura 4.13: Efeito do tratamento com anticorpo anti-MIF (200 μ g/animal) sobre a função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas frente à aerolização de metacolina (3 - 27 mg/mL). Resistência (A) e elastância pulmonares (B), 7 dias após instilação de sílica (10 mg/50 μ L). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (n=5). ⁺ $p < 0,05$ comparado ao grupo salina; [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo sílica.

4.9 Efeito do tratamento anti-MIF sobre as alterações morfológicas no parênquima pulmonar após instilação de sílica

Sabendo que o fenômeno de comprometimento da função pulmonar é refletido no quadro histopatológico, buscamos analisar o efeito do tratamento com anticorpo anti-MIF, 7 dias pós-sílica, no tecido pulmonar dos camundongos.

Os animais do grupo controle exibiram arquitetura do parênquima pulmonar normal, com suas estruturas preservadas e sem qualquer indicativo de infiltrado inflamatório (Figura 4.14A). Conforme ilustrado na Figura 4.14B, camundongos instilados com sílica apresentaram alteração das estruturas do parênquima pulmonar, incluindo espessamento dos septos alveolares e presença de infiltrado celular. O tratamento com IgG não-imune (200 µg/animal) (Figura 4.14C) resultou em alterações morfológicas semelhantes ao observado no grupo sílica. Na condição de neutralização do MIF, detectamos uma menor área de granuloma (Figura 4.14D), confirmado através da análise morfométrica (Figura 4.14E) e corroborando os achados anteriores da participação do MIF como mediador pró-inflamatório de fase aguda da silicose.

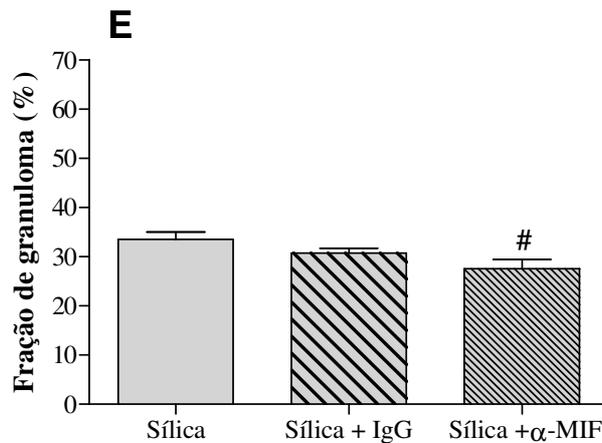
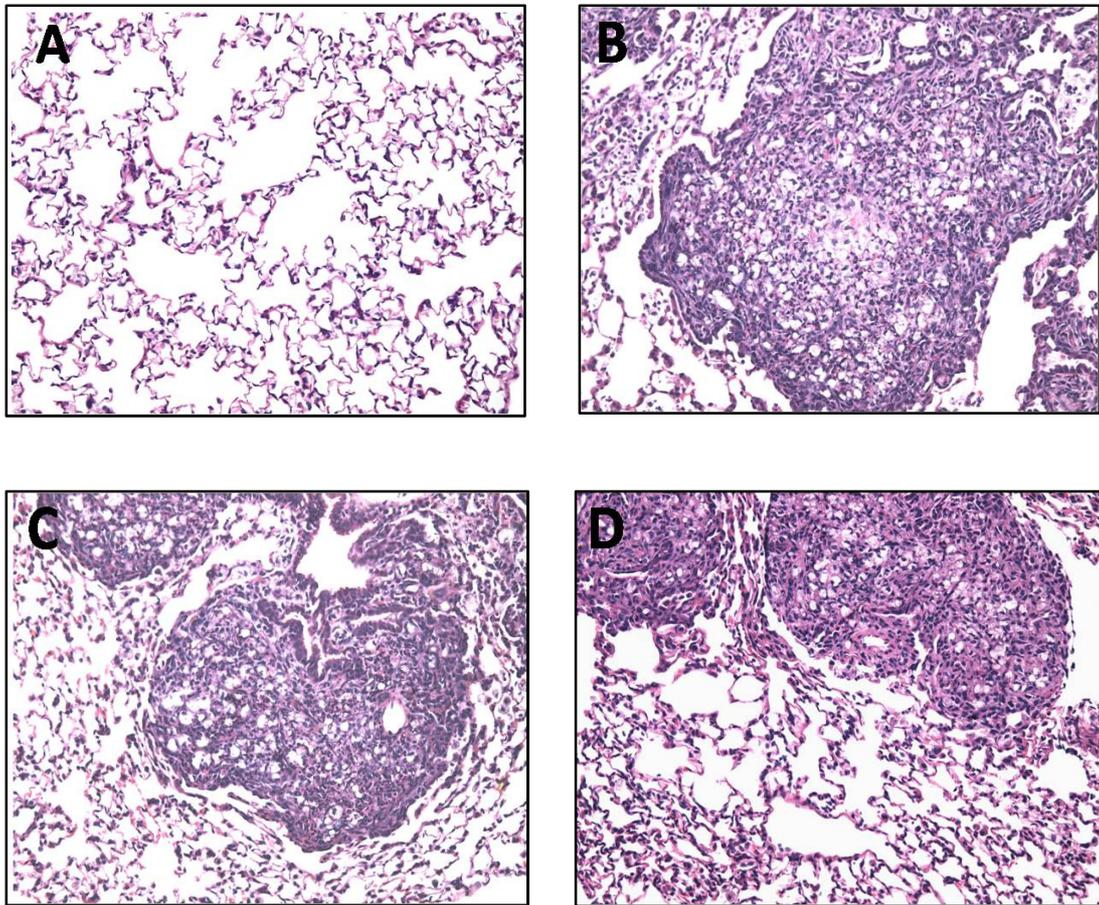


Figura 4.14: Efeito do tratamento com anticorpo anti-MIF (200 μ g/animal) sobre as alterações morfológicas no pulmão, 7 dias após instilação intranasal de salina (A) ou sílica (10 mg/50 μ L) (B, C e D). Camundongos tratados com IgG não-imune (C) e camundongos tratados com anti-MIF (D). Avaliação quantitativa da área de granuloma no pulmão através da técnica de morfometria (E). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. Salina (n= 6) e sílica (n= 8). [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo sílica. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Aumento de 200x.

5. Discussão

A inalação de partículas de sílica na forma livre e cristalina acarreta o desenvolvimento da pneumoconiose denominada silicose, caracterizada por um processo inflamatório pulmonar crônico, evidenciado por resposta granulomatosa e fibronodular (Thakur *et al.*, 2009). O curso da doença humana é insidioso e sua progressão ocorre mesmo na ausência de exposição contínua à sílica, levando a um quadro de insuficiência respiratória e invalidez.

