



Ministério da Saúde

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



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

Patricia Canto Ribeiro

**Estudo da Implicação da Interleucina-13 (IL-13) e Outros Marcadores Inflamatórios em  
Trabalhadores Expostos à Poeira de Sílica**

Rio de Janeiro

2023

Patricia Canto Ribeiro

**Estudo da Implicação da Interleucina-13 (IL-13) e Outros Marcadores Inflamatórios em  
Trabalhadores Expostos à Poeira de Sílica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Hermano Albuquerque de Castro.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins.

Rio de Janeiro

2023

## Identification of Interleukin-13 (IL-13) as a Biomarker in Workers Exposed to Silica Dust.

R484e Ribeiro, Patricia Canto.  
Estudo da Implicação da Interleucina-13 (IL-13) e Outros Marcadores Inflamatórios em Trabalhadores Expostos à Poeira de Sílica / Patricia Canto Ribeiro. -- 2023.  
104 f. : il.color.

Orientador: Hermano Albuquerque de Castro.  
Coorientadora: Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins.  
Tese (Doutorado em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2023.  
Bibliografia: f. 80-90.

1. Saúde Ocupacional. 2. Silicose. 3. Interleucina-13. 4. Inflamação - prevenção & controle. 5. Sílica. I. Título.

CDD 363.11

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Cláudia Menezes Freitas - CRB-7-5348 Biblioteca de Saúde Pública

Patricia Canto Ribeiro

**Estudo da Implicação da Interleucina-13 (IL-13) e Outros Marcadores Inflamatórios em  
Trabalhadores Expostos à Poeira de Sílica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 21 de agosto de 2023.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Algranti  
Fundação Jorge Duprat Figueiredo

Prof.<sup>a</sup> Dra. Margareth Maria Pretti Dalcolmo  
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof.<sup>a</sup> Dra. Liliane Reis Teixeira  
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof.<sup>a</sup> Dra. Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos  
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof.<sup>a</sup> Dra. Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins (Coorientadora)  
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Hermano Albuquerque de Castro (Orientador)  
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2023

Dedico esta tese a minhas amadas filhas Isabela e Alice, simplesmente o melhor de mim. Vocês me enchem de orgulho e alegria.

## AGRADECIMENTOS

Aos amigos pesquisadores do laboratório de Inflamação Pulmonar do IOC: Ana Carolina Santos de Arantes, Amanda da Costa Cotias, Daniella Bianchi Reis Insuela, Fernanda Verdini Guimarães, Fabiana dos Santos Pacheco, Dr Vinicius de Frias Carvalho e Prof. Dr. Marco Aurélio Martins; cada um de vocês tem participação fundamental neste projeto.

Ao Prof. Dr Hugo Caire de Castro Faria Neto por suas contribuições nas discussões, na dosagem das interleucinas e pela expertise indispensável para a execução deste projeto.

A toda equipe do ambulatório do CESTEJ, em especial a equipe de enfermagem e do arquivo, o trabalho diário de vocês é o DNA desta tese.

Aos pacientes do ambulatório de pneumologia do CESTEJ, esta tese foi pensada na perspectiva de contribuir com a qualidade de vida de todos aqueles que sofrem, vítimas de suas condições de trabalho insalubres. Este projeto existe por vocês e para vocês.

Aos membros da minha banca de avaliação: Prof.<sup>a</sup> Dra Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos; Prof.<sup>a</sup> Dra Liliane Reis Teixeira; Prof Dr Eduardo Algranti e Prof.<sup>a</sup> Dra Margareth Maria Pretti Dalcolmo por contribuírem com seu conhecimento para o aperfeiçoamento desta tese.

A Dra Tatiana Paula Teixeira Ferreira, grande amiga, por sua parceria de todas as horas, pelas boas risadas, por sempre me incentivar e ainda por tanto mais!

A Prof. Dra Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins, minha coorientadora, por sua generosidade em partilhar seus conhecimentos, sua infinita paciência e por estar sempre acessível.

Ao Prof. Dr. Hermano Albuquerque de Castro, meu orientador na dobradinha mestrado e doutorado, por manter a esperança e o bom humor, mesmo nos momentos mais estressantes. Você tem sido meu maior exemplo e inspiração.

A meu pai Waltemar de Almeida Ribeiro e meus irmãos Alan Canto Ribeiro, e Waltemar Ferreira Ribeira “Junior”, pelas histórias que vivemos juntos, por serem base do que acredito e do que sou.

A minha mãe, Maria das Graças Ferreira Ribeiro (Graça), a primeira feminista que conheci e que me ensinou a importância da profissão na vida de uma mulher, *In memoriam*.

A minha amada tia Ná, Maria Aparecida Ferreira D’Ácri, minha mãe, minha amiga, avó de Isabela e Alice. Tudo começou com seu abrigo.

Durante séculos,  
cavadores de poços procuraram água no subterrâneo  
guiando-se apenas por seus instintos.

(Pamuk, 2020, p. 26)

## RESUMO

A silicose é uma doença pulmonar crônica e fibrosante, causada pela inalação de poeira de sílica cristalina livre; a pneumoconiose de maior prevalência no mundo. Associada a um processo inflamatório crônico, desencadeado pela partícula de sílica no alvéolo pulmonar, tem como centro do processo o papel do macrófago alveolar, o aporte de polimorfonucleares, a participação das células epiteliais e a liberação de mediadores inflamatórios, em especial citocinas, entre elas a Interleucina-13, Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), e a formação de NETs. O objetivo foi avaliar o potencial envolvimento de citocinas inflamatórias, em especial a IL-13, como biomarcadores em indivíduos expostos à sílica, bem como a produção de NETs e ROS por neutrófilos de sangue periférico em trabalhadores expostos. Foram avaliados 29 trabalhadores expostos e 31 sem história de exposição ocupacional à sílica, com recordatório ocupacional e de sintomas respiratórios, através de questionário. A quantificação de citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET) foram realizadas por ELISA, sonda intracelular CM-H2DCFDA e *Sytox Green*, respectivamente. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/FIOCRUZ (CAAE: 46140821.8.3001.5248), e o consentimento foi assinado por cada participante. A prevalência de tabagismo foi semelhante em ambos os grupos. Quanto aos sintomas tosse e dispneia, eles foram mais frequentes em indivíduos expostos, em comparação aos não expostos. Foram encontrados níveis aumentados de IL-13, bem como de IL-7, MIP-1alfa, IP-10 e eotaxina entre os expostos à sílica em comparação com os voluntários não expostos. Foi encontrado que a geração de ROS e a liberação de NETs foram espontaneamente elevadas nos neutrófilos de trabalhadores expostos à sílica. A ativação com PMA ou LPS, mas não com sílica, aumentou a produção de ROS, com resposta mais pronunciada detectada nas células dos trabalhadores expostos. Para NET, quando neutrófilos de trabalhadores expostos foram ativados com PMA e LPS, eles apresentaram resposta inferior em comparação aos controles. Nenhuma diferença foi notada ao comparar a resposta de PMN de expostos e controles, sob condições de estimulação com sílica. Nossos resultados mostram, a presença de níveis aumentados da citocina IL-13 no plasma de trabalhadores expostos à sílica. Além disso, os neutrófilos de sangue periférico mostraram um estado primário caracterizado por produção elevada de ROS e liberação de NET, sugerindo que IL-13 e/ou neutrófilos podem ser considerados como biomarcadores no caso de trabalhadores expostos ao pó de sílica inalável. Tanto a IL-13 quanto a produção de ROS e NETs podem ser potenciais biomarcadores de processo inflamatório na exposição à sílica.

Palavras-chave: saúde do trabalhador; sílica; marcadores inflamatórios; silicose; interleucina-13 (IL-13).



## ABSTRACT

Silicosis is a severe, progressive, fibrosing lung disease caused by inhaling free crystalline silica dust; the most prevalent pneumoconiosis in the world. Associated with a chronic inflammatory process, triggered by the silica particle in the pulmonary alveolus, the center of the process is the role of the alveolar macrophage, the contribution of polymorphonuclear cells, the participation of epithelial cells and the release of inflammatory mediators, especially cytokines, among them Interleukin-13, Reactive Oxygen Species (ROS), and the formation of NETs. The objective was to evaluate the potential involvement of inflammatory cytokines, especially IL-13, as biomarkers in individuals exposed to silica, as well as the production of NETs and ROS by peripheral blood neutrophils in exposed workers. Twenty-nine exposed workers and 31 without a history of occupational exposure to silica were evaluated, with occupational recall and respiratory symptoms, using a questionnaire. The quantification of cytokines, reactive oxygen species (ROS) and neutrophil extracellular traps (NET) were performed by ELISA, intracellular probe CM-H2DCFDA and Sytox Green, respectively. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Sergio Arouca National School of Public Health/FIOCRUZ (CAAE: 46140821.8.3001.5248), and consent was signed by each participant. The incidence of smoking was similar in both groups. As for the symptoms of cough and dyspnea, they were more frequent in exposed individuals compared to non-exposed ones. Increased levels of IL-13, as well as IL-7, MIP-1alpha, IP-10 and eotaxin were found among those exposed to silica compared to unexposed volunteers. It was found that the generation of ROS and the release of NETs were spontaneously elevated in the neutrophils of workers exposed to silica. Activation with PMA or LPS, but not silica, increased ROS production, with the most pronounced response detected in cells from exposed workers. For NET, when neutrophils from exposed workers were activated with PMA and LPS, they showed an inferior response compared to controls. No difference was noted when comparing the PMN response of exposed and controls under silica stimulation conditions. Our results show the presence of increased levels of the cytokine IL-13 in the plasma of workers exposed to silica. Furthermore, peripheral blood neutrophils showed a primary state characterized by elevated ROS production and NET release, suggesting that IL-13 and/or neutrophils can be considered as biomarkers in the case of workers exposed to inhalable silica dust. Both IL-13 and the production of ROS and NETs may be potential biomarkers of the inflammatory process in exposure to silica.

Keywords: worker's health; silica; inflammatory markers; silicosis; interleukin-13 (IL-13).

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 1 -  | Modelo de Prevenção da Silicose em Trabalhadores da Indústria de Pedras Artificiais.....   | 25 |
| Figura 2 -  | Mecanismos envolvidos na iniciação e progressão da silicose.....   | 26 |
| Figura 3 -  | Organograma de processamento das amostras provenientes de paciente não expostos e expostos à poeira contendo sílica livre.....   | 56 |
| Figura 4 -  | Avaliação da produção de citocinas no plasma de voluntários expostos ou não à partículas de sílica.....  | 62 |
| Figura 5 -  | Avaliação dos níveis de quimiocinas no plasma de voluntários expostos ou não expostos a partículas de sílica.....  | 62 |
| Figura 6 -  | Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) liberadas a partir de polimorfonucleares do sangue periférico de pacientes não expostos (A) e expostos (B) a partículas de sílica (estímulo com PMA).....    | 65 |
| Figura 7 -  | Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) liberadas a partir de polimorfonucleares do sangue periférico de pacientes não expostos (A) e expostos (B) a partículas de sílica (estímulo com LPS).....    | 66 |
| Figura 8 -  | Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) liberadas a partir de polimorfonucleares do sangue periférico de pacientes não expostos (A) e expostos (B) a partículas de sílica (estímulo com sílica)..... | 67 |
| Figura 9 -  | Avaliação da formação de “neutrophil extracellular traps” (NETs) a partir de polimorfonucleares do sangue periférico de pacientes não expostos (A) e expostos (B) a partículas de sílica (estímulo com PMA).....         | 68 |
| Figura 10   | Avaliação da formação de “neutrophil extracellular traps” (NETs) a partir de polimorfonucleares do sangue periférico de pacientes não expostos (A) e expostos (B) a partículas de sílica (estímulo com LPS).....         | 69 |
| Figura 11 - | Avaliação da formação de “neutrophil extracellular traps” (NETs) a partir de polimorfonucleares do sangue periférico de pacientes não expostos (A) e expostos (B) a partículas de sílica (estímulo com sílica).....      | 69 |

## LISTA DE QUADROS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Quadro 1-   | Atividades de Maior Risco à Exposição à Sílica.....   | 21 |
| Quadro 2 -  | Superfamília da Interleucina-1.....   | 35 |
| Quadro 3 -  | Citocinas e sua origem celular.....   | 45 |
| Quadro 4 -  | Quimiocinas e sua origem celular.....   | 46 |
| Quadro 5 -  | Possibilidades de tratamento testadas em modelos animais de silicose ou fibrose.....                                    | 47 |
| Quadro 6 -  | Citocinas com diferença significativa no teste <i>Mann-Whitney</i> encontradas no estudo.....                           | 63 |
| Quadro 7 -  | Citocinas com diferença não significativa no teste <i>Mann-Whitney</i> encontradas no estudo.....                       | 63 |
| Quadro 8 -  | Valores da produção de ROS por neutrófilos em meio de cultura, valores basais e pós estimulação.....                    | 67 |
| Quadro 9 -  | Valores da produção de NETs por neutrófilos em meio de cultura, valores basais e pós estimulação com desvio padrão..... | 70 |
| Quadro 10 - | Dados sociodemográficos de todos os pacientes expostos a partículas de sílica.....                                      | 71 |

## LISTA DE TABELAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Tabela 1-  | Caracterização da População de Estudo.....   | 60 |
| Tabela 2 - | Análise total e diferencial de Leucócitos no Sangue periférico de indivíduos não expostos e expostos a partículas de sílica..... | 61 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                           |   |
|---------------------------|---|
| AggNETs                   | Agregados de armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês <i>Aggregated neutrophil extracellular traps</i> )   |
| AP-1                      | Proteína Ativadora-1 (do inglês <i>Activator protein 1</i> )  |
| ATP                       | Adenosina Trifosfato  |
| BAL                       | Lavado broncoalveolar (do inglês <i>Bronchoalveolar lavage</i> )  |
| Células Tc                | Células T citotóxicas (do inglês <i>cytotoxic T cell</i> )  |
| CESTEH                    | Centro de Estudos do Trabalhador e Ecologia Humana  |
| CCR2                      | Receptor de quimiocinas CC tipo 2 (do inglês <i>Chemokine receptor 2</i> )  |
| CSF                       | Fatores Estimuladores de Colônias (do inglês <i>Colony Stimulating Factors</i> )  |
| CSF-G                     | Fator estimulador de Colônias-G (do inglês <i>Colony stimulating factor – G</i> )   |
| CSF-GM                    | Fator estimulador de colônias-granulócito-macrófago (do inglês <i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> )  |
| DP                        | Desvio padrão   |
| ENSP                      | Escola Nacional de Saúde Pública  |
| EPI                       | Equipamento de proteção individual  |
| FIZZ1                     | Proteína encontrada na Zona Inflamatória 1 (do inglês <i>Found in inflammatory zone</i> )   |
| FGFR                      | Receptor do fator de crescimento de fibroblastos (do inglês <i>fibroblast growth factor receptor</i> )  |
| FPI                       | Fibrose pulmonar idiopática   |
| IFN (x)                   | <u>Interferon (x)</u>   |
| IL (x)                    | Interleucina (do inglês <i>Interleukin</i> ) (x)  |
| IL (x) R                  | Receptor de interleucina (x) (do inglês <i>Interleukin receptor</i> (x))  |
| IL-13-PE ou IL-13-PE38QQR | Proteína chimérica (imunotoxina) composta por IL-13 humana e exotoxina <i>Pseudomonas</i> (Do inglês <i>a chimeric protein composed of human IL-13 and a mutated form of Pseudomonas exotoxin</i> ) |
| IP-10                     | Interferon gama induzido pela proteína 10kDa (do inglês <i>Interferon gamma inducible protein-10</i> )  |
| LPS                       | Lipopolissacarídeo (do inglês <i>Lipopolysaccharide</i> )   |

|                  |   |
|------------------|---|
| MAP quinase      | Proteína quinase ativada por mitógenos (do inglês <i>Mitogen activated protein kinase</i> )                               |
| MCP-1            | Proteína quimiotraente de monócitos-1 (do inglês <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> )                              |
| MIP-1            | Proteína inflamatória de macrófagos-1 (do inglês <i>Macrophage inflammatory protein – 1</i> )                             |
| MPO              | Mieloperoxidase   |
| NE               | Elastase de Neutrófilos (do inglês <i>Neutrophil elastase</i> )   |
| NETs             | Armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês <i>Neutrophil extracellular traps</i> )                               |
| NF-Kb            | Fator nuclear Kb (do inglês <i>Nuclear factor Kb</i> )  |
| NO               | Óxido nítrico (do inglês <i>Nitric Oxide</i> )  |
| PBMC             | Leucócitos Mononucleares do sangue periférico (do inglês <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )                      |
| PBS              | Solução tampão de fosfato (do inglês <i>Phosphate buffer solution</i> )   |
| PCR              | Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i> )  |
| PDGF             | Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês <i>Platelet-derived growth factor</i> )                             |
| PKC              | Proteína quinase C (do inglês <i>Protein Kinase C</i> )   |
| PMA              | Forbol-12-miristato-13-acetato (do inglês <i>Phorbol-12-miristato-13-acetato</i> )  |
| PMN              | Polimorfonucleares neutrófilos (do inglês <i>Polymorphonuclear neutrophil</i> )   |
| PPAR $\gamma$    | Receptor- $\gamma$ ativado por Proliferador de Peroxissoma (do inglês <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> ) |
| PR3              | Proteinase-3  |
| RNS              | Espécies reativas de nitrogênio (do inglês <i>Reactive nitrogen species</i> )   |
| ROS              | Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>Reactive oxygen species</i> )   |
| sIL-2R           | Receptor IL (x) solúvel (do inglês <i>Soluble IL (x) receptor</i> )   |
| SiO <sub>2</sub> | Dióxido de silício  |
| SMA- $\alpha$    | Actina de Músculo Liso- $\alpha$ (do inglês <i><math>\alpha</math>-Smooth muscle actin</i> )                              |
| SMAD 2/3         | SMAD (do inglês " <i>Small</i> " worm phenotype) and MAD family (" <i>Mothers Against Decapentaplegic</i> ")2/3)          |

|          |  |
|----------|--|
| sTNF     | TNF solúvel  |
| TCLE     | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido   |
| TGF      | Fator de crescimento transformador (do inglês <i>Transforming growth factor</i> )                        |
| TGF-(x)  | Fator de Crescimento Transformador (x) (do inglês <i>Transforming growth factor (x)</i> )                |
| Th2      | Células T auxiliares do tipo 2 (do inglês <i>T helper 2</i> )  |
| TmTNF    | TNF Trans membrana   |
| TNF      | Fator de necrose tumoral (do inglês <i>Tumor necrosis factor</i> )                                       |
| TNFR-(x) | Receptor(x) de TNF   |
| VSMCs    | Células vasculares de músculo liso (do inglês <i>Vascular smooth muscle cells</i> )                      |
| VEGFR    | Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> ) |

## SUMÁRIO

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 17 |
| <b>2</b>     | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....                                   | 19 |
| 2.1          | EXPOSIÇÃO.....   | 20 |
| 2.2          | EPIDEMIOLOGIA.....   | 22 |
| 2.3          | FORMAS CLÍNICAS.....   | 23 |
| 2.4          | FORMAS DE PREVENÇÃO.....   | 24 |
| 2.5          | FISIOPATOLOGIA.....  | 25 |
| <b>2.5.1</b> | <b>Macrófagos</b> .....  | 26 |
| <b>2.5.2</b> | <b>Neutrófilos</b> .....   | 29 |
| <b>2.5.3</b> | <b>Mediadores inflamatórios</b> .....                                | 31 |
| 2.5.3.1      | Fator de Necrose Tumoral (TNF).....                                  | 32 |
| 2.5.3.2      | Interleucina-1 (IL-1).....   | 34 |
| 2.5.3.3      | Interleucina-2 (IL-2).....   | 36 |
| 2.5.3.4      | Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-13 (IL-13) .....                | 37 |
| 2.5.3.5      | Interleucina-6 (IL-6).....   | 39 |
| 2.5.3.6      | Interleucina-7 (IL-7).....   | 39 |
| 2.5.3.7      | Interleucina-10 (IL-10) .....  | 40 |
| 2.5.3.8      | Interleucina-17 (IL-17) .....  | 40 |
| 2.5.3.9      | Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) .....                               | 41 |
| 2.5.3.10     | Interferon Gama Induzido pela Proteína 10 kDa (IP-10) .....          | 42 |
| 2.5.3.11     | Interleucina-8 (IL-8).....   | 42 |
| 2.5.3.12     | Eotaxin.....   | 43 |
| 2.5.3.13     | Proteína Inflamatória de Macrófago-1 $\alpha$ (MIP1 $\alpha$ ) ..... | 43 |
| 2.5.3.14     | Proteína Químioatraente de Monócitos -1 (MCP-1) .....                | 44 |
| 2.6          | TRATAMENTO .....   | 47 |
| <b>3</b>     | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....   | 51 |
| <b>4</b>     | <b>HIPÓTESE</b> .....  | 52 |



|              |   |    |
|--------------|---|----|
| <b>5</b>     | <b>OBJETIVO GERAL</b> .....   | 53 |
| 5.1          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 53 |
| <b>6</b>     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 54 |
| 6.1          | POPULAÇÃO DE ESTUDO .....   | 54 |
| 6.2          | AVALIAÇÃO DOS TRABALHADORES.....  | 55 |
| 6.3          | TIPO DE ESTUDO .....  | 55 |
| 6.4          | PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....  | 56 |
| 6.5          | COLETA DE SANGUE E CONTAGEM DE LEUCÓCITOS .....   | 56 |
| 6.6          | ISOLAMENTO DE LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS .....   | 57 |
| <b>6.6.1</b> | <b>Leucócitos polimorfonucleares (PMN)</b> .....  | 58 |
| 6.7          | ESTIMULAÇÃO “IN VITRO” DE LEUCÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO.....  | 58 |
| <b>6.7.1</b> | <b>Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)</b> .....  | 58 |
| <b>6.7.2</b> | <b>Liberação de NETs</b> .....  | 58 |
| 6.8          | QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PELO SISTEMA MULTIPLEX .....   | 58 |
| 6.9          | ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 59 |
| <b>7</b>     | <b>RESULTADOS</b> .....   | 60 |
| 7.1          | CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO .....   | 60 |
| 7.2          | PERFIL DE CELULARIDADE NO SANGUE PERIFÉRICO.....  | 60 |
| 7.3          | CITOCINAS.....  | 61 |
| 7.4          | AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR NEUTRÓFILOS PROVENIENTES DE VOLUNTÁRIOS EXPOSTOS OU NÃO A PARTICULAS DE SÍLICA.....          | 65 |
| 7.5          | AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DAS NEUTROPHIL EXTRACELULAR TRAP (NETs) POR NEUTRÓFILOS PROVENIENTES DE VOLUNTÁRIOS EXPOSTOS OU NÃO A PARTÍCULAS DE SÍLICA ..... | 68 |
| <b>8</b>     | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | 72 |
| <b>9</b>     | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | 79 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>80</b> |
| <b>ANEXO 1 – QUESTIONÁRIO PADRONIZADO SOBRE SINTOMAS<br/>RESPIRATÓRIOS .....</b> | <b>91</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A silicose é a doença ocupacional de maior prevalência no mundo. É uma doença pulmonar grave, progressiva e fibrosante (LESO et al., 2019), causada pela inalação de poeira de sílica cristalina livre (OZMEN et al., 2010), que não se limita ao adoecimento físico, mas também a um sofrimento psíquico e que apresenta poucos recursos terapêuticos, seja na perspectiva de cura, por transplante pulmonar, ou no aumento da expectativa de vida, com medidas paliativas como o lavado broncoalveolar (PANG et al., 2021) e medidas terapêuticas de suporte, o que torna a busca por tratamentos capazes de retardar a progressão da doença uma necessidade real e urgente para milhares de trabalhadores em todo mundo. Está relacionada a uma série de atividades econômicas, algumas antigas como a mineração (ROSENTAL, 2017) e cavação de poços, mas também surge em novas atividades como o trabalho com pedras artificiais (LESO et al., 2019) e na indústria de roupas (BAYRAM; GHIO, 2011).

As partículas de sílica geradas no ambiente de trabalho têm tamanhos variáveis, as respiráveis são menores que 10  $\mu$ , com tamanho médio de 5  $\mu$ , que podem chegar ao trato respiratório inferior. Partículas maiores ficam depositadas nas vias nasais, cornetos e nasofaringe (RAMÍREZ, 2013a).

Os fatores relacionados ao adoecimento incluem susceptibilidades individuais, tempo de exposição e quantidade e características da poeira inalada (LESO et al., 2019). Segundo Castro, (CASTRO, MARCOS CÉSAR SANTOS DE et al., 2022), o desenvolvimento da silicose, além de se relacionar ao tempo de exposição, uso ou não de equipamentos de proteção individual, quantidade de poeira inalada, depuração pulmonar prejudicada e deficiências no sistema imunológico, também está relacionado a fatores genéticos, o que poderia justificar as diferentes manifestações fenotípicas em pacientes com o mesmo tipo de exposição.

Uma vez que as partículas cheguem aos alvéolos, zona de troca gasosa, são fagocitadas pelos macrófagos alveolares, perpetuando-se e dando início a um processo inflamatório cíclico, ainda não totalmente elucidado (TAN; CHEN, 2021a).

No processo inflamatório temos a participação de células de defesa, macrófagos e neutrófilos. Os macrófagos são normalmente encontrados no espaço alveolar, sendo as primeiras células residentes a fazer contato com a sílica (CASTRANOVA, 2004), apresentam-se em número elevado no interstício pulmonar e dentro dos alvéolos, constituindo assim, parte importante e efetiva do processo de imunidade inata. A participação dos macrófagos no processo de reparo tecidual é bastante relevante, uma vez que têm a capacidade de secretar

citocinas e fatores quimiotáticos que regulam o acúmulo local de células mesenquimais (fibroblastos) e de componentes da matriz extracelular.

Apesar dos inúmeros estudos sobre o processo inflamatório e de fibrose, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares cruciais que iniciam e orientam o processo inflamatório. Segundo Martins et al, 2020, mais recentemente a proteína encontrada na zona inflamatória 1 (FIZZ1), produzida por macrófagos alveolares e fibroblastos, mostrou-se capaz de induzir a proliferação de miofibroblastos e sua transdiferenciação, causando fibrose tecidual (MARTINS et al., 2020), reafirmando o papel dos macrófagos e fibroblastos na patogenicidade da doença. Em seu estudo, Martins sugere que o Colágeno V autoimunogênico, produzido por células epiteliais alveolares e fibroblastos associado com a FIZZ1, proteínas Notch-1 e receptor- $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ), pode ser um mecanismo patogênico chave para a formação dos granulomas silicóticos em pulmões de camundongos. Camundongos têm sido utilizados como modelos para o estudo dos fatores fisiopatológicos envolvidos na gênese do adoecimento e do processo inflamatório em humanos.

