

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE FIBROBLASTOS PROVENIENTES DE
ANIMAIS SILICÓTICOS: ESTABELECIMENTO DE SISTEMA DE CULTURA EM 3D

ANDRESSA MORAES GUIMARÃES DA SILVA

Rio de Janeiro
Outubro de 2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Andressa Moraes Guimarães da Silva

Avaliação da reatividade de fibroblastos provenientes de animais silicóticos:
Estabelecimento de sistema de cultura em 3D

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

Orientadora: Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva

RIO DE JANEIRO

Outubro de 2012

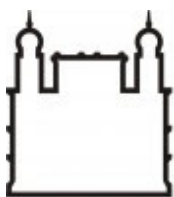
Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ – RJ

S586 Silva, Andressa Moraes Guimarães da
Avaliação da reatividade de fibroblastos provenientes de animais
silicóticos: estabelecimento de sistema de cultura em 3D / Andressa Moraes
Guimarães da Silva. – Rio de Janeiro, 2012.
xvi,58 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, 2012.
Bibliografia: f. 48-58

1. Silicose. 2. Fibroblastos. 3. Cultura 3D. I. Título.

CDD 616.24407583



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Autora: Andressa Moraes Guimarães da Silva

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE FIBROBLASTOS PROVENIENTES DE ANIMAIS SILICÓTICOS: ESTABELECIMENTO DE SISTEMA DE CULTURA EM 3D

Orientadora: Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva

Aprovada em: 22/10/2012

Examinadores:

Dra. Helene Santos Barbosa (Presidente) (IOC - FIOCRUZ)

Dra. Maria Isabel Doria Rossi (CCS - UFRJ)

Dr. Luiz Anastácio Alves (IOC - FIOCRUZ)

Dr. Julio Beltrame Daleprane (IN - UERJ)

Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto (IOC - FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 22 de outubro de 2012.

A Deus, por se fazer presente em todos os dias da minha vida.

*Aos meus pais, Tania e Nilson, por seus valores inabaláveis,
pela dedicação e amor imensurável.*

À minha irmã, Nayara, minha eterna companheira.

*E ao meu noivo, Tiago, pela paciência, força, equilíbrio e
amor durante esta caminhada.*

Agradecimentos

A Deus por ter sempre zelado pela minha vida, me confortado e dado força para superar todas as dificuldades;

À minha mãe, mulher virtuosa, minha maior incentivadora, por ter guiado meus passos em busca do conhecimento, por ter me dado valores inabaláveis que levarei para o resto da vida, amor, carinho e compreensão;

Ao meu pai, pelo esmero em tornar os meus sonhos realidade, por aceitar minhas escolhas e fazer parte das minhas alegrias;

À minha irmã, por fazer parte desta realização de alguma forma;

Aos meus tios amados, pela ajuda imensurável, pela atenção e por terem muitas vezes para comigo cuidado e amor de pais;

Ao meu noivo, pelo amor, força e equilíbrio durante toda esta jornada;

À minha orientadora, Dra. Patrícia M. R. e Silva, pela oportunidade enriquecedora de fazer parte do Laboratório de Inflamação do IOC, pelo cuidado, atenção e confiança que depositou em mim e principalmente pelo exemplo de profissional e de pessoa. Cresci muito vendo os seus passos. Obrigada!

Ao chefe do Laboratório de Inflamação do IOC, Dr. Marco Aurélio Martins, pelos ensinamentos transmitidos e pela grande oportunidade de fazer parte do Laboratório de Inflamação;

À amiga Patrícia Trentin, pela “cuore”-orientação, pelo carinho, cuidado e ajuda em todos os momentos de aflição. Trentin, você é uma pessoa sensacional!

Aos amigos-irmãos de laboratório Diana, Daniele, Suzana, Luciana, Priscilla, Aline, Bianca, Thiago, Davidson e Rafael pelas ótimas conversas, pelo apoio em todos os experimentos, pelas risadas, almoços, congressos e pela vida que dividimos juntos. Nada teria o mesmo valor se não vencêssemos juntos essa jornada. Amo muito vocês!!!

A toda equipe do laboratório de Inflamação, pela ótima convivência e pelo aprendizado. Em especial aos colegas: Ana Carol, Tatiana Paula, Ana Lúcia, Rodrigo, Rafael, Natália e Rafa;

À Osirene (Dadá), nosso anjo-da-guarda, pela assistência, apoio e cuidado com todos do Laboratório;

À Dra. Helene Barbosa, pelo esmero em tornar parte desta dissertação realidade, pelo cuidado, apoio, compromisso e indiscutivelmente pelo exemplo de profissional;

Às meninas do Laboratório de Biologia Estrutural do IOC, em especial, à Renata Morley e à Sandrinha, pela amizade, carinho e apoio na realização dos experimentos de microscopia eletrônica;

À equipe do biotério setorial e do CECAL por toda a ajuda e cuidados com os animais, peças fundamentais para realização desse trabalho;

À Daniele Lobato e todos os funcionários do PGBCM por toda ajuda prestada;

Ao apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAPERJ para realização deste trabalho.

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

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Data de ingresso no programa de mestrado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: julho de 2010.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE FIBROBLASTOS PROVENIENTES DE ANIMAIS SILICÓTICOS: ESTABELECIMENTO DE SISTEMA DE CULTURA EM 3D

Resumo

A silicose é uma doença pulmonar, de caráter restritivo, causada pela inalação de partículas de sílica cristalina. Se caracteriza pela indução de uma inflamação crônica associada à intensa proliferação de fibroblastos e acúmulo exacerbado de componentes de matriz extracelular, e para a qual não há um tratamento eficaz. Os fibroblastos são considerados alvos cruciais em doenças de natureza fibrótica e o desenvolvimento de sistemas que permitam avaliar a reatividade destas células é de fundamental importância na busca por terapias anti-fibróticas. No presente estudo foi desenvolvido um sistema de cultura primária em 3D (esferóides), utilizando fibroblastos provenientes do pulmão de camundongos normais e silicóticos objetivando analisar comparativamente os aspectos morfológicos/funcionais de ambas as populações celulares. Os fibroblastos foram obtidos a partir da dissociação mecânica/enzimática dos pulmões de camundongos Swiss-Webster 7 dias após a instilação intranasal de salina (controle) ou sílica (10 mg/animal). Após a terceira passagem, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, revestidas com agarose, na ausência ou presença de IL-13 (40 ng/mL), sendo os esferóides avaliados quanto a aspectos morfológicos (tamanho/diâmetro médio/constituição), e funcionais tais como: proliferação, produção de citocinas (TGF- β e quimiocinas (MCP-1)) e de colágeno. Através da análise por microscopia de luz invertida, verificamos que os esferóides contendo fibroblastos de animais normais e silicóticos mostraram progressiva diminuição do tamanho/diâmetro, e maior densidade, ao longo do tempo analisado (1 – 4 dias), com os silicóticos apresentando valores sempre superiores aos dos controles. A estimulação com IL-13 induziu claro aumento de tamanho/diâmetro em ambas as populações de esferóides. A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou haver diferenças morfológicas importantes entre os grupos normal e silicótico, no que tange ao formato e à constituição celular, com expressivo aumento no conteúdo de matriz extracelular detectado na condição de estimulação com IL-13. De forma interessante, foi observado que os esferóides silicóticos apresentaram níveis basais aumentados de proliferação celular e secreção de TGF- β , assim como de colágeno, em comparação aos dos controles. Tanto esferóides normais quanto silicóticos foram sensíveis à estimulação com IL-13, sendo verificado aumento equivalente na taxa de proliferação e nos níveis de TGF- β e MCP-1 em ambos os grupos. No que tange a produção de colágeno, os esferóides normais mostraram-se responsivos à IL-13 enquanto os silicóticos não. Em conjunto, nossos achados mostraram que os fibroblastos pulmonares de camundongos adultos são: (i) passíveis de serem cultivados em sistema de cultura 3D; (ii) responsivos à estimulação com IL-13 e que; (iii) os esferóides silicóticos apresentam características de ativação em comparação aos normais. Além disso, este modelo mostrou-se reprodutível e promissor quanto a possibilidade de utilização futura na busca por compostos com atividade anti-fibrótica.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