A silicose tem sido reproduzida em diferentes modelos animais, os quais desenvolvem mudanças morfológicas similares ao observado na patologia humana (Ramos *et al.*, 1988), de forma a proporcionar um melhor entendimento acerca dos eventos iniciais que compõem a fase inflamatória aguda, e por sua vez, as alterações tardias subseqüentes, características da fase crônica da doença. Nesta tese, utilizamos um modelo não-invasivo de silicose, onde os animais foram instilados por via intranasal com uma pequena quantidade de sílica (10 mg), em oposição ao estudo elaborado por Perez-Ramos *et al.* (1999) de indução intratraqueal com 50 mg de sílica. Nosso método de exposição às partículas apresenta eficácia quanto à defesa desencadeada no pulmão dos camundongos, visto que, uma dose excessiva de sílica pode vir a produzir efeitos precoces não relevantes àqueles esperados com doses menores e observados na fisiopatologia humana. Além disso, o presente estudo dispôs de um protocolo que garantiu a distribuição homogênea das partículas no pulmão em comparação à distribuição gravitacional observada no modelo intratraqueal (Brain *et al.*, 1976). A utilização de camundongos geneticamente deficientes do fator inibidor da migração de macrófagos permitiu a análise direta da participação desse mediador na silicose.

O MIF é uma citocina pró-inflamatória descoberta há mais de 40 anos e recentemente reconhecida como potente mediador de respostas imunológicas. Participa da patogênese de doenças inflamatórias agudas e crônicas como choque séptico, artrite reumatóide e síndrome do desconforto respiratório agudo, amplificando a cascata de reações inflamatórias (Kitaichi *et al.*, 2000, Nishihira *et al.*, 2003). Dessa maneira, por apresentar-se em níveis aumentados em patologias de natureza inflamatória e por ter ampla distribuição tecidual, principalmente em órgãos de contato direto com o ambiente natural do hospedeiro, como o pulmão (Calandra and Roger, 2003), objetivamos investigar a participação do MIF na resposta pulmonar murina, frente à estimulação com sílica.

As pneumoconioses, as quais são estudadas dentro do grupo de doenças intersticiais pulmonares, apresentam como característica comum a restrição funcional representada pela diminuição da expansibilidade do parênquima. Usualmente são adotados testes de função pulmonar com o objetivo de se determinar o grau de comprometimento no pulmão dos pacientes silicóticos. Zanotto and Boner (1985) sugeriram o envolvimento da condição de hiperreatividade brônquica, onde as vias aéreas apresentam resposta broncoconstrictora intensa à determinado estímulo provocativo, em patologias caracterizadas por comprometimento do processo de trocas gasosas, tais como: inflamação, infecção ou exposição à alérgenos. No presente estudo, realizamos um ensaio de mecânica respiratória onde camundongos WT e MIF^{-/-} silicóticos apresentaram, 7 dias pós-sílica, alteração basal dos parâmetros analisados: resistência (capacidade das vias aéreas em resistir à entrada de ar) e elastância pulmonar (propriedade de resistência à deformação por forças estranhas, sendo expressa como o inverso da complacência pulmonar) (Berne and Levy, 2000). O grupo de animais deficientes de MIF apresentou níveis reduzidos dos parâmetros em questão quando comparado ao grupo WT sílica, e após aerossolização de concentrações crescentes (3 – 27 mg/mL) do agente broncoconstrictor metacolina, observamos um aumento concentração-dependente nos níveis de resistência e elastância pulmonar no grupo WT sílica em relação ao seu controle, fenômeno que mostrou-se marcadamente reduzido nos animais MIF^{-/-} sílica. Esses achados apontam claramente supressão do quadro de hiperreatividade das vias aéreas em resposta à provocação com metacolina. No tempo de 28 dias, verificamos que os camundongos de ambos os grupos silicóticos apresentaram alteração da capacidade pulmonar na condição basal, representada por níveis elevados de resistência das vias aéreas e elastância pulmonar. O resultado encontra suporte em dados na literatura, que demonstram a partir de testes de função pulmonar, comprometimento restritivo da ventilação com aumento da elastância e diminuição da capacidade de difusão em doença inflamatória granulomatosa (Mohr, 2004). Notamos ainda, na fase crônica, que a metacolina induziu broncoconstrição das vias aéreas nos grupos silicóticos, sendo que o grupo MIF^{-/-} sílica apresentou aumento significativo nos níveis de resistência e elastância pulmonar em relação ao grupo WT sílica, indicando um maior comprometimento do quadro silicótico no grupo “knockout”.

Acredita-se que o processo de injúria pulmonar é iniciado devido às características aerodinâmicas das partículas, como tamanho e propriedades de superfície (Albrecht *et al.*, 2005), no entanto, o influxo de células inflamatórias tem recebido grande destaque nesse sentido. A regulação da resposta pulmonar na silicose é um processo complexo que envolve a

tolerância às partículas ambientais. A injúria respiratória interfere na homeostase imunológica através da indução de uma resposta inflamatória inicial, compreendida pela ativação de populações de células residentes e subsequente acúmulo de diferentes tipos celulares do sistema imunológico, visto que o pulmão é um órgão ricamente vascularizado, o que possibilita a migração de leucócitos através dos capilares. As primeiras células responsáveis por mecanismos de defesa incluem macrófagos e neutrófilos, os quais eliminam debris celulares, células mortas e organismos invasores. Após 7 dias de instilação de sílica, nossos resultados revelaram no lavado broncoalveolar, um aumento significativo no número de leucócitos totais presentes nos grupos WT e MIF^{-/-} sílica, quando comparados aos respectivos grupos salina. Essas células constituíram-se de mononucleares e polimorfonucleares. Vale ressaltar que, o grupo MIF^{-/-} sílica apresentou redução do número de leucócitos totais em relação ao grupo selvagem, refletido principalmente pelo número diminuído de neutrófilos. O mesmo perfil de celularidade manteve-se presente até o tempo de observação mais tardio, o qual corresponde à fase crônica da doença, onde notamos aumento no número de macrófagos no grupo WT, assim como no grupo deficiente de MIF, contudo, neste último, o número de células mononucleares encontrou-se reduzido quando comparado ao selvagem. Observamos ainda, uma tendência de redução no número de neutrófilos no grupo MIF^{-/-} sílica. É descrito na literatura que o fator inibidor da migração de macrófagos promove sobrevida de células inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos, através da inibição da apoptose mediada pela proteína p53 e participando de forma ativa no retardo da clivagem das moléculas pró-apoptóticas Bid e Bax, assim como, no bloqueio da liberação do citocromo C pela mitocôndria (Mitchell *et al.*, 2002), respectivamente. Outra explicação para o número reduzido de neutrófilos é que os macrófagos do grupo “knockout” estariam com atividade quimiotática reduzida após instilação de sílica, dificultando o recrutamento de polimorfonucleares. Tendo em vista que a transmigração de neutrófilos para o compartimento e interstício alveolares apresenta papel crucial no estabelecimento da inflamação pulmonar aguda, direcionamos as análises para o tecido pulmonar dos camundongos.