A interleucina-13 (IL-13) é um mediador chave para a fibrose tecidual causada pela inflamação associada a células T auxiliares do tipo 2 (Th2) (LEE et al., 2001), possuindo um papel fundamental em vários processos inflamatórios e de adoecimento (SHIMAMURA et al., 2008) com formação de granulomas, já sendo estudada sua associação em uma série de patologias como doenças neoplásicas e esteatose hepática não alcoólica (SHIMAMURA et al., 2008), bem como na asma brônquica (PELAIA et al., 2022).

Uma estratégia terapêutica voltada especificamente para a atividade pró-fibrótica da IL-13 no pulmão foi estudada em camundongos, envolvendo uma proteína de fusão composta por um fragmento da IL-13 humana, que reconhece e se liga aos receptores desta citocina, e uma forma mutante de exotoxina de *Pseudomonas* (IL-13-PE38QQR ou IL-13-PE) (FERREIRA et al., 2013), com resultados que apontam que essa pode ser uma via de atuação na redução do processo inflamatório pulmonar induzido pela sílica.

Com base no exposto acima, neste trabalho, o objetivo foi avaliar a expressão da citocina IL-13 e outros marcadores inflamatórios no sangue periférico de trabalhadores expostos e não expostos à partícula de sílica em seu ambiente laboral, no sentido de obter subsídios que nos permitam identificar possíveis biomarcadores, assim como potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da silicose.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A identificação precoce e o tratamento para as pneumoconioses têm sido perseguidos por pesquisadores do mundo inteiro e a compreensão do processo imunológico e inflamatório na gênese das doenças respiratórias produzidas por poeiras minerais, como a sílica, é entendida como a chave para esse processo. Buscar uma via de tratamento para a doença é almejado com o aumento da compreensão dos processos fisiopatológicos associados ao adoecimento.

A silicose é uma das doenças mais antigas já descritas, com os primeiros relatos datando do Império Grego, sendo identificada entre trabalhadores associados à exploração de rochas (BAYRAM; GHIO, 2011). Essa pneumoconiose se tornou um grande problema de saúde pública depois que a revolução industrial introduziu a mecanização, por exemplo com o uso de furadeiras, o que aumentou tanto os níveis de poeira quanto o número de trabalhadores expostos (BAYRAM; GHIO, 2011). Normalmente, a sílica pode ser inalada durante a produção ou utilização de matérias-primas industriais como areia, cascalho, minerais industriais, carvão, cimento, gesso, entre outros (TAN; CHEN, 2021a). Devido ao amplo espectro de utilização em processos produtivos, alguns tão antigos como a mineração, mas também novos processos incorporados, como a produção de pedras artificiais e o envelhecimento de roupas, que geram formação de sílica cristalina, é que a silicose permanece como grave problema de saúde pública e para a saúde do trabalhador, sendo então a pneumoconiose mais prevalente no mundo, (CASTRO<sup>1,2,3A</sup>, FERREIRA NANI<sup>2</sup> et al., [s.d.]).

A inalação de partículas de sílica induz reações inflamatórias pulmonares que podem causar silicose, doenças autoimunes e/ou câncer de pulmão, em um processo explicável pela biopersistência das partículas (TURCI et al., 2016). A exposição à sílica também se associa a uma série de outras doenças como tuberculose pulmonar e outras micobacterioses e infecções fúngicas (TRIPATHI; PANDEY; PAUL, [s.d.]). Esta atividade tóxica da poeira de sílica é extremamente variável e dependente da fonte e dos processos de geração da poeira. A porção molecular exata que explica e prevê essa toxicidade variável da sílica permanece indefinida, no entanto, Pavan et al em seu estudo de 2020 sugerem que a presença do grupo Silicol na superfície das moléculas de sílica, seria o principal responsável por sua toxicidade (PAVAN et al., 2020).

Turci et al, 2016, avaliaram as principais características físico-químicas relevantes para a toxicidade da sílica: distribuição do tamanho das partículas, a micromorfologia, a cristalinidade, a carga superficial e o potencial oxidativo livre das células (TURCI et al., 2016). Nesse estudo, eles levantam a hipótese de que a atividade biológica da poeira de quartzo não se

deve à cristalinidade, mas à fragmentação do cristal, quando se formam as fraturas concoidais. Além da geração de radicais, o fraturamento perturba a esperada ordem de longo alcance das porções de superfície não radicais - silanóis, silanolatos, siloxanos - que rompem as membranas e induzem a toxicidade celular, ambos resultados associados à resposta inflamatória ao quartzo.

Formas de quartzo como a cristobalita e a tridimita têm uma propriedade piezoelétrica, ou seja, a capacidade de produzir cargas elétricas opostas em lados opostos do corpo físico quando submetido à pressão. Provavelmente, essa é uma característica que induz à produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) na borda da molécula de sílica, o que pode gerar danos aos macrófagos (TRIPATHI; PANDEY; PAUL, [s.d.]).

## 2.1 EXPOSIÇÃO

Como a sílica (dióxido de silício, SiO<sub>2</sub>) é um mineral de ocorrência natural que responde por 59% da massa da crosta terrestre e é o principal constituinte de mais de 95% das rochas, muitas atividades desenvolvidas pelo homem são responsáveis por exposição à sílica livre, ou cristalina, trazendo o risco de adoecimento. Historicamente, a maioria dos trabalhadores em risco de silicose eram aqueles que desenvolviam trabalhos ligados ao ambiente natural, como mineradores, cavadores de túneis e pedreiros (BARNES et al., 2019). Com o advento da revolução industrial, ocorreu a ampliação da possibilidade de exposição com processos geradores de poeira: mineração de metais, extração e beneficiamento de rochas, lapidação de quartzo e pedras preciosas, construção civil (perfuração de poços e túneis), jateamento de areia, metalurgia, entre outras (MAGALHÃES et al., 2020).

Uma nova modalidade de exposição tem se somado as já descritas e bem conhecidas, como o aumento do uso de pedra artificial (também conhecida como pedra projetada, reconstituída, manufaturada e quartzo aglomerado) para a fabricação de bancadas. Em comparação com as pedras naturais usadas tradicionalmente, a pedra artificial é mais barata do que o mármore, não é porosa, é mais resistente a arranhões e manchas, tem quatro vezes mais resistência à flexão e o dobro da resistência ao impacto que o granito (BARNES et al., 2019). A pedra artificial é formada a partir de rochas finamente trituradas (predominantemente quartzo, com a adição de vidro colorido, conchas e metais) que são ligadas por resina de apolímero, moldada em forma e curada pelo calor. A Pedra artificial contém 85-93% de sílica cristalina, concentração muito mais elevada que qualquer outro material comumente utilizado para fabricação de bancadas. Os trabalhadores usam ferramentas manuais de alta potência, como moedores, para cortar essas placas, para dar forma e criar cortes para pias e torneiras, seguido de polimento do produto final. Esses processos geram níveis extremamente altos de

exposição à poeira de sílica cristalina respirável, constituindo um alto risco de adoecimento para esses trabalhadores em toda cadeia produtiva.

Essa série de possibilidades de exposição em diversos tipos de trabalho e profissões é um dos principais fatores para a difusão do risco de exposição à sílica livre em todo mundo. Além disso, essa ubiquidade da sílica aumenta o risco de exposição em atividades de trabalho não formais, dificultando uma estimativa mais exata para o número de trabalhadores sob risco em todo mundo. Na tabela 1 apresento a relação de exposições relacionadas ao adoecimento por silicose.

Quadro 1 - Atividades de Maior Risco à Exposição à Sílica

|  |  |
|--|--|
| <b>Indústria Extrativista</b>  | Mineração e atividades de extração, beneficiamento de pedras que contenham o mineral   |
| <b>Construção Civil</b>  | Ao longo do processo de trabalho como nas fundações, acabamento, corte de azulejos e de pedras, misturas de cimento e areia                                |
| <b>Perfuração de Rochas e Cavação de Poços</b>                               | Construção de túneis, barragem e estradas, perfuração de poços artesianos  |
| <b>Perfuração de rochas em mineração de não metálicos</b>                    | Exemplo: mica e feldspato  |
| <b>Jateamento de Areia</b>   | Utilizada na indústria naval, na opacificação de vidros, na fundição e no polimento de peças na indústria metalúrgica e em várias situações de manutenção* |
| <b>Fundição de ferro, aço ou outros metais</b>                               | Quando se utilizam moldes de areia   |
| <b>Indústrias Cerâmicas</b>  | Fabricação de pisos, azulejos, louças sanitárias, louças domésticas em especial nos acabamentos  |
| <b>Fabricação de vidros</b>  | Na preparação e no uso de jateamento de areia  |
| <b>Artesanatos e acabamento em mármore, ardósia, granito e outras pedras</b> | Trabalhos em pedras semipreciosas, bancadas e diversas manipulações de pedras  |

|   |  |
|---|--|
| <b>Construção de fornos refratários</b> | Principalmente no corte do material  |
| <b>Atividade Agrícola</b>               | Aragem   |
| <b>Indústria de Pedras Artificiais</b>  | Bancadas para pias e banheiros   |
| <b>Indústria de Roupas</b>              | Aparência envelhecida em jeans com o uso de jateamento de areia                      |
| <b>Outras exposições</b>                | Atividades de protético, fabricação de material abrasivo, moagem de quartzo e pedras |

. Fonte: Adaptada do Mapa de Exposição à Sílica no Brasil, (2010)

\* Proibida no Brasil desde 2005 em decorrência do alto grau de exposição e adoecimento dos trabalhadores. Uma das maiores fontes de exposição em nossa coorte, em decorrência da forte presença da Indústria Naval no Estado do Rio de Janeiro

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

O número de casos de pessoas acometidas por silicose em todo mundo é certamente subestimado, especialmente pelo número de trabalhadores expostos em processos de trabalho informais e em países de média e baixa renda, onde há falhas nos serviços de vigilância e notificação, ainda que a silicose não seja uma doença exclusiva desses países. Somado às subnotificações, há poucos estudos sobre o número real de expostos e doentes em todo o mundo.

De acordo com o estudo de Krefft a China tem 23 milhões de trabalhadores sobre risco (KREFFT; WOLFF; ROSE, 2020) de adoecimento por silicose. Também estão em risco de exposição 11,5 milhões de trabalhadores na Índia e 3,2 milhões na União Europeia e, além disso, estima-se que 5.000 trabalhadores turcos têm silicose (KREFFT; WOLFF; ROSE, 2020). Barber e colaboradores apontam que cerca de 600.000 trabalhadores estão expostos à sílica no Reino Unido (BARBER et al., 2019).

Em estudo publicado em THE LANCET, 2012, Leung aponta que, somente na área de mineração de ouro brasileira em Minas Gerais, mais de 4.500 trabalhadores foram diagnosticados com silicose entre 1978 e 1998. Leung também aponta que, dos garimpeiros de ouro na África do Sul que morrem por causas externas (ferimentos, queimaduras, envenenamento e afogamento), as proporções com silicose identificadas na autópsia aumentaram de 3% para 32% para mineiros negros e de 18% para 22% para mineiros brancos entre 1975 e 2007 (LEUNG; YU; CHEN, 2012).



Segundo o Mapa de Exposição à Sílica no Brasil, 2010, utilizando-se a base de população empregada, a estimativa de expostos no país é de aproximadamente 6 milhões de pessoas (Mapa de Exposição à Sílica no Brasil, 2010).

Em seu estudo publicado em 2021, que avaliou a mortalidade por silicose no Brasil no período de 01/01/1980 a 31/12/2017, Algranti encontrou 3.164 óbitos cuja causa básica declarada foi silicose, sendo 3.057 homens e 107 mulheres (ALGRANTI et al., 2021).

Os dados epidemiológicos nos mostram como é difusa a exposição à sílica no Brasil e no mundo e que, por esse motivo, ampliar o conhecimento sobre o adoecimento pela silicose é tão importante para a saúde pública e do trabalhador.

Uma forma bastante agressiva de uma doença pulmonar chamada silicose vem sendo registrada em trabalhadores que atuam no corte, lixamento e polimento de pedras artificiais de quartzo usadas em pias e bancadas de cozinha. Produzidas também no Brasil a partir da prensagem de grão de quartzo e uma mistura com resinas, polímeros e pigmentos, essas pedras contêm de 3 a 30 vezes mais sílica ( $\text{SiO}_2$ ) do que as naturais, de granito ou mármore. O preparo para a produção de tampos e bancadas libera grãos muito finos de sílica, que, inalados, se acumulam no pulmão e geram cicatrizes, as quais, com o tempo, deixam o órgão rígido e a respiração difícil (FAPESP, 2023).

### 2.3 FORMAS CLÍNICAS

Desde os tempos de Aristóteles e Galeno os médicos associam determinadas doenças ao tipo de exposição ocupacional. Ramazzini se aprofunda e recomenda que seja realizada uma anamnese dirigida para os tipos de atividades laborais praticadas pelo paciente (RAMÍREZ, 2013b). Mais do que saber a profissão, é fundamental um recordatório dos tipos de atividades e as condições de trabalho com os eventuais agentes de exposição para uma adequada hipótese diagnóstica no caso das doenças ocupacionais.

Doença pulmonar progressiva fibrosante, a silicose se caracteriza pela imagem radiológica de nódulos com predomínio nos campos pulmonares superiores, que podem confluir com a evolução da doença, formando grandes massas ou conglomerados, as chamadas grandes opacidades. Seu diagnóstico envolve a história ocupacional de exposição à sílica livre, com alteração radiológica compatível. Esta avaliação pode ser complementada pela espirometria, mas que não é obrigatória para o diagnóstico. Muitas das vezes a doença é silenciosa em suas formas iniciais, permanecendo assintomática até uma maior evolução do caso. Os sintomas iniciais geralmente são dispneia aos esforços e tosse (SISHODIYA, 2022).

A silicose pode ser vista em três formas clínicas distintas: crônica, acelerada ou aguda, esta última, a sua forma mais grave (POLLARD, 2016). A forma clássica da doença é a forma crônica, com a presença de nódulos silicóticos ou fibrose maciça progressiva, com lesões confluentes que substituem o parênquima pulmonar, surgindo com 10 ou mais anos após o início da exposição. Embora as manifestações clínicas sejam comparáveis à silicose crônica, a doença acelerada se apresenta dentro de 10 anos após a exposição inicial às partículas. Já a silicose aguda, ocorre dentro de semanas até 5 anos após a exposição inicial e, em relação às formas crônica e acelerada, exibe maior evidência de lesão inflamatória e está associada a concentrações de exposição a níveis mais elevados de poeira (BAYRAM; GHIO, 2011), como o que ocorre no jateamento de areia, hoje banido em todo território nacional.

#### 2.4 FORMAS DE PREVENÇÃO

A prevenção das pneumoconioses envolvem medidas primárias e secundárias (BRAZIL; DEPARTAMENTO DE AÇÕES PROGRAMÁTICAS ESTRATÉGICAS, 2006). As medidas de intervenção primárias se relacionam ao controle ambiental nos locais de trabalho, às medidas de higiene com redução de partículas e a processos limpos que gerem o mínimo de resíduos respiráveis, mudanças nos processos de trabalho como o uso de capelas e corte úmido, uso de máscaras e demais Equipamentos de Proteção Individual (EPI), filtros e exaustores.

As medidas de prevenção secundária envolvem a vigilância ativa dos trabalhadores, com exames periódicos rigorosos, incluindo a radiografia de tórax e espirometria na periodicidade regulamentada pela NR7 (MINISTÉRIO DA ECONOMIA/SECRETARIA ESPECIAL DE PREVIDÊNCIA E TRABALHO, 2020).

A figura 1, modificada de Leso, et al, 2019, representa esses dois momentos da prevenção das pneumoconioses, no processo de produção de pedras artificiais, mas que nos dá uma ideia das etapas de atuação na cadeia produtiva para a redução dos riscos.

Figura 1: Modelo de Prevenção da Silicose em Trabalhadores da Indústria de Pedras Artificiais.



Fonte: Adaptado de (LESO et al., 2019).

## 2.5 FISIOPATOLOGIA

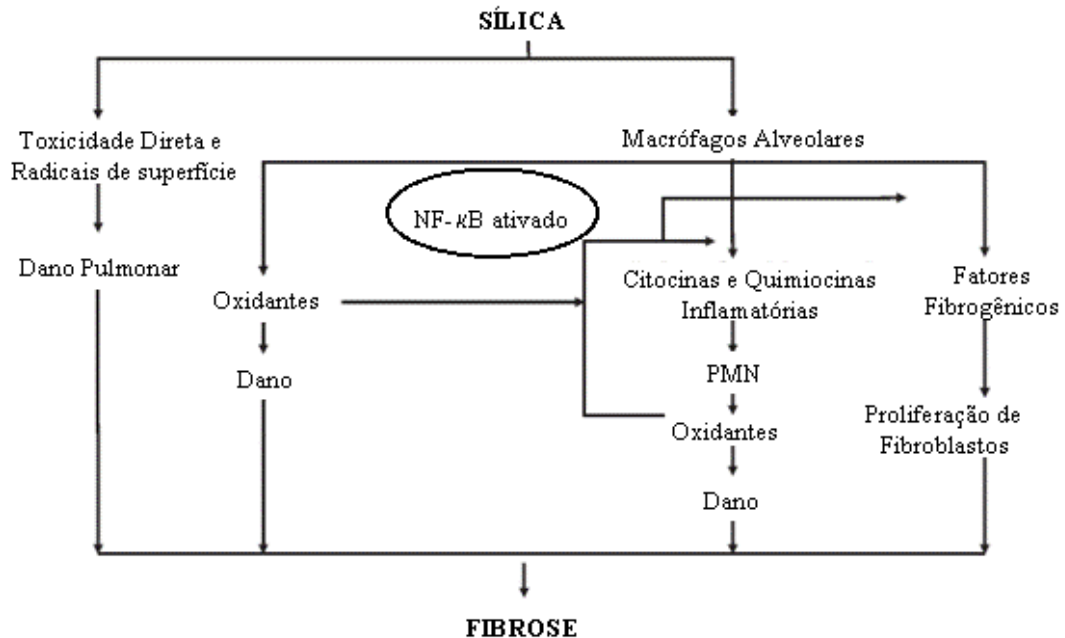
A inalação de poeira de sílica livre leva a um processo cíclico de inflamação pulmonar que gera uma doença fibrosante, a silicose. Uma vez que grande parte das partículas de sílica depositada nos alvéolos não podem ser removidas, o afastamento da exposição não é suficiente para interromper o processo fibrogênico (DU et al., 2019), ainda que seja essencial para reduzir a carga de partículas inaladas e, conseqüentemente, reduzir a aceleração da doença.

A resposta inflamatória começa com macrófagos alveolares engolfando as partículas, levando à infiltração de diversas células imunes e à produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. A inflamação persistente resulta na ativação da imunidade adaptativa, dano tecidual, proliferação e migração de fibroblastos, deposição anormal de colágeno, que pode levar à perda funcional, incapacidade e mesmo evoluir para óbito (DU et al., 2019) (Figura 2).

Wang apresenta em seu artigo de 2022 (WANG et al., 2022) que vários estudos atuais sugerem que a patogênese da silicose envolve respostas imunes persistentes e secreção de citocinas induzidas pela inalação de poeira, que podem ser divididas nas seguintes cinco vias: dano direto causado por partículas de poeira no tecido alveolar, que em muito é dependente das características físico-químicas da partícula (INOUE et al., 2021); estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS); inflamação ativada por NF- $\kappa$ B (Fator nuclear Kb; do inglês *Nuclear factor Kb*), AP-1 (Proteína Ativadora-1, uma conhecida ativadora imune) (WANG et al., 2013) e outros fatores inflamatórios; fibrose promovida por fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa

(TNF- $\alpha$ ) e metaloproteinases de matriz (MMPS); apoptose mediada por caspase induzida por partículas de poeira e fatores inflamatórios relacionados.

Figura 2: Mecanismos envolvidos na iniciação e progressão da silicose.



Fonte: Adaptada de Castranova, (2004).

### 2.5.1 Macrófagos

A silicose pode ser entendida como uma doença pulmonar inflamatória que é caracterizada pelo infiltrado de macrófagos e neutrófilos nos pulmões e pela produção de citocinas e quimiocinas pró inflamatórias, e espécies reativas de oxigênio (ROS), (SATO et al., 2008), que podem ser avaliados no lavado broncoalveolar (LBA) e também no plasma sanguíneo (AMORIM et al., 2012 08).

Os macrófagos atuam na resposta imune para a remoção de patógenos, na resolução da inflamação e na reparação da lesão tecidual. Quando ocorre o dano tecidual, os macrófagos residentes nos tecidos liberam citocinas e quimiocinas inflamatórias, além de recrutar células efetoras, como os neutrófilos (BOSURGI et al., 2017).

Os macrófagos têm um papel importante na imunidade inata, com o reconhecimento, a fagocitose e a eliminação de materiais estranhos, de bactérias a partículas de sílica. Com a fagocitose, geralmente há a eliminação do material biológico estranho, via ROS e proteases lisossômicas (JOSHI; GOETJEN; KNECHT, 2015). Segundo Joshi, 2015, há relato de aumento da geração de ROS em células expostas à sílica, o que pode ser um fator de importância na

toxicidade celular induzida pela sílica. O aumento das ROS intracelulares causa aumento do estresse oxidativo das células e este, se mantido por longos períodos, ou em níveis elevados por períodos curtos, pode causar danos celulares (apoptose ou morte celular programada) (LEHMAN et al., 2016).

Os macrófagos, quando ativados, podem se diferenciar em dois fenótipos: os macrófagos M1, ou macrófagos classicamente ativados, e os macrófagos M2, alternativamente ativados (ZHANG; YANG; ERICSSON, 2021). O macrófago M1 tem um papel pró-inflamatório (LIANG et al., 2022), destruindo patógenos através da produção de grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias (LIAN et al., 2022), enquanto o M2 tem um papel anti-inflamatório (LIANG et al., 2022) e com maior atividade de fagocitose contra patógenos (LIAN et al., 2022).

Os macrófagos M1 são conhecidos como macrófagos clássicos e podem ser induzidos por LPS (do inglês *ligand lipopolysaccharide*) e IFN- $\gamma$  (TABAS; BORNFELDT, 2016) e secretam citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 (KUNINAKA et al., 2022) e quimiocinas como MCP-1 (do inglês *monocyte chemoattractant protein-1*) (TABAS; BORNFELDT, 2016), estando a regulação de sua função diretamente ligada ao controle da resposta imune excessiva, o que pode levar à inflamação crônica e doenças inflamatórias (KUNINAKA et al., 2022). A secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos M1 está relacionada à morte de bactérias, vírus e células tumorais malignas (KUNINAKA et al., 2022).

Quanto aos macrófagos M2, estão relacionados ao remodelamento tecidual, sendo induzidos por citocinas como a IL-4 e a IL-13, além disso, secretam IL-10 e TGF- $\beta$ , em um processo para suprimir a resposta inflamatória (TABAS; BORNFELDT, 2016)(KUNINAKA et al., 2022).

Os macrófagos alveolares são células residentes no tecido pulmonar que desempenham um papel principal na manutenção da homeostase imunológica e na defesa do organismo. Eles são responsáveis pela identificação das partículas de sílica cristalina por meio de receptores necrófagos que dão início à fagocitose (ZHAO et al., 2020). Esse processo gera produção de ROS, o que resulta na ativação de processos inflamatórios e na secreção de citocinas (DU et al., 2019). As ROS também levam à disfunção mitocondrial, forçando os macrófagos alveolares a sofrerem apoptose mitocondrial. A liberação maciça de ROS e fatores inflamatórios apoptóticos causam lesão tecidual. Esses macrófagos apoptóticos também liberam o cristal de sílica engolfado no parênquima pulmonar, recrutando ainda mais macrófagos alveolares e perpetuando o ciclo de danos. Segundo DU, et al, 2019, a redução da apoptose pode ser um dos

pontos de intervenção no processo inflamatório que leva à fibrose/silicose. Os macrófagos estão presentes tanto na fase inflamatória quanto na fase de fibrose tecidual irreversível da silicose (ZHAO et al., 2020). Na fase inflamatória, ao serem ativados, liberam interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), proteína inflamatória de macrófagos (MIP) e proteína quimioatraente de monócitos (MCP). A fase de fibrose irreversível tem a participação dos macrófagos pois são eles os responsáveis pela transformação dos fibroblastos em miofibroblastos, que secretam colágeno e fibronectina. Os fibroblastos residentes pulmonares são a principal fonte de miofibroblastos e são ativados pelos macrófagos através da secreção de fatores pró fibróticos como o fator transformador de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e a prostaglandina E2 (RICHARDS, 2017).

Estudos *in vivo*, *in vitro* e em humanos, têm se concentrado na investigação das causas e processos para o desenvolvimento da silicose, que incluem a variabilidade do potencial patogênico das diversas variedades de sílica, o papel dos produtos de macrófagos alveolares ativados no desenvolvimento e progressão da silicose, e o papel direto desempenhado pela superfície da partícula de sílica no desencadeamento de reações biológicas adversas, como a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS). As ROS englobam os radicais hidroxila, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete (dioxigênio) e são produzidas tanto por células fagocíticas quanto na superfície das partículas de sílica livre (FUBINI; HUBBARD, 2003).

A geração de oxidantes e células ativadas pela sílica resultam em danos às células e aos pulmões, em expressão aumentada de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (Interleucina 1 $\beta$ ) e TGF- $\beta$  (Fator de Crescimento Transformador- $\beta$ ), ativação das vias de sinalização celular, incluindo as vias da MAP quinase (Proteína Quinase Ativada por Mitógenos) e fosforilação e ativação de fatores de transcrição específicos (por exemplo, NF- $\kappa$ B; Fator Nuclear  $\kappa$ B). As ROS, RNS e Óxido Nítrico (NO) gerados pelas partículas de sílica também induzem apoptose em macrófagos e outras células (RIMAL; GREENBERG; ROM, 2005). Os autores ressaltam que mais pesquisas sobre os mecanismos moleculares envolvidos nos processos inflamatórios, importantes para a progressão das doenças fibróticas, são necessárias para o desenvolvimento de um tratamento eficaz para a silicose, mas que estratégias terapêuticas potenciais incluem a inibição de citocinas como IL-1 (Interleucina-1), o TNF- $\alpha$ , o uso de antioxidantes e a inibição da apoptose. A análise da produção das citocinas em sangue periférico estimulado tem sido usada para imitar o ambiente natural *in vivo*. Alguns dos estimulantes utilizados são o PMA e o LPS. As diferenças nos reagentes

estimulantes e tratamentos podem resultar na produção de diferentes tipos de citocinas em diferentes níveis (AI et al., 2013).