EVALUATION OF FIBROTIC ANIMALS FIBROBLASTS REACTIVITY: ESTABLISHING 3D CULTURE SYSTEM

Abstract

Silicosis is a restrictive pulmonary disease caused by inhalation of crystalline silica particles, which is characterized by chronic inflammation associated with intense fibroblast proliferation and exacerbated accumulation of extracellular matrix components. There is no effective treatment for this disease. Fibroblasts are considered crucial cells in fibrosis, and the development of systems which lead to evaluate their reactivity is important in the search for anti-fibrotic therapy. In this study we aimed to establish a system of primary cell culture in 3D (spheroids) using lung fibroblasts from normal and silicosis mice, in order to perform a comparative analysis of morphological/functional aspects of both cell populations. Fibroblasts were obtained after mechanical/enzymatic dissociation of the lung tissue from Swiss-Webster mice, 7 days after intranasal instillation of saline (control) or silica (10 mg / animal). After the third passage, the cells were cultured in 96-well plates coated with agarose, in the absence or presence of IL-13 (40 ng/ml) and the spheroids were evaluated regarding the morphological (size/diameter/constitution) and functional parameters (proliferation and generation of cytokine (TGF- β), chemokine (MCP-1) and collagen. By means of inverted light microscopy, we noted that spheroids containing fibroblasts from normal and silicotic animals showed a progressive reduction in size/ diameter and increase in density when analyzed for 1 - 4 days of culture. Those from silicotic mice showed themselves bigger as compared to controls. Stimulation with IL-13 induced an increase in size/diameter of both cell populations. The analysis by scanning electron microscopy (SEM) revealed significant morphological differences between normal and silicotic groups, with a significant increase in the content of extracellular matrix being detected under condition of stimulation with IL-13. Interestingly, we observed that spheroids with cells from silicotic mice showed increased basal levels of cell proliferation and secretion of TGF- β and collagen as compared to the controls. Both spheroid populations were sensitive to IL-13 stimulation as attested by increased cell proliferation as well as TGF- β and MCP-1 levels. Increased collagen production was detected only in the case of normal cells. Altogether, our findings show that adult mouse lung fibroblasts grow in a 3D culture system, that they are responsive to IL-13 stimulation and that those from silicotic mice showed an activated phenotype as compared to the controls. Thus, this experimental model seems to be reproducible and promising in the case of searching for anti-fibrotic compounds.

Índice

Resumo.....	ix
Abstract.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xiii
Lista de Figuras.....	xv
1 Introdução.....	1
1.1 Sistema Respiratório de Mamíferos.....	1
1.2 Doenças Pulmonares e Pneumoconioses.....	2
1.3 Silicose.....	3
1.3.1 Sílica.....	3
1.3.2 Epidemiologia.....	4
1.3.3 Fisiopatologia.....	6
1.3.4 Classificação Clínica e Diagnóstico.....	9
1.3.5 Tratamento.....	10
1.4 Remodelamento Tecidual e Fibroblastos.....	10
1.5 Sistemas Tridimensionais de Cultivo Celular (cultura 3D).....	12
2 Objetivos.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 Materiais e Métodos.....	17
3.1 Animais.....	17
3.2 Indução da Silicose.....	17
3.3 Análise Histológica.....	18
3.4 Imunohistoquímica.....	18
3.5 Cultura Primária de Fibroblastos Pulmonares Obtidos de Camundongos Normais e Silicóticos.....	19
3.6 Contagem e Plaqueamento de Células em Sistema de Agarose.....	20
3.7 Obtenção de Imagens e Aferição do Diâmetro dos Esferóides.....	20
3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	21
3.9 Ensaio de Proliferação Celular (Timidina- ³ H).....	21
3.10 Quantificação de Citocinas e Quimiocinas (ELISA).....	22
3.11 Quantificação de Colágeno (SIRCOL).....	22
3.12 Análise Estatística.....	23

4	Resultados	24
4.1	Avaliação Morfológica e Morfométrica de Esferóides Contendo Fibroblastos Pulmonares Obtidos de Camundongos Normais e Silicóticos	26
4.1.1	Microscopia de Luz Invertida	26
4.1.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	31
4.2	Avaliação da Funcionalidade de Esferóides Contendo Fibroblastos Pulmonares Obtidos de Camundongos Normais e Silicóticos	35
5	Discussão.....	41
6	Conclusões	46
7	Perspectivas do Trabalho.....	47
8	Referências Bibliográficas.....	48

Lista de Abreviaturas

2D - Bidimensional

3D - Tridimensional

AP-1 - "Activator Protein -1" - Proteína Ativadora - 1

BSA - "Bovine Serum Albumin" - Albumina Sérica Bovina

CACO - Cacodilato de Sódio

CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório

CEUA - Comitê de Ética de Uso de Animais

CO₂ - Dióxido de Carbono Molecular

CPM - Contagem por Minuto

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

ECM - "Extracellular Matrix" - Matriz Extracelular

EDTA - "Ethylenediaminetetraacetic acid" - Ácido etilenodiaminotetraacético

EPM - Erro Padrão da Média

GA - Glutaraldeído

HE - Hematoxilina e Eosina

HRP - "Neutravidin-horseradish peroxidase" - Peroxidase de Rábano Conjugada a Neutravidina

i.n. - Intranasal

IFN- γ - Interferon- γ

IGF-1 - "Insulin Growth Factor - 1" - Fator de Crescimento do Tipo Insulina - 1

IL-(n) - Interleucina-(n)

MCP-1 - "Monocyte Chemoattractant Protein - 1" - Proteína Quimiotática de Monócito
1

MIP-1 - "Macrophage Inflammatory Protein - 1" - Proteína Inflamatória de Macrófago
1

MMPs - "Matrix Metalloproteinases" - Metaloproteinases de Matriz

NF- κ B - “Nuclear Factor - Kappa B” - Fator de Transcrição Nuclear- kappa B

O₂ - Oxigênio Molecular

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAS - “Periodic Acid - Schiff” - Ácido Periódico de Schiff

PBS - “Phosphate Buffered Saline” - Salina Tamponada com Fosfato

PDGF - “Platelet Derived Growth Factor” - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

RNS - “Reactive Nitrogen Species” - Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS - “Reactive Oxygen Species” - Espécies Reativas de Oxigênio

SFB - Soro Fetal Bovino

SiO₂ - Dióxido de Silício

TGF- α - “Transforming Growth Factor - α ” - Factor de Crescimento e Transformação - α

TGF- β - “Transforming Growth Factor - β ” - Factor de Crescimento e Transformação - β

TIMPs - “Tissue Inhibitor of Metalloproteinases” - Inibidores Teciduais de Metaloproteinases

TNF- α - “Tumor Necrosis Factor - α ” - Fator de Necrose Tumoral - α

α -SMA - “ α - Smooth Muscle Actin” - α - Actina de Músculo Liso

Lista de Figuras

Figura 1.1: Esquema do processo inflamatório induzido pela inalação de partículas de sílica	08
Figura 3.1: Esquema de indução da silicose	17
Figura 3.2: Esquema de plaqueamento de células em sistema de agarose	20
Figura 4.1: Imagens representativas do pulmão de camundongos instilados com salina e sílica (10 mg)	25
Figura 4.2: Imagens representativas de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais (1 - 4 dias).....	27
Figura 4.3: Avaliação do diâmetro médio de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais (1 - 4 dias).....	27
Figura 4.4: Imagens representativas de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais (1 - 8 dias).....	29
Figura 4.5: Avaliação do diâmetro médio de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais (1 - 8 dias).....	29
Figura 4.6: Imagens representativas de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais e silicóticos.....	30
Figura 4.7: Avaliação do diâmetro médio de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais e silicóticos.....	30
Figura 4.8: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais incubados com meio (3 dias).....	32
Figura 4.9: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais estimulados com IL-13 (40 ng/mL) (3 dias)	33