Conforme previamente descrito (Sato *et al.*, 2008) a instilação de sílica induz inflamação no parênquima pulmonar, o que foi possível constatar nos grupos selvagem e nos animais MIF^{-/-} sílica. Em confirmação aos dados de celularidade observados no lavado broncoalveolar, camundongos deficientes de MIF apresentaram redução da resposta inflamatória 7 dias pós-sílica, atestado pela atenuação do infiltrado inflamatório tecidual, nódulos silicóticos de menor proporção no pulmão e redução de fibras colágenas, reafirmando

a participação do MIF na fase aguda da silicose. Nossos resultados referentes à fase crônica apontaram para a formação de fibrose nos camundongos expostos à sílica (WT e MIF^{-/-}), demonstrando a progressão da patologia, desde o alvéolo contendo o foco de células inflamatórias durante a fase aguda para a plena formação de granulomas peribronquiolares em 28 dias. No entanto, o grupo de camundongos MIF^{-/-} sílica apresentou granulomas extensos, ocupando grande parte do pulmão e com aspecto morfológico diferente dos granulomas observados no grupo WT. Esses apresentaram coloração rosada e presença de menor infiltrado inflamatório na região central. Vale ressaltar que a diminuição de fibras colágenas observada é indicativa de um processo intenso de natureza necrótica com degradação de componentes de matriz extracelular por MMPs e padrão similar ao detectado em outras patologias granulomatosas dotadas de zonas de necrose caseosa (Saunders and Britton, 2007). Nossos resultados confirmam ainda os achados de Satoskar *et al.* (2001), onde no modelo de infecção por *Leishmania major* camundongos deficientes de MIF apresentaram resposta granulomatosa intensa. A fibrose resulta tipicamente de inflamação crônica, sendo definida por uma resposta imunológica que permanece por meses e na qual, a inflamação e o processo de reparo tecidual ocorrem de forma simultânea. As patologias fibróticas apresentam em comum a persistência do agente agressor, o qual induz a liberação de mediadores inflamatórios de forma a estimular a substituição e nova síntese de componentes de matriz em um processo conhecido como “turnover” (Stetler-Stevenson, 1996, Wynn, 2007). Por ser um composto extremamente tóxico, a sílica é susceptível à formação de radicais livres em sua superfície quando em contato com água e lipoproteínas presentes na camada de revestimento alveolar, podendo contribuir de forma ativa para a resposta granulomatosa exacerbada encontrada no grupo de camundongos deficientes de MIF na fase crônica da silicose. Além disso, a redução de células inflamatórias numa fase inicial pode relacionar-se a uma desestruturação na montagem dos mecanismos de defesa no hospedeiro.

Há mais de 10 anos descobriu-se que partículas inaláveis de origem ocupacional como a sílica foram consideradas importantes indutores do fator nuclear kB (NF-kB) (Chen *et al.*, 1995), responsável em controlar a expressão de genes que codificam diferentes mediadores inflamatórios (Chen *et al.*, 1999, Karin and Ben-Neriah, 2000). Estudos conduzidos por Chen *et al.* (1995) e dados obtidos em nosso laboratório (não-mostrados) indicam a sílica como potencial indutor de translocação nuclear do NF-kB em macrófago murino. Sabe-se que a fibrose pulmonar é descrita em humanos e modelos experimentais em associação à inflamação crônica pulmonar caracterizada pelo acúmulo de macrófagos, linfócitos e

granulócitos (Gross and Hunninghake, 2001). Essas células inflamatórias constituem a principal fonte de liberação de mediadores como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que por sua vez, possuem a habilidade de estimular a proliferação de fibroblastos, em um cenário tipicamente observado em modelos induzidos por sílica em animais (Bissonnette and Rola-Pleszczynski, 1989).

Evidências experimentais implicam o TNF- α como uma citocina secretada por macrófagos alveolares e fundamental na patogênese da silicose (Gambelli *et al.*, 2004, Rojanasakul *et al.*, 1999). Sua expressão é regulada de forma positiva nos pulmões de camundongos expostos à sílica de maneira que precede ao desenvolvimento de fibrose pulmonar. Em concordância com os achados descritos, observamos logo na fase inicial de nosso modelo, aumento da produção de TNF- α nos grupos WT e MIF^{-/-} sílica. Todavia, na fase crônica encontramos níveis elevados de produção da mesma no grupo deficiente de MIF, assim como, produção aumentada de outra citocina dotada de potencial fibrogênico, TGF- β (Border *et al.*, 1992, Sato *et al.*, 2003) quando comparado ao grupo selvagem, corroborando a idéia de uma resposta fibrogênica exacerbada no grupo MIF^{-/-}. Na silicose humana, o reparo tecidual é orquestrado por uma sequência de eventos bioquímicos e celulares (Park and Barbul, 2004). O TGF- β , identificado a partir de macrófagos e fibroblastos (Rimal *et al.*, 2005), tem recebido destaque principalmente por ser um fator de crescimento diretamente relacionado ao crescimento e proliferação de células mesenquimais, com a finalidade de restaurar a arquitetura do tecido. Avaliamos através de imunohistoquímica a presença de miofibroblastos, ativados a partir de fibroblastos residentes durante o desencadeamento do processo de injúria tecidual. Para tal, utilizamos anticorpo anti- α -actina de músculo liso, uma vez que essa proteína é expressa pelas células em questão. Verificamos marcação acentuada em ambos os grupos de camundongos expostos à sílica em relação aos respectivos controles, possibilitando assim, através da expressão de α -SMA a identificação de miofibroblastos no tecido pulmonar desses animais. Na fase aguda da silicose, o grupo MIF^{-/-} sílica apresentou redução significativa do marcador molecular em relação ao grupo WT sílica. Contudo, 28 dias pós-sílica, o grupo deficiente de MIF exibiu marcação de maior intensidade de miofibroblastos no tecido pulmonar, reafirmando presença de inflamação exacerbada observada no tempo correspondente à fase crônica.