### 2.5.2 Neutrófilos

Os neutrófilos, células efetoras da imunidade inata, são as mais abundantes do sistema imunológico humano, sendo os leucócitos mais circulantes no sangue e com um papel central na defesa imune (PAPAYANNOPOULOS, 2018). Seu papel no bloqueio e na morte de microorganismos estão associados a vários fatores, um deles a fagocitose do microorganismo e sua junção em vesículas lisossômicas, gerando os fagolisossomos (WIGERBLAD; KAPLAN, 2022), que podem bloquear e matar os agentes agressores, bem como podem produzir citocinas que atrairão novas células para o local da inflamação. Os neutrófilos são dotados de potentes antimicrobianos armazenados em grânulos em seu interior que, ao serem liberados, podem causar injúria tecidual; sua utilização é regulada por mecanismos distintos: a fagocitose, a degranulação e a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *Neutrophil extracellular traps*). As NETs são grandes estruturas extracelulares em forma de teia, compostas por proteínas citosólicas e granulares que são montadas em um arcabouço de cromatina descondensada. Quando há um processo inflamatório recorrente, ou o agente agressor é persistente, os neutrófilos, por uma incapacidade de regular o sistema, podem liberar NETs que vão exacerbar o dano tecidual, por um processo inflamatório inadequado (CASTANHEIRA; KUBES, 2019). As NETs prendem, neutralizam e matam bactérias, fungos, vírus e parasitas e são estruturadas para prevenir a disseminação de infecções (PAPAYANNOPOULOS, 2018). No entanto, se desreguladas, as NETs podem contribuir para a patogênese de doenças relacionadas ao sistema imunológico. Segundo Wigerblad (WIGERBLAD; KAPLAN, 2022), a formação das NETs pode ser iniciada por vários estímulos, incluindo microorganismos e seus produtos, citocinas, complexos imunes, autoanticorpos, cristais, produtos químicos e plaquetas.

Outro papel desempenhado pelas NETs diz respeito às doenças humanas causadas por microcristais. Microcristais endógenos, como o urato monossódico, pirofosfato de cálcio di-hidratado, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, oxalato de cálcio, colesterol e também os microcristais exógenos, como a sílica cristalina, são capazes de desencadear a liberação de NETs (LI et al., 2018b). Segundo LI, 2018, em baixas ou altas densidades, os neutrófilos formam NETs e NETs agregados (aggNETs; do inglês *Aggregated neutrophil extracellular traps*) que supostamente orquestram a iniciação e a resolução da inflamação estéril mediada por

cristais, respectivamente, sendo os produtos derivados das NETs potenciais alvos terapêuticos para doenças mediadas por cristais.

Outros estímulos à formação das NETs, além dos já citados acima, são os agentes inflamatórios estéreis como lipopolissacarídeos (LPS); forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), molécula que ativa a proteína quinase C (PKC; do inglês *Protein kinase C*) e desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (PAPAYANNOPOULOS, 2018); IL-8; ionomicina ou citocinas; complexos imunes; plaquetas ativadas e material particulado (LI et al., 2018b). Sob certas circunstâncias, a formação de NETs é acompanhada por um programa único de morte celular conhecido como NETose. Este é distinto da apoptose e da necrose celular. Segundo LI, 2018, durante a NETose, a cromatina se descondensa, as membranas do núcleo e dos grânulos se desintegram para gerar a cromatina combinada com proteínas e enzimas nucleares e granulares. Após a ruptura da membrana celular, a cromatina recebe uma infinidade de moléculas internas, incluindo histonas, elastase de neutrófilos (NE; do inglês *Neutrophil elastase*), mieloperoxidase (MPO), proteinase-3 (PR-3), lactoferrina, catepsina G, metaloprotease de matriz 9, peptidoglicano- proteínas de reconhecimento, proteína B1 de grupo de alta mobilidade, pentraxina, e a proteína bactericida / que aumenta a permeabilidade. Esses conteúdos são então expelidos para o ambiente extracelular (LI et al., 2018b).

Na silicose, o recrutamento dos neutrófilos para os alvéolos ocorre em decorrência da ingestão inicial da partícula de sílica pelos macrófagos alveolares e células endoteliais que ativam o inflamassoma NALP3, produzem ROS e levam a danos fagolisossômicos, ocorrendo, em seguida, a liberação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF. Além da depuração fagocítica, os neutrófilos sofrem NETose. No início da doença, as NETs são escassas e liberam inúmeras citocinas pró-inflamatórias e conteúdos citotóxicos que alimentam a inflamação aguda. Junto com a progressão da doença, os aggNETs se formam e apresentam efeito anti-inflamatório no microambiente local, ao eliminar mediadores pró-inflamatórios, aprisionar a partícula de sílica recoberta por proteases e sequestrá-los em nódulos silicóticos. A persistência de nódulos silicóticos tende a sustentar a inflamação e pode causar silicose ou mesmo câncer de pulmão (LI et al., 2018b).

Já é bem descrito na literatura que neutrófilos são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), além de enzimas e peptídeos com grande poder microbicida, sendo células chave na destruição de microorganismos (SWAIN; ROHN; QUINN, 2002).



### 2.5.3 Mediadores inflamatórios

A resposta inflamatória é complexa e envolve vários tipos de células, com especial foco em leucócitos como macrófagos, neutrófilos e linfócitos dentre outras, que liberam substâncias especializadas que incluem aminas e peptídeos vasoativos, eicosanoides, citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, que medeiam o processo inflamatório evitando danos teciduais adicionais e, finalmente, resultando na cicatrização e restauração da função tecidual (JANSSEN; HENSON, 2012). As citocinas têm efeitos importantes na atividade de muitas células, com particular importância na regulação do sistema imunológico (CHUNG, 2001). Elas constituem uma classe de pequenas proteínas que atuam como moléculas sinalizadoras em concentrações baixas (pico ou nanomolar) para regular a inflamação e modular as atividades celulares, como crescimento, sobrevivência e diferenciação (YADAV; SAINI; ARORA, 2010). As citocinas são um grupo excepcionalmente grande e diverso de fatores pró ou anti-inflamatórios (LIU et al., 2021) que são agrupados em famílias com base em sua homologia estrutural ou de seus receptores (BORISH; STEINKE, 2003). As quimiocinas, por sua vez, são um grupo de proteínas secretadas dentro da família das citocinas cuja função genérica é induzir a migração celular (“Chemokines - Definition, Function and Quiz | Biology Dictionary”, [s.d.]) Essas “citocinas quimiotáticas” estão envolvidas na quimioatração de leucócitos e no tráfego de células imunes para locais em todo o organismo (YADAV; SAINI; ARORA, 2010). As quimiocinas pertencem a duas categorias com base em sua atividade biológica, incluindo, tanto a manutenção da homeostase, como a indução da inflamação. Aquelas de caráter inflamatório são produzidas como resposta a um estímulo inflamatório e facilitam uma resposta imune ao atingir células do sistema imunológico inato e adaptativo (SINGH; ANSHITA; RAVICHANDIRAN, 2021). A ligação de uma citocina ou ligante de quimiocina ao seu receptor cognato resulta na ativação do receptor, que por sua vez desencadeia uma cascata de eventos de sinalização que regulam várias funções celulares, como adesão celular, fagocitose, secreção de citocinas, ativação celular, proliferação celular, sobrevivência celular e morte celular, apoptose, angiogênese e proliferação (ROSSI; ZLOTNIK, 2000) (JANSSEN; HENSON, 2012).

Scalia Carneiro *et al* analisaram as concentrações de citocinas CXCL16 e CCL5 em sangue periférico de trabalhadores com exposição à sílica (69 expostos e 22 sem exposição) e identificaram que níveis mais altos de CXCL16 foram associados ao status de exposição e à gravidade radiológica da silicose e que esta poderia ser uma opção de biomarcador para distinguir exposição de doença (SCALIA CARNEIRO et al., 2020).

Diversos estudos têm associado citocinas ao processo inflamatório na condição de exposição às partículas de sílica, e mesmo considerando o quadro estabelecido da silicose (CASTRO et al., 2005), (AMORIM et al., 201208). Abaixo, destaco algumas citocinas e quimiocinas que foram avaliadas neste estudo.

#### 2.5.3.1 Fator de Necrose Tumoral (TNF)

Entre as citocinas secretadas pelos macrófagos em resposta à sílica está o Fator de Necrose Tumoral (TNF), que parece desempenhar um papel chave no processo de adoecimento. Em modelos animais, a sílica aumentou a liberação de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos alveolares e é uma molécula importante envolvida na regulação do processo fibrótico na silicose (SLAVOV et al., 2010). O TNF é uma citocina inflamatória que tem efeitos pleiotrópicos em vários tipos de células (ADMIN, 2015). Foi identificado como um importante regulador das respostas inflamatórias, e é conhecido por estar envolvido na patogênese de algumas doenças inflamatórias e autoimunes (WOZNICKI et al., 2021).

Estruturalmente, o TNF é uma proteína homotrímica composta por 157 aminoácidos, gerada principalmente por macrófagos ativados, linfócitos T e células *natural killer*. É funcionalmente conhecido por desencadear uma série de moléculas inflamatórias, incluindo outras citocinas e quimiocinas. O TNF existe na forma solúvel e transmembranar. O TNF transmembrana (tmTNF) é a forma precursora inicialmente sintetizada e precisa ser processada pela enzima conversora de TNF (TACE) (DEORA et al., 2017), uma desintegrina metaloproteinase ligada à membrana, para ser liberada como o TNF solúvel (sTNF). O sTNF processado facilita várias atividades biológicas por meio de receptores tipo 1 (TNFR1) e receptores tipo 2 (TNFR2) (SALOMON, 2021). O tmTNF atua tanto no TNFR1 quanto no TNFR2. O TNFR1 é expresso por todos os tecidos no organismo, e é o principal receptor de sinalização para o TNF. O TNFR2 é geralmente expresso em células imunes e facilita respostas biológicas limitadas. Ao se ligar a seus receptores, TNFR1 e TNFR2, o TNF transmite sinais moleculares para funções biológicas como inflamação e morte celular. O TNFR1 é ativado tanto pelo sTNF quanto pelo tmTNF, e processa um domínio de morte (DD) que interage com a proteína adaptadora do domínio de morte associado ao TNFR1 (TRADD). A ativação do TNFR1 pode desencadear a formação de diferentes complexos de sinalização que resulta na ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). O resultado funcional é conhecido por ser a indução de inflamação, tecido, sobrevivência e proliferação celular e a defesa imune contra patógenos. Alternativamente,

ativação pelo TNF pode levar ao processo de ativação da caspase-8 e resultar em apoptose celular (SALOMON, 2021).

Ensaio prévios realizados por P.-R. JIANG e colaboradores, (“Plasma levels of TNF- $\alpha$  and MMP-9 in patients with silicosis”, [s.d.]) demonstraram que os níveis de TNF no plasma de pacientes com silicose se mostraram elevados quando comparados aos dos indivíduos controles, indicando assim o provável envolvimento do mediador no processo inflamatório e fibrose associados à silicose. Além disso, o TNF pode ser considerado, ainda, como um biomarcador precoce na silicose, isso corroborado pelo fato de os trabalhadores expostos ao pó de sílica, ainda sem silicose estabelecida, apresentaram níveis plasmáticos de TNF maiores que os controles saudáveis, porém inferiores aos dos pacientes portadores de silicose. Evidências adicionais mostraram que, em modelos de silicose experimental, foi detectada a liberação de TNF por macrófagos alveolares (SLAVOV et al., 2010); bem como produção de ROS e a consequente geração de MCP-1 e MIP-2 por células estimuladas com partículas de sílica (BARRETT et al., 1999).

Outro estudo, de Barret et al, através da cultura de células de cobaias estimuladas com cristobalita (sílica), mostrou que a interação entre cristobalita-células levou à regulação positiva de TNF, por meio da qual ocorre a geração de ROS induzida por TNF, levando à ativação de MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos) e MIP-2 (proteína inflamatória de macrófagos) (BARRETT et al., 1999).

O TNF é produzido em grande quantidade no pulmão dos pacientes com fibrose maciça progressiva (estágio mais avançado da Pneumoconiose dos Trabalhadores de Carvão) e seria o responsável pelo início e perpetuação da reação inflamatória nestes pacientes com fibrose maciça progressiva (VANHEE et al., 1995).

O TNF é secretado por macrófagos fibroblastos, linfócitos e células de músculo liso no tecido pulmonar. O principal papel do TNF- $\alpha$  na silicose é induzir o influxo de células inflamatórias, promover a secreção de outras citocinas, potencializar a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno. O TNF faz *upregulation* de vários fatores formadores de fibras (por exemplo, fibronectina e colágeno) e induz a agregação de plaquetas nos pulmões (“Plasma levels of TNF- $\alpha$  and MMP-9 in patients with silicosis”, [s.d.]).

No estudo de P.-R. JIANG e cols. (“Plasma levels of TNF- $\alpha$  and MMP-9 in patients with silicosis”, [s.d.]) demonstraram que os níveis no plasma de TNF foram estatisticamente maiores em pacientes com silicose, quando comparados com indivíduos controles, indicando

seu possível envolvimento no processo inflamatório de fibrose na silicose e que este, pode ser uma alternativa de biomarcador precoce na silicose, isso sendo corroborado pelo fato de os trabalhadores expostos ao pó de sílica mas que ainda não tinham desenvolvido silicose apresentavam níveis plasmáticos de TNF-maiores que os controles saudáveis, mas menores que os pacientes com silicose.

#### 2.5.3.2 Interleucina-1 (IL-1)

A interleucina-1 (IL-1), uma citocina inflamatória, é importante por possuir diversas funções fisiológicas e patológicas. Evidências destacam a importância da interleucina-1 para a imunidade inata associada a um amplo espectro de doenças de caráter inflamatório. Os membros da família de citocinas IL-1 desencadeiam a inflamação inata por meio da família de receptores IL-1, sendo identificados 11 membros da família de citocinas IL-1 e 10 membros da família de receptores IL-1 (Tabela 2). Mais do que qualquer outra família de citocinas, os membros da família da IL-1 estão intimamente ligados ao componente prejudicial da inflamação; podendo, entretanto, atuar aumentando a resistência inespecífica à infecção, e o desenvolvimento da resposta imune a antígenos estranhos. A importância dos membros da família IL-1 para a resposta inata ficou evidente com a descoberta de que o domínio citoplasmático do receptor de IL-1 tipo I (IL-1R1) também é encontrado na proteína “Toll”. O domínio funcional do componente citossólico de IL-1R1 é denominado domínio do receptor Toll interleucina-1 (TIR). De fato, o domínio TIR é altamente homólogo aos domínios TIR de todos os receptores semelhantes a “Toll” (TLR). Assim, respostas inflamatórias importantes, como a indução da enzima ciclo-oxigenase 2, produção de múltiplas citocinas e quimiocinas, aumento da expressão de moléculas de adesão e síntese de óxido nítrico, são respostas indistinguíveis para ligantes de IL-1 e TLR. (DINARELLO, 2018).

Quadro 2: Superfamília da Interleucina-1

| <b>IL-1 Família de Ligantes e Receptores</b> |                            |                    |                   |
|--|----------------------------|--------------------|-------------------|
| <b>Família Interleucina-1</b>                | <b>Receptor Específico</b> | <b>Correceptor</b> | <b>Função</b>     |
| IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$                 | IL-1R1                     | IL-1R3             | Pró-inflamatória  |
| IL-1 $\beta$                                 | IL-1R2                     | IL-1R3             | Anti-inflamatória |
| IL-1Ra                                       | IL-1R1                     | NA                 | Anti-inflamatória |
| IL-18  | IL1-R5                     | IL1-R7             | Pró-inflamatória  |
| IL-33  | IL1-R4                     | IL1-R3             | Pró-inflamatória  |
| IL-36 $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$          | IL-1R6                     | IL-1R3             | Pró-inflamatória  |
| IL-36Ra                                      | IL-1R6                     | IL-1R3             | Anti-inflamatória |
| IL-37  | IL1R-5                     | IL1-R8             | Anti-inflamatória |
| IL-38  | IL-1R6                     | IL1-R9             | Anti-inflamatória |

Fonte: Traduzida de DINARELLO, (2018).

A IL-1 $\beta$  é a mais estudada devido ao seu papel na mediação de doenças autoinflamatórias. Sem qualquer dúvida, IL-1 $\beta$  evoluiu para auxiliar na defesa do hospedeiro contra infecções (EDER, 2009), e estudos apontaram que uma dose baixa de IL-1 $\beta$  recombinante protege camundongos contra infecções bacterianas letais, na ausência de neutrófilos. A IL-1 $\beta$  foi purificada pela primeira vez em 1977, estando associada a febre em coelhos nos estudos iniciais (DINARELLO, 2018). Ela tem sido caracterizada como um dos

componentes mais importantes do processo inflamatório e da resposta às infecções, sejam virais, bacterianas, fúngicas ou parasitárias (EDER, 2009), mas também está aumentada em processos autoimunes como artrite reumatoide, esclerose múltipla e doença de Crohn, bem como na doença de Alzheimer e na doença de Parkinson. A IL-1 $\beta$  é produzida e secretada por macrófagos e monócitos, como uma molécula inativa a pró- IL-1 $\beta$  (LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011).

Em relação à resposta à sílica, a fagocitose da partícula pelo macrófago produz dano lisossômico e efluxo de potássio intracelular, levando à ativação do inflamassoma NLRP3 (família de receptores do tipo NOD contendo domínio de pirina 3 – (PENG et al., 2022) um complexo proteico intracelular que medeia a ativação da caspase-1 e a subsequente maturação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-18 com consequente fibrose (BENMERZOUG et al., 2018).

#### 2.5.3.3 Interleucina-2 (IL-2)

Inicialmente descoberta por sua potente ação no crescimento de células T *in vitro* (BOYMAN; SURH; SPRENT, 2006), a IL-2 pertence à família de citocinas de cadeia gama comum ( $\gamma$ c), como a IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. A IL-2 é produzida principalmente por células auxiliares T CD4+ ativadas, embora células T CD8+, células natural killer (NK), Células NK T e células dendríticas ativadas por estímulos microbianos também tenham sido relatadas na produção de IL-2, ainda que em níveis baixos. A IL-2 tem um mecanismo de ação por ligação ao receptor IL-2 (IL-2R), geralmente composto por 3 subunidades IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  (BOYMAN; SURH; SPRENT, 2006) e sua atividade parece ser regulada pela quantidade de IL-2 secretada e pela expressão dos receptores IL-2R expressos na superfície celular (JOEL M. DEPPER, et al., [s.d.]). Segundo Amado *et al*, a ação da IL-2 é auto regulada, no seu estudo a ausência de IL-2 determina aumento dos receptores para IL-2, numa tentativa de restaurar seus níveis (AMADO et al., 2013).

No estudo de avaliação dos níveis do Receptor IL-2 solúvel em soro (sIL-2R) Hayashi e colaboradores (HAYASHI et al., 2009) avaliaram que seus níveis podem ser utilizados como um indicador precoce de sintomas subclínicos no status imunológico de pacientes com exposição à sílica, também estando relacionado a alterações autoimunes em paciente com silicose, ainda que sem alterações respiratórias.

#### 2.5.3.4 Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-13 (IL-13)

A IL-13 foi inicialmente descrita como uma citocina de células T que inibia a produção de citocinas inflamatórias. A IL-13 é uma proteína secretada de 12Kda de 33 aminoácidos, sendo produzida principalmente por células T-helper 2 CD4<sup>+</sup> ativadas. A IL-13 induz proliferação e diferenciação de células B e produção de IgE além de regulação positiva da expressão do MHC de classe II. O gene da IL-13 está no cromossomo 5q31, muito próximo ao gene da IL-4 e compartilha grandes sequências reguladoras idênticas em suas regiões promotoras. IL-13 e IL-4 têm funções sobrepostas devido ao fato de compartilharem um receptor de citocinas de cadeia  $\gamma$ . Há também um receptor atípico para IL-13, denominado IL-13R $\alpha$ 2, cujo efeito sugerido seria como limitante da atividade de IL-13 por ligação, porém não de sinalização. Embora inicialmente descrita por seus efeitos sobre citocinas inflamatórias, a IL-13 apresenta uma ampla variedade de efeitos e está implicada em doenças associadas ao perfil TH2, como a asma. A IL-13 parece particularmente importante na quimioatração de eosinófilos para os pulmões em um mecanismo dependente da quimiocina eotaxina e de citocina IL-5 (POPE et al., 2001). O papel da IL-13 tem sido bem estudado na asma, onde está relacionada ao aumento na produção de muco, hiperresponsividade brônquica e eosinofilia de vias aéreas. Fibroblastos constituem um grupo heterogêneo de células que expressam diferentes fenótipos e características funcionais, na dependência de seu local de origem (DOUCET et al., 1998).

Embora a IL-13 e a IL-4 compartilhem um receptor comum e, portanto, induzindo respostas comuns, elas também têm funções independentes. A IL-13 desempenha um papel dominante na fibrose. Pesquisas demonstraram que pulmões de portadores de fibrose pulmonar idiopática (FPI) apresentam níveis elevados de IL-13, sendo esta secretada por macrófagos pulmonares (LIU et al., 2021). Animais transgênicos, nos quais há a superexpressão de IL-13 direcionada ao pulmão murino tem como consequência a ocorrência de fibrose pulmonar. Além disso, essa IL-13 pode afetar diretamente os fibroblastos pulmonares por meio da regulação positiva da integrina  $\beta$ 1 e da IL-6, e da proteína quimioatratante de monócitos 1 (MCP-1/CCL2) em células humanas. Um dos mecanismos subjacentes para a condução da fibrose induzida por IL-13 é a estimulação seletiva do fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), uma potente citocina pró-fibrótica (LEE et al., 2001). Também foi sugerido que a IL-13 é responsável pela fibrose associada ao acúmulo de colágeno mediado por supressão de metaloproteases da matriz. Na fibrose induzida por isotiocianato de fluoresceína foi demonstrado que camundongos deficientes em IL-13, mas não em IL-4, foram protegidos da

fibrose. Curiosamente no camundongos duplos nocautes IL-4/IL-13, não houve efeito aditivo na redução da fibrose e, portanto, a IL-4 não desempenha nenhum papel. Munitz, e colaboradores apontaram para o papel das citocinas IL-13 e IL-4, oriundas de linfócitos T helper 2 (Th2), como centrais na ativação da resposta inflamatória e fibrose durante a inflamação Th2 (MUNITZ et al., 2008), em especial o receptor de IL-13 (IL-13R)  $\alpha$ , tendo formulado a hipótese de que este receptor regula as respostas induzidas pela IL-4. A IL-13 atua diretamente sobre macrófagos e fibroblastos no processo inflamatório e desenvolvimento de granulomas (FERREIRA et al., 2013). Fibroblastos pulmonares humanos foram identificados por poder se comportar como células inflamatórias, quando ativados por IL-4/IL-13 e que, uma vez ativados, têm papel no remodelamento pulmonar, recrutamento, manutenção e ativação de células inflamatórias. Um outro tipo celular associado ao processo inflamatório são os miofibroblastos que representam a principal célula efetora nas doenças inflamatórias pulmonares, são eles responsáveis pela expressão da actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Segundo Xu, e col 2021, há evidências significativas de que outra citocina, o fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) é também uma chave moduladora da fibrose pulmonar (XU et al., 2012). Shiyi Tan et al demonstraram que a secreção do fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) estimula os fibroblastos a se transformarem em miofibroblastos, para a síntese de colágeno, deposição de matriz extracelular o que é parte essencial do processo de hialinização do parênquima, consequente formação de fibrose e, em última análise, da silicose (TAN; CHEN, 2021b). De acordo com Stefan, et al, 2006, a IL-13 é o principal indutor de fibrose em muitas doenças autoimunes e infecciosas crônicas (FICHTNER-FEIGL et al., 2006). Nos estudos dos mecanismos subjacentes a essa indução, os autores descreveram que a IL-13 induz o fator de crescimento transformador -  $\beta$ 1 (TGF -  $\beta$ 1) em macrófagos por meio de um processo em dois estágios envolvendo, em primeiro lugar, a indução do IL-13R $\alpha$ 2. Tal indução requer IL-13 (ou IL-4) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). De acordo com seus estudos, sugeriram que a sinalização de IL-13R $\alpha$ 2 durante a inflamação prolongada é um importante alvo terapêutico para a prevenção da fibrose mediada por TGF- $\beta$ 1.

Ferreira, et. al, 2013, avaliaram se o uso de uma imunotoxina recombinante composta por IL-13 humana e uma forma mutada da exotoxina de *Pseudomonas* (IL-13-PE), a proteína quimérica IL13-PE, poderia alterar e afetar as características patológicas da silicose induzida em camundongos Swiss-Webster, que receberam instilação nasal de partículas de sílica cristalina (FERREIRA et al., 2013). Os resultados foram bastante promissores, e revelaram que a administração terapêutica da imunotoxina IL-13-PE foi capaz de reverter as alterações morfológicas e funcionais nos pulmões de camundongos estimulados com partículas de sílica.



Estes achados, totalmente originais, nos levaram a considerar o potencial envolvimento da citocina IL-13 no quadro da fibrose pulmonar associado à condição da silicose clínica, nos impulsionando ao desenvolvimento de uma pesquisa de caráter translacional como desenvolvida neste projeto.