Figura 4.10: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos silicóticos incubados com meio (3 dias).....	34
Figura 4.11: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos silicóticos estimulados com IL-13 (40 ng/mL) (3 dias)	36
Figura 4.12: Avaliação da proliferação de fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais contidos em esferóides	37
Figura 4.13: Avaliação da proliferação de fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais e silicóticos contidos em esferóides	37
Figura 4.14: Quantificação dos níveis de TGF- β no sobrenadante de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais e silicóticos...	39
Figura 4.15: Quantificação dos níveis de MCP-1 no sobrenadante de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais e silicóticos...	39
Figura 4.16: Quantificação de colágeno no sobrenadante de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais e silicóticos	40

1 Introdução

1.1 Sistema Respiratório de Mamíferos

O sistema respiratório de mamíferos é composto pelos pulmões, pelas vias aéreas condutoras, por componentes do sistema nervoso central envolvidos no controle dos músculos respiratórios, e pela parede torácica. A parede torácica compreende os músculos respiratórios como: o diafragma, os músculos intercostais, os músculos abdominais e a caixa torácica (Levitzky, 2004).

A principal função desse sistema é oxigenar o sangue colocando o ar inspirado em íntima relação com o sangue venoso nos capilares pulmonares e dele remover o produto gasoso do metabolismo celular, isto é, o gás carbônico (Aires, 2008). Para efetuar esta função, os pulmões são divididos em porção condutora de ar e porção respiratória. A porção condutora de ar compreende a traquéia que se divide em dois brônquios primários extra-pulmonares, que posteriormente dão origem aos brônquios secundários e em seguida penetram e se ramificam pelo pulmão formando os bronquíolos terminais. Adiante, surge a porção respiratória, que compreende os bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolos (Junqueira & Carneiro, 2004).

Nos seres humanos, a superfície pulmonar encarregada pelas trocas gasosas possui de 70 a 100 m², sendo esta a maior área de contato do organismo com o meio ambiente (Aires, 2008). Desta forma, fica evidente que os pulmões encontram-se em amplo contato com o meio externo, susceptíveis a inúmeras doenças devido à sua exposição a diversos agentes agressores como: patógenos (bactérias, vírus e fungos), substâncias antigênicas (pólen), material particulado (sílica e asbesto) e xenobióticos (Caramori e col., 2003). Sendo assim, apesar da principal função do sistema respiratório ser a realização da troca gasosa, outras funções não respiratórias são atribuídas a esse sistema, como a sua própria defesa contra matérias particuladas inspiradas, o armazenamento e a filtração do sangue da circulação sistêmica e a produção e liberação de substâncias utilizadas nos alvéolos ou na circulação (Levitzky, 2004).

Dentre os mecanismos de defesa utilizados por esse sistema o primeiro deles é a criação da turbulência do fluxo de ar inspirado ao contato com cada ramificação

da árvore respiratória. A turbulência permite que as partículas inaladas não retidas pelo sistema respiratório superior sejam contidas pelo sistema mucociliar presente ao longo das vias condutoras de ar até os bronquíolos terminais, fazendo com que a maioria das partículas menores do que 0,5 µm permaneçam suspensas no ar alveolar até serem expelidas pela expiração. Apesar da eficiência deste processo, algumas partículas de tamanho entre 1 e 5 µm sofrem precipitação gravitacional e são fixadas no muco que reveste as vias aéreas superiores, a traquéia, os brônquios e bronquíolos respiratórios (Guyton & Hall, 2006).

As partículas retidas nas vias aéreas terminais e nos alvéolos podem ser eliminadas ou destruídas por enzimas da superfície de células específicas e por fatores séricos contidos nas secreções das vias aéreas, a exemplo da lisozima, encontrada em leucócitos e que tem ação bactericida; o interferon, substância antiviral produzida por macrófagos e linfócitos; o complemento, o qual participa como um co-fator nas reações antígeno-anticorpo ou ainda, pelo processo de fagocitose mediado por macrófagos, onde as partículas são destruídas através da ação de enzimas lisossomais, como acontece com a maior parte das bactérias (Levitzky, 2004). Entretanto, algumas partículas, como a sílica, ao serem inaladas não são destruídas de modo eficaz pelos macrófagos podendo levar a morte destas células com liberação de enzimas, metabólitos, componentes da resposta imunológica, citocinas e outros mediadores. Dessa forma, iniciasse o processo inflamatório, cuja evolução resulta na proliferação de tecido fibroso e em debilidade permanente do órgão decorrente da silicose (Crapo e cols., 2000; Guyton & Hall, 2006)

1.2 Doenças Pulmonares e Pneumoconioses

De acordo com as alterações na fisiologia, as doenças pulmonares podem ser classificadas em: obstrutivas ou restritivas. As obstrutivas são caracterizadas pelo aumento da resistência ao fluxo de ar, devido à obstrução parcial ou completa em qualquer nível das vias aéreas, desde a traquéia e grandes brônquios aos bronquíolos terminais e respiratórios. Encontram-se neste grupo: o enfisema, a bronquite crônica, a asma e a bronquiectasia. As restritivas apresentam a expansão reduzida do parênquima pulmonar com diminuição da capacidade pulmonar total, enquanto o fluxo de ar permanece normal ou é proporcionalmente reduzido,

podendo ser observadas alterações clínicas, radiológicas e patológicas particulares. Dentre as doenças pulmonares restritivas encontram-se a fibrose idiopática, a pneumonia intersticial inespecífica, as doenças Intersticiais relacionadas ao tabagismo e as pneumoconioses (Robbins & Cotran, 2006).

O termo pneumoconiose é utilizado para designar o grupo genérico de doenças relacionadas etiologicamente à inalação de poeiras em ambientes de trabalho. Excluindo-se dessa denominação as alterações neoplásicas e as reações obstrutivas (Parkes, 1994). O seu desenvolvimento depende de fatores primordiais como: (1) a quantidade de poeira retida no pulmão e nas vias aéreas; (2) do tamanho e da forma e, portanto, da flutuação das partículas; (3) da solubilidade e das propriedades físico-químicas das partículas e, (4) de possíveis efeitos adicionais de outros irritantes (por exemplo, tabagismo) (Godleski, 1994). Essas considerações têm importância quando são estudados os processos fisiopatológicos subjacentes a determinadas pneumopatias ocasionadas pela inalação de poeiras, como a antracose, ocasionada pela pó de carvão; a asbestose, pelo asbesto e a silicose, causada pela inalação de poeiras contendo sílica (Robbins & Cotran, 2006).

1.3 Silicose

1.3.1 Sílica

A sílica ou dióxido de silício (Si_2O) é um composto natural formado pelos dois elementos químicos mais abundantes na crosta terrestre, o oxigênio e o silício. A sílica é encontrada na natureza sob as formas amorfa e cristalina, que quando combinadas com metais e óxidos dão origem a silicatos como o talco, feldspato, caulim e mica (Terra Filho & Santos, 2006). A forma amorfa, embora não seja inerte, é menos tóxica do que a cristalina, sendo encontrada em rochas vulcânicas vitrificadas, terras diatomáceas não aquecidas, sílica em gel, no vidro sintético e na lã de vidro (“Silicosis and Silicate Disease Committee”, 1988). A sílica cristalina é encontrada sob a forma de um cristal tetraédrico tridimensional apresentando diversos polimorfismos, como a cristobalita, algumas formas de tridimita e o quartzo, a forma mais comum (More, 1999).