Dando continuidade à análise dos mediadores importantes no curso da silicose, partimos para investigar as quimiocinas que regulam a transmigração de leucócitos para o compartimento alveolar e interstício pulmonar em processos inflamatórios (Charo and

Ransohoff, 2006). Nossos dados foram consistentes com observações anteriores (Driscoll, 1994) sobre o aumento da produção de quimiocinas C-C e C-X-C após exposição de sílica. Foi demonstrado que o MIF atua como ligante não cognato de receptores de quimiocinas C-X-C (CXCR2 e CXCR4) (Bernhagen *et al.*, 2007, Dewor *et al.*, 2007). Os animais MIF^{-/-} sílica apresentaram em ambos os tempos de análise, redução nos níveis de MIP-1 α (C-C) e MIP-2 (C-X-C), relacionadas à quimiotaxia de monócitos e neutrófilos, respectivamente (Holmes *et al.*, 2002), quando comparado ao grupo WT sílica. Uma vez que essas quimiocinas promovem um “loop” inflamatório positivo responsável pela manutenção da resposta local, podemos justificar a atenuação da injúria observada no grupo MIF^{-/-} na fase aguda da silicose e a menor marcação de macrófagos ativados no tecido pulmonar desses animais, através da expressão reduzida de F4/80 realizada por imunohistoquímica.

Através da utilização de camundongos “knockout” para o fator inibidor da migração de macrófagos, demonstramos sua participação na inflamação pulmonar aguda no modelo de silicose. Com a finalidade de validar os dados obtidos até o momento e aprofundar o entendimento acerca do efeito do MIF endógeno, foram realizados experimentos utilizando anticorpo anti-MIF. As primeiras pesquisas experimentais visando bloquear as ações do MIF envolveram a terapia neutralizante via anticorpo anti-MIF. Em respostas imunoinflamatórias severas como a sepse, responsável por uma alta taxa de mortalidade e morbidade em unidades de terapia intensiva, a administração de anticorpo anti-MIF anteriormente ou após indução de choque séptico, protegeu os camundongos da condição de choque endotóxico letal (Bernhagen *et al.*, 1993, Calandra *et al.*, 2000). De forma similar, na sepse causada por bactérias Gram-positivas, a neutralização do MIF com anticorpos específicos, aumentou de forma significativa a sobrevivência dos animais (Calandra *et al.*, 1998).

Recentemente, foi demonstrado que camundongos tratados com anticorpo anti-MIF exibiram atenuação significativa do fenômeno de hiperreatividade tanto à metacolina inalada como à ovoalbumina no modelo de asma experimental induzido por ovoalbumina (Kobayashi *et al.*, 2006). Além disso, o aumento da reatividade induzida pelo agente broncoconstrictor em camundongos deficientes de MIF também encontrou-se reduzido quando comparado ao grupo de camundongos WT (Magalhaes *et al.*, 2007). Nossos resultados referentes ao efeito do tratamento neutralizante sobre o comprometimento na função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas detectados após instilação de sílica indicou, alteração basal nos parâmetros de resistência e elastância pulmonar no grupo silicótico, ao passo que, como esperado, camundongos tratados com anticorpo anti-MIF (200 μ g/animal) apresentaram redução

significativa dos parâmetros na condição basal com níveis próximos ao detectado no grupo salina. Após aerolização de concentrações crescentes de metacolina, notamos aumento nos níveis de resistência e elastância pulmonar no grupo sílica e mais uma vez, na condição de neutralização do fator, verificamos redução significativa desses níveis, corroborando os dados observados anteriormente nos animais MIF^{-/-} no tempo de 7 dias.

Através da análise histológica 7 dias pós-sílica, foi possível observar certo comprometimento tecidual no grupo silicótico, constituído de espessamento septal e presença de infiltrado celular, enquanto que o grupo tratado com anti-MIF apresentou redução do infiltrado inflamatório nos espaços aéreos, confirmado através de análise morfométrica. Tendo em vista que a destruição tecidual pode ocorrer em parte pela ação de enzimas proteolíticas liberadas por células inflamatórias e que o mecanismo de apoptose celular no sítio inflamatório é um processo importante para delimitar a resposta inflamatória, isto é, contribuir para a resolução da mesma, dados bibliográficos mostram a participação do MIF como fator inibidor de apoptose de diferentes tipos celulares (Baumann *et al.*, 2003, Nguyen *et al.*, 2003). Macrófagos obtidos de camundongos deficientes de MIF exibiram aumento de apoptose celular em comparação aos camundongos WT (Mitchell *et al.*, 2002). Em adição, a administração de MIF recombinante reduziu a apoptose induzida por óxido nítrico na linhagem macrofágica celular RAW 264.7 (Baumann *et al.*, 2003). Sendo assim, a atividade neutralizante anti-MIF pode aumentar a apoptose de células inflamatórias, resultando por sua vez, em um considerável decréscimo de infiltrado celular. De forma a somar e sustentar essa hipótese, resultados reportados da literatura indicam supressão de acúmulo de neutrófilos induzido por LPS no pulmão de ratos tratados com anti-MIF via efeito reduzido nos níveis de MIP-2 (Makita *et al.*, 1998). Foram encontrados também, níveis reduzidos das quimiocinas MIP-2 e KC no tecido pulmonar de animais silicóticos tratados com anticorpo neutralizante anti-MIF em comparação ao grupo sílica (dados não-mostrados), o que nos sugere certa implicação do MIF no infiltrado de neutrófilos induzida por sílica. Estudos prévios realizados por Tanino *et al.* (2002) propuseram o envolvimento do MIF no desenvolvimento da injúria pulmonar aguda. Através de um modelo de indução de fibrose por bleomicina, constataram 7 dias pós-bleomicina, redução do acúmulo de células inflamatórias e redução da expressão de TNF- α nos espaços alveolares juntamente com diminuição da lesão pulmonar histopatológica após tratamento com anti-MIF, estabelecendo, em consistência com nossos achados, a participação do MIF na supressão da injúria pulmonar aguda.

Considerando que a terapia anti-MIF tem recebido ênfase como estratégia imunofarmacológica promissora, a neutralização do MIF através da utilização de anticorpos específicos pode tornar-se uma ferramenta viável para o tratamento de uma gama de patologias inflamatórias. Acreditamos que, os efeitos benéficos da terapia anti-MIF descritos em condições inflamatórias experimentais, permitam a identificação de alvos terapêuticos, isto é, as vias imunológicas exatas de ação do MIF com aplicação futura em tratamentos de doenças em humanos.

Os resultados mostrados nesta tese apresentam relevância principalmente por constituírem a primeira evidência da participação do MIF na fisiopatologia da silicose. Em conjunto, os dados obtidos fazem do MIF um fator modulador do quadro silicótico.