#### 2.5.3.5 Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 tem um amplo espectro de ação no processo inflamatório, na resposta imune e na hematopoiese (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). Identificada pela primeira vez em 1973, a IL-6 é secretada pelas células T, sendo importante na produção de anticorpos pelas células B e está implicada em doenças autoimunes como artrite reumatoide, artrite idiopática juvenil, doença de Still do adulto, arterite de células gigantes e arterite de Takayasu, bem como outras condições, como doença de Castleman e síndrome de liberação de citocinas, além de, mais recentemente, pneumonia por COVID-19 (CHOY et al., 2020). O papel da IL-6 também está relacionado ao processo de reparação do epitélio, regulando a resposta vascular nas vias aéreas e aumentando a proliferação dos fibroblastos (JI Herseth, M Refsnes, M Låg, G Hetland, PE Schwarze, 2008”, [s.d.]). Tripathi e colaboradores, 2010, demonstraram, em seu estudo sobre fibrose pulmonar induzida por sílica em camundongos, que a inalação de sílica induz perda da função pulmonar, alteração da histologia pulmonar e aumento da expressão de citocinas Th2 nas vias aéreas de animais de laboratório. Demonstraram ainda que o silenciamento do receptor de IL-6 nos tecidos pulmonares e traqueais melhora a resposta inflamatória em vias aéreas de camundongos (TRIPATHI et al., 2010).

#### 2.5.3.6 Interleucina-7 (IL-7)

É uma citocina pró-inflamatória (OLIVEIRA et al., 2011) cuja produção é basicamente estrutural, mas também pode ser afetada pelo IFN $\gamma$  (WINER et al., 2022). A IL-7 é uma citocina que atua através da síntese de mediadores inflamatórios por monócitos e, também, pode apresentar efeitos antifibróticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Parece ter sensibilidade diferente para fibroblastos ativados e normais. Na fibrose pulmonar, a sinalização de TGF- $\beta$  induz a ativação de fibroblastos e a síntese de colágeno, enquanto Smad7 pode bloquear esse processo inibindo a sinalização de TGF- $\beta$ . A IL-7 medeia o aumento de Smad7 através da sinalização JAK/STAT e exerce um efeito antifibróticos (HUANG et al., 2002). Especialmente, a IL-7 só funciona dessa maneira em fibroblastos de pacientes com fibrose pulmonar idiopática, não em

indivíduos saudáveis. Além disso, verificou-se que a IL-7 inibe a fosforilação mediada por TGF- $\beta$  de PKC- $\delta$  (proteína quinase C- $\delta$ ) em fibroblastos de pulmão fibrótico, mas não da contraparte normal. In vitro, a IL-7 inibe a deposição de colágeno de fibroblastos de maneira dependente de Smad-7 (HUANG et al., 2002). In vivo, a IL-7 limita a fibrose pulmonar.

A IL-7 é necessária para a sobrevivência dos timócitos imaturos, das células T virgens e das células T de memória, para as células pró-B e para os linfócitos inatos (WINER et al., 2022). A IL-7 e seu receptor IL-7R foram identificados há mais de 30 anos (FERNANDES; BARATA, 2023) hoje se sabe que a própria IL-7 é capaz de fazer *down regulation* de seu receptor IL-7R (FRY; MACKALL, 2005). Há evidências de que, tanto a IL-7 quanto seu receptor IL-7R atuem para além das células T, B ou células linfóides inatas, mas também impactando outras células do sistema imunológico e células não imunes (FERNANDES; BARATA, 2023). Martin et al em seus estudos com camundongos verificaram que a homeostase da IL-7 é alcançada por meio do consumo por vários subconjuntos de células imunes inatas e adaptativas (MARTIN et al., 2017).

#### 2.5.3.7 Interleucina-10 (IL-10)

A IL-10 é produto especialmente dos linfócitos B nos processos inflamatórios (LIU et al., 2016), onde apresenta uma ação anti-inflamatória (FRANÇOIS HUAUX, et al., 1997) mas, ao mesmo tempo, potencializadora da ação fibrosante nas exposições à sílica (POLLARD, 2016). Sua ação parece ligada à ativação da resposta Th2 e produção de IL-4 pró-fibrótica e IL-13 (POLLARD, 2016). A IL-10 estimula a imunidade humoral e inibe a imunidade celular, apresentando uma série de ações nesse sentido: inibe a apresentação de antígenos pelos macrófagos às células T, inibe a produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a produção de radicais livres de oxigênio e óxido nítrico e ainda inibe a produção de citocinas pelos linfócitos T e estimula a proliferação de linfócitos B ativados e a produção de imunoglobulinas (FRANÇOIS HUAUX, et al., 1997).

#### 2.5.3.8 Interleucina-17 (IL-17)

Atualmente, na literatura, a IL-17 é reconhecida como IL-17A, parte da família IL-17, composta por seis membros de IL-17A a IL-17F, sendo a IL-17A e a IL-17F as principais da família (MIOSSEC; KOLLS, 2012). Níveis elevados de IL-17A têm sido encontrados em asma e em doença pulmonar induzida por poeiras, da mesma forma, níveis aumentados de IL-17 têm sido encontrados em outras patologias como na nefrite lúpica, doenças autoimunes, vasculites

graves como arterite de células gigantes e granulomatose de Wegner, embora esse significado na patogênese dessas doenças não esteja definido, se é um papel patogênico direto ou se é resultado de mecanismos de feedback (MIOSSEC; KOLLS, 2012).

Segundo Ritzmann et al. estudos pré-clínicos sugerem que a expressão mediada por IL-17 de citocinas e quimiocinas em células estruturais contribui para a inflamação neutrofílica, remodelação das vias aéreas, perda da função pulmonar e dano pulmonar na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, na fibrose cística, na asma e na proliferação tumoral (RITZMANN et al., 2022).

#### 2.5.3.9 Interferon $\Upsilon$ (IFN- $\Upsilon$ )

Isaacs e Lindenmann descobriram, em 1957, uma substância que protegia as células de infecções virais, a qual chamaram de Interferon (PESTKA; KRAUSE; WALTER, 2004) desde então, muito se evoluiu no estudo dessa substância e já se sabe que existem os Interferons tipo I, tipo II (PESTKA; KRAUSE; WALTER, 2004) e o tipo III – tipo I (INF-1), tipo II (INF-II, INF- $\Upsilon$ ), e tipo III (INF III ou INF— $\lambda$ ) (LI et al., 2018a). Os interferons foram a primeira classe de citocinas utilizadas de forma terapêutica. O Interferon-delta é um tipo de Interferon I, como o Interferon- $\alpha$  e o Interferon- $\beta$  (LEFÈVRE et al., 1998), que possui uma ação antiviral e também ação imunomoduladora, com ação antiviral menor que do INF- $\alpha$  (LI et al., 2018a). Nos pulmões a ação do INF está associada à regulação do sistema imune inato e também no adaptativo (DUERR; FRITZ, 2020).

O IFN-gama há muito é reconhecido como uma citocina pró-inflamatória característica que desempenha um papel central na inflamação e nas doenças autoimunes (LIU et al., 2021). A citocina IFN- $\Upsilon$  pertence à família dos interferons, intimamente relacionados pela capacidade de proteger as células de infecções virais. Com base em vários critérios, as moléculas de IFN foram divididas em duas classes distintas: i) a primeira classe é denominada IFN tipo I e inclui as moléculas IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , que são os clássicos induzidos em resposta a infecções virais; e ii) a segunda classe é composta exclusivamente por IFN- $\Upsilon$  que não se relaciona com o IFN tipo I, tanto no nível genético quanto no proteico. Embora o IFN- $\Upsilon$  exiba a maioria das atividades biológicas descritas, ele tem uma atividade antiviral específica mais baixa, mas apresenta mais propriedades imunomoduladoras do que os interferons tipo I (FARRAR; SCHREIBER, 1993). Por muito tempo, a produção de IFN- $\Upsilon$  foi considerada restrita às células natural killer (NK) ativadas, células CD4+ T helper-1 (Th1) e células CD8+ T citotóxicas (FARRAR;

SCHREIBER, 1993)(BOEHM et al., 1997). Outros estudos identificaram tipos adicionais de células secretoras de IFN- $\gamma$ , incluindo linfócitos T  $\gamma\delta$ , células NKT, macrófagos, células dendríticas, células T CD4+ naives e até mesmo linfócitos B (FRUCHT et al., 2001)(SZABO et al., 2003). De forma interessante, Benmerzoug et al. demonstraram em seus experimentos com camundongos que as partículas de sílica induziram espécies reativas de oxigênio, morte celular e liberação de auto-dsDNA, correlacionando-se com a resposta de IFN tipo I (BENMERZOUG et al., 2018), sinalizando a importância da participação do IFN tipo I na silicose.

#### 2.5.3.10 Interferon Gama Induzido pela Proteína 10kDa (IP-10)

O IP-10/CXCL10 é um membro da família das quimiocinas CXC, sendo liberado por uma ampla variedade de células inflamatórias e epitélios das vias aéreas em resposta à inflamação aguda (HAYNEY et al., 2017) (CHEN et al., 2020). A atividade desta citocina é mediada pela ligação ao receptor CXCR3 principalmente nos linfócitos T e B, células NK e macrófagos, ocorrendo como processo de retroalimentação positiva em processos agudos, permitindo a ocorrência de efeitos como a indução de apoptose, a regulação do epitélio brônquico e a proliferação e migração de pneumócitos tipo II. Esses vários efeitos fornecem evidências sugestivas de um papel para IP-10 em doenças inflamatórias pulmonares. A expressão robusta de IP-10 em células das vias aéreas *in vitro* demonstra a importância do epitélio de superfície, além das células inflamatórias respiratórias, no início e manutenção dessa via inflamatória. Estudos utilizando ratos geneticamente depletados do gene codificante para IP-10 demonstraram exacerbação da resposta de fibrose pulmonar quando do desafio com o agente bleomicina (CRAIG et al., 2013), (TAGER AM; KRADIN RL; LACAMERA P; BERGURY SD; CAMPANELLA GS; LEARY CP; POLOSUKHIN V; ZHAO LH; SAKAMOTO H; BLACKWELL TS; LUSTER AD, [s.d.]

#### 2.5.3.11 Interleucina-8 (IL-8)

A IL-8/CXCL-8 compõe a classe das quimiocinas CXC, constituindo um membro da família de supergenes da interleucina-8, que inclui outros pequenos peptídeos quimiotáticos com homologia estrutural. É secretada por vários tipos de células, incluindo monócitos, neutrófilos, células epiteliais, fibroblastos, endoteliais, mesoteliais e tumorais (“Pro-Inflammatory Cytokines Overview - BR”, [s.d.]). A IL-8 desempenha um papel importante na inflamação, na cicatrização de feridas e é um potente mediador da fase aguda do processo

inflamatório, atraindo neutrófilos e modulando a proliferação endotelial na angiogênese (JI Herseth, M Refsnes, M Låg, G Hetland, PE Schwarze, 2008”, [s.d.]) (DOBREVA et al., 2006) e tem a capacidade de recrutar células T, bem como células inflamatórias inespecíficas em locais de inflamação, ativando neutrófilos (SCHRÖDER, 1992). Também estimula a produção de  $\alpha$  actina do músculo liso em fibroblastos humanos (SIMS; SMITH, 2010). Além disso, a IL-8 é quimiotática para fibroblastos, acelera sua migração e estimula a deposição de tenascina, fibronectina e colágeno I durante a cicatrização de feridas *in vivo* (SIMS; SMITH, 2010).

#### 2.5.3.12 Eotaxina

A eotaxina/CCL11 é uma CC quimiocina, descoberta como um quimioatraente seletivo para eosinófilos no lavado broncoalveolar (BAL) (ADAR et al., 2014), obtido após o desafio com alérgenos de cobaias ativamente sensibilizadas (Griffiths-Johnson et al. 1993, Jose et al. 1994a). É liberada por células endoteliais ativadas, células epiteliais, eosinófilos e macrófagos (KATHERINE A. FITZGERALD, ... ROBIN E. CALLARD, [s.d.]). O recrutamento de eosinófilos é comum em muitas doenças inflamatórias e fibróticas, incluindo fibrose pulmonar idiopática, tendo sido demonstrado que eosinófilos estimulam a proliferação de fibroblastos e a diferenciação em miofibroblastos, exagerando a deposição de matriz extracelular (MEC). É considerada um potente atraente de eosinófilos (ADAR et al., 2014), basófilos e linfócitos Th2 que é liberada por células endoteliais ativadas, células epiteliais, eosinófilos e macrófagos (KATHERINE A. FITZGERALD, ... ROBIN E. CALLARD, [s.d.]). Seus níveis já foram avaliados como elevados em condições patológicas distintas, desde inflamação das vias aéreas a linfoma de Hodgkin, passando por obesidade e doença arterial coronariana (ADAR et al., 2014). A eotaxina é produzida por células endoteliais estimuladas por  $IFN\gamma$ , eosinófilos ativados por complemento, monócitos ativados por TNF e fibroblastos dérmicos e em resposta à estimulação de IL-4 *in vivo*. O mRNA da eotaxina é expresso constitutivamente no intestino delgado, cólon, pulmão e coração (AMERIO et al., 2003).

#### 2.5.3.13 Proteína Inflamatória de Macrófago - $1\alpha$ (MIP- $1\alpha$ )

MIP é um membro da subfamília CC de quimiocinas (HSIEH et al., 2008), produzidas por uma variedade de tipos de células, incluindo neutrófilos, fibroblastos e células epiteliais e células dendríticas em resposta a processos inflamatórios agudos e crônicos, atuando no recrutamento de células pró-inflamatórias (HSIEH et al., 2008); (DRISCOLL, 1994). Aumentos na expressão de MIP- $1\alpha$  têm sido documentados em doenças autoimunes e em

doenças inflamatórias, como na esclerose múltipla, enterite experimental e pneumonite induzida por influenza (AJUEBOR et al., 2004). É um dos principais fatores produzidos por macrófagos e monócitos, após estimulação com endotoxina bacteriana ou citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , porém pode ser expressa por vários tipos celulares incluindo aquelas hematopoiéticas e algumas teciduais, como fibroblastos, células epiteliais, células musculares lisas vasculares ou plaquetas após ativação. O efeito biológico é desencadeado por meio da ligação aos receptores CCR1 (ligante CCL3) e CCR5 (ligantes CCL3 e CCL4), com destaque a quimiotaxia e a migração transendotelial. A MIP-1 $\alpha$  afeta monócitos, linfócitos T, células dendríticas, células NK e plaquetas, ativando também granulócitos humanos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos). Podem contribuir, também, para a inflamação através da indução da síntese e liberação de outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF a partir de fibroblastos e macrófagos (SCHALLER et al., 2017) (NTANANISIS-STATHOPOULOS; FOTIOU; TERPOS, 2020)

#### 2.5.3.14 Proteína Quimioatraente de Monócitos-1 (MCP-1)

A MCP-1 pertence à subfamília das quimiocinas CC e é crítica para os processos inflamatórios (FUENTES et al., 1995) (SINGH; ANSHITA; RAVICHANDIRAN, 2021). A MCP-1 derivada de fibroblastos pulmonares pode desempenhar um papel crucial na proliferação e migração de fibroblastos (LIU et al., 2015). No Estudo de Liu et al, 2015, em que foi realizada a estimulação de fibroblastos humanos por sílica, eles demonstraram que a regulação positiva da MCP-1 derivada de fibroblastos pulmonares, está envolvida na migração de fibroblastos pulmonares induzida por SiO<sub>2</sub> e que o receptor de quimiocinas CC tipo 2 (CCR2) também sofreu *upregulation* após essa estimulação.

Todos esses estudos apontam vias do processo inflamatório que podem ser alvo de ações para o tratamento da silicose e, possivelmente, de outras doenças fibrosantes. Como a silicose é uma doença progressiva e incurável que afeta milhares de trabalhadores em todo mundo, é fundamental que pesquisas possam esclarecer sua patogênese e, assim, formular intervenções terapêuticas eficazes, trazendo esperança real de cura ou bloqueio da progressão da doença.

Os quadros 3 e 4 apresentam um resumo das citocinas e quimiocinas e suas células produtoras.

Quadro 3 – Citocinas e sua origem celular

| <b>Citocina</b>                                  | <b>Tipo de Citocina</b> | <b>Origem Celular</b>   |
|--|-------------------------|---|
| <b>Fator de Necrose Tumoral (TNF)</b>            | Pró-inflamatória        | Macrófagos, mastócitos, células NK, VSMCs, células T e B          |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>                    | Pró-inflamatória        | Monócitos, macrófagos   |
| <b>IL-2</b>                                      |                         | Células Th1   |
| <b>IL-4</b>                                      | Anti-inflamatória       | Células T (Th2), mastócitos, células B, células estromais         |
| <b>IL-6</b>                                      | Pró-inflamatória        | Células Th, macrófagos, fibroblastos                              |
| <b>IL-7</b>                                      | Pró-inflamatória        | células estromais da medula óssea, células epiteliais             |
| <b>IL-10</b>                                     | Anti-inflamatória       | Células T, células B, macrófagos                                  |
| <b>IL-13</b>                                     | Anti-inflamatória       | Células T (Th2)   |
| <b>IL-17</b>                                     | Pró-inflamatória        | Células Th17  |
| <b>Interferon gama (INF-<math>\gamma</math>)</b> | Pró-inflamatória        | Macrófagos, células Th1, células Tc, células B, células NK, VSMCs |

Fonte: Adaptado de (“Pro-Inflammatory Cytokines Overview - BR”, [s.d.]) e (LIU et al., 2021)

Quadro 4 – Quimiocinas e sua origem celular

| <b>Quimiocina</b>   | <b>Tipo de Citocina/<br/>Quimiocina</b> | <b>Origem Celular</b>   |
|---|---|---|
| <b>Interferon Gama induzido pela proteína 10kDa (IP-10) / CXXL10</b>                                | Pró-inflamatória                        | leucócitos, neutrófilos ativados, eosinófilos, monócitos, células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos        |
| <b>IL-8 / CXCL8</b>   | Pró-inflamatória                        | Monócitos, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais, hepatócitos, condrócitos e células tumorais                             |
| <b>Eotaxina / CCL11</b>   | Pró-inflamatória                        | células endoteliais ativadas, células epiteliais, eosinófilos e macrófagos  |
| <b>Proteína Inflamatória de Macrófago - 1<math>\alpha</math> (MIP-1 <math>\alpha</math>) / CCL3</b> | Pró-inflamatória                        | neutrófilos, fibroblastos e células epiteliais e células dendríticas  |
| <b>Proteína Quimiotraente de Monócitos-1 (MCP-1) / CCL2</b>   | Pró-inflamatória                        | células epiteliais, células endoteliais, células musculares lisas, monócitos/macrófagos, fibroblastos, astrócitos e células microgliais |

Fonte: Adaptado de (“Pro-Inflammatory Cytokines Overview - BR”, [s.d.]) e (LIU et al., 2021)



## 2.6 TRATAMENTO

A silicose permanece como uma doença incurável e para a qual não há tratamento específico, a despeito de estudos com terapias experimentais, como os citados no Quadro 5.

Quadro 5 - Possibilidades de tratamento testadas em modelos animais de silicose ou fibrose.

|  |
|--|
| <b>TRATAMENTO</b>  |
| <b>Drogas anti-fibróticas</b>                                    |
|  |
| <b>Nintedanibe</b>   |
| <b>Pirfenidona</b>   |
| <b>Terapias anti-citocinas</b>                                   |
|  |
| <b>Anakinra (IL-1ra)</b>   |
| <b>Anticorpo Anti-IL-17</b>                                      |
| <b>Anticorpo anti-IL-9</b>                                       |
| <b>IL-13 imunotoxina</b>   |
| <b>Receptor recombinante solúvel de TNF</b>                      |
|  |
| <b>Infliximab</b>  |
| <b>Anticorpo anti-CD-11</b>                                      |
| <b>Agentes que influenciam o sistema de autofagia lisossomal</b> |
|  |
| <b>Imipramina</b>  |
| <b>Dioscina</b>  |
| <b>Rapamycin/cAMP</b>  |
| <b>Atractylenolide III</b>                                       |
| <b>Trehalose</b>   |

|  |
|--|
| <b>Antioxidantes</b>                                   |
|  |
| <b>N-Acetilcisteína</b>                                |
| <b>Dexametasona</b>                                    |
| <b>Flunisolide</b>                                     |
| <b>Glicocorticoides endógenos</b>                      |
|  |
| <b>Anexina A1</b>                                      |
| <b>Agentes ampliadores de AMPc</b>                     |
|  |
| <b>Roflumilast</b>                                     |
| <b>Tadalafil</b>                                       |
| <b>Sildenafil</b>                                      |
| <b>Agentes que influenciam TGF-<math>\alpha</math></b> |
|  |
| <b>Emodin</b>  |
| <b>Ponatinib</b>                                       |
| <b>Outros Agentes</b>                                  |
|  |
| <b>Rupatadine</b>                                      |
| <b>Piroxican</b>                                       |
| <b>Nicorandil</b>                                      |
| <b>Hesperetin</b>                                      |
| <b>Micro RNA</b>                                       |
| <b>Células Mesenquimais</b>                            |
| <b>Vesículas Extracelulares</b>                        |

**Fonte:** Adaptada de [Jana Adamcakova](#) e [Daniela Mokra](#) (ADAMCAKOVA; MOKRA, 2021)

Na atualidade, o que podemos oferecer aos milhares de trabalhadores adoecidos, são tratamentos paliativos e de suporte, como a vacinação completa (gripe, COVID-19, pertussis, influenza e pneumocócicas), reabilitação respiratória, medicamentos sintomáticos, oxigenioterapia e, em última análise, o transplante pulmonar, como única alternativa à doença terminal (MCEWEN; BRODIE, 2021).

A busca por alternativas de tratamento que reduzam o processo fibrótico tem sido o caminho mais provável como alternativa terapêutica aos milhares de doentes em todo mundo. Como drogas promissoras entre os inúmeros tratamentos experimentais para a silicose, já existem duas drogas antifibróticas liberadas para o tratamento da Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI) mas, seriam estas opções para o tratamento da silicose? A FPI é uma doença pulmonar idiopática fibrosante, progressiva e que pode levar ao óbito (BADDINI-MARTINEZ et al., 2015), para a qual já temos drogas liberadas pela ANVISA no Brasil. Duas drogas antifibróticas têm sido utilizadas até o momento no tratamento da FPI: a pirfenidona e o nintedanibe, o que pode nos indicar uma possibilidade de sua utilização no tratamento também da silicose (LI et al., 2022).

A pirfenidona ainda não tem o mecanismo de ação completamente elucidado, mas parece relacionado à diminuição da expressão genética de pró-colágenos, TGF- $\beta$  e PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas Humanas), além de inibir a produção de TNF- $\alpha$ . A droga parece ainda possuir propriedades antioxidantes. Já o nintedanibe atua na FPI inibindo a atividade de receptores dependentes de tirosinas quinases. Ele bloqueia pontos intracelulares de ligação do ATP (Adenosina Trifosfato) em tirosinas quinases específicas. Não sabemos avaliar com certeza, até o momento, se o tratamento aprovado para a FPI poderia ser útil no tratamento da silicose.

Jingwe Guo et al, 2019, estudaram o papel da pirfenidona no tratamento da silicose induzida em cobaias. No seu estudo, após a instilação intranasal de sílica, desde o primeiro dia, os ratos receberam pirfenidona (50, 100 mg / kg / dia) e foram sacrificados no 14º e 28º dias para observar a histopatologia dos pulmões, para analisar o nível de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 em tecidos pulmonares e para medir a expressão de TGF- $\beta$ 1, Smad2 / 3, vimentina e E-caderina em tecidos pulmonares. Os resultados mostraram que a pirfenidona (50, 100 mg / kg / dia) reduziu a inflamação alveolar induzida pela sílica, o dano da estrutura alveolar e as áreas azuis das fibras de colágeno nos pulmões dos ratos. Ao mesmo tempo, a pirfenidona também reduziu o nível de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 no tecido pulmonar e a expressão da proteína do colágeno I. Após intervenção da pirfenidona por 14 dias e 28 dias, a expressão da proteína vimentina diminuiu e a expressão da proteína E-caderina foi regulada positivamente nos tecidos pulmonares. Além

disso, a via TGF- $\beta$ 1 / SMAD 2 / 3 foi ativada 14 e 28 dias após a instilação de sílica, e a pirfenidona reduziu a expressão de TGF- $\beta$ 1 e SMAD2 / 3 (um tipo de fator de transcrição) (LAMARCHE et al., 2021) nos pulmões. Os resultados indicaram que a intervenção com pirfenidona inibiu a transição epitelial-mesenquimal e a fibrose pulmonar em modelo de silicose em ratos, cujos efeitos podem estar relacionados à via TGF- $\beta$ 1 (GUO et al., 2019), mostrando uma possibilidade a ser avaliada para o tratamento em humanos.

Já em outro estudo sobre os antifibróticos na silicose, Cao et al induziram silicose em camundongos e avaliaram a resposta ao tratamento com pirfenidona (CAO et al., 2022). O papel da pirfenidona na silicose é desconhecido, mas ela atua tanto reduzindo a inflamação quanto o processo de fibrose. No estudo de Cao et al eles encontraram melhora na disfunção pulmonar e redução na secreção de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), bem como diminuição na deposição pulmonar de colágeno I e fibronectina, proteínas fibróticas.

O nintendanibe é um inibidor do receptor da tirosina quinase específico para receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR) (MAILLET et al., 2012). Maillet et al. Identificaram, em seu estudo ,que ocorreu uma redução efetiva na inflamação crônica induzida por sílica e a fibrose em camundongos tratados com nintendanibe, concluindo que a as características anti-inflamatórias e antifibróticas de nintedanibe podem afetar o curso progressivo de doenças pulmonares fibróticas, como FPI ou silicose (MAILLET et al., 2012). Em outro estudo, com a utilização de nintedanibe em uma formulação intranasal, Andrade da Silva et al. demonstraram a segurança dessa via de aplicação e sua efetividade no tratamento da silicose e da fibrose pulmonar em um modelo de experimentação animal (ANDRADE DA SILVA et al., 2023).

### **3 JUSTIFICATIVA**

Este projeto justifica-se pela necessidade de ampliar os conhecimentos acerca do padrão inflamatório na patogênese da silicose em humanos, uma vez que inúmeros estudos demonstram que é na via inflamatória que se vislumbram opções terapêuticas futuras. No campo da saúde pública, a compreensão desses processos abre caminhos para pesquisas com drogas que tragam perspectivas reais de tratamento aos milhares de doentes e identificação precoce dos trabalhadores com risco de adoecimento.

Tomando por base o estudo pré-clínico indicativo do envolvimento da citocina Th2 IL-13 no desenvolvimento da fibrose pulmonar na silicose murina, consideramos a possibilidade de que a IL-13, assim como outras citocinas, serem uma alternativa de biomarcador de exposição ou de adoecimento precoce para trabalhadores expostos à poeira de sílica.