Os riscos da inalação de poeira contendo sílica cristalina podem estar presentes em uma ampla variedade de situações: extração e beneficiamento de

rochas como o granito e pedras em geral, mineração de ouro, arsênico, estanho e pedras preciosas e perfuração de poços, nas indústrias de cerâmica, de materiais de construção, na fabricação de vidro e de fertilizantes (rocha fosfática), em fundições e na produção de talco (comumente contaminado com sílica), operação de jateamento de areia, retífica e polimento de metais e minerais com abrasivos contendo sílica, e em atividades de manutenção e limpeza de fornos, moinhos e filtros; além da confecção de prótese dentária (Terra Filho & Santos, 2006).

A inalação contínua da sílica cristalina tem sido historicamente associada com o desenvolvimento de severas doenças respiratórias como a silicose, pneumoconiose caracterizada por proteinose alveolar e fibrose difusa que resulta em progressiva restrição da função pulmonar (Davis, 1986). É teorizado que isto ocorre devido a uma propriedade das formas polimórficas da sílica cristalina chamada de piezoelectricidade (Greenberg e cols., 2007). Esta propriedade confere cargas elétricas opostas em lados diferentes da estrutura física da partícula no momento da sua fraturação, gerando radicais livres capazes de formar ligações com o hidrogênio encontrado nas membranas celulares, levando à danos celulares como a perda da estrutura de membrana, o vazamento lisossomal e conseqüentemente à danos teciduais. Desta forma, esta propriedade da superfície da partícula desempenha um importante papel na fisiopatologia da silicose (Castranova, 2004).

Além da silicose, outras doenças como: esclerose sistêmica, artrite reumatóide, lúpus eritematoso, doença renal crônica, algumas doenças imunes e casos raros de câncer de pulmão também têm sido associadas à inalação desta partícula (Cooper e cols., 2002; Peretz e cols., 2006).

1.3.2 Epidemiologia

A silicose provavelmente é uma das doenças ocupacionais mais relatadas ao longo da história. Na Antiguidade, Hipócrates já havia descrito a dificuldade respiratória em mineiros, e em 1690, Lohneiss notou que quando “a poeira e as pedras caem nos pulmões, o homem tem doença pulmonar e respira com dificuldade” (Muetterties e cols., 2003). Peacock e Greenhow relataram a descoberta do pó de sílica nos pulmões dos mineiros em 1860, e dez anos depois Visconti usou a palavra “silicose” para descrever a doença causada pela exposição por inalação à

sílica (Hunter, 1986). Na virada do século XX, a Metropolitan Life Insurance Company informou que os trabalhadores de fundições, pedreiras e oficinas mecânicas estavam ausentes do trabalho com mais frequência do que outros trabalhadores. Isto constituiu a primeira sugestão contemporânea sobre a importância clínica da exposição à sílica (Greenberg e cols., 2007). No entanto, foi apenas após o desastre do Túnel Hawk's Nest, em 1930, que a silicose foi claramente definida como uma preocupação de saúde pública. As técnicas de construção utilizadas neste projeto não empregavam a chamada perfuração-molhada para reduzir a produção de pó. Conseqüentemente, enormes quantidades de pó contendo sílica foram geradas e um número notável de trabalhadores adoeceu com mais de quatrocentas mortes relatadas devido à silicose (Cherniak, 1986).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) ([http://www.who.int/occupational health](http://www.who.int/occupational%20health)) a silicose é considerada a pneumoconiose que produz o maior número de vítimas. Anualmente mata centenas de pessoas em todo o mundo, podendo promover graves transtornos para a saúde do trabalhador, assim como resultar em um sério impacto sócio-econômico. Embora várias medidas sanitárias tenham sido implementadas para o controle desta doença, a incidência em países desenvolvidos e em desenvolvimento é ainda bastante elevada. O número estimado de trabalhadores potencialmente expostos à poeiras contendo sílica é superior a 6 milhões somente no Brasil (em torno de 4 milhões na construção civil, 500 mil na mineração e no garimpo e acima de 2 milhões nas indústrias de transformação de minerais, cerâmicas e vidros), esta alta incidência ocorre em particular na região sudeste, onde a mineração, exploração de pedreira, construção civil, e indústrias de processamento de minerais constituem atividades econômicas predominantes. Nas regiões de seca no nordeste, a escavação de poços com alto conteúdo de quartzo resulta em uma prevalência de 26% de silicose nos indivíduos (FUNDACENTRO, 2008). Estas taxas de prevalência referem-se aos trabalhadores em atividade e o contraste entre as mesmas reflete as condições de exposição dentro de cada grupo analisado (FUNDACENTRO, 2008).

A Administração de Segurança e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos (OSHA), relatou em 2004 que mais de 2 milhões de trabalhadores norte-americanos são potencialmente expostos à sílica cristalina e que destes trabalhadores, cerca de cem mil, são empregados em funções de alto risco como jateamento de areia, perfuração de rochas e indústrias de fundição (OSHA, 2004).

Em 2002, o Instituto Nacional para Segurança e Saúde Ocupacional (NIOSH) publicou um relatório atualizado intitulado “Work-Related Lung Disease Surveillance Report”. Este relatório indicou que aproximadamente um terço de todos os portadores de silicose, entre 1990 e 1999, haviam sido empregado na área da construção civil e de indústrias de mineração.

1.3.3 Fisiopatologia

Embora a fisiopatologia da silicose ainda não tenha sido totalmente elucidada, acredita-se que a doença resulte de um ciclo de lesão celular, inflamação e fibrose. Essa proposta envolve a citotoxicidade direta da partícula de sílica sobre células residentes como macrófagos alveolares e células epiteliais do tipo II. A ativação desses dois tipos celulares resulta na produção e liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias. Como resultado ocorre a ativação e a migração de leucócitos para o local da lesão, que acarreta a intensificação da lesão devido à produção e liberação de espécies reativas de oxigênio no parênquima pulmonar (Fubini e col., 2003; Castranova, 2004).

Devido às propriedades de superfície, a sílica cristalina induz a ativação de macrófagos alveolares através de sua atuação em receptores do tipo “scavenger”, como MARCO (Hamilton e cols., 2006). A partícula de sílica ao ser fagocitada promove a ativação da cascata de sinalização envolvendo a estimulação da proteína quinase C (PKC) e subsequente fosforilação de MAPK, ERK-1 e ERK-2 e ativação do fator de transcrição AP-1. As espécies reativas de oxigênio, produzidas em resposta a fagocitose da partícula de sílica, também levam à estimulação de vias de sinalização para ativação de NF- κ B com consequente indução da síntese de TNF- α (Castranova, 2004). Além disso, a sílica estimula outros tipos celulares como células epiteliais e fibroblastos induzindo a ativação da via de sinalização do NF- κ B (Fubini e col., 2003; Huaux, 2007).

Recentemente, foi descrita a importante participação do inflamossoma NALP3 no desenvolvimento da silicose. O NALP3 constitui um receptor citoplasmático pertencente à família dos receptores NOD similar. Estes sofrem o processo de oligomerização quando ativados e se transformam no inflamossoma NALP3, que promove a ativação da caspase-1 e consequente clivagem de pró-IL-1 β e pró IL-18 a

IL-1 β e IL-18, respectivamente (Petrilli e cols., 2007). Os cristais de sílica, quando fagocitados, induzem dano ao lisossoma resultando na desestabilização da membrana, levando à conseqüente ativação do inflamossoma NALP3 (Cassel e cols., 2008; Hornung e cols., 2008).

A inflamação granulomatosa induzida pela sílica é caracterizada pelo acúmulo de macrófagos com partículas minerais nos nódulos. A resposta inflamatória é seguida por um processo fibrótico com proliferação de fibroblastos e acúmulo de matriz extracelular, incluindo colágeno intersticial e elastina insolúvel (Perez-Ramos e cols., 1999; Corbel e cols., 2002).