6. Conclusões

Tomando por base os resultados apresentados nesta dissertação, podemos concluir que:

- Através do modelo experimental de silicose não-invasivo foi verificado que a instalação intranasal de dose única de partículas de sílica mostrou-se capaz de induzir resposta inflamatória no parênquima pulmonar dos camundongos, o que se refletiu em comprometimento da função respiratória;
- Camundongos MIF^{-/-} sílica apresentaram atenuação da fase aguda da resposta silicótica, conforme atestado por um menor comprometimento da função pulmonar, diminuição do infiltrado leucocitário e formação de granuloma, assim como, redução dos níveis de quimiocinas estritamente relacionadas ao recrutamento de células inflamatórias;
- Na deficiência do MIF verificou-se uma potenciação da resposta fibrótica na fase crônica da doença, indicada por maior comprometimento da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas, aumento da área ocupada por granulomas no tecido pulmonar e níveis elevados de mediadores pró-fibróticos;
- O tratamento de camundongos silicóticos com anticorpo anti-MIF foi eficaz em reduzir o comprometimento da função pulmonar e o infiltrado de células inflamatórias no tecido pulmonar, confirmando observação anterior da participação do MIF como mediador pró-inflamatório da fase aguda da doença;
- Em conjunto, nossos dados sugerem um papel modulador para o MIF na fisiopatologia da silicose, constituindo um potencial alvo para intervenção terapêutica.

7. Referências Bibliográficas

- 1 Abe R, Peng T, Sailors J, Bucala R, Metz CN. Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol*. 2001 Jan 15;166(2):747-53.
- 2 Akiba S, Sato T. Cellular function of calcium-independent phospholipase A2. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2004 Aug;27(8):1174-8.
- 3 Albrecht C, Knaapen AM, Becker A, Hohr D, Habertzettl P, van Schooten FJ, et al. The crucial role of particle surface reactivity in respirable quartz-induced reactive oxygen/nitrogen species formation and APE/Ref-1 induction in rat lung. *Respiratory research*. 2005;6:129.
- 4 Amin MA, Volpert OV, Woods JM, Kumar P, Harlow LA, Koch AE. Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circulation research*. 2003 Aug 22;93(4):321-9.
- 5 Antao VC, Pinheiro GA, Kavakama J, Terra-Filho M. High prevalence of silicosis among stone carvers in Brazil. *American journal of industrial medicine*. 2004 Feb;45(2):194-201.
- 6 Arcangeli G, Cupelli V, Giuliano G. Effects of silica on human lung fibroblast in culture. *The Science of the total environment*. 2001 Apr 10;270(1-3):135-9.
- 7 Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, et al. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Jul 23;93(15):7849-54.
- 8 Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, Mu W, Metz CN, Chesney JA, et al. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *The American journal of pathology*. 1997 Jan;150(1):235-46.
- 9 Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, Dhabhar FS, Mu W, Metz CN, et al. MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 1998 Apr;4(4):217-30.
- 10 Balaan MR, Weber SL, Banks DE. Clinical aspects of coal workers' pneumoconiosis and silicosis. *Occupational medicine (Philadelphia, Pa)*. 1993 Jan-Mar;8(1):19-34.
- 11 Barbarin V, Nihoul A, Misson P, Arras M, Delos M, Leclercq I, et al. The role of pro- and anti-inflammatory responses in silica-induced lung fibrosis. *Respiratory research*. 2005;6:112.
- 12 Barnes NC. Reducing oral steroids with inhaled steroids: is that all that can be achieved? *Chest*. 2006 May;129(5):1124-5.
- 13 Barnes PJ. Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases. *Cytokine & growth factor reviews*. 2003 Dec;14(6):511-22.

- 14 Baugh JA, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor. *Critical care medicine*. 2002 Jan;30(1 Suppl):S27-35.
- 15 Baumann R, Casaulta C, Simon D, Conus S, Yousefi S, Simon HU. Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *Faseb J*. 2003 Dec;17(15):2221-30.
- 16 Belvisi MG. Regulation of inflammatory cell function by corticosteroids. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2004;1(3):207-14.
- 17 Benigni F, Atsumi T, Calandra T, Metz C, Echtenacher B, Peng T, et al. The proinflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor induces glucose catabolism in muscle. *The Journal of clinical investigation*. 2000 Nov;106(10):1291-300.
- 18 Berne R, Levy M. *Fisiologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.
- 19 Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*. 1993 Oct 21;365(6448):756-9.
- 20 Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nature medicine*. 2007 May;13(5):587-96.
- 21 Beutler B. Application of transcriptional and posttranscriptional reporter constructs to the analysis of tumor necrosis factor gene regulation. *The American journal of the medical sciences*. 1992 Feb;303(2):129-33.
- 22 Bissonnette E, Rola-Pleszczynski M. Pulmonary inflammation and fibrosis in a murine model of asbestosis and silicosis. Possible role of tumor necrosis factor. *Inflammation*. 1989 Jun;13(3):329-39.
- 23 Blackford JA, Jr., Antonini JM, Castranova V, Dey RD. Intratracheal instillation of silica up-regulates inducible nitric oxide synthase gene expression and increases nitric oxide production in alveolar macrophages and neutrophils. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1994 Oct;11(4):426-31.
- 24 Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science (New York, NY)*. 1966 Jul 1;153(731):80-2.
- 25 Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, et al. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature*. 1992 Nov 26;360(6402):361-4.
- 26 Borges VM, Falcao H, Leite-Junior JH, Alvim L, Teixeira GP, Russo M, et al. Fas ligand triggers pulmonary silicosis. *The Journal of experimental medicine*. 2001 Jul 16;194(2):155-64.

- 27 Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, et al. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *The Journal of experimental medicine*. 1999 Jan 18;189(2):341-6.
- 28 Brain JD, Knudson DE, Sorokin SP, Davis MA. Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation. *Environmental research*. 1976 Feb;11(1):13-33.
- 29 Brieland JK, Jackson C, Menzel F, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Halpern J, et al. Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity*. 2001 Mar;69(3):1554-60.
- 30 Bucala R. MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *Faseb J*. 1996 Dec;10(14):1607-13.
- 31 Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews*. 2003 Oct;3(10):791-800.
- 32 Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *The Journal of experimental medicine*. 1994 Jun 1;179(6):1895-902.
- 33 Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Sep 15;95(19):11383-8.
- 34 Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, et al. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nature medicine*. 2000 Feb;6(2):164-70.
- 35 Caramori G, Adcock I. Pharmacology of airway inflammation in asthma and COPD. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2003;16(5):247-77.
- 36 Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Jul 1;105(26):9035-40.
- 37 Castranova V, Vallyathan V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environmental health perspectives*. 2000 Aug;108 Suppl 4:675-84.
- 38 Castranova V, Robinson VA, Frazer DG. Pulmonary reactions to organic dust exposures: development of an animal model. *Environmental health perspectives*. 1996 Mar;104 Suppl 1:41-53.
- 39 Chaqour B, Yang R, Sha Q. Mechanical stretch modulates the promoter activity of the profibrotic factor CCN2 through increased actin polymerization and NF-kappaB activation. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Jul 21;281(29):20608-22.