#### **4 HIPÓTESE**

A IL-13 ou outras interleucinas podem ser utilizadas como uma alternativa de biomarcadores de exposição ou de adoecimento precoce para trabalhadores expostos à sílica.

## 5 OBJETIVO GERAL

Avaliar a potencial correlação entre os níveis de mediadores inflamatórios, com destaque para a citocina próinflamatória IL-13, e a condição de exposição ou não de indivíduos à poeira contendo partículas de sílica.

### 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a reatividade de células provenientes de sangue periférico de indivíduos nas condições expostos e não expostos;
2. Avaliar os níveis da citocina IL-13 em amostras de plasma de indivíduos expostos ou não à poeira de sílica livre;
3. Avaliar os níveis de outras moléculas inflamatórias incluindo as citocinas TNF, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-7, e das citocinas IL8, MIP1- $\alpha$ , IP-10 e eotaxina no plasma de indivíduos expostos ou não à poeira de sílica livre;
4. Avaliar a reatividade de polimorfonucleares neutrófilos provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos ou não à poeira com sílica, na condição basal ou frente à estimulação com LPS, 13-acetato-12-miristato-forbol (PMA) e partículas de sílica “in vitro”.

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foi utilizada uma amostra de conveniência, não probabilística, constituída por trabalhadores atendidos no Ambulatório de Pneumopatias Ambientais e Ocupacionais do Centro de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana – CESTEHE/ENSP/Fiocruz. Foram recrutados 60 indivíduos, dos quais 31 do grupo não exposto, sem história de exposição a poeiras, e 29 com relato de exposição à poeira contendo partículas de sílica. Todos os participantes responderam ao questionário padronizado sobre sintomas respiratórios (anexo 1). Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da escola Nacional de Saúde Pública (ENSP/FIOCRUZ) - **CAAE: 46140821.8.3001.5248**. A amostra utilizada foi uma amostra de conveniência, onde os expostos foram selecionados a partir do convite para participação no estudo aos trabalhadores regularmente atendidos no ambulatório de pneumologia do CESTEHE e os não expostos foram recrutados entre os trabalhadores da Fiocruz, convidados a integrar o estudo. Ambos os grupos responderam ao TCLE para ingresso no estudo.

Foram considerados aptos a participar do estudo os seguintes participantes:

- ✚ Maiores de 18 anos de idade, do sexo masculino;
- ✚ Trabalhadores atendidos no Ambulatório de Pneumopatias Ambientais e Ocupacionais do CESTEHE com história de exposição a poeira de sílica livre;
- ✚ Trabalhadores atendidos no Ambulatório de Pneumopatias Ambientais e Ocupacionais do CESTEHE sem história de exposição a poeiras minerais (não exposto);
- ✚ Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Como a maioria dos trabalhadores de nossa amostra de conveniência eram do sexo masculino em decorrência da natureza do trabalho, em geral serviços da indústria naval, de metalurgia e mineração, foram incluídos apenas trabalhadores do sexo masculino. A caracterização da exposição foi definida pelo Questionário Padronizado já utilizado no ambulatório, que se encontra no anexo 1.

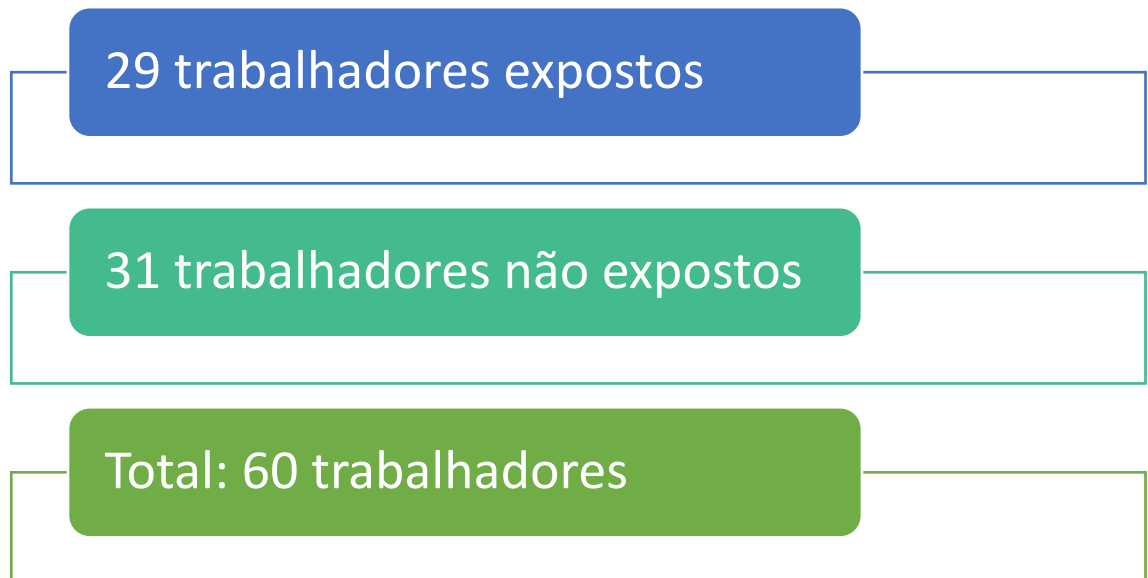
Os critérios de exclusão foram:

- ✚ Sexo feminino;
- ✚ Quadro infeccioso no momento do estudo, ou até um mês antes da inclusão;
- ✚ Presença de tuberculose ativa;
- ✚ Neoplasias malignas torácicas ou extratorácicas no momento da inclusão;
- ✚ Insuficiência cardíaca aguda ou descompensada;
- ✚ Insuficiência coronariana aguda ou não controlada;



✚ Participação em outro estudo;

No total foram selecionados 60 trabalhadores divididos em:



## 6.2 AVALIAÇÃO DOS TRABALHADORES

Os trabalhadores foram avaliados através de um questionário padronizado de sintomas respiratórios em que foi avaliada a presença de tosse, expectoração, dispneia e hábitos tabágicos. A caracterização da exposição também foi avaliada neste questionário, onde a exposição à sílica foi identificada através do recordatório sobre atividades laborais com exposição à sílica.

Para a coleta de dados foi utilizado um questionário de sintomas respiratórios com respostas fechadas e estrutura baseada no questionário da American Thoracic Society, modificado pela comissão técnica de pneumopatias ocupacionais vinculada à Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Rio de Janeiro (CASTRO et al., 2004), que é rotineiramente empregado no ambulatório. O questionário encontra-se detalhado no anexo 1.

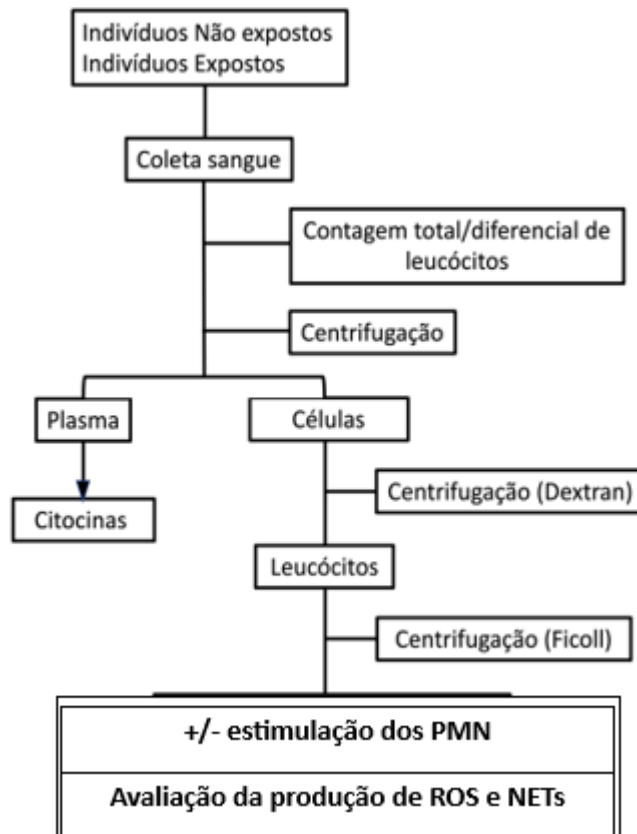
## 6.3 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo transversal com amostra de conveniência.

#### 6.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Todos os participantes, expostos e não expostos à sílica foram submetidos à coleta de sangue venoso, sendo inicialmente analisado o perfil leucocitário sanguíneo para conhecimento acerca da condição de cada indivíduo. Após centrifugação, foi obtido o plasma, utilizado para posterior análise dos níveis de citocinas. A partir do “pellet” celular, foi realizada a obtenção de leucócitos, posteriormente purificados nas populações de mono e polimorforfonucleares, que foram analisadas quanto a parâmetros específicos na condição basal e frente a estímulo (LPS, PMA e sílica; Figura 3).

Figura 3: Organograma de processamento das amostras provenientes de paciente não expostos e expostos à poeira contendo sílica livre.



Fonte: Próprio autor, 2023

#### 6.5 COLETA DE SANGUE E CONTAGEM DE LEUCÓCITOS

Para a coleta de sangue venoso dos doadores, foram utilizados tubos de plástico a vácuo, heparinizados, cada tubo de 10 mL, com revestimento interior de silicone e rolha lubrificada com silicone. No total, foram coletados 5 tubos, totalizando 50 mL de sangue periférico, de

cada paciente. Após a coleta do sangue, foram retirados 10 µL de sangue e adicionados a 490 µL de líquido de Türk para contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer, com auxílio de um microscópio óptico de luz. Para contagem diferencial dos leucócitos, foi realizado esfregaço sanguíneo utilizando-se 5 µL de sangue colocados diretamente sobre uma lâmina de vidro, posteriormente espalhados em uma camada fina com o auxílio de outra lâmina. Os esfregaços foram corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa, e a avaliação das células feita em microscópio de luz e objetiva de imersão em óleo.

#### 6.6 ISOLAMENTO DE LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS

Após a coleta do sangue, uma amostra de 10 mL do sangue foi transferida para um novo tubo, ficando mantido em banho-maria à 37°C para a separação do soro autólogo. O restante do sangue foi transferido, cuidadosamente, para outro tubo, e centrifugado a 900 rpm por 20 minutos à 37°C. Em seguida, o plasma foi recolhido e armazenado à -80°C, para posterior análise de citocinas através do sistema multiplex (item 4). Após recolhimento do plasma, o “pellet” celular foi recuperado e adicionados aproximadamente 15 mL de solução de salina (NaCl) 0,9%. Após homogeneização, foi adicionado dextran 70 a 6%, na proporção 2:1, e em seguida feita incubação por 1 hora à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 1350 rpm por 5 minutos a 4°C com freio e aceleração. Para lise das hemácias, após descarte do sobrenadante, foi realizado o choque osmótico realizado com a adição de 20 mL de salina 0,2% (hipotônica) ao “pellet” celular, seguida de agitação em vórtex por 20 segundos. Imediatamente após, foi adicionado igual volume (20 mL) de salina 1,6% (hipertônica) e feita homogeneização por mais 20 segundos. Após essa etapa, a amostra foi centrifugada a 1350 rpm por 5 minutos à 4°C, com freio e aceleração. O sobrenadante foi descartado e ao “pellet” (contendo de células) foram adicionados 5 mL da solução de HBSS/A e homogeneizado lentamente. Foram adicionados 5 mL da suspensão celular sobre 15 mL de Ficoll-Paque, seguida de centrifugação a 1350 rpm durante 30 minutos a 4°C. Ao final dessa etapa, foram observadas 3 bandas: i) superior de HBSS/A, ii) intermediária com células mononucleares (MNC) e iii) inferior com as células polimorfonucleares (PMN). Para confirmação do processo de separação das populações de células mono e polimorfonucleares, foi realizada análise diferencial através da confecção de citocentrifugados corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa (citocentrífuga Shandon). A avaliação foi feita em microscópio de luz (Olympus BX40) com objetiva de imersão em óleo com aumento de 100x.

### **6.6.1 Leucócitos polimorfonucleares (PMN)**

Para a população de polimorfonucleares, o “pellet” celular recolhido e homogeneizado em 8 mL de HBSS/A. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 1500 rpm a 4°C, por 10 minutos, para a retirada de resíduos de Ficoll-Paque. O “pellet” foi ressuspensionado em 2 mL de HBSS/A, e alíquotas de células foram diluídas em solução de PBS + Tripan 0,2% na proporção de 1:50 para a contagem em câmara de Neubauer, sendo dado prosseguimento ao ensaio de ativação celular.

## **6.7 ESTIMULAÇÃO “IN VITRO” DE LEUCÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO**

### **6.7.1 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)**

Para determinação da produção de ROS,  $5 \times 10^5$  polimorfonucleares/poço foram adicionados a placas de 96 poços escuras e, em seguida, estimulados com LPS (1 µg/mL), PMA (40 ng/mL) ou partículas de sílica (0,5 – 10 µm) (300 µg/mL) por 1 hora, a 37°C. Em seguida, as células foram incubadas com a sonda intracelular CM-H2DCFDA (5 µM) por 15 minutos, a 37°C, e a leitura foi realizada em leitora de placa de fluorescência SpectraMax (Molecular Devices) (excitação a 495 nm e emissão a 530nm).

### **6.7.2 Liberação de NETs**

Para avaliação da liberação de NETs,  $5 \times 10^5$  polimorfonucleares/poço foram adicionados a placas de 96 poços escuras, em seguida, estimulados com LPS (1 µg/mL), PMA (40 ng/mL) ou partículas de sílica (300 µg/mL) por 1 hora, a 37°C. Em seguida, foi adicionado o marcador de DNA extracelular Sytox Green (1:1000), e após 10 minutos de incubação foi realizada a leitura de fluorescência (excitação a 485 nm e emissão a 532nm) em leitora SpectraMax (Molecular Devices).

## **6.8 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PELO SISTEMA MULTIPLEX**

Para a quantificação das citocinas no plasma foi utilizado um kit comercial Multiplex, seguindo as instruções do fabricante (Bio-Rad, Hercules, CA). Os padrões e as amostras (50 µL) foram diluídos em tampão de diluição, adicionados à placa e feita incubação com 50 µL do conjunto de microesferas, acopladas aos anticorpos (2.000 grânulos/poço), por 30 min à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob agitação ajustada (300 rpm). Foram feitas 3 lavagens sucessivas utilizando 100 µL de tampão de lavagem. Os anticorpos secundários e os de detecção foram adicionados aos poços e feita incubação à temperatura ambiente. Após 3 lavagens sucessivas utilizando 100 µL de tampão de lavagem, foram adicionados 125 µL de

tampão a cada poço e feita agitação da placa por 1 min para 500 rpm. A análise dos dados foi realizada utilizando o software Bio-Plex Manager. O ensaio de multiplex *bead array* tem alto grau de precisão intra-ensaio (variação inferior a 10%) e inter-ensaio (variação de 10-20%). Os valores obtidos foram expressos como pg de citocina por mL.

## 6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos utilizados para a análise da população foi o qui-quadrado de Pearson, com valor de significância  $p \leq 0,05$ , no pacote Epi INFO, versão 7.0.

O teste estatístico utilizado para avaliação de ROS e NET foi o teste T de *Student* e na avaliação das citocinas o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Para ambos os testes, os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. O pacote utilizado para estas análises foi o Prisma 8.1.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Nesse estudo foram recrutados 60 indivíduos, todos do sexo masculino, sendo 29 expostos entre 48 e 79 anos ( $54,5 \pm 9,3$ ) e 31 não expostos entre 38 e 73 anos ( $62,0 \pm 8,1$ ). Na tabela 6, pode-se observar que 13 pacientes eram fumantes no grupo não exposto e 17 eram fumantes entre os expostos, não apresentando variação significativa entre os dois grupos quanto ao tabagismo ( $p < 0,1507$ ). Outro parâmetro avaliado nessa população foi a presença de sintomas respiratórios tais como tosse e dispneia. Para tosse, apenas 5 indivíduos do grupo não exposto apresentaram esse sintoma com frequência. Já no grupo exposto, o número foi elevado significativamente, onde 17 indivíduos relataram tosse como sintoma frequente. Para o sintoma dispneia, 20 indivíduos relataram sentir dispneia no grupo exposto, contra 11 indivíduos no grupo não exposto, sendo a presença desse sintoma significativamente maior em voluntários expostos a partículas de sílica (tabela 1). No quadro 10 é possível avaliar de forma detalhada todos os valores coletados de todos os voluntários expostos à partículas de sílica deste estudo.

Tabela 1 - Caracterização da População de Estudo

| Grupos              | N  | Idade (anos)   | Fumantes |     | Sintomas respiratórios |     |       |      |
|---------------------|----|----------------|----------|-----|------------------------|-----|-------|------|
|                     |    |                | Não      | Sim | Dispneia               |     | Tosse |      |
|                     |    |                |          |     | Não                    | Sim | Não   | Sim  |
| <b>Não expostos</b> | 31 | $54,5 \pm 9,3$ | 18       | 13  | 20                     | 11  | 26    | 5    |
| <b>Expostos</b>     | 29 | $62,0 \pm 8,1$ | 12       | 17  | 6                      | 23* | 12    | 17** |

\*  $p < 0,0006$  quando comparado ao grupo Não expostos com dispneia. \*\*  $p < 0,0007$  quando comparado ao grupo Não expostos com tosse.

Fonte: Próprio autor, 2023

### 7.2 PERFIL DE CELULARIDADE NO SANGUE PERIFÉRICO

Em relação aos parâmetros hematológicos, apresentados na Tabela 2, vimos que pacientes expostos não apresentaram alteração no número total de leucócitos ( $9,72 \pm 2,26 \times 10^6/\text{mm}^3$ ), bem como nos tipos celulares avaliados, tais como neutrófilos bastonetes ( $0,59 \pm 0,30 \times 10^6/\text{mm}^3$ ), neutrófilos segmentados ( $5,21 \pm 1,66 \times 10^6/\text{mm}^3$ ), linfócitos ( $3,39 \pm 1,02 \times 10^6/\text{mm}^3$ ), monócitos ( $0,23 \pm 0,12 \times 10^6/\text{mm}^3$ ) e eosinófilos ( $0,30 \pm 0,24 \times 10^6/\text{mm}^3$ ) quando comparado aos leucócitos totais ( $11,28 \pm 4,28 \times 10^6/\text{mm}^3$ ), neutrófilos bastonetes ( $0,58 \pm 0,36 \times 10^6/\text{mm}^3$ ), neutrófilos segmentados ( $6,13 \pm 2,81 \times 10^6/\text{mm}^3$ ), linfócitos ( $4,07 \pm 1,77$

$\times 10^6/\text{mm}^3$ ), monócitos ( $0,31 \pm 0,17 \times 10^6/\text{mm}^3$ ) e eosinófilos ( $0,23 \pm 0,28 \times 10^6/\text{mm}^3$ ) presentes no grupo não exposto.

Tabela 2 – Análise total e diferencial de Leucócitos no Sangue periférico de indivíduos não expostos e expostos a partículas de sílica

| Leucócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) | Não expostos     | Expostos        |
|--|------------------|-----------------|
| Total                                    | 11,28 $\pm$ 4,28 | 9,72 $\pm$ 2,26 |
| Neutrófilos Bastonetes                   | 0,58 $\pm$ 0,36  | 0,59 $\pm$ 0,30 |
| Neutrófilos Segmentados                  | 6,13 $\pm$ 2,81  | 5,21 $\pm$ 1,66 |
| Linfócitos                               | 4,07 $\pm$ 1,77  | 3,39 $\pm$ 1,02 |
| Monócitos                                | 0,31 $\pm$ 0,17  | 0,23 $\pm$ 0,12 |
| Eosinófilos                              | 0,23 $\pm$ 0,28  | 0,30 $\pm$ 0,24 |

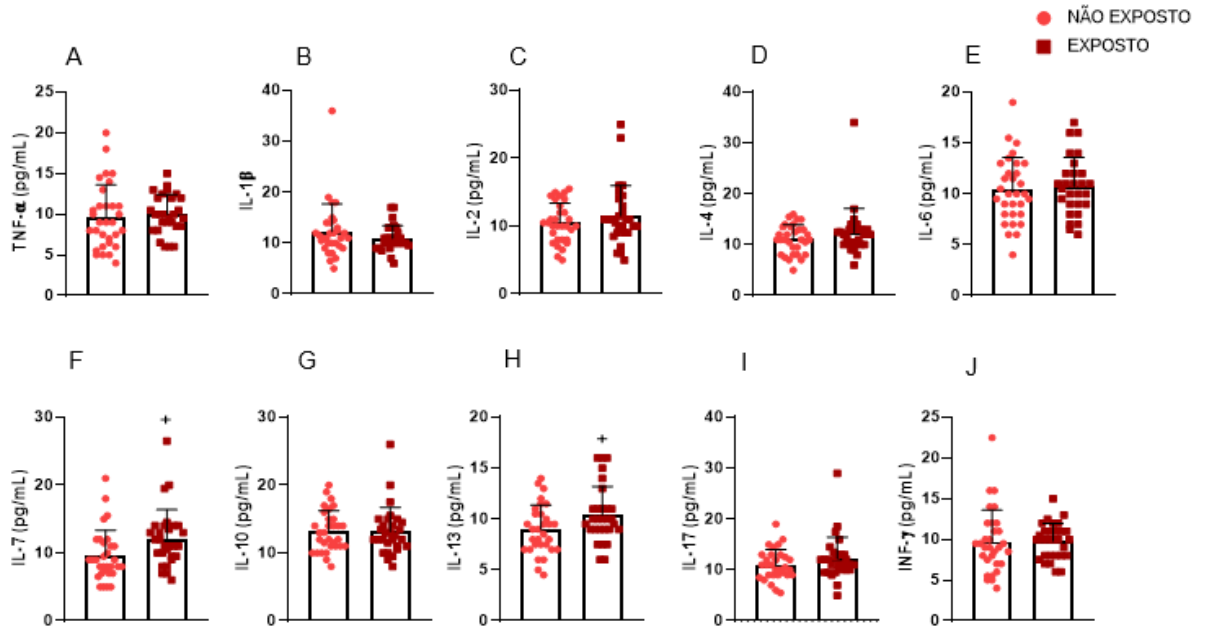
Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão. Indivíduos não expostos (n=31) e expostos (n=29) à sílica.

Fonte: Próprio autor, 2023.

### 7.3 CITOCINAS

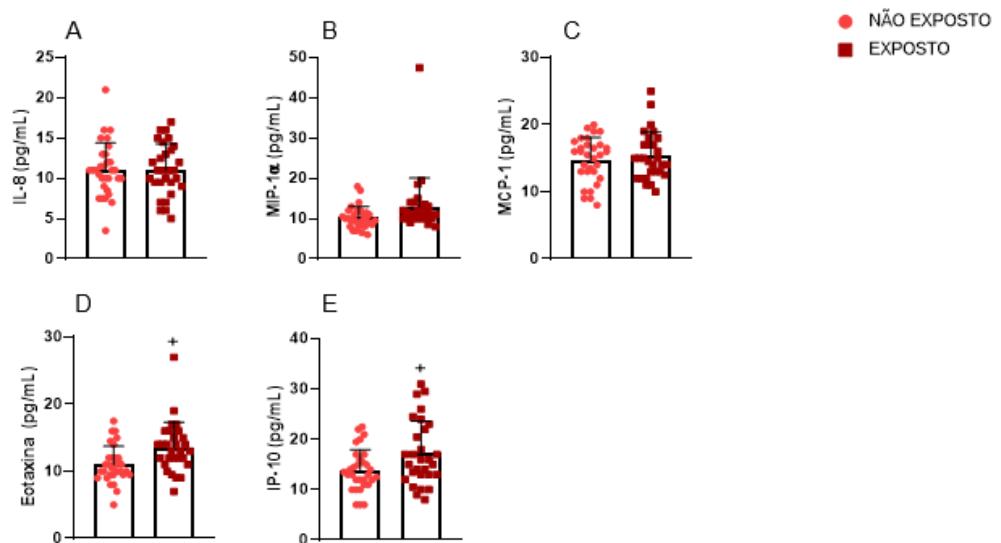
Para verificação do perfil de citocinas no plasma de voluntários expostos ou não expostos à sílica, fizemos um ensaio de Multiplex para a detecção das citocinas TNF, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, IL-10, IL-13, IL-17 e INF- $\delta$  (figura 4) e das quimiocinas IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, Eotaxina, IP-10 (figura 5). Foi possível observar que o plasma de indivíduos expostos à sílica apresentou níveis elevados das citocinas IL-7 (figura 4F) e IL-13 (figura 4H) e das quimiocinas Eotaxina (figura 5D) e IP-10 (figura 5E) e MIP1- $\alpha$ , valores encontrados estão apresentados na Tabela 3. Entretanto, vimos que os níveis de TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 e INF- $\gamma$  não se mostraram alterados após a exposição a partículas de sílica, estes valores estão apresentados nos Quadro 6 e 7.

Figura 4: Avaliação da produção de citocinas no plasma de voluntários expostos ou não à partículas de sílica. As análises incluem: (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-1 $\beta$ , (C) IL-2, (D) IL-4, (E) IL-6, (F) IL-7, (G) IL-10, (H) IL-13, (I) IL-17 e (J) INF- $\gamma$ .



Fonte: Próprio autor, 2023

Figura 5: Avaliação dos níveis de quimiocinas no plasma de voluntários expostos ou não expostos a partículas de sílica. As análises incluem: (A) IL-8, (B) MIP-1 $\alpha$ , (C) MCP-1, (D) Eotaxina, (E) IP-10.



Fonte: Próprio autor, 2023



Quadro 6 – citocinas com diferença significativa no test *Mann-Whitney* encontradas no estudo.

| <b>Citocina</b>                 | <b>Não exposto<br/>(n=31) média<br/>e DP</b> | <b>Exposto<br/>(n=29) média<br/>e DP</b> | <b>Não<br/>exposto<br/>(n=31)<br/>Mediana</b> | <b>Exposto<br/>(n=29)<br/>Mediana</b> | <b>Valor de p</b> |
|---------------------------------|--|--|---|---------------------------------------|-------------------|
| <b>Eotaxina</b>                 | 11,0 ±2,74                                   | 13,57±3,76                               | 10,50   | 13,00                                 | 0,0026            |
| <b>IL-7</b>                     | 9,60±3,76                                    | 12,12±4,27                               | 9,00  | 11,00                                 | 0,0062            |
| <b>IL-13</b>                    | 8,97±2,40                                    | 10,43±2,77                               | 9,00  | 10,00                                 | 0,0500            |
| <b>IP-10</b>                    | 13,84±4,13                                   | 17,26±6,42                               | 13,00   | 16,00                                 | 0,0350            |
| <b>MIP-1<math>\alpha</math></b> | 10,85±4,32                                   | 12,98±7,13                               | 10,00   | 11,00                                 | 0,0203            |

Fonte: Próprio autor, 2023.