Os macrófagos alveolares exercem uma importante ação no desenvolvimento e progressão da silicose através da liberação de diversos produtos, tais como: enzimas e espécies reativas do oxigênio que promovem dano pulmonar; citocinas e quimiocinas capazes de ativar e recrutar células inflamatórias, como neutrófilos, monócitos e linfócitos; e fatores fibrogênicos, os quais induzem a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (Castranova, 2000; Rimal e cols., 2005; Huaux, 2007). No modelo experimental de silicose, os mecanismos que levam ao acúmulo de colágeno e à proliferação da matriz extracelular, ainda não estão totalmente esclarecidos. Algumas citocinas fibrogênicas têm importante ação em modelos de silicose e na doença em humanos. Foi demonstrado que o fator de necrose tumoral α (TNF- α) tem sua expressão aumentada em macrófagos alveolares na fibrose induzida por sílica (Gossart e cols., 1996), e que o anticorpo anti-TNF- α é capaz de prevenir o desenvolvimento da fibrose (Piguet e cols., 1990). O fator transformador de crescimento β (TGF- β) também tem sua expressão aumentada e associada com populações de células dispersas no granuloma, principalmente em macrófagos, fibroblastos e epitélio alveolar hiperplásico (Jagirdar e cols., 1996; Mariani e cols., 1996). Neutrófilos também se encontram associados aos macrófagos, e constituem a primeira etapa da fase aguda da inflamação. Além disso, exercem importante ação no processo fibrótico, uma vez que são capazes de liberar espécies ativas do oxigênio e metaloproteinases de matriz (MMPs), principalmente MMP-2 e MMP-9, que participam do remodelamento da matriz extracelular promovendo a sua degradação (Corbel e cols., 2003). As MMPs promovem a lesão de células endoteliais e pneumócitos tipo I e hipertrofia e hiperplasia de pneumócitos tipo II. Estas células juntamente com células epiteliais e macrófagos produzem citocinas fibrogênicas, como TGF- β , IL-13 e TNF- α , que promovem a ativação de fibroblastos resultando na produção de liberação de colágeno, e assim, contribuindo para a

formação de granulomas (Fubini e col., 2003; Hamilton e cols., 2008). A sílica cristalina também apresenta capacidade de ativar diretamente fibroblastos pulmonares, promovendo o aumento da proliferação dos mesmos, além de induzir a ativação dessas células, permitindo o aumento da produção de colágeno e citocinas através da ação de citocinas provenientes de macrófagos, como TNF- α e TGF- β (Arcangeli e cols., 2001).

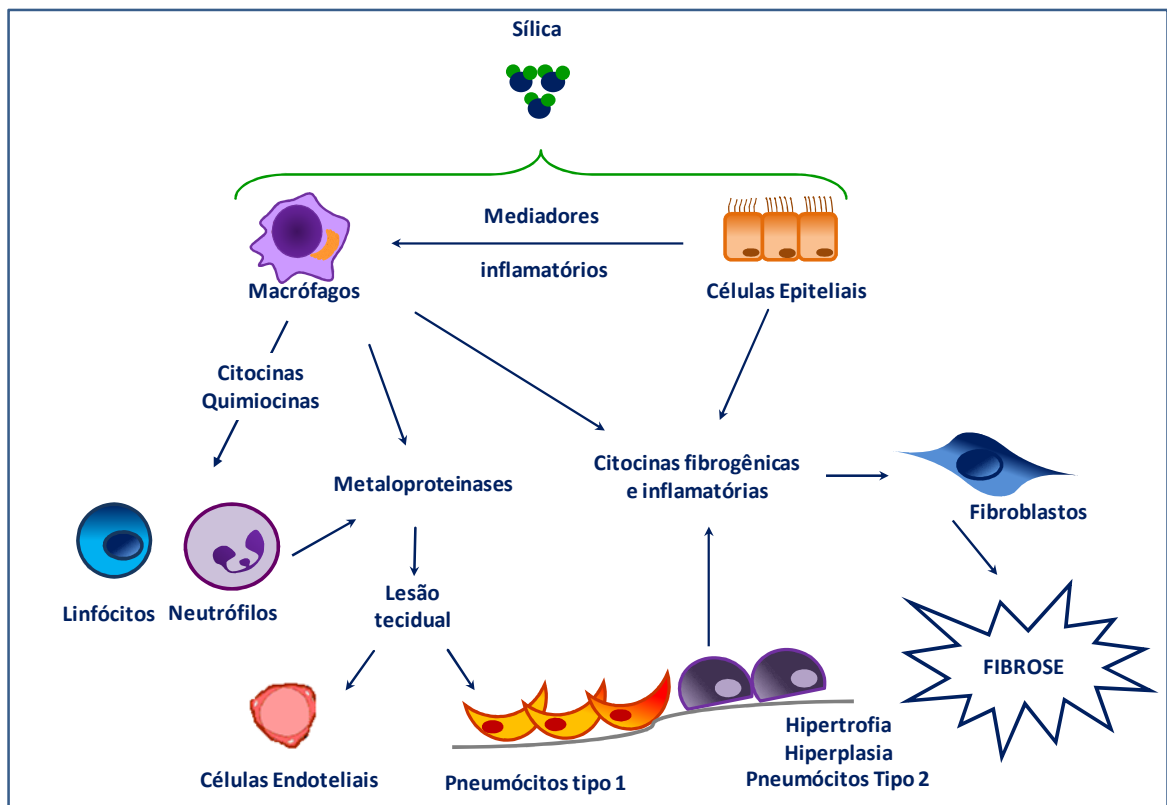


Figura 1.1: Esquema do processo inflamatório induzido pela inalação de partículas de sílica. Está representada a ativação de células residentes (células epiteliais e macrófagos alveolares) por partículas de sílica. Essas células ativadas liberam mediadores inflamatórios e fibrogênicos que induzem o recrutamento de leucócitos para o local da lesão e a ativação de fibroblastos pulmonares. A produção de metaloproteínas pelos leucócitos induz a hipertrofia e hiperplasia de pneumócitos dos tipos I e II, que por sua vez liberam citocinas fibrogênicas, resultando na indução da fibrose.

1.3.4 Classificação Clínica e Diagnóstico

A silicose é uma doença pulmonar que apresenta geralmente uma evolução lenta, progressiva e irreversível, levando a insuficiência respiratória (Godleski, 1994; Rimal e cols., 2005). De acordo com a concentração, o tempo de exposição e o tipo de partícula de sílica cristalina inalada, esta doença pode ser classificada sob três formas de manifestação clínica: silicose aguda, acelerada e crônica (Ding e cols., 2002). A silicose aguda ocorre geralmente após meses ou poucos anos de exposição à elevada quantidade de partículas de sílica, apresentando intensa dispnéia, astenia, perda de peso, hipoxemia, padrão infiltrativo com distribuição difusa em achados de radiografia e opacidade em vidro fosco em tomografia computadorizada. As alterações patológicas características são: lesão de pneumócitos tipo I, presença na luz alveolar de exsudato constituído por material lipoproteináceo corado por PAS (*Periodic Acid Schiff*), proliferação de pneumócito do tipo II, aumento da produção de fosfolipídios, além de inflamação intersticial com presença de fibrose não intensa (Terra Filho & Santos, 2006). A silicose acelerada, cujo período de manifestação ocorre entre as formas aguda e crônica, se manifesta geralmente após um período de exposição de cinco à dez anos, apresentando características clínicas semelhantes à forma crônica como a formação de granulomas, a presença de células mononucleares, fibroblastos e acúmulo de fibras de colágeno com orientação circular (Castranova, 2004). A forma crônica é a mais comum, geralmente ocorre após dez à quinze anos de exposição à baixas concentrações de sílica, sendo inicialmente assintomática e apresentando nos exames de imagem lesões nodulares, mais frequentes, nos lobos superiores. Com o progredir da doença, durante a forma crônica, pode ainda ocorrer a coalescência dos nódulos e a formação de grandes opacidades, geralmente bilaterais, recebendo a condição a denominação de fibrose maciça progressiva. (Ding e cols., 2002; Terra Filho & Santos, 2006).