- 40 Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *The New England journal of medicine*. 2006 Feb 9;354(6):610-21.
- 41 Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinical chemistry*. 1999 Jan;45(1):7-17.
- 42 Chen F, Sun SC, Kuh DC, Gaydos LJ, Demers LM. Essential role of NF-kappa B activation in silica-induced inflammatory mediator production in macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995 Sep 25;214(3):985-92.
- 43 Chen W, Zhuang Z, Attfield MD, Chen BT, Gao P, Harrison JC, et al. Exposure to silica and silicosis among tin miners in China: exposure-response analyses and risk assessment. *Occupational and environmental medicine*. 2001 Jan;58(1):31-7.
- 44 Crowell RE, Heaphy E, Valdez YE, Mold C, Lehnert BE. Alveolar and interstitial macrophage populations in the murine lung. *Experimental lung research*. 1992 Jul-Aug;18(4):435-46.
- 45 Daniel LN, Mao Y, Wang TC, Markey CJ, Markey SP, Shi X, et al. DNA strand breakage, thymine glycol production, and hydroxyl radical generation induced by different samples of crystalline silica in vitro. *Environmental research*. 1995 Oct;71(1):60-73.
- 46 Daun JM, Cannon JG. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic IkappaBalpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Sep;279(3):R1043-9.
- 47 David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1966 Jul;56(1):72-7.
- 48 Delgado L, Parra ER, Capelozzi VL. Apoptosis and extracellular matrix remodelling in human silicosis. *Histopathology*. 2006 Sep;49(3):283-9.
- 49 Denkinger CM, Denkinger M, Kort JJ, Metz C, Forsthuber TG. In vivo blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates acute experimental autoimmune encephalomyelitis by impairing the homing of encephalitogenic T cells to the central nervous system. *J Immunol*. 2003 Feb 1;170(3):1274-82.
- 50 Dewor M, Steffens G, Krohn R, Weber C, Baron J, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes fibroblast migration in scratch-wounded monolayers in vitro. *FEBS letters*. 2007 Oct 2;581(24):4734-42.
- 51 Donn RP, Ray DW. Macrophage migration inhibitory factor: molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule. *The Journal of endocrinology*. 2004 Jul;182(1):1-9.
- 52 Donnelly SC, Haslett C, Reid PT, Grant IS, Wallace WA, Metz CN, et al. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nature medicine*. 1997 Mar;3(3):320-3.

- 53 Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science (New York, NY)*. 2008 May 2;320(5876):674-7.
- 54 Driscoll KE. Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Experimental lung research*. 1994 Nov-Dec;20(6):473-90.
- 55 Ferreira SH. Are macrophages the body alarm cells? *Agents And Actions*. 1980;10:229-30.
- 56 Fingerle-Rowson G, Koch P, Bikoff R, Lin X, Metz CN, Dhabhar FS, et al. Regulation of macrophage migration inhibitory factor expression by glucocorticoids in vivo. *The American journal of pathology*. 2003 Jan;162(1):47-56.
- 57 Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nature clinical practice*. 2004 Dec;1(2):98-105.
- 58 Fubini B, Fenoglio I, Elias Z, Poirot O. Variability of biological responses to silicas: effect of origin, crystallinity, and state of surface on generation of reactive oxygen species and morphological transformation of mammalian cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2001;20 Suppl 1:95-108.
- 59 Fujimura N. Pathology and pathophysiology of pneumoconiosis. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2000 Mar;6(2):140-4.
- 60 Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of pathology*. 2003 Jul;200(4):500-3.
- 61 Gambelli F, Di P, Niu X, Friedman M, Hammond T, Riches DW, et al. Phosphorylation of tumor necrosis factor receptor 1 (p55) protects macrophages from silica-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Jan 16;279(3):2020-9.
- 62 Gamsu G, Aberle DR. CT findings in pulmonary asbestosis. *Ajr*. 1995 Aug;165(2):486-7.
- 63 Gillissen A, Gessner C, Hammerschmidt S, Hoheisel G, Wirtz H. [Health significance of inhaled particles]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*. 2006 Mar 24;131(12):639-44.
- 64 Godleski JJ. The pneumoconiosis: Silicosis and silicatosi due to inhalation of non-asbestos silicates. *Pathology of Pulmonary Disease*. 1994:387-93.
- 65 Gossart S, Cambon C, Orfila C, Seguelas MH, Lepert JC, Rami J, et al. Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF-alpha production in rat lung inflammation induced by silica. *J Immunol*. 1996 Feb 15;156(4):1540-8.
- 66 Greaves IA. Not-so-simple silicosis: a case for public health action. *American journal of industrial medicine*. 2000 Mar;37(3):245-51.

- 67 Gregory JL, Morand EF, McKeown SJ, Ralph JA, Hall P, Yang YH, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via CC chemokine ligand 2. *J Immunol*. 2006 Dec 1;177(11):8072-9.
- 68 Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2001 Aug 16;345(7):517-25.
- 69 Gwinn MR, Vallyathan V. Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2006 Jan-Feb;9(1):27-39.
- 70 Hamilton RF, Jr., Thakur SA, Holian A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free radical biology & medicine*. 2008 Apr 1;44(7):1246-58.
- 71 Hamilton RF, Jr., Thakur SA, Mayfair JK, Holian A. MARCO mediates silica uptake and toxicity in alveolar macrophages from C57BL/6 mice. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Nov 10;281(45):34218-26.
- 72 Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *The Journal of investigative dermatology*. 2007 Mar;127(3):526-37.
- 73 Holmes MC, Zhang P, Nelson S, Summer WR, Bagby GJ. Neutrophil modulation of the pulmonary chemokine response to lipopolysaccharide. *Shock (Augusta, Ga)*. 2002 Dec;18(6):555-60.
- 74 Huaux F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2007 Apr;7(2):168-73.
- 75 Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *The Journal of experimental medicine*. 1999 Nov 15;190(10):1375-82.
- 76 IARC. Silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils. IARC Press. 1997:506 pp.
- 77 Iyer R, Hamilton RF, Li L, Holian A. Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor in human alveolar macrophages. *Toxicology and applied pharmacology*. 1996 Nov;141(1):84-92.
- 78 Jagirdar J, Begin R, Dufresne A, Goswami S, Lee TC, Rom WN. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in silicosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996 Oct;154(4 Pt 1):1076-81.
- 79 Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annual review of immunology*. 2000;18:621-63.
- 80 Kitaichi N, Ogasawara K, Iwabuchi K, Nishihira J, Namba K, Onoe K, et al. Different influence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in signal transduction pathway of various T cell subsets. *Immunobiology*. 2000 Jan;201(3-4):356-67.