Quadro 7 – citocinas com diferença não significativa no test *Mann-Whitney* encontradas no estudo.

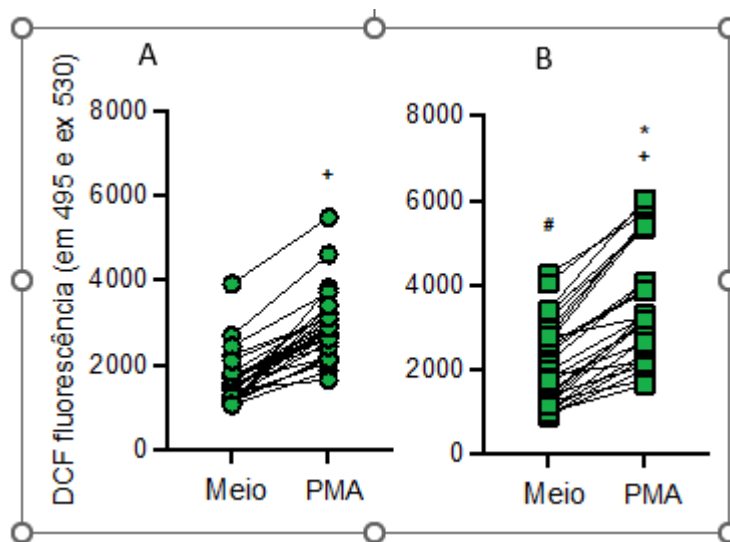
| <b>Citocina</b>                | <b>Não exposto<br/>(n=31)<br/>média e DP</b> | <b>Exposto<br/>(n=29)<br/>média e DP</b> | <b>Não exposto<br/>(n=31)<br/>Mediana</b> | <b>Exposto<br/>(n=29)<br/>Mediana</b> | <b>Valor de p</b> |
|--------------------------------|--|--|---|---------------------------------------|-------------------|
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | 12,26 $\pm$ 5,47                             | 10,95 $\pm$ 2,51                         | 11,00                                     | 10,00                                 | 0,3340            |
| <b>IL-2</b>                    | 10,48 $\pm$ 2,93                             | 11,53 $\pm$ 4,44                         | 10,00                                     | 11,00                                 | 0,4952            |
| <b>IL-4</b>                    | 11,11 $\pm$ 2,84                             | 12,40 $\pm$ 4,71                         | 11,00                                     | 12,00                                 | 0,4407            |
| <b>IL-6</b>                    | 10,37 $\pm$ 3,22                             | 10,38 $\pm$ 3,40                         | 10,00                                     | 10,75                                 | 0,6367            |
| <b>IL-8</b>                    | 11,10 $\pm$ 3,34                             | 11,07 $\pm$ 3,24                         | 11,00                                     | 11,00                                 | 0,9971            |
| <b>IL-10</b>                   | 13,21 $\pm$ 3,03                             | 13,19 $\pm$ 3,55                         | 13,00                                     | 12,50                                 | 0,8568            |
| <b>IL-17</b>                   | 14,45 $\pm$ 19,44                            | 12,19 $\pm$ 4,26                         | 10,75                                     | 11,00                                 | 0,2386            |
| <b>IFN-<math>\delta</math></b> | 9,73 $\pm$ 3,89                              | 9,81 $\pm$ 2,19                          | 9,00                                      | 10,00                                 | 0,4363            |
| <b>MCP-1</b>                   | 14,77 $\pm$ 3,32                             | 15,34 $\pm$ 3,56                         | 15,50                                     | 15,00                                 | 0,9151            |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | 9,68 $\pm$ 3,97                              | 9,66 $\pm$ 3,01                          | 9,00                                      | 10,00                                 | 0,3824            |

Fonte: Próprio autor, 2023.

#### 7.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR NEUTRÓFILOS PROVENIENTES DE VOLUNTÁRIOS EXPOSTOS OU NÃO A PARTÍCULAS DE SÍLICA.

Ao avaliarmos os níveis de ROS *in vitro* produzidos por neutrófilos isolados do sangue de indivíduos, e estimulados com *Phorbol-12-miristato-13-acetato* (PMA 40 ng/mL), vimos que houve um aumento significativo na produção de ROS quando comparado ao respectivo grupo controle (sem estimulação) tanto por neutrófilos de voluntários do grupo não exposto (Figura 6 A), quanto por neutrófilos provenientes de voluntários do grupo exposto (Figura 6 B). É importante ressaltar que neutrófilos em cultura sem estimulação (basal) provenientes de indivíduos expostos apresentaram significativamente maior liberação de ROS quando comparados aos neutrófilos estimulados do grupo não exposto.

Figura 6 - Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) liberadas a partir de polimorfonucleares do sangue periférico de pacientes não expostos (A) e expostos (B) a partículas de sílica (estímulo com PMA).

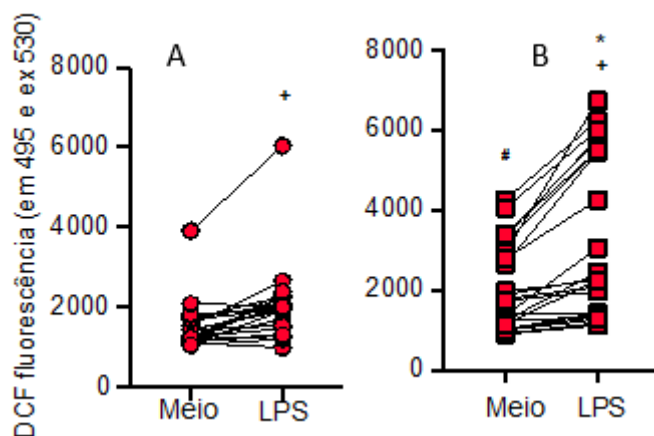


Fonte: Próprio autor, 2023

Um perfil similar de resposta foi observado quando os neutrófilos isolados foram estimulados com LPS (1 µg/mL). Na Figura 6, notamos que neutrófilos cultivados apenas no meio de cultura basal (controle) no grupo de pacientes expostos à sílica (figura 7B),

apresentaram liberação significativamente maior de ROS quando comparados aos neutrófilos do grupo de pacientes não expostos (Figura 7A). Foi possível notar também que o estímulo com LPS foi capaz de aumentar a produção de ROS tanto em células provenientes de indivíduos expostos (figura 7 B) quanto não expostos (figura 7 A). Porém, quando essas células foram estimuladas com partículas de sílica (Figura 8), vimos que houve um aumento na produção de ROS em indivíduos não expostos (Figura 8 A), mas no grupo exposto (com exposição ocupacional à sílica; figura 8B) não foi observada diferença significativa. É importante ressaltar que, neutrófilos de pacientes expostos à sílica também apresentaram maior produção de ROS a níveis basais.

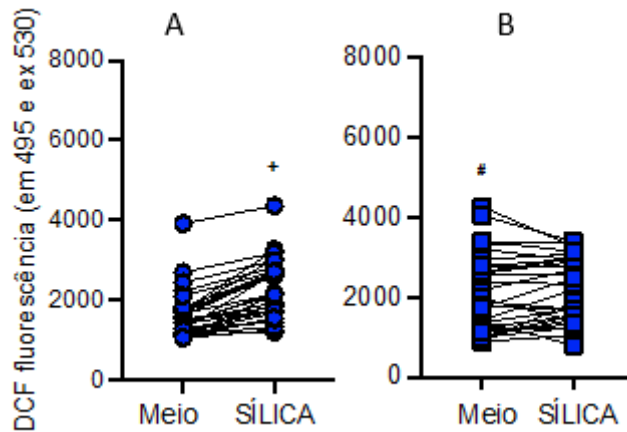
Figura 7 - Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) liberadas a partir de polimorfonucleares do sangue periférico de pacientes não expostos (A) e expostos (B) a partículas de sílica (estímulo com LPS).



Fonte: Próprio autor, 2023

O quadro 8 apresenta os valores da produção de ROS por neutrófilos em meio de cultura, valores basais e pós estimulação com os respectivos desvios padrão (DP).

Figura 8 - Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) liberadas a partir de polimorfonucleares do sangue periférico de pacientes não expostos (A) e expostos (B) a partículas de sílica (estímulo com sílica).



Fonte: Próprio autor, 2023

Quadro 8 – Valores da produção de ROS por neutrófilos em meio de cultura, valores basais e pós estimulação

| Grupo       | MEIO DE CULTURA |            |            |           |
|-------------|-----------------|------------|------------|-----------|
|             | Basal           | PMA        | LPS        | Sílica    |
| Não exposto | 1619,74         | 2893,73    | 2052,15    | 2265,89   |
|             | DP 589,15       | DP 776,98  | DP 960,58  | DP 718,87 |
| Exposto     | 2155,07         | 3731,08    | 3329,06    | 2238,82   |
|             | DP 988,66       | DP 1410,92 | DP 2030,43 | DP 818,99 |

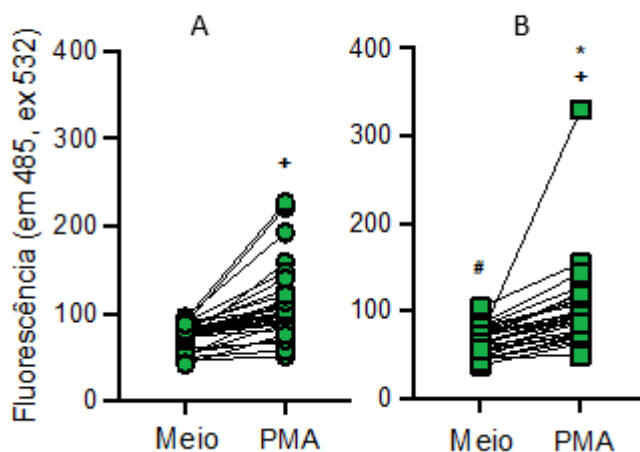
Fonte: Próprio autor, 2023.

## 7.5 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DAS *NEUTROPHIL EXTRACELULAR TRAP* (NETS) POR NEUTRÓFILOS PROVENIENTES DE VOLUNTÁRIOS EXPOSTOS OU NÃO A PARTÍCULAS DE SÍLICA.

Foi observado que os neutrófilos isolados do sangue de indivíduos expostos à sílica ao serem semeados em meio de cultura, apresentam maior formação das NETs a nível basal quando comparado aos neutrófilos de indivíduos sem exposição à sílica (Figuras 9, 10 e 11). Para a estimulação com PMA (40 ng/mL), ou LPS (1 µg/mL), foi visto que os neutrófilos dos pacientes do grupo controle apresentaram resposta mais significativa na produção de NETs, quando comparados ao grupo exposto. Quanto à produção de NETs após estimulação por sílica (300 µg/mL) nos dois grupos,

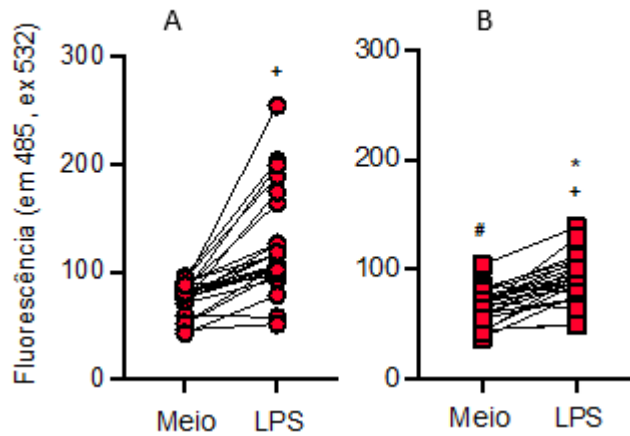
O quadro 9 apresenta os valores da produção de NETs por neutrófilos em meio de cultura, valores basais e pós estimulação com os respectivos desvios padrão (DP).

Figura 9 - Avaliação da formação de “neutrophil extracellular traps” (NETs) a partir de polimorfonucleares do sangue periférico de pacientes não expostos (A) e expostos (B) a partículas de sílica (estímulo com PMA).



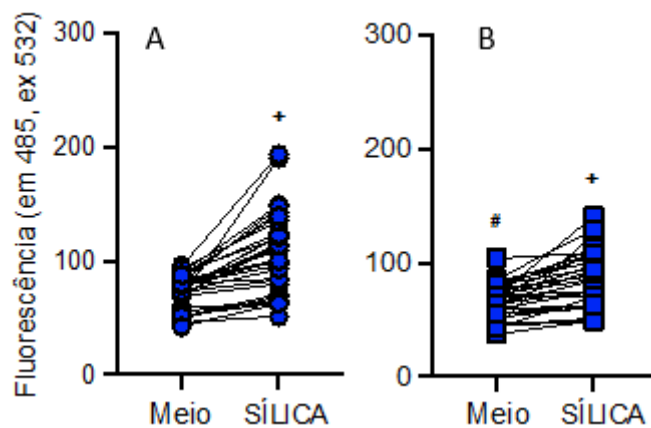
Fonte: Próprio autor, 2023.

Figura 10 - Avaliação da formação de “neutrophil extracellular traps” (NETs) a partir de polimorfonucleares do sangue periférico de pacientes não expostos (A) e expostos (B) a partículas de sílica (estímulo com LPS).



Fonte: Próprio autor, 2023.

Figura 11 - Avaliação da formação de “neutrophil extracellular traps” (NETs) a partir de polimorfonucleares do sangue periférico de pacientes não expostos (A) e expostos (B) a partículas de sílica (estímulo com sílica).



Fonte: Próprio autor, 2023.

Quadro 9 – Valores da produção de NETs por neutrófilos em meio de cultura, valores basais e pós estimulação com desvio padrão.

| <b>Grupo</b>       | <b>MEIO DE CULTURA</b> |            |            |               |
|--------------------|------------------------|------------|------------|---------------|
|                    | <b>Basal</b>           | <b>PMA</b> | <b>LPS</b> | <b>Sílica</b> |
| <b>Não exposto</b> | 73,72                  | 111,30     | 125,53     | 107,62        |
|                    | DP 14,33               | DP 41,73   | DP 49,79   | DP 35,57      |
| <b>Exposto</b>     | 65,80                  | 104,2      | 90,71      | 86,0          |
|                    | DP 15,65               | DP 49,60   | DP 21,79   | DP 25,53      |

Fonte: Próprio autor, 2023.



Quadro 10 - Dados sociodemográficos de todos os pacientes expostos a partículas de sílica

| PACIENTE | IDADE | PROFISSÃO                             | ANOS DE EXPOSIÇÃO | ATIVIDADE  | PROFUSÃO RAD | MRC* |
|----------|-------|---------------------------------------|-------------------|------------|--------------|------|
| 1        | 52    | artesão de pedras semipreciosas       | 9                 | Autônomo   | 1            | 3    |
| 2        | 63    | jatista de areia                      | 10                | Estaleiro  | 2            | 1    |
| 3        | 68    | jatista de areia                      | 30                | Estaleiro  | 2            | 1    |
| 4        | 56    | jatista de areia                      | 3                 | Estaleiro  | 1            | 1    |
| 5        | 54    | polidor de mármore                    | 32                | Marmoraria | 2            | 3    |
| 6        | 61    | marleteiro                            | 36                | Pedreira   | 2            | 0    |
| 7        | 58    | jatista de areia                      | 1,5               | Estaleiro  | 2            | 1    |
| 8        | 68    | jatista de areia                      | 25                | Estaleiro  | 1            | 0    |
| 9        | 54    | marleteiro                            | 29                | Pedreira   | 3            | 1    |
| 10       | 67    | soldador                              | 27                | Estaleiro  | 1            | 0    |
| 11       | 49    | esmerilhador                          | 10                | Estaleiro  | 1            | 2    |
| 12       | 62    | fabricação de aço                     | 20                | Autônomo   | 1            | 1    |
| 13       | 54    | marleteiro                            | 10                | Pedreira   | 1            | 1    |
| 14       | 65    | jatista de areia                      | 12                | Estaleiro  | 3            | 3    |
| 15       | 65    | pintor                                | 9                 | Estaleiro  | 1            | 2    |
| 16       | 79    | marmorista                            | 30                | Marmoraria | 2            | 1    |
| 17       | 57    | marmorista                            | 45                | Marmoraria | 3            | 3    |
| 18       | 53    | serrador de mármore                   | 25                | Marmoraria | 3            | 3    |
| 19       | 66    | serrador naval                        | 20                | Estaleiro  | 1            | 1    |
| 20       | 64    | jatista e pintor                      | 28                | Estaleiro  | 1            | 1    |
| 21       | 63    | operador de perfuratriz               | 25                | Pedreira   | 1            | 1    |
| 22       | 55    | pintor industrial                     | 14                | Estaleiro  | 1            | 3    |
| 23       | 68    | goivador                              | 20                | Estaleiro  | 1            | 3    |
| 24       | 68    | pintor                                | 28                | Estaleiro  | 1            | 1    |
| 25       | 48    | carregava caminhão em pedreira        | 20                | Pedreira   | 1            | 0    |
| 26       | 56    | pedreiro                              | 49                | Pedreira   | 1            | 1    |
| 27       | 77    | pintor                                | 34                | Estaleiro  | 2            | 0    |
| 28       | 55    | polidor de mármore                    | 23                | Marmoraria | 3            | 3    |
| 29       | 78    | assistente técnico de indústria naval | 29                | Estaleiro  | 2            | 0    |

Fonte: Próprio autor, 2023.

MRC\*: Modified Medical Research Council Dyspnea (MUNARI et al., 2018)

## 8 DISCUSSÃO

Esta tese pretende apresentar as comparações entre dois grupos de indivíduos, escolhidos por amostragem de conveniência, um grupo com exposição à poeira de sílica livre, com ou sem silicose, e outro sem exposição à poeira de sílica livre. Os achados correspondem a dados referentes a essa comparação e, para extrapolação para populações distintas, há a necessidade de estudos epidemiológicos de base populacional que possam corroborar esses achados. Vale ressaltar que encontramos algumas limitações nesse estudo, como por exemplo, o tamanho amostral, bem como, a população ser apenas do sexo masculino. Tendo em vista, que o perfil dos trabalhadores acometidos por essa doença, que chegam ao ambulatório, são da indústria da mineração, antigos trabalhadores da Jateamento de areia, escavadores de poços e outras áreas afins, essa população é de destaque majoritariamente do sexo masculino. E por isso, não tínhamos em nosso ambulatório nenhuma paciente do sexo feminino acometida pela doença ou com relatos de silicose. Mesmo com essas limitações, nosso estudo apresentou resultados relevantes e que acreditamos que seja de bastante interesse para a saúde pública.

A presença de tabagismo, que poderia ser um fator de confundimento para a presença de sintomas respiratórios entre os dois grupos de comparação, não mostrou diferença estatística significativa entre os grupos exposto e não exposto ( $p$  valor de 0,1507), o que reforça a hipótese de que as diferenças estatísticas entre os dois grupos, em relação aos sintomas respiratórios avaliados (tosse e dispneia), não estão relacionadas a diferenças no hábito tabágico.

A exposição à sílica, que pode causar o desenvolvimento de fibrose pulmonar, é responsável por uma cascata de eventos inflamatórios que pode alterar a resposta imune, levar ao desenvolvimento de uma série de doenças autoimunes, ao câncer, ao desenvolvimento de alterações funcionais ventilatórias e está relacionada à presença de sintomas respiratórios. Na prática clínica, podemos identificar a presença frequente de sintomas respiratórios entre os pacientes com exposição à sílica, como tosse, expectoração e dispneia. Há décadas, um grande número de artigos já chamam a atenção para a presença de sintomas respiratórios relacionados à exposição a poeiras fibrogênicas, como é o caso da sílica (WANG; CHRISTIANI, 2000). Em um estudo que realizou a comparação entre trabalhadores expostos à sílica, asbesto e poeira de carvão (mineradores de carvão), a presença de sintomas respiratórios nos trabalhadores expostos à sílica foi maior entre aqueles com mais alteração radiológica (WANG; CHRISTIANI, 2000), mostrando uma correlação entre sintomas respiratórios e a ocorrência de fibrose pulmonar.

Em um artigo publicado por Rumchev, Hoang e Lee (RUMCHEV; HOANG; LEE, 2022), em que foram avaliados, por questionário padronizado para sintomas respiratórios, 6.563 mineiros australianos, a prevalência de expectoração ( $p = 0,017$ ) e qualquer sintoma respiratório ( $p = 0,013$ ) foi significativamente maior entre os mineradores (população com exposição à sílica) e entre esses sintomas, a maior prevalência foi de chiado (OR 1,05 e IC 1,00-1,11). Do total de mineradores avaliados através do questionário, 29,8% dos trabalhadores relataram, pelo menos, um sintoma respiratório, sendo a tosse (14,7%) o sintoma mais comum, seguido de chiado (12,8%), expectoração (10,6%) e dispneia (9,2%).

Outro artigo que fala sobre a presença de sintomas relatados por trabalhadores expostos à sílica, que utilizou um questionário sobre sintomas, e que avaliou a presença de seis complicações respiratórias, é o estudo de Mahdinia *et al.* Segundo eles, a prevalência de expectoração (37%), falta de ar durante a atividade (25,9%), tosse frequente (18,5%), aperto no peito e falta de ar (14,8%) e sibilos (7,4%) apresentaram relação significativa com a exposição à sílica ( $p < 0,05$ ), (MAHDINIA *et al.*, 2015).

Em estudo publicado em 2004, em que foram avaliados 457 trabalhadores expostos à sílica, Castro *et al* encontraram uma frequência elevada de sintomas respiratórios (37,2% expectoração; 30,5% tosse; 17,6% chiado no peito; 11,0% dispnéia e 8,2% hemoptóicos) (CASTRO *et al.*, 2004), sendo tosse e dispneia também encontrados elevados em nosso estudo.

Os achados referentes aos sintomas de tosse e dispneia corroboram os resultados de outros estudos na literatura, confirmando a maior prevalência de sintomas respiratórios entre trabalhadores expostos à poeira de sílica, em comparação a um grupo não exposto.

Quanto aos mediadores inflamatórios, este estudo encontrou um aumento significativo de eotaxina, IP-10, MIP-1 $\alpha$ , quimiocinas; e IL-7 e IL-13, citocinas, no grupo exposto em comparação ao não exposto. Existem muitos estudos que correlacionam o aumento nas citocinas/quimiocinas e a exposição à sílica.

Um estudo realizado por Blanco-Pérez *et al*, 2021, a avaliação dos níveis séricos de IL2R (Receptor de IL-2), IL-6 e IL-8 estavam aumentados nos pacientes expostos à sílica e diagnosticados com silicose, em comparação a um grupo controle saudável. Os pacientes com silicose apresentaram níveis mais altos de IL-8 que os pacientes expostos e, ainda dentro do grupo de pacientes com silicose, aqueles com doença mais avançada (silicose complicada) apresentaram níveis mais altos de IL2R, IL-6 e IL-8 (BLANCO-PÉREZ *et al.*, 2021). Os resultados da análise da IL-8, um fator quimiotático de neutrófilos, indicaram o seu potencial como biomarcador na presença de silicose e na predição de mortalidade. Este estudo foi o primeiro a analisar a utilidade clínica de uma variedade de biomarcadores séricos em uma ampla

coorte de indivíduos expostos ao pó de sílica, com e sem silicose. Eles concluíram que era possível diferenciar os pacientes com silicose complicada daqueles com silicose simples através das dosagens dos mediadores inflamatórios. Este é um estudo com uma amostra significativa, uma vez que contou com 30 indivíduos sem exposição à sílica e 337 expostos. Em nosso estudo, o número de indivíduos avaliados foi bem inferior aos do estudo de Blanco-Pérez *et al*, 2021, este fato pode explicar a ausência de diferença estatisticamente significante entre os grupos estudados para estas duas interleucinas, IL-6 e IL-8.

Em sua avaliação dos genes relacionados às interleucinas IL-18, IL-8 e do receptor de quimiocinas CXCR2, Mohebbi, Rad e Bagheri, 2013 não encontraram correlação entre os pacientes com silicose em comparação a controles saudáveis, ainda que eles chamem atenção para a amostra pequena do estudo (45 expostos e 45 não expostos (MOHEBBI; RAD; BAGHERI, 2013). Os resultados referentes a IL-8 são compatíveis com os achados desta tese, que não mostrou diferença significativa dos níveis plasmáticos de IL-8 entre os grupos estudados, da mesma forma tivemos uma amostra pequena, como o autor sinaliza.

Ao contrário destes estudos, Lee *et al*, (LEE et al., 2010) avaliaram as concentrações séricas de IL-8 e TNF- $\alpha$  estudando trabalhadores com pneumoconiose dos mineiros de carvão (22 controles e 88 trabalhadores com pneumoconiose) e encontraram um nível sérico de IL-8 significativamente maior nos doentes em comparação aos controles, além disso, a IL-8 também se correlacionou com o grau de doença. O nível sérico médio de TNF- $\alpha$  foi significativamente maior em indivíduos com doença progressiva em comparação com indivíduos sem progressão de doença. Nos dados de nosso estudo, tanto os níveis séricos de IL-8 quanto os níveis séricos de TNF- $\alpha$  estavam normais, contrastando com os resultados encontrados por Lee *et al*, mas vale ressaltar que ambos os estudos têm uma amostra pequena tanto de controles quanto de expostos.

No estudo de Chen *et al*, (CHEN et al., 2017), a dosagem de IL-10 em sangue periférico em pacientes com silicose foi maior quando comparada com a dosagem de trabalhadores saudáveis, em uma amostra de 57 indivíduos. Da mesma forma, em estudo com silicose induzida em camundongos, Huaux *et al*, 1997, encontraram níveis aumentados de IL-10 no lavado broncoalveolar e no tecido pulmonar dos camundongos doentes, quando comparados aos controles sadios (FRANÇOIS HUAUX, et al., 1997). No nosso estudo não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis plasmáticos de IL-10 entre expostos e não expostos.