O diagnóstico da silicose é baseado na história de exposição do trabalhador à sílica, nos achados radiológicos e de tomografia computadorizada compatíveis com a doença, juntamente com a exclusão de outros diagnósticos de doenças com sintomatologia semelhante como: tuberculose miliar, infecções fúngicas, sarcoidose, doença pulmonar idiopática, doença pulmonar intersticial e carcinomatosa (Leung, 2012).

Na silicose aguda, a tomografia computadorizada revela a presença de múltiplos nódulos, de tamanhos que variam de 2 a 5 mm podendo atingir até 10 mm, localizados predominantemente nas zonas pulmonares superiores e inferiores cuja maior concentração se encontra na região centro-lobular. Nas manifestações iniciais ou atípicas da silicose, os nódulos podem ser mal definidos e há a presença de opacidades centro-lobulares que correspondem patologicamente à fibrose irregular (Akira, 2002; Antao e cols., 2005). Ainda nesta fase da doença é frequente a linfadenopatia hilar e mediastinal e a calcificação dos linfonodos em aspecto de “casca de ovo”.

Na silicose crônica, o raios-X revela a expansão e confluência dos nódulos silicóticos gerando grandes opacidades simétricas, maiores que 1 cm de diâmetro, que geralmente ocorrem nos segmentos apicais e posteriores dos lobos. Ocasionalmente essas grandes opacidades tornam-se áreas necróticas e podem cavar, resultando em uma isquemia (Akira, 2002; Chong e cols., 2006).

1.3.5 Tratamento

Uma variedade de modalidades de tratamento visa reduzir a resposta inflamatória pulmonar causada pela exposição à sílica. Entretanto, até o momento não existe um tratamento eficaz para a silicose (Brown, 2009). Dentre as condutas terapêuticas podemos citar: a utilização de glicocorticóides e citrato de alumínio (Kennedy, 1956; Goldman e cols., 1992), antitussígenos, oxigenoterapia e procedimento de lavado broncoalveolar, a fim de remover as partículas de sílica (Banks e cols., 1993). Além disso, o transplante pulmonar também de ser lembrado como uma possível medida de sobrevivência em casos mais graves da evolução da doença (Terra Filho & Santos, 2006).

1.4 Remodelamento Tecidual e Fibroblastos

Desordens crônicas de órgãos internos são uma das maiores causas de morbidade, mortalidade e de demanda nos sistemas de saúde. Uma das principais características destas doenças é a destruição e o remodelamento da matriz

extracelular (ECM) com efeitos deletérios sobre a função tecidual (Laurent, 2008). O remodelamento da matriz extracelular é um processo dinâmico e essencial associado a respostas fisiológicas e patológicas, envolvendo tanto a degradação e eliminação de componentes de matriz, bem como a produção e deposição de componentes recém-sintetizados. O saldo destes processos resulta em preservação ou alteração da estrutura e das funções do tecido alvo (Liu e col., 1998). A reabsorção da ECM é mediada predominantemente por metaloproteinases (MMPs), que sofrem, por sua vez, regulação de sua atividade enzimática por ação de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), enquanto a geração da ECM é alcançada através da produção de colágeno (Mauch, 1998). Dados da literatura relatam que durante a desregulação do processo homeostático da ECM ocorre a formação de fibrose tecidual, que corresponde a um fenômeno de reparo excessivo, traduzido por alterações funcionais importantes (Keane e col., 2002). O aumento da geração de componentes de ECM está, desta forma, ligado a doenças fibróticas, tais como a silicose (Jimenez e cols., 1996).

Muitos tipos celulares estão envolvidos nos processos descritos acima, porém há uma predominância de células mesenquimais: fibroblastos, miofibroblastos e células musculares lisas, sendo estas responsáveis pelo “turnover” da ECM (Mcanulty e cols., 2002; 2007).

Os fibroblastos são células que se encontram normalmente no estroma de vários tecidos, e no caso do pulmão, estão presentes na adventícia de estruturas vasculares e nas vias respiratórias (Phan, 2007). Na condição de lesão tecidual, tal como ocorre na silicose, os fibroblastos proliferam, migram e produzem grandes quantidades de componentes de matriz extracelular que ajudam a reparar o tecido lesado (Adler e cols., 1989). Como características principais estas células apresentam: morfologia fusiforme, a expressão de vimentina, a ausência de desmina e de α -actina de músculo liso (Mcanulty, 2007). Ao serem ativadas por citocinas pró-fibróticas altamente expressas em lesões teciduais, principalmente pelo TGF- β e IL-13, os fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos, distinguindo-se dos primeiros pela presença de α -actina de músculo liso contendo fibras de estresse, pela protusão de filamentos de fibronectina, aumento da ED-fibronectina e de junções do tipo “gap” (Mattey e cols., 1997; Desmouliere e cols., 2003; Eyden, 2005). Como principais funções dos fibroblastos podemos destacar: a produção e secreção de colágenos (tipo I e/ou IV), proteoglicanos, fibronectina, tenascina e laminina para manutenção e homeostase da ECM do tecido ou órgão em que residem, produção

de metaloproteinases (MMPs), (TIMPs) e de diversas citocinas (Mcanulty e cols., 1991; 2007). Várias publicações relatam o fato que na fibrose pulmonar inúmeros fatores fibrogênicos e citocinas encontram-se em níveis elevados ou diminuídos, incluindo o TGF- β , TNF- α , IL-13, dentre outras. Altas concentrações destas citocinas são capazes de induzir a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e a sua proliferação (Mattey e cols., 1997; Uh e cols., 1998; Crystal e cols., 2002). Desta forma, podemos considerar os fibroblastos como células que desempenham um papel chave no desenvolvimento da fibrose pulmonar por habilitar a expressão de altos níveis de componentes de matriz e de citocinas fibrogênicas, e por contribuir para alterações mecânicas no tecido afetado (Phan, 2007).

1.5 Sistemas Tridimensionais de Cultivo Celular (cultura 3D)

Sistemas tradicionais de cultivo celular *in vitro* tem sido ao longo dos anos utilizados na área da biologia celular como ferramenta importante para analisar diferentes tipos celulares e delinear diversas funções celulares essenciais como migração, proliferação/diferenciação, apoptose, metabolismo de componentes de ECM e secreção de proteases, dentre outras. Entretanto, para estudar estes processos, as células obtidas através de linhagens celulares imortalizadas, de culturas primárias isoladas de espécimes cirúrgicos ou *post mortem* e de explantes de tecidos são geralmente cultivadas em monocamadas (cultura bidimensional ou 2D) em substratos artificiais, tais como plástico ou vidro (Elsdale e col., 1972; Lloyd & Robinson, 2007). Essa condição induz as células a se ajustarem a uma superfície rígida e plana onde o crescimento celular encontra-se limitado levando a modificações entre as interações celulares, a matriz extracelular e o complexo organizacional de integrinas e as moléculas do citoesqueleto, alterando sua morfologia e influenciando nas diversas funções celulares. Em razão destas observações, questiona-se até que ponto os sistemas de cultura 2D representam os processos que ocorrem em organismos vivos, uma vez que, o substrato autêntico para a maioria das células *in vivo* é a matriz extracelular, que possui uma estrutura tridimensional complexa e dinâmica na sua composição molecular e variável quanto a sua flexibilidade (Boudreau & Jones, 1999; Hay e Burridge, 2001; Walpita & Hay, 2002)

Desta maneira, nas últimas quatro décadas, sistemas tridimensionais de cultivo celular (cultura 3D) têm sido utilizados em pesquisas biomédicas com o objetivo de fornecer dados mais fidedignos sobre os mecanismos celulares e teciduais ocorridos *in vivo*. Os pioneiros nessa área foram os embriologistas J. Holtfreter e A. Moscona. Entre 1940 e 1950, conhecendo a tendência natural de muitos tipos celulares em formar agregados, os autores modularam as condições de cultivo, induzindo a redução da interação das células com o substrato, favorecendo as interações homotípicas célula-célula, criando assim, o sistema de cultivo 3D. Os agregados celulares foram denominados esferóides e, em 1971, a técnica foi adaptada por Surtherland R M e colaboradores para pesquisa contra o câncer. O principal objetivo destes cientistas era promover um microambiente *in vitro* adequado para o crescimento tumoral a ser aplicado em radiobiologia. Desde então, o espectro de estudos sobre esferóides vem aumentando rapidamente e expandindo-se para outras áreas da pesquisa biomédica e da biologia celular básica (Kunz-Schughart, 1999).