- 81 Kobayashi M, Nasuhara Y, Kamachi A, Tanino Y, Betsuyaku T, Yamaguchi E, et al. Role of macrophage migration inhibitory factor in ovalbumin-induced airway inflammation in rats. *Eur Respir J*. 2006 Apr;27(4):726-34.
- 82 Kobzik L, Cotran RS, Kumar V, Collins T. The Lung. In: *Pathological basis of disease* 1999.
- 83 Kuna P, Reddigari SR, Rucinski D, Oppenheim JJ, Kaplan AP. Monocyte chemoattractant and activating factor is a potent histamine-releasing factor for human basophils. *The Journal of experimental medicine*. 1992 Feb 1;175(2):489-93.
- 84 Leech M, Metz C, Bucala R, Morand EF. Regulation of macrophage migration inhibitory factor by endogenous glucocorticoids in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2000 Apr;43(4):827-33.
- 85 Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *The Journal of experimental medicine*. 2003 Jun 2;197(11):1467-76.
- 86 Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2002 Apr;4(4):449-60.
- 87 Magalhaes ES, Mourao-Sa DS, Vieira-de-Abreu A, Figueiredo RT, Pires AL, Farias-Filho FA, et al. Macrophage migration inhibitory factor is essential for allergic asthma but not for Th2 differentiation. *European journal of immunology*. 2007 Apr;37(4):1097-106.
- 88 Makita H, Nishimura M, Miyamoto K, Nakano T, Tanino Y, Hirokawa J, et al. Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998 Aug;158(2):573-9.
- 89 Martin TR. MIF mediation of sepsis. *Nature medicine*. 2000 Feb;6(2):140-1.
- 90 Meyer-Siegler K. Macrophage migration inhibitory factor increases MMP-2 activity in DU-145 prostate cells. *Cytokine*. 2000 Jul;12(7):914-21.
- 91 Mikulowska A, Metz CN, Bucala R, Holmdahl R. Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice. *J Immunol*. 1997 Jun 1;158(11):5514-7.
- 92 Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Jun 18;274(25):18100-6.
- 93 Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Jan 8;99(1):345-50.

- 94 Mizue Y, Ghani S, Leng L, McDonald C, Kong P, Baugh J, et al. Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Oct 4;102(40):14410-5.
- 95 Mohr LC. Hypersensitivity pneumonitis. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2004 Sep;10(5):401-11.
- 96 Naito M. Macrophage differentiation and function in health and disease. *Pathology international*. 2008 Mar;58(3):143-55.
- 97 Naujokas MF, Morin M, Anderson MS, Peterson M, Miller J. The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell*. 1993 Jul 30;74(2):257-68.
- 98 Neff TA, Guo RF, Neff SB, Sarma JV, Speyer CL, Gao H, et al. Relationship of acute lung inflammatory injury to Fas/FasL system. *The American journal of pathology*. 2005 Mar;166(3):685-94.
- 99 Nguyen MT, Lue H, Kleemann R, Thiele M, Tolle G, Finkelmeier D, et al. The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis. *J Immunol*. 2003 Mar 15;170(6):3337-47.
- 100 NIOSH. National Institute for Occupational Safety and Health. Manual of Analytical Methods (NMAM) 1974 [cited 2008 02/08]; Available from: <http://www.cdc.gov/niosh/homepage.html>.
- 101 Nishihira J, Ishibashi T, Fukushima T, Sun B, Sato Y, Todo S. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Its potential role in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003 May;995:171-82.
- 102 Nishino T, Bernhagen J, Shiiki H, Calandra T, Dohi K, Bucala R. Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 1995 Nov;1(7):781-8.
- 103 OMS. Organização Mundial de Saúde. 1986 [cited 2008 15/08]; Available from: http://www.who.int/occupational_health
- 104 Ortiz LA, Lasky J, Lungarella G, Cavarra E, Martorana P, Banks WA, et al. Upregulation of the p75 but not the p55 TNF-alpha receptor mRNA after silica and bleomycin exposure and protection from lung injury in double receptor knockout mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1999 Apr;20(4):825-33.
- 105 Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3203-13.
- 106 Palecanda A, Kobzik L. Receptors for unopsonized particles: the role of alveolar macrophage scavenger receptors. *Current molecular medicine*. 2001 Nov;1(5):589-95.

- 107 Palecanda A, Paulauskis J, Al-Mutairi E, Imrich A, Qin G, Suzuki H, et al. Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles. *The Journal of experimental medicine*. 1999 May 3;189(9):1497-506.
- 108 Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American journal of surgery*. 2004 May;187(5A):11S-6S.
- 109 Patzold S, Schmidt A, Seidel A. Loss of cathepsin B activity in alveolar macrophages after in vitro quartz phagocytosis. *Journal of toxicology and environmental health*. 1993 Dec;40(4):547-54.
- 110 Perez-Ramos J, de Lourdes Segura-Valdez M, Vanda B, Selman M, Pardo A. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999 Oct;160(4):1274-82.
- 111 Petrovsky N, Socha L, Silva D, Grossman AB, Metz C, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor exhibits a pronounced circadian rhythm relevant to its role as a glucocorticoid counter-regulator. *Immunology and cell biology*. 2003 Apr;81(2):137-43.
- 112 Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest*. 2002 Dec;122(6 Suppl):286S-9S.
- 113 Phan SH, Zhang K, Zhang HY, Gharaee-Kermani M. The myofibroblast as an inflammatory cell in pulmonary fibrosis. *Current topics in pathology*. 1999;93:173-82.
- 114 Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Sappino AP, Vassalli P. Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature*. 1990 Mar 15;344(6263):245-7.
- 115 Powell ND, Papenfuss TL, McClain MA, Gienapp IE, Shawler TM, Satoskar AR, et al. Cutting edge: macrophage migration inhibitory factor is necessary for progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2005 Nov 1;175(9):5611-4.
- 116 Ramos C, Montano M, Gonzalez G, Vadillo F, Selman M. Collagen metabolism in experimental lung silicosis. A trimodal behavior of collagenolysis. *Lung*. 1988;166(6):347-53.
- 117 Rehn B, Seiler F, Rehn S, Bruch J, Maier M. Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *Toxicology and applied pharmacology*. 2003 Jun 1;189(2):84-95.
- 118 Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *The New England journal of medicine*. 2005 Oct 20;353(16):1711-23.
- [119] Ribeiro. Exposição ocupacional à sílica no Brasil. *VII Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva* 2003.
- 120 Rimal B, Greenberg AK, Rom WN. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2005 Mar;11(2):169-73.