Outro estudo realizado por Braz *et al*. (2016), mostrou que os níveis plasmáticos de interleucina-6 foram maiores em indivíduos expostos à sílica com e sem silicose do que no grupo controle. Houve correlação positiva entre gravidade radiológica e qualidade de vida, enquanto correlação negativa entre gravidade radiológica e função pulmonar. Altos níveis de

IL-10, uma citocina anti-inflamatória, estava associada com a melhora da capacidade funcional e melhor qualidade de vida da população. Não foram encontradas diferenças nos níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , sTNFR1 ou sTNFR2 entre os dois grupos estudados (BRAZ et al., 2016). No caso dos resultados referentes a IL-10 e TNF- $\alpha$ , os resultados são correlatos ao do nosso estudo, onde essas interleucinas também não apresentaram alterações estatisticamente significativas entre grupo controle e exposto, diferentemente da IL-6, onde nosso estudo não encontrou diferença significativa entre os grupos.

Um estudo desenvolvido na China por JIANG et al (2015), avaliou os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e MMP-9, em grupos de expostos com e sem silicose e em indivíduos saudáveis, sendo encontrado um aumento desses marcadores entre doentes e não doentes, porém mais significativo em pacientes com silicose. O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina iniciadora de respostas inflamatórias e vários estudos mostram produção aumentada em células mononucleares de pacientes com silicose. A MMP-9 regula a diferenciação celular e a proliferação, e os níveis de MMP-9 são regulados positivamente pelo TNF- $\alpha$ . Assim, ambas as citocinas podem estar envolvidas no desenvolvimento da silicose, de acordo com o autor (JIANG et al., 2015). Apesar dos estudos da literatura indicarem esse importante papel do TNF- $\alpha$ , nosso estudo não encontrou valores elevados de TNF no grupo exposto.

Anlar HG *et al* (2017) avaliaram as interleucinas IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em ceramistas turcos, expostos à sílica (N= 99) em comparação a um grupo controle de trabalhadores de escritório (N= 81). Os grupos eram equivalentes em relação a idade e hábitos tabágicos. Neste estudo, dos 99 trabalhadores expostos, quase 50% foram diagnosticados com silicose; 84% desses trabalhadores apresentavam profusão de silicose categoria 1. Os expostos possuíam níveis significativamente mais altos de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ . Trabalhadores com maior duração de exposição (>16 anos) apresentaram níveis de IL-6 significativamente mais elevados do que outros trabalhadores (ANLAR et al., 2017). Os achados de Anlar HG *et al* diferem dos nossos achados, uma vez que os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  em nosso estudo não mostraram diferenças entre os grupos exposto e não exposto.

O papel exato da eotaxina no desenvolvimento da silicose ainda não está bem estabelecido, no entanto valores aumentados de eotaxina foram vistos no estudo que avaliou os níveis séricos de eotaxina antes e logo após o início dos sintomas de artrite reumatoide. Foi demonstrado que os níveis de eotaxina no soro e fluidos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide foram significativamente maiores do que aqueles no soro de controles saudáveis (WAKABAYASHI et al., 2021). A artrite reumatoide é uma das doenças reumáticas

frequentemente associadas à silicose, estria os níveis de eotaxina envolvidos tanto no potencial desenvolvimento de artrite reumatóide entre os pacientes com silicose, como na patogênese da fibrose? Em nosso estudo, os valores da eotaxina apresentaram-se elevados entre os expostos quando comparados ao grupo controle. Existe uma escassez de estudos sobre o papel da eotaxina na silicose, mostrando a importância de nossos resultados e apontando para a necessidade de mais estudos capazes de elucidar o papel desta citocina no adoecimento pela sílica.

Um estudo recente, 2023, e muito semelhante ao estudo realizado nesta tese, que avaliou dosagens de 34 citocinas em pacientes com silicose simples (n = 53) e com a modalidade fibrose maciça progressiva (n = 38) em comparação a um grupo controle saudável (n = 22) (CAMPOS-CARO et al., 2023), em sangue periférico, foram encontradas alterações nos níveis séricos de citocinas entre os doentes, quando comparados ao grupo controle. No geral, foi encontrado aumento de citocinas pro-inflamatórias no plasma dos pacientes com silicose (modalidade simples ou fibrose maciça progressiva) em comparação ao grupo controle. L-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-8, IL-17A, IL-33 e TNF- $\alpha$  estavam significativamente elevadas nos doentes quando comparados ao grupo controle. Quanto às citocinas anti-inflamatórias os níveis de IL-1RA, IL-4 e IL-13 estavam aumentados nos doentes, em comparação ao grupo não exposto. No estudo de Campos-Caro também foram medidos os níveis das quimiocinas, IP-10, MCP-1, Eotaxina, MIP-1 $\alpha$ ; mas, para IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  houve diferenças significativas quando qualquer um dos grupos silicóticos foi comparado ao grupo controle, sem exposição. Além disso, os níveis de MIP-1 $\alpha$  mostraram um aumento significativo em pacientes com fibrose maciça progressiva em comparação com pacientes com silicose simples. Os autores demonstraram que os pacientes mais graves, aqueles com fibrose maciça progressiva, apresentaram níveis de citocinas mais elevados que aqueles na modalidade silicose simples. Comparando o estudo desta tese com o estudo de Campos-Caro *et al*, vemos que também encontramos aumento nos níveis de IL-7 e IL-13. Por outro lado, não foi visto nesta tese diferença estatisticamente significativa nos valores de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17, que no estudo de Campos-Caro estavam aumentadas nos grupos expostos em comparação ao grupo saudável. Os autores concluíram que os níveis de citocinas no plasma são um bom indicador de gravidade de doença, que as citocinas podem ser utilizadas como biomarcadores e como possíveis alvos terapêuticos. Em analogia aos resultados de Campos-Caro, cotejando com nossos resultados encontrados na avaliação da IL-13, vemos que esta pode sim, ser utilizada como um biomarcador para exposição à sílica, corroborando nossa hipótese inicial.

A produção de ROS está associada à homeostase celular, sendo necessária, em baixas concentrações, para a sinalização celular normal e, em altas concentrações, tornando-se um importante mediador da toxicidade celular (REFSNES et al., 2019); (LEHMAN et al., 2016). No estudo dessa tese foi identificado que os neutrófilos dos indivíduos expostos à sílica apresentavam níveis basais de ROS superiores aos níveis basais dos não expostos, o que pode indicar um aumento do estresse oxidativo induzido por ROS nesse grupo exposto à sílica em seu ambiente de trabalho. Refsnes *et al* apontam que, se a defesa antioxidante for sobrecarregada, levando ao estresse oxidativo, a formação de ROS pode causar citotoxicidade, dano ao DNA celular e inflamação (REFSNES et al., 2019). No entanto, os estudos que avaliam o papel das ROS nos processos patológicos na exposição a partículas, como a sílica, não foram capazes de definir quanto dos efeitos induzidos por partícula são devidos à formação de ROS e, até que ponto a formação de ROS surgem diretamente das partículas e componentes das partículas, ou são reflexo da ativação da geração celular de ROS (ØVREVIK et al., 2015).

Os resultados desta tese também mostraram que a produção de ROS pelos neutrófilos dos indivíduos expostos em ambiente ocupacional à sílica, quando estimulados em cultura por PMA e por LPS, é maior que a do grupo controle, sem a exposição ocupacional, indicando um aumento no estresse oxidativo entre o grupo exposto. Além disso, foi visto que as células dos indivíduos do grupo exposto ocupacionalmente reagem menos quando estimuladas por sílica em meio de cultura quando comparadas às células dos indivíduos sem exposição ocupacional à sílica, podendo indicar um possível esgotamento das vias oxidativas ativadas pela sílica, o que também sugere que os indivíduos com exposição ocupacional avaliados apresentam um continuum estresse oxidativo autoalimentado pelas partículas de sílica inaladas. O estudo de Vallyathan *et al*, de 1997, foi o primeiro experimento a evidenciar *in vivo* que os pulmões silicóticos estão em estado de estresse oxidativo e que o aumento da geração de ROS está associado a níveis aumentados de enzimas oxidativas e peroxidação lipídica, através da avaliação de pulmões de ratos com silicose em comparação a animais sadios (VALLYATHAN et al., 1997). Esta hipótese parece ser corroborada por nossos achados neste estudo.

Neutrófilos são células cruciais na resposta inflamatória disparada pelas partículas de sílica. Um dos mecanismos de ação dos neutrófilos é a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *Neutrophil extracellular trap*), que são formadas quando os neutrófilos entram em contato com estímulos biológicos, bem como com plaquetas ativadas ou estímulos inflamatórios (ZAWROTNIAK; RAPALA-KOZIK, 2013) e também podem ser liberadas em resposta a estímulos não infecciosos (DESAI et al., 2017). A liberação das NETs ocorre durante o processo inflamatório, atuando na captura de patógenos, prevenindo sua

disseminação e potencialmente matando os agentes agressores (DÖMER et al., 2021); (CASTANHEIRA; KUBES, 2019). No entanto, quando há persistência do agente agressor, ou ocorre perpetuação da inflamação, a liberação das NETs pode agravar o processo inflamatório e consequente dano tecidual (CASTANHEIRA; KUBES, 2019). Na exposição à sílica há uma incapacidade do organismo em erradicar as partículas de sílica presentes na árvore respiratória, sendo esse um estímulo ao processo inflamatório persistente. Neste estudo, foi possível avaliar que quando os neutrófilos dos indivíduos expostos à sílica, foram ativados com PMA e LPS, eles apresentaram resposta inferior em comparação aos controles e, frente à estimulação por sílica, nenhuma diferença foi notada ao comparar a resposta de neutrófilos de expostos e controles, sob condições de estimulação com sílica. A produção de NETs, menor no grupo exposto quando estimulado, pode ser um dos fatores implicados no maior risco de adoecimento por outros patógenos na silicose, e mesmo na exposição à sílica sem doença, uma vez que a produção de NETs está associada à resposta do hospedeiro aos agentes agressores. Desai et al., em estudo em que estimulou neutrófilos de indivíduos saudáveis a uma série de partículas, incluindo dióxido de silício (DESAI et al., 2017), encontrou produção significativa de NETs a partir desses estímulos em meio de cultura. A literatura não dispõe de artigos com avaliação semelhante ao nosso estudo, mostrando a importância dos dados coletados e o ineditismo do estudo.



## 9 CONCLUSÃO

Os achados corroboram a hipótese inicial de que há um aumento na produção de IL-13 no sangue periférico dos expostos à sílica, interleucina implicada em uma série de processos inflamatórios já documentados na literatura. No entanto, sua participação nos processos patológicos da resposta inflamatória perpetuada pela sílica ainda precisa ser alvo de novos estudos.

Além disso, também encontramos níveis elevados de eotaxina, IL-7, IP-10 e MIP-1 $\alpha$  entre os expostos ocupacionalmente à sílica, mostrando que estas citocinas podem estar implicadas nos processos patogênicos da sílica e que precisam ser avaliadas em novos estudos para o entendimento de seu papel no processo inflamatório que leva à silicose.

O aumento de eotaxina, IL-7, IP-10 e MIP-1 $\alpha$  e, em especial, IL-13 nos aponta para o possível uso dessas citocinas como biomarcadores de exposição à sílica e, possivelmente, como marcadores precoces de doença. Além disso, esses podem ser avaliados como possíveis alvos terapêuticos para a silicose, levando esperança a milhares de doentes em todo mundo.

O papel do estresse oxidativo, entendido como um dos pilares no processo de fibrose induzida pela sílica, parece evidente nestes achados, uma vez que a produção de ROS foi marcadamente elevada entre os expostos, em comparação a controles.

A produção de NETs, aumentada no grupo exposto em condições basais, é mais um dado que corrobora o perfil inflamatório desses pacientes, de forma contínua e autopropetuada, uma vez que há uma incapacidade para eliminação definitiva das partículas de sílica do organismo. Porém, sua menor resposta a estímulos, aponta para uma dificuldade na resposta imunológica efetiva dos neutrófilos do grupo exposto à sílica.

A exemplo da possível utilização da IL-13, tanto a produção de ROS, quanto a produção de NETs podem ser potenciais biomarcadores de processo inflamatório na exposição à sílica.

Do ponto de vista da saúde pública, a possibilidade de utilização de biomarcadores de exposição, ou mesmo de adoecimento precoces, representa um grande avanço e que pode significar o afastamento da exposição ainda em períodos anteriores ao adoecimento detectado à radiografia de tórax, como é utilizado ainda hoje.

Por se tratar de uma amostra de conveniência, os dados foram analisados como referentes ao teste laboratorial de comparação de dois grupos não randomizados, não aleatórios. Ainda assim, foram encontrados resultados relevantes e que suscitam a necessidade de novos estudos sobre o tema.

## REFERÊNCIAS

- ADAMCAKOVA, J.; MOKRA, D. New Insights into Pathomechanisms and Treatment Possibilities for Lung Silicosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4162, 17 abr. 2021.
- ADAR, T. et al. From airway inflammation to inflammatory bowel disease: eotaxin-1, a key regulator of intestinal inflammation. **Clinical Immunology (Orlando, Fla.)**, v. 153, n. 1, p. 199–208, jul. 2014.
- ADMIN. **Plasma levels of TNF- $\alpha$  and MMP-9 in patients with silicosis. European Review**, 13 maio 2015. Disponível em: <https://www.europeanreview.org/article/8897>. Acesso em: 26 mar. 2023.
- AI, W. et al. Optimal Method to Stimulate Cytokine Production and Its Use in Immunotoxicity Assessment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 9, p. 3834–3842, set. 2013.
- AJUEBOR, M. N. et al. CCL3/MIP-1 $\alpha$  is pro-inflammatory in murine T cell-mediated hepatitis by recruiting CCR1-expressing CD4<sup>+</sup> T cells to the liver. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 10, p. 2907–2918, 2004.
- ALGRANTI, E. et al. Mortality from silicosis in Brazil: Temporal trends in the period 1980-2017. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 64, n. 3, p. 178–184, mar. 2021.
- AMADO, I. F. et al. IL-2 coordinates IL-2–producing and regulatory T cell interplay. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 12, p. 2707–2720, 18 nov. 2013.
- AMERIO, P. et al. Eotaxins and CCR3 receptor in inflammatory and allergic skin diseases: therapeutical implications. **Current Drug Targets. Inflammation and Allergy**, v. 2, n. 1, p. 81–94, mar. 2003.
- AMORIM, M. R. et al. Biomarcadores inflamatórios na silicose pulmonar. **Arq. ciências saúde UNIPAR**, v. 16, n. 2, p. 93–98, 201208.
- ANDRADE DA SILVA, L. H. et al. Development of nintedanib nanosuspension for inhaled treatment of experimental silicosis. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 8, n. 2, p. e10401, 2023.
- ANLAR, H. G. et al. Effects of Occupational Silica Exposure on OXIDATIVE Stress and Immune System Parameters in Ceramic Workers in TURKEY. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A**, v. 80, n. 13–15, p. 688–696, 2017.
- BADDINI-MARTINEZ, J. et al. Atualização no diagnóstico e tratamento da fibrose pulmonar idiopática. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 5, p. 454–466, out. 2015.
- BARBER, C. M. et al. Epidemiology of Silicosis: Reports from the Sword Scheme in the Uk from 1996 to 2017. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 76, n. 1, p. 17–21, 2019.
- BARNES, H. et al. Silica-associated lung disease: An old-world exposure in modern industries. **Respirology**, v. 24, n. 12, p. 1165–1175, 2019.

- BARRETT, E. G. et al. Silica-induced chemokine expression in alveolar type II cells is mediated by TNF- $\alpha$ -induced oxidant stress. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 276, n. 6, p. L979–L988, jun. 1999.
- BAYRAM, H.; GHIO, A. J. Killer Jeans and Silicosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 184, n. 12, p. 1322–1324, 15 dez. 2011.
- BENMERZOUG, S. et al. STING-dependent sensing of self-DNA drives silica-induced lung inflammation. **Nature Communications**, v. 9, p. 5226, 6 dez. 2018.
- BLANCO-PÉREZ, J. J. et al. Serum levels of inflammatory mediators as prognostic biomarker in silica exposed workers. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 13348, 25 jun. 2021.
- BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon-gamma. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 749–795, 1997.
- BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2 Suppl, p. S460-475, fev. 2003.
- BOSURGI, L. et al. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. **Science**, v. 356, n. 6342, p. 1072–1076, 9 jun. 2017.
- BOYMAN, O.; SURH, C. D.; SPRENT, J. Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 6, n. 12, p. 1323–1331, 1 dez. 2006.
- BRASIL. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Pneumoconioses**. Brasília, DF: Editora MS, 2006.
- BRASIL. Ministério da Economia. Secretaria Especial de Previdência e Trabalho, I. **Portaria nº 6.734, de 9 de março de 2020 - DOU - Imprensa Nacional**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou>. Acesso em: 7 mar. 2021.
- BRAZ, N. F. T. et al. Influence of Cytokines and Soluble Receptors in the Quality of Life and Functional Capacity of Workers Exposed to Silica. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 58, n. 3, p. 272–276, mar. 2016.
- CAMPOS-CARO, A. et al. Plasma Cytokine Profiling Reveals Differences between Silicotic Patients with Simple Silicosis and Those with Progressive Massive Fibrosis Caused by Engineered Stone. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1541, jan. 2023.
- CAO, Z. et al. Pirfenidone ameliorates silica-induced lung inflammation and fibrosis in mice by inhibiting the secretion of interleukin-17A. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 43, n. 4, p. 908–918, abr. 2022.
- CASTANHEIRA, F. V. S.; KUBES, P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. **Blood**, v. 133, n. 20, p. 2178–2185, 16 maio 2019.
- CASTRANOVA, V. Signaling Pathways Controlling The Production Of Inflammatory Mediators in Response To Crystalline Silica Exposure: Role Of Reactive Oxygen/Nitrogen Species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 7, p. 916–925, 1 out. 2004.

CASTRO, H. A. DE et al. Perfil respiratório de 457 trabalhadores expostos à poeira de sílica livre no Estado do Rio de Janeiro. 2004.

CASTRO, H. et al. Estudo Da Interleucina 1 E 6 E Fator De Necrose Tumoral Em Trabalhadores Expostos À Sílica. **Cadernos saúde coletiva**, v. 13, n. 4, p. 785–798, 2005.

CASTRO, MARCOS CÉSAR SANTOS DE et al. Genetic polymorphisms and their effects on the severity of silicosis in workers exposed to silica in Brazil. **J Bras Pneumol**, p. 8, 13 maio 2022.

CHEMOKINES - Definition, Function and Quiz | Biology Dictionary. Disponível em: <https://biologydictionary.net/chemokines/>. Acesso em: 12 fev. 2023.

CHEN, Y. et al. IL-10-Producing CD1dhiCD5+ Regulatory B Cells May Play a Critical Role in Modulating Immune Homeostasis in Silicosis Patients. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

CHEN, Y. et al. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. **Molecular Medicine**, v. 26, n. 1, p. 97, 29 out. 2020.

CHOY, E. H. et al. Translating IL-6 biology into effective treatments. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 16, n. 6, p. 335–345, jun. 2020.

CHUNG, K. F. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. **European Respiratory Journal**, v. 18, n. 34 suppl, p. 50s–59s, 2 jul. 2001.

CRAIG, V. J. et al. Profibrotic Activities for Matrix Metalloproteinase-8 during Bleomycin-Mediated Lung Injury. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 8, p. 4283–4296, 15 abr. 2013.

DEORA, A. et al. Transmembrane TNF-dependent uptake of anti-TNF antibodies. **mAbs**, v. 9, n. 4, p. 680–695, 2017.

DESAI, J. et al. Particles of different sizes and shapes induce neutrophil necroptosis followed by the release of neutrophil extracellular trap-like chromatin. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15003, 3 nov. 2017.

DINARELLO, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunological reviews**, v. 281, n. 1, p. 8–27, jan. 2018.

DOBREVA, I. et al. Interleukin-8 Secretion by Fibroblasts Induced by Low Density Lipoproteins Is p38 MAPK-dependent and Leads to Cell Spreading and Wound Closure\*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 1, p. 199–205, 6 jan. 2006.

DÖMER, D. et al. Neutrophil Extracellular Traps Activate Proinflammatory Functions of Human Neutrophils. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

DOUCET, C. et al. Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 10, p. 2129–2139, 15 maio 1998.

DRISCOLL, K. E. Macrophage Inflammatory Proteins: Biology and Role in Pulmonary Inflammation. **Experimental Lung Research**, v. 20, n. 6, p. 473–490, 1 jan. 1994.

DU, S. et al. Dioscin Alleviates Crystalline Silica-Induced Pulmonary Inflammation and Fibrosis through Promoting Alveolar Macrophage Autophagy. **Theranostics**, v. 9, n. 7, p. 1878–1892, 7 mar. 2019.

DUERR, C. U.; FRITZ, J. H. Editorial: Immunoregulatory Mechanisms of Interferon. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 14 fev. 2020.

EDER, C. Mechanisms of interleukin-1 $\beta$  release. **Immunobiology**, Vesicular trafficking in immune cells. v. 214, n. 7, p. 543–553, 1 jul. 2009.

FARRAR, M. A.; SCHREIBER, R. D. The Molecular Cell Biology of Interferon-gamma and its Receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 11, n. 1, p. 571–611, 1993.

FATIMA SUELI. **Mapa de exposição a sílica no Brasil**. [s.l: s.n.].

FERNANDES, M. B.; BARATA, J. T. IL-7 and IL-7R in health and disease: An update through COVID times. **Advances in Biological Regulation**, Symposium issue 2022. v. 87, p. 100940, 1 jan. 2023.

FERREIRA, T. P. T. et al. IL-13 Immunotoxin Accelerates Resolution of Lung Pathological Changes Triggered by Silica Particles in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 10, p. 5220–5229, 15 nov. 2013.

FICHTNER-FEIGL, S. et al. IL-13 signaling through the IL-13 $\alpha$  2 receptor is involved in induction of TGF- $\beta$  1 production and fibrosis. **Nature Medicine**, v. 12, n. 1, p. 99–106, jan. 2006.

FRANÇOIS HUAUX, J. L. et al. **Role of Interleukin-10 in the Lung Response to Silica in Mice** | **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. Disponível em: [https://www.atsjournals.org/doi/10.1165/ajrcmb.18.1.2911?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://www.atsjournals.org/doi/10.1165/ajrcmb.18.1.2911?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed). Acesso em: 1 mar. 2023.

FRUCHT, D. M. et al. IFN- $\gamma$  production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 10, p. 556–560, out. 2001.

FRY, T. J.; MACKALL, C. L. The Many Faces of IL-7: From Lymphopoiesis to Peripheral T Cell Maintenance. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 11, p. 6571–6576, 1 jun. 2005.

FUBINI, B.; HUBBARD, A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 12, p. 1507–1516, 15 jun. 2003.

FUENTES, M. E. et al. Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 155, n. 12, p. 5769–5776, 15 dez. 1995.

GUO, J. et al. Pirfenidone inhibits epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis in the rat silicosis model. **Toxicology Letters**, v. 300, p. 59–66, jan. 2019.

HAYASHI, H. et al. Soluble interleukin-2 receptor as an indicator of immunological disturbance found in silicosis patients. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 22, n. 1, p. 53–62, 2009.

HAYNEY, M. S. et al. Serum IFN- $\gamma$ -induced protein 10 (IP-10) as a biomarker for severity of acute respiratory infection in healthy adults. **Journal of Clinical Virology**, v. 90, p. 32–37, 1 maio 2017.

HSIEH, C.-H. et al. The Role of MIP-1 $\alpha$  in the Development of Systemic Inflammatory Response and Organ Injury following Trauma Hemorrhage1. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 4, p. 2806–2812, 15 ago. 2008.

HUANG, M. et al. IL-7 inhibits fibroblast TGF- $\beta$  production and signaling in pulmonary fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 7, p. 931–937, 1 abr. 2002.

**IL-1 $\beta$  as a determinant in silica-induced cytokine responses in monocyte-endothelial cell co-cultures - JI Herseeth, M Refsnes, M Låg, G Hetland, PE Schwarze, 2008.** Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327108094610>. Acesso em: 19 fev. 2023.

INOUE, M. et al. Size and surface modification of silica nanoparticles affect the severity of lung toxicity by modulating endosomal ROS generation in macrophages. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 18, n. 1, p. 21, 17 jun. 2021.

JANSSEN, W. J.; HENSON, P. M. Cellular Regulation of the Inflammatory Response. **Toxicologic pathology**, v. 40, n. 2, p. 166–173, 2012.

JIANG, P.-R. et al. Plasma levels of TNF- $\alpha$  and MMP-9 in patients with silicosis. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 9, p. 1716–1720, 2015.

JOEL M. DEPPER, et al. **Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene.** Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.82.12.4230>. Acesso em: 11 fev. 2023.

JOSHI, G. N.; GOETJEN, A. M.; KNECHT, D. A. Silica particles cause NADPH oxidase-independent ROS generation and transient phagolysosomal leakage. **Molecular Biology of the Cell**, v. 26, n. 18, p. 3150–3164, 15 set. 2015.

KATHERINE A. FITZGERALD, ... ROBIN E. CALLARD. **Eotaxin - an overview | ScienceDirect Topics.** Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/eotaxin>. Acesso em: 29 jan. 2023.

KREFFT, S.; WOLFF, J.; ROSE, C. Silicosis: An Update and Guide for Clinicians. **Clinics in Chest Medicine**, Advances in Occupational and Environmental Lung Diseases. v. 41, n. 4, p. 709–722, 1 dez. 2020.

KUNINAKA, Y. et al. Macrophage polarity and wound age determination. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 20327, 25 nov. 2022.

LAMARCHE, É. et al. SMAD2 promotes myogenin expression and terminal myogenic differentiation. **Development**, v. 148, n. 3, p. dev195495, 8 fev. 2021.

