

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

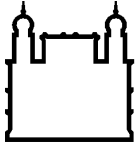
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**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

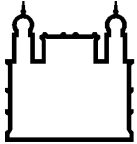
Participação do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) no processo inflamatório pulmonar induzido por sílica em camundongos.

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 retroprojeter 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

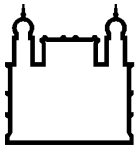
- α -SMA - “ α -Smooth-muscle Actin” ou α -Actina de Músculo Liso.
ACTH - “Adrenocorticotropic Hormone” ou Hormônio Adrenocorticotrópico.
ARDS - “Acute Respiratory Distress Syndrome” ou Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo.
ASC - “Apoptosis-associated Speck-like Protein”.
AP-1 - “Activator Protein-1” 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

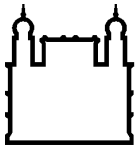
Fundação Oswaldo Cruz

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.