- 121 Rojanasakul Y, Ye J, Chen F, Wang L, Cheng N, Castranova V, et al. Dependence of NF-kappaB activation and free radical generation on silica-induced TNF-alpha production in macrophages. *Molecular and cellular biochemistry*. 1999 Oct;200(1-2):119-25.
- 122 Rossi AG, Haslett C, Hirani N, Greening AP, Rahman I, Metz CN, et al. Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *The Journal of clinical investigation*. 1998 Jun 15;101(12):2869-74.
- 123 Santos L, Hall P, Metz C, Bucala R, Morand EF. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clinical and experimental immunology*. 2001 Feb;123(2):309-14.
- 124 Sato M, Markiewicz M, Yamanaka M, Bielawska A, Mao C, Obeid LM, et al. Modulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by endogenous sphingolipid mediators. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Mar 14;278(11):9276-82.
- 125 Sato T, Shimosato T, Alvord WG, Klinman DM. Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit silica-induced pulmonary inflammation. *J Immunol*. 2008 Jun 1;180(11):7648-54.
- 126 Satoskar AR, Bozza M, Rodriguez Sosa M, Lin G, David JR. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infection and immunity*. 2001 Feb;69(2):906-11.
- 127 Saúde M. Ministério da Saúde. 1997 [cited 2008 28/09]; Brasil. Fundação Nacional da Saúde.]. Available from:
<http://www.fundacentro.gov.br/conteudo.asp?D=SES&C=920&menuAberto=785>
- 128 Saunders BM, Britton WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunology and cell biology*. 2007 Feb-Mar;85(2):103-11.
- 129 Scabilloni JF, Wang L, 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*. 2005 Apr;288(4):L709-17.
- 130 Schacke H, Docke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & therapeutics*. 2002 Oct;96(1):23-43.
- 131 Schimmelpfeng J, Drosselmeyer E, Hofheinz V, Seidel A. Influence of surfactant components and exposure geometry on the effects of quartz and asbestos on alveolar macrophages. *Environmental health perspectives*. 1992 Jul;97:225-31.
- 132 Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Seminars in liver disease*. 2001 Aug;21(3):351-72.
- 133 Seiler F, Rehn B, Rehn S, Hermann M, Bruch J. Quartz exposure of the rat lung leads to a linear dose response in inflammation but not in oxidative DNA damage and mutagenicity. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001 Apr;24(4):492-8.

- 134 Shen HM, Zhang Z, Zhang QF, Ong CN. Reactive oxygen species and caspase activation mediate silica-induced apoptosis in alveolar macrophages. *American journal of physiology*. 2001 Jan;280(1):L10-7.
- 135 Shi X, Mao Y, Daniel LN, Saffiotti U, Dalal NS, Vallyathan V. Silica radical-induced DNA damage and lipid peroxidation. *Environmental health perspectives*. 1994 Dec;102 Suppl 10:149-54.
- 136 Sime PJ, O'Reilly KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2001 Jun;99(3):308-19.
- 137 Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Csaky KG, Gauldie J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *The Journal of clinical investigation*. 1997 Aug 15;100(4):768-76.
- 138 Srivastava KD, Rom WN, Jagirdar J, Yie TA, Gordon T, Tchou-Wong KM. Crucial role of interleukin-1beta and nitric oxide synthase in silica-induced inflammation and apoptosis in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002 Feb 15;165(4):527-33.
- 139 Stetler-Stevenson WG. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *The American journal of pathology*. 1996 May;148(5):1345-50.
- 140 Sugimoto H, Suzuki M, Nakagawa A, Tanaka I, Nishihira J. Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocyte at 2.1 Å resolution. *FEBS letters*. 1996 Jul 1;389(2):145-8.
- 141 Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 May 28;93(11):5191-6.
- 142 Sutterwala FS, Ogura Y, Zamboni DS, Roy CR, Flavell RA. NALP3: a key player in caspase-1 activation. *Journal of endotoxin research*. 2006;12(4):251-6.
- 143 Tanino Y, Makita H, Miyamoto K, Betsuyaku T, Ohtsuka Y, Nishihira J, et al. Role of macrophage migration inhibitory factor in bleomycin-induced lung injury and fibrosis in mice. *American journal of physiology*. 2002 Jul;283(1):L156-62.
- 144 Taylor AB, Johnson WH, Jr., Czerwinski RM, Li HS, Hackert ML, Whitman CP. Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor complexed with (E)-2-fluoro-p-hydroxycinnamate at 1.8 Å resolution: implications for enzymatic catalysis and inhibition. *Biochemistry*. 1999 Jun 8;38(23):7444-52.
- 145 Thakur SA, Beamer CA, Migliaccio CT, Holian A. Critical Role of Marco in Crystalline Silica-Induced Pulmonary Inflammation. *Toxicol Sci*. 2009 Jan 16.
- 146 Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP, 3rd, Martinez FJ. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annual review of medicine*. 2004;55:395-417.

- 147 Thibodeau MS, Giardina C, Knecht DA, Helble J, Hubbard AK. Silica-induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity. *Toxicol Sci.* 2004 Jul;80(1):34-48.
- 148 Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 May;3(5):349-63.
- 149 Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Experimental cell research.* 2000 May 25;257(1):180-9.
- 150 Wang XL. [Myofibroblast and hyperoxia lung injury]. *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics.* 2006 Jun;8(3):260-backcover.
- 151 Ward PA, Hunninghake GW. Lung inflammation and fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 1998 Apr;157(4 Pt 2):S123-9.
- 152 Webb WR, Muller NL, Naidich DP. Standardized terms for high-resolution computed tomography of the lung: a proposed glossary. *Journal of thoracic imaging.* 1993 Summer;8(3):167-75.
- 153 Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1989 Oct;86(19):7522-6.
- 154 Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews.* 2003 Jul;83(3):835-70.
- 155 White ES, Lazar MH, Thannickal VJ. Pathogenetic mechanisms in usual interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of pathology.* 2003 Nov;201(3):343-54.
- 156 Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation.* 2007 Mar;117(3):524-9.
- 157 Zanotto CE, Boner AL. [Bronchial hyperreactivity. I. General concepts]. *Pediatr Med Chir.* 1985 May-Jun;7(3):375-81.
- 158 Zar JH. *Biostatistical analysis.* 3th. ed. Prentice-Hall Inc., New Jersey. 1996.
- 159 Zhang Y, Lee TC, Guillemin B, Yu MC, Rom WN. Enhanced IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol.* 1993 May 1;150(9):4188-96.