- LEE, C. G. et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 6, p. 809–821, 17 set. 2001.
- LEE, J. S. et al. Serum Levels of Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor-alpha in Coal Workers' Pneumoconiosis: One-year Follow-up Study. **Safety and Health at Work**, v. 1, n. 1, p. 69–79, set. 2010.
- LEFÈVRE, F. et al. Interferon-delta: The first member of a novel type I interferon family. **Biochimie**, v. 80, n. 8, p. 779–788, 1 ago. 1998.
- LEHMAN, S. E. et al. Silica Nanoparticle-Generated ROS as a Predictor of Cellular Toxicity: Mechanistic Insights and Safety by Design. **Environmental science. Nano**, v. 3, n. 1, p. 56–66, 1 fev. 2016.
- LESO, V. et al. Artificial Stone Associated Silicosis: A Systematic Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 4, p. 568, 2019.
- LEUNG, C. C.; YU, I. T. S.; CHEN, W. Silicosis. **The Lancet**, v. 379, n. 9830, p. 2008–2018, maio 2012.
- LI, S. et al. Type I Interferons: Distinct Biological Activities and Current Applications for Viral Infection. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 5, p. 2377–2396, 2018a.
- LI, T. et al. Early Identification, Accurate Diagnosis, and Treatment of Silicosis. **Canadian Respiratory Journal**, v. 2022, p. 3769134, 25 abr. 2022.
- LI, Y. et al. Neutrophil Extracellular Traps Formation and Aggregation Orchestrate Induction and Resolution of Sterile Crystal-Mediated Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018b.
- LIAN, Q. et al. Differential effects of macrophage subtypes on SARS-CoV-2 infection in a human pluripotent stem cell-derived model. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 2028, 19 abr. 2022.
- LIANG, L. et al. Sequential activation of M1 and M2 phenotypes in macrophages by Mg degradation from Ti-Mg alloy for enhanced osteogenesis. **Biomaterials Research**, v. 26, n. 1, p. 17, 28 abr. 2022.
- LIU, C. et al. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. **Advanced Science**, v. 8, n. 15, p. 2004433, 2021.
- LIU, F. et al. Role of IL-10-producing regulatory B cells in modulating T-helper cell immune responses during silica-induced lung inflammation and fibrosis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28911, 29 jun. 2016.
- LIU, X. et al. Role of human pulmonary fibroblast-derived MCP-1 in cell activation and migration in experimental silicosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 288, n. 2, p. 152–160, 15 out. 2015.
- LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 4, p. 189–195, 1 ago. 2011.

- MAGALHÃES, F. et al. Silicose: uma revisão sistemática. **Revista Ciência e Estudos Acadêmicos de Medicina** - Número 12. Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT (Cáceres), v. 12, p. 22–47, jul. 2020.
- MAHDINIA, M. et al. Assessment of Occupational Exposure to Silica Dust and Respiratory Effects in Exposed Workers in one of the Ceramic Products Industry. 1 jan. 2015.
- MAILLET, I. et al. Effect of nintedanib on silica-induced lung inflammation and fibrosis in mice. **European Respiratory Journal**, v. 40, n. Suppl 56, 1 set. 2012.
- MARCOS CÉSAR SANTOS DE CASTRO<sup>1,2,3A</sup>, ANGELA SANTOS FERREIRA NANI<sup>2</sup> et al. Polimorfismos genéticos e seus efeitos na gravidade da silicose em trabalhadores expostos à sílica no Brasil. **J Bras Pneumol**, p. 8, [s.d.].
- MARTIN, C. E. et al. Interleukin-7 Availability Is Maintained by a Hematopoietic Cytokine Sink Comprising Innate Lymphoid Cells and T Cells. **Immunity**, v. 47, n. 1, p. 171- 182.e4, 18 jul. 2017.
- MARTINS, V. et al. In situ evidence of collagen V and signaling pathway of found inflammatory zone 1 (FIZZ1) is associated with silicotic granuloma in lung mice. **Pathology - Research and Practice**, v. 216, n. 9, p. 153094, 1 set. 2020.
- MCEWEN, K.; BRODIE, L. Lung transplantation for silicosis and recovery: an Australian case study. **British Journal of Nursing**, v. 30, n. 3, p. 178–183, 11 fev. 2021.
- MIOSSEC, P.; KOLLS, J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 10, p. 763–776, out. 2012.
- MOHEBBI, I.; RAD, I. A.; BAGHERI, M. Interleukin-18, interleukin-8, and CXCR2 and the risk of silicosis. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 9, p. 830–837, 1 out. 2013.
- MUNARI, A. B. et al. Modified Medical Research Council Dyspnea Scale in GOLD Classification Better Reflects Physical Activities of Daily Living. **Respiratory Care**, v. 63, n. 1, p. 77–85, 1 jan. 2018.
- MUNITZ, A. et al. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor  $\alpha 1$  and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 20, p. 7240–7245, 20 maio 2008.
- NTANANISIS-STATHOPOULOS, I.; FOTIOU, D.; TERPOS, E. CCL3 Signaling in the Tumor Microenvironment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1231, p. 13–21, 2020.
- OLIVEIRA, C. M. B. DE et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, p. 260–265, abr. 2011.
- ORHAN PAMUK. **A Mulher Ruiva**. [s.l.] Companhia das Letras, 2020.
- ØVREVIK, J. et al. Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1399–1440, 2 jul. 2015.



OZMEN, C. A. et al. MDCT Findings of Denim-Sandblasting-Induced Silicosis: a cross-sectional study. **Environmental Health**, v. 9, n. 1, p. 17, 17 abr. 2010.

PANG, J. et al. Multi-omics study of silicosis reveals the potential therapeutic targets PGD2 and TXA2. **Theranostics**, v. 11, n. 5, p. 2381–2394, 1 jan. 2021.

PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 2, p. 134–147, fev. 2018.

PAVAN, C. et al. Nearly free surface silanols are the critical molecular moieties that initiate the toxicity of silica particles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 45, p. 27836–27846, 10 nov. 2020.

PELAIA, C. et al. Interleukins 4 and 13 in Asthma: Key Pathophysiologic Cytokines and Druggable Molecular Targets. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 851940, 2022.

PENG, Z. et al. Impaired interferon- $\gamma$  signaling promotes the development of silicosis. **iScience**, v. 25, n. 7, p. 104647, 19 jun. 2022.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, v. 202, n. 1, p. 8–32, dez. 2004.

PLASMA levels of TNF- $\alpha$  and MMP-9 in patients with silicosis. Disponível em: <https://www.europeanreview.org/article/8897>. Acesso em: 26 mar. 2023.

POLLARD, K. M. Silica, Silicosis, and Autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 2016.

POPE, S. M. et al. IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5- and eotaxin-dependent mechanism. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 4, p. 594–601, 1 out. 2001.

PRO-INFLAMMATORY Cytokines Overview - BR. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/immunology-at-work/proinflammatory-cytokines-overview.html>. Acesso em: 7 maio. 2023.

RAMÍREZ, A. V. Silicosis. **Anales de la Facultad de Medicina**, v. 74, n. 1, p. 49–56, jan. 2013a.

RAMÍREZ, A. V. Silicosis. **Anales de la Facultad de Medicina**, v. 74, n. 1, p. 49–56, jan. 2013b.

REFSNES, M. et al. Concentration-dependent cytokine responses of silica nanoparticles and role of ROS in human lung epithelial cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 125, n. 3, p. 304–314, 2019.

RICHARDS, C. D. Innate Immune Cytokines, Fibroblast Phenotypes, and Regulation of Extracellular Matrix in Lung. **Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 37, n. 2, p. 52–61, fev. 2017.

- RIMAL, B.; GREENBERG, A. K.; ROM, W. N. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 11, n. 2, p. 169–173, mar. 2005.
- RITZMANN, F. et al. IL-17 Cytokines and Chronic Lung Diseases. **Cells**, v. 11, n. 14, p. 2132, jan. 2022.
- ROSENTAL, P.-A. **Silicosis: A World History**. [s.l.] JHU Press, 2017.
- ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 217–242, 2000.
- RUMCHEV, K.; HOANG, D. V.; LEE, A. Case Report: Exposure to Respirable Crystalline Silica and Respiratory Health Among Australian Mine Workers. **Frontiers in Public Health**, v. 10, p. 798472, 14 jun. 2022.
- SALOMON, B. L. Insights into the biology and therapeutic implications of TNF and regulatory T cells. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 17, n. 8, p. 487–504, ago. 2021.
- SATO, T. et al. Suppressive Oligodeoxynucleotides Inhibit Silica-Induced Pulmonary Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 11, p. 7648–7654, 1 jun. 2008.
- SCALIA CARNEIRO, A. P. et al. Inflammatory and oxidative stress biomarkers induced by silica exposure in crystal craftsmen. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 63, n. 4, p. 337–347, abr. 2020.
- SCHALLER, T. H. et al. Chemokines as adjuvants for immunotherapy: Implications for immune activation with CCL3. **Expert review of clinical immunology**, v. 13, n. 11, p. 1049–1060, nov. 2017.
- SCHRÖDER, J. M. The neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8, a novel neutrophil chemotactic cytokine. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 40, n. 1, p. 23–31, 1992.
- SHIMAMURA, T. et al. Novel Role of IL-13 in Fibrosis Induced by Nonalcoholic Steatohepatitis and Its Amelioration by IL-13R-Directed Cytotoxin in a Rat Model. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 7, p. 4656–4665, 1 out. 2008.
- SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 10, n. 2, p. 89–102, fev. 2010.
- SINGH, S.; ANSHITA, D.; RAVICHANDIRAN, V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. **International Immunopharmacology**, v. 101, p. 107598, dez. 2021.
- SISHODIYA, P. K. Silicosis—An Ancient Disease: Providing Succour to Silicosis Victims, Lessons from Rajasthan Model. **Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 26, n. 2, p. 57–61, 2022.
- SLAVOV, E. et al. Correlation between TNF-alpha and IL-12p40-containing cytokines in silicosis. **Toxicology and Industrial Health**, v. 26, n. 8, p. 479–486, 1 set. 2010.

- SWAIN, S. D.; ROHN, T. T.; QUINN, M. T. Neutrophil Priming in Host Defense: Role of Oxidants as Priming Agents. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 4, n. 1, p. 69–83, fev. 2002.
- SZABO, S. J. et al. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 713–758, 2003.
- TABAS, I.; BORNFELDT, K. E. Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. **Circulation research**, v. 118, n. 4, p. 653–667, 19 fev. 2016.
- TAN, S.; CHEN, S. Macrophage Autophagy and Silicosis: Current Perspective and Latest Insights. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, 5 jan. 2021a.
- TAN, S.; CHEN, S. The Mechanism and Effect of Autophagy, Apoptosis, and Pyroptosis on the Progression of Silicosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 8110, 28 jul. 2021b.
- TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, p. a016295, out. 2014.
- TRIPATHI, S. S. et al. IL-6 receptor-mediated lung Th2 cytokine networking in silica-induced pulmonary fibrosis. **Archives of Toxicology**, v. 84, n. 12, p. 947–955, dez. 2010.
- TRIPATHI, S. S.; PANDEY, H. P.; PAUL, B. Overview of cytokines and receptors in Silicosis. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, p. 5, [s.d.].
- TURCI, F. et al. Revisiting the paradigm of silica pathogenicity with synthetic quartz crystals: the role of crystallinity and surface disorder. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 13, n. 1, p. 32, 10 jun. 2016.
- VALLYATHAN, V. et al. Oxidative stress in silicosis: Evidence for the enhanced clearance of free radicals from whole lungs. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 168, n. 1, p. 125–132, 1 mar. 1997.
- VANHEE, D. et al. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal workers' pneumoconiosis. **European Respiratory Journal**, v. 8, n. 5, p. 834–842, 1 maio 1995.
- WAKABAYASHI, K. et al. Eotaxin-1/CCL11 is involved in cell migration in rheumatoid arthritis. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 7937, 12 abr. 2021.
- WANG, A. et al. Transcription factor complex AP-1 mediates inflammation initiated by *Chlamydia pneumoniae* infection. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 779–794, maio 2013.
- WANG, M. et al. Gefitinib and fostamatinib target EGFR and SYK to attenuate silicosis: a multi-omics study with drug exploration. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, p. 157, 13 maio 2022.
- WANG, X. R.; CHRISTIANI, D. C. Respiratory symptoms and functional status in workers exposed to silica, asbestos, and coal mine dusts. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1076–1084, nov. 2000.

WIGERBLAD, G.; KAPLAN, M. J. Neutrophil extracellular traps in systemic autoimmune and autoinflammatory diseases. **Nature Reviews Immunology**, p. 1–15, 18 out. 2022.

WINER, H. et al. IL-7: Comprehensive review. **Cytokine**, v. 160, p. 156049, 1 dez. 2022.

WOZNICKI, J. A. et al. TNF- $\alpha$  synergises with IFN- $\gamma$  to induce caspase-8-JAK1/2-STAT1-dependent death of intestinal epithelial cells. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 10, p. 1–15, 23 set. 2021.

XU, H. et al. A New Antifibrotic Target of Ac-SDKP: Inhibition of Myofibroblast Differentiation in Rat Lung with Silicosis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40301, 3 jul. 2012.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 21, p. 1570–1579, 11 nov. 2010.

ZAWROTNIAK, M.; RAPALA-KOZIK, M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 3, p. 277–284, 2013.

ZHANG, C.; YANG, M.; ERICSSON, A. Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 620510, 1 mar. 2021.

ZHAO, Y. et al. Silica particles disorganize the polarization of pulmonary macrophages in mice. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 193, p. 110364, 15 abr. 2020.

**ANEXO 1 - QUESTIONÁRIO PADRONIZADO SOBRE SINTOMAS RESPIRATÓRIOS**

Nome Completo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Endereço (rua, nº, complementos, bairro, município) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Telefone para contato: \_\_\_\_\_

Instituição/nº de série: \_\_\_\_\_

Sexo (1= masculino; 2= feminino ) Data do Nascimento     Raça (1=branca; 2=negra; 3=amarela; 4=outras) Estado Civil (1=solteiro; 2=casado ou amasiado; 3=viúvo; 4=separado ) Ocupação Atual Empregador Atual Firma onde presta serviços atualmente Código do Entrevistador Data da Entrevista

**Sintomas Gerais**

**Q1.** O Sr. Vem engordando, emagrecendo ou vem mantendo o seu peso?

(1=engordando; 2=emagrecendo; 3=mantendo o peso)

Em caso de emagrecendo a Q1:

**Q1a.** Há quanto tempo o Sr. vem emagrecendo ?

(anotar a resposta em meses)

**Q1b.** Quantos quilos o Sr. acha que perdeu neste período ?

**Q2.** O Sr. vem tendo febre ?

Em caso de SIM a Q2:

**Q2a.** Há quanto tempo o Sr. vem tendo essa febre ?

( anotar a resposta em meses )

**Q3.** Tem lhe acontecido de acordar no meio da noite com a roupa da cama ou com a roupa do corpo molhada de suor ?

Em caso de SIM a Q3:

**Q3a.** Há quanto tempo isso vem lhe acontecendo ?

( anotar a resposta em meses )

**Tosse**

**Q4.** O Sr. costuma ter tosse pela manhã, depois de se levantar ?

**Q5.** O Sr. costuma ter tosse durante o resto do dia ou à noite ?

Em caso de SIM a Q4 e/ou Q5 :

**Q6a.** Há quanto tempo o Sr, vem tendo essa tosse ?

(resposta em anos)

( resposta em meses)

**Q6b.** De 1 ano para cá, o Sr. chegou a ter tosse na maioria dos dias, durante 3 meses seguidos ?

Em caso de SIM a Q6b :

**Q6c.** Há quantos anos o Sr. vem tendo tosse dessa maneira- na maioria dos dias, durante 3 meses seguidos ?

**Expectoração**

**Q7.** O Sr. costuma ter expectoração pela manhã depois de se levantar ?

**Q8.** O Sr. costuma ter expectoração durante o resto do dia ou à noite ?

Em caso de SIM a Q7 e/ou a Q8

**Q9a.** Há quanto tempo o Sr. vem tendo essa expectoração ?

(resposta em anos)

(resposta em meses)

**Q9b.** De 1 ano para cá, o Sr. chegou a ter expectoração na maioria dos dias durante 3 meses seguidos ?

Em caso de SIM a Q9b :

**Q9c.** Há quantos anos o Sr. vem tendo expectoração dessa maneira, na maioria dos dias, durante 3 meses seguidos ?

**Episódios Arrastados de Expectoração**

**Q10.** De 1 ano para cá o Sr. teve algum período de ( aumento da) expectoração  
que durasse mais 3 semanas ?

Em caso de SIM a Q10 :

**Q10 a.** De 1 ano para cá, quantos desses períodos o Sr. teve ?

**Escarros Sangüíneos**

**Q11.** O Sr. tem escarrado sangue ?

Em caso de SIM a Q11 :

**Q11a.** A primeira vez que isso lhe aconteceu foi há quanto tempo ?

(resposta em anos)

(resposta em meses)

**Dor Torácica**

**Q12.** O Sr. tem sentido dor no peito ou nas costas ao respirar fundo ?

Em caso de SIM a Q12 :

**Q12a.** Há quanto tempo o Sr. vem sentindo isso ?

(resposta em anos)

(resposta em meses)







**ATENÇÃO:** Em caso de SIM a qualquer item de Q13 e/ou Q14, fazer as perguntas Q15a e Q15b

**Q15a.** A primeira vez em que o Sr. teve chiados no peito foi há quanto tempo ?

(resposta em anos)

(resposta em meses)

**Q15b.** A última vez em que o Sr. teve chiados no peito foi há quanto tempo?

(resposta em anos)

(resposta em meses)

### **Crises de Chiado no Peito**

**Q16.** Alguma vez o Sr. teve uma crise de abafamento ou falta de ar, acompanhada de chiados no peito ?

Em caso de SIM a Q16 :

**Q16a.** Isso já lhe aconteceu em repouso ?

**Q16b.** Isso já lhe aconteceu trabalhando ?

**Q16c.** Há quanto tempo o Sr. teve a primeira dessas crises ?

(resposta em anos)

(resposta em meses)

**Q16d.** Há quanto tempo o Sr. teve a última dessas crises?

(resposta em anos)

(resposta em meses)

No caso de a última crise ter sido HÁ MAIS DE 1 ANO, pule para Q16g; caso contrário, aplique Q16e e Q16f.

**Q16e.** De 1 ano para cá, quantas dessas crises o Sr. teve ?

**Q16f.** Das crises que o Sr. teve de 1 ano para cá, em quantas   
(nessa crise) o Sr. precisou ser atendido de emergência ?

PULE PARA Q17

**Q16g.** De 1 ano para cá, o Sr. fez algum tratamento para evitar essas crises?

**Falta de Ar**

**Q17.** Para andar a pé, o Sr. tem dificuldade causada por problemas nos ossos,   
nos músculos ou nas juntas ?

Em caso de NÃO a Q17 :

**Q17a.** (Não estando em crises de chiados) o Sr. sente falta de ar ao andar depressa em   
terreno plano ou ao subir uma ladeira pouco inclinada?

Em caso de SIM a Q17a.:

**Q17b.** (Não estando em crises de chiados) o Sr. sente falta de ar ao andar com pessoas   
de sua idade, em passo normal, em terreno plano ?

**Q17c.** (Não estando em crises de chiados) o Sr. é obrigado a parar para tomar fôlego   
quando anda no seu próprio passo, em terreno plano ?

**Q17d.** (Não estando em crises de chiados) o Sr. sente falta de ar ao tomar banho ou ao   
vestir-se ?

### **Doenças Torácicas Pgressas**

- Q18.** Alguma vez o Sr. sofreu um traumatismo no tórax ?
- Q19.** Alguma vez o Sr. foi operado de tórax ?
- Q20.** Alguma vez o médico lhe disse que o Sr. tinha:
- 20.1** Pressão Alta ?
- 20.2** Problemas no coração ?
- 20.3** Bronquite ?
- 20.4** Bronquite crônica ou bronquite causada pelo cigarro ?
- 20.5** Bronquite alérgica ou bronquite asmática ou asma ?
- Q21.** Alguma vez o médico lhe disse que o Sr. estava com :
- 21.1** Enfisema nos pulmões ?
- 21.2** Pneumonia ou broncopneumonia ?
- 21.3** Derrame pleural ou água na pleura ?
- 21.4** Tuberculose pulmonar ?
- Em caso de NÃO a Q21.4 :
- 21.4a.** Alguma vez o médico lhe disse que o Sr. estava com mancha ou sombra nos pulmões ou que o Sr. estava fraco dos pulmões ?
- Q22.** . O Sr. já teve algum outro problema nos brônquios ou nos pulmões ?

**Hábito de Fumar Cigarros**

**Q23.** Alguma vez na vida o Sr. já fumou cigarros ?

Em caso de SIM a Q23 :

**Q23a.** Ao longo de toda sua vida, o Sr. terá fumado, ao todo mais de 20 maços de cigarros?

Em caso de SIM a Q23a

**Q23b.** Nos últimos 12 meses, o Sr. fumou pelo menos 1 cigarro por dia, todos os dias?

**Q23c.** Com que idade o Sr. começou a fumar cigarros todos os dias ?

**Q23d.** Atualmente, quantos cigarros em média o Sr. está fumando por dia ?

**Q23e.** Levando em conta todo o período em que o Sr. fumou, quantos cigarros,   
em média o Sr. acha que fumou por dia ?

**Q23f.** O Sr. traga (tragava) a fumaça do cigarro ?

ATENÇÃO: Em caso de NÃO a Q23b:

**Q23g.** Nos últimos 12 meses, o Sr. fumou algum cigarro ?

Em caso de NÃO a Q23g

**Q23h.** Com que idade o Sr. parou definitivamente de fumar cigarros ?

**Q23i.** Total = maços / ano  / anos

(No. cigarros x No. anos / 20 )

(cálculo: ex-fumante:  $Q23e \times Q23h - Q23c \div 20$  )

fumante:  $Q23e \times \text{idade} - Q23c \div 20$ )

**Exposições Ocupacionais**

**Q24.** No seu emprego atual - ou em algum emprego anterior – o Sr. trabalha –

ou trabalhou exposto a substâncias tais como poeiras, fumaças gases ou vapores irritantes ?

Em caso de afirmativo, fale-me desses empregos ou das principais atividades:

Formular as questões Q24 (n) a – Q24 (n) h para cada emprego ou atividade em que tenha havido exposição a poeira (que não a de casa ou das ruas), fumaça, gás, ou vapor irritante, anotando as respostas no Quadro1.

**Q24(n)a.** O que o Sr. faz (fazia) nesse emprego ou atividade ? *Resposta coluna A*

**Q24(n)b.** Qual é (era) a substância a que o Sr. está (estava) exposto ? *Resposta coluna B*

**Q24(n)c.** Nesse emprego ou atividade contando com as horas extras e com os serões, quantas horas semanais, em média, o Sr. trabalha (ou trabalhava) ?

*Resposta coluna C*

**Q24(n)d.** Há quanto tempo (durante quanto tempo) o Sr. trabalha (trabalhou) nesse emprego ou nessa atividade ?

*Resposta coluna D*

**Q24(n)e.** Nesse emprego ou atividade, o Sr. trabalha (trabalhou) a maior parte do tempo em um ambiente fechado, em um ambiente aberto ou tempo igual nos dois ambientes?

( 1= aberto; 2= fechado; 3= igual )

*Resposta coluna E*

Em caso de ambiente fechado (=2) perguntar Q24(n)f.

**Q24(n)f.** . Nesse emprego ou atividade, durante as suas horas de trabalho em ambiente fechado, funciona (funcionava) um sistema de exaustão?

( 1= não; 2=sim; 3= as vezes )

*Resposta coluna F*

**Q24(n) g.** Nesse emprego ou atividade, durante o seu trabalho, o Sr. usa (usava)  
equipamento de proteção ?

( 1= não; 2=sim; 3= as vezes )

*Resposta coluna G*

**Q24(n)h.** Nesse emprego ou atividade, durante o seu trabalho, a quantidade de  
substâncias no ar que lhe cerca (cercava) é (era) pequena, média ou grande ?

(1=pequena; 2=média; 3=grande )

*Resposta coluna H*



| <u>CÓDIG</u><br><u>O</u> | <b>A</b>               | <b>B</b>    | <b>C</b>               | <b>D</b>                                    | <b>E</b>     | <b>F</b>      | <b>G</b>     | <b>H</b>       |
|--------------------------|------------------------|-------------|------------------------|---|--------------|---------------|--------------|----------------|
| <b>24.</b>               | OCUPAÇÃO<br><br>TAREFA | SUBSTÂNCIAS | HORAS<br>POR<br>SEMANA | TEMP<br>O DE<br>TRAB<br>ALHO<br>EM<br>MESES | AMBI<br>ENTE | Exhaust<br>ão | Proteç<br>ão | Quantid<br>ade |
| <b>24.1</b>              |                        |             | □□□                    | □□□   | □            | □             | □            | □              |
| <b>24.2</b>              |                        |             | □□□                    | □□□   | □            | □             | □            | □              |
| <b>24.3</b>              |                        |             | □□□                    | □□□   | □            | □             | □            | □              |
| <b>24.4</b>              |                        |             | □□□                    | □□□   | □            | □             | □            | □              |
| <b>24.5</b>              |                        |             | □□□                    | □□□   | □            | □             | □            | □              |
| <b>24.6</b>              |                        |             | □□□                    | □□□   | □            | □             | □            | □              |
| <b>24.7</b>              |                        |             | □□□                    | □□□   | □            | □             | □            | □              |
| <b>24.8</b>              |                        |             | □□□                    | □□□   | □            | □             | □            | □              |
| <b>24.9</b>              |                        |             | □□□                    | □□□   | □            | □             | □            | □              |
| <b>24.10</b>             |                        |             | □□□                    | □□□   | □            | □             | □            | □              |
| <b>24.11</b>             |                        |             | □□□                    | □□□   | □            | □             | □            | □              |
| <b>24.12</b>             |                        |             | □□□                    | □□□   | □            | □             | □            | □              |
| <b>24.13</b>             |                        |             | □□□                    | □□□   | □            |               |              |                |

**Q24i.** Há quanto tempo o Sr. está afastado da exposição à essas substâncias?

(resposta em anos)

( resposta em meses)

**Q25.** Considerando todas as empresas em que o Sr. já trabalhou como \_\_\_\_\_

inclusive a empresa atual, o Sr. diria que: no ar que lhe cerca enquanto o Sr. trabalha

a quantidade de \_\_\_\_\_ costuma ser, pequena, média ou grande ?

( 1 = pequena; 2 = média; 3 = grande )

## **HISTÓRIA FAMILIAR**

**Q26.** Alguma vez um médico disse que seu pai ou sua mãe tinha ?

|  | PAI                      | MÃE                      |
|--|--------------------------|--------------------------|
| <b>26.1.</b> Bronquite ?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>26.2.</b> Bronquite Crônica ?                                 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>26.3.</b> Bronquite alérgica ou asma ?                        | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>26.4.</b> Enfisema Pulmonar ?                                 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>26.5.</b> Câncer de Pulmão ?                                  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>26.6</b> Alguma outra doença dos brônquios<br>ou dos pulmões? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

(1= não ; 2= sim ; 3= não sabe )