Atualmente, várias técnicas de cultivo tridimensional têm sido descritas enfatizando as suas vantagens e desvantagens individuais. Os principais métodos para obtenção de esferóides são:

i. Sistema de cultura rotativa

Neste sistema, as células são semeadas em agitadores giratórios que se movimentam continuamente, impedindo a adesão celular à superfície de cultivo (Schwarz, 1992). Essa técnica favorece a manutenção das melhores condições de suprimento de nutrientes durante um longo período e é a mais adequada para o cultivo em larga escala (Friedrich e col., 2009).

ii. Sistemas de cultura estacionária

- Em placas de 96 poços com fundo arredondado

Neste sistema, a superfície do fundo das placas é revestida com uma fina camada de substâncias não adesivas, naturais como o colágeno tipo I ou artificiais como a agarose ou o poli-hidróxietilmetacrilato (poli-HEMA), o que impede a aderência das células e favorece a formação do esferóide (Carlsson e cols., 1984).

Essa técnica permite a formação de um único e uniforme esferóide por poço, garantindo alta reprodutibilidade aos ensaios.

- Gota pendente ou suspensão em gota (“hanging drop”)

Neste modelo, as células são semeadas em gotas sobre placas de Petri que posteriormente são invertidas e mantidas em cultura. A tensão superficial faz com que a gota se mantenha suspensa e com que as células se agrupem na parte mais inferior da gota por gravidade, formando os esferóides. Essa metodologia resulta na formação de múltiplos esferóides de tamanhos variados, e, portanto, exige do experimentador uma seleção dos espécimes mais semelhantes para obtenção de um grupo mais homogêneo (Kelm e cols., 2003; Timmins e cols., 2005).

Estudos demonstram que em comparação aos métodos de culturas celulares tradicionais, em suspensão ou em monocamadas, reagregados celulares em sistemas tridimensionais são capazes de mimetizar os processos celulares ocorridos em organismos vivos como a adesão, migração, morfogênese, proliferação, diferenciação, apoptose e algumas respostas imunes (Pampaloni e cols., 2007).

Dados da literatura demonstram que esferóides formados a partir de células oriundas de gliomas humanos apresentam uma quantidade maior de proteoglicanos e fibronectina quando comparados à cultura destas mesmas células em sistema de monocamada (Glimelius e cols., 2008). Além disso, fibroblastos humanos obtidos a partir de cultura primária e cultivados em sistema tridimensional apresentam diferenças marcantes no comportamento celular referente ao processo de adesão e migração quando comparados aqueles cultivados em sistema bidimensional. A adesão celular inicial é aumentada em seis vezes por fibroblastos em cultura 3D e o processo de migração é marcadamente aumentado em extensão, devido tanto a velocidade como o tempo em que esse processo ocorre (Yamada e col., 2007).

Desta forma, devido aos diversos dados que demonstram as diferenças entre os modelos bidimensional e tridimensional, o modelo de cultura 3D vem sendo aplicado, com a perspectiva de resultados promissores, em diversas áreas como: na indústria biotecnológica para a produção de hormônios e enzimas sintéticas; no diagnóstico clínico para o câncer; na engenharia tecidual para regeneração e produção de tecidos viáveis; na triagem clínica de um grande grupo de candidatos a

novas drogas e para substituição de alguns modelos de ensaios em animais (Dutta e col., 2009).

Em conclusão, com base nas observações descritas acima fica clara a relevância dos fibroblastos no contexto de doenças inflamatórias de caráter fibrótico e da potencialidade do sistema de cultura de células em 3D (esferóides) para estudos envolvendo este tipo celular na condição da doença. Não há, até o presente momento, relatos na literatura acerca de estudos envolvendo o sistema de cultura de células em 3D relacionados à silicose.

A busca pela identificação de compostos anti-fibróticos é imperativa e sistemas *in vitro* que reproduzam as condições da doença *in vivo* são de fundamental importância.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer um sistema de cultura em 3D de fibroblastos provenientes do pulmão de camundongos normais e silicóticos visando a análise comparativa quanto aos aspectos morfológicos e funcionais de ambas as populações celulares.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar aspectos morfológicos de fibroblastos de camundongos controles e silicóticos contidos em esferóides *in vitro*, na condição de estimulação ou não com IL-13, utilizando análise por microscopia de luz invertida e microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a resposta de proliferação celular de fibroblastos de camundongos controles e silicóticos, contidos em esferóides *in vitro*, na condição de estimulação ou não com IL-13, utilizando-se sistema de incorporação de timidina tritiada;
- Avaliar a resposta de ativação de fibroblastos de camundongos controles e silicóticos contidos em esferóides *in vitro*, na condição de estimulação ou não com IL-13, avaliando a secreção de colágeno e de fatores pró-fibróticos como TGF- β e MCP-1.

3 Materiais e Métodos

Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA), da Fundação Oswaldo Cruz, através da licença (L-034/09) e sob as regras internacionais de cuidados na manipulação de animais.

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da cepa Swiss-Webster (18 – 20 g) provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura entre 25 e 28 °C, ciclo de luz definido em 12 h de claro e 12 h de escuro e livre acesso à ração.

3.2 Indução da Silicose

Os camundongos foram submetidos à anestesia mediante inalação com halotano (0,5% - Tanohalo; Cristália) até sedação completa. Em seguida, foram instilados por via intranasal com 10 mg de sílica (SiO₂; tamanho da partícula: 0,5 - 10 µm; Sigma) diluídos em 50 µl de salina estéril (grupo experimental/silicótico) ou com apenas igual volume de salina estéril (grupo controle/normal). (n=7 animais por grupo, representativo de 15 experimentos).

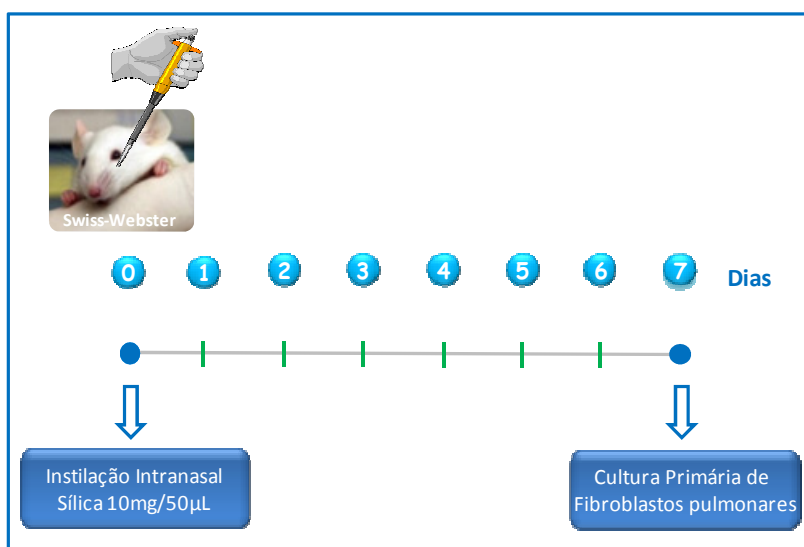


Figura 3.1: Esquema de indução da silicose

3.3 Análise Histológica

Após 7 dias da instilação intranasal, com salina estéril ou sílica, a análise histopatológica foi realizada. Para isto camundongos normais e silicóticos foram eutanasiados com tiopental de sódico (500 mg/kg, i.p) (n=7 animais por grupo, representativo de 3 experimentos). A perfusão foi realizada por meio de uma cânula intracardíaca com solução de salina e EDTA (10 mM) para a retirada do sangue. O pulmão esquerdo foi perfundido com uma solução de paraformaldeído tamponado a 4% e fixado em formol tamponado a 10% (24 h), desidratado em soluções crescentes de etanol, clarificado em xileno e incluído em parafina. Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram realizados utilizando-se blocos de parafina contendo fragmentos do tecido pulmonar, e submetidos à coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) para análise da estrutura do tecido pulmonar e realização de imunohistoquímica. Os cortes foram observados em microscópio de luz (Olympus U-TV1X) acoplado a uma câmera (Olympus Q Color 3 – 0044C-194) e a captura da imagem feita mediante o uso de um “software” de análise (Q Capture).

3.4 Imunohistoquímica

Para verificar a expressão de alfa-actina de músculo liso (α -SMA), proteína indicadora de miofibroblastos, utilizamos a técnica de imunohistoquímica. Após a desparafinização, os cortes foram hidratados com TBS (Tris/HCl 0,05 M + NaCl 0,5 M, pH 7,6), bloqueados com H₂O₂ a 3% em metanol por 15 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes com TBS e bloqueadas com Tris-HCl + BSA 5% por 1 h. O anticorpo primário anti- α -SMA (A2547; Sigma) foi diluído em solução de Tris-HCl + BSA 1% em duas concentrações: 1:100 e 1:400. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário por 12 h a 4 °C. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes com TBS. O anticorpo secundário, anti-IgG conjugado com HRP (anti-IgG de camundongo - HAF007 R&D para α -SMA), foi diluído em solução de Tris-HCl, na concentração de 1:80 e incubado por 2 h. A revelação foi feita com 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) por aproximadamente 15 min. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada, contra-coradas com hematoxilina de Mayer e montadas em meio aquoso contendo gelatina.

3.5 Cultura Primária de Fibroblastos Pulmonares Obtidos de Camundongos Normais e Silicóticos

Ao sétimo dia após a instilação com salina estéril ou sílica, os animais normais e silicóticos (n=7 animais por grupo, representativo de 12 experimentos) foram eutanasiados em câmara de CO₂ e seus pulmões perfundidos com solução de PBS (1x) , retirados, adicionados a uma solução de digestão enzimática contendo collagenase tipo I (1 mg/ml; GIBCO) e cortados em pequenos fragmentos. A solução com os fragmentos foi então transferida para um frasco estéril e mantida sob agitação por 1 h a 37 °C. Em seguida, um volume extra de PBS foi adicionado à suspensão celular e o sobrenadante livre do resíduo de tecido retirado e armazenado a -4 °C. Ao precipitado foi adicionado um novo volume de solução de collagenase tipo I e repetido o ciclo de agitação por 1 h. O material recolhido foi submetido à passagem em uma fina malha, juntamente com o sobrenadante armazenado do ciclo de agitação anterior, e centrifugado a 433 xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspensão e submetido ao gradiente de concentração de Percoll (60%; GE Healthcare), para retirada das partículas de sílica, sob centrifugação de 433 xg por 25 min a 25 °C. A banda localizada no topo do gradiente (livre de partículas de sílica) foi recolhida e centrifugada novamente com meio Eagle modificado por Dulbeco (DMEM; GIBCO) + 10% de Soro Fetal Bovino (SFB; Cultilab) a 433 xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspensão em DMEM + 10% SFB, sendo as células isoladas adicionadas as garrafas de 75 cm² acrescidas de meio DMEM + 10% SFB, penicilina (1x10⁶ U/mL) e estreptomicina (0,2 g/mL). A cada 7 dias, após atingirem o estado de confluência, as células foram submetidas a um processo de tripsinização mediante adição de uma solução de PBS contendo Tripsina (1,25 g/L; GIBCO) e EDTA (0,2 g/L; Sigma) e em seguida transferidas para novas garrafas. As células utilizadas nos experimentos foram obtidas entre a 3^a e a 4^a passagens.

3.6 Contagem e Plaqueamento de Células em Sistema de Agarose

Após a 3ª passagem, foi realizada nova etapa de tripsinização e uma amostra da suspensão celular foi diluída em meio DMEM sem soro (1:10) e a contagem celular realizada em câmara de Neubauer utilizando-se microscópio de luz invertido (Olympus Ix70).

Para realização do cultivo celular foram usadas placas de 96 poços, com fundo em “U”, previamente revestidas com agarose (1%; Seakem® LE) e colocadas invertidas durante 1 h em estufa de CO₂ para eliminação de qualquer tipo de excesso de agarose no fundo das placas. Posteriormente, os poços correspondentes às fileiras mais externas (verticais e horizontais) foram preenchidos com água destilada estéril, com o objetivo de criar uma câmara úmida, e as células foram então plaqueadas nos poços revestidos com agarose numa densidade de $1,25 \times 10^4$ na presença ou ausência da citocina IL-13 (40 ng/mL; R&D) e mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C durante os tempos de análise (1 – 4, 1 – 8 ou 3 dias).

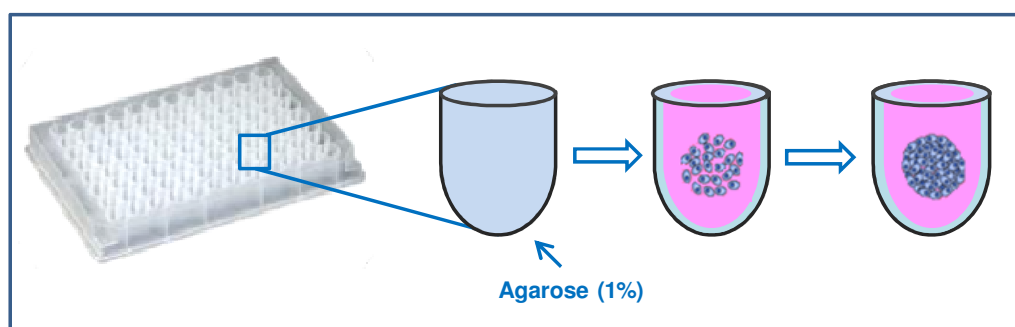


Figura 3.2: Esquema de plaqueamento de células em sistema de agarose (1%).

3.7 Obtenção de Imagens e Aferição do Diâmetro dos Esferóides

Os esféricos de fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais e silicóticos, na ausência ou na presença de IL-13 (40 ng/mL) (n= 9 por grupo, representativo de 3 experimentos) foram fotografados diariamente quando ainda nas placas de cultivo correspondentes à cinética de análise (1 - 4 e 1 -8). Os registros foram feitos através de um sistema de câmera acoplada ao microscópio de luz invertido (Olympus IX70) e as imagens obtidas processadas pelo programa Image-Pro Plus para aferição do diâmetro médio (μm).

3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

No dia 3 de cultivo, esferóides de fibroblastos pulmonares de animais normais e silicóticos, na ausência ou na presença de IL-13 (40 ng/mL) (n = 60 por grupo, representativo de 3 experimentos) foram recolhidos, lavados 3 vezes com PBS (1x) por 10 min e fixados com 2,5% glutaraldeído (GA) diluído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio (CACO) contendo 3,5% de sacarose e 2,5 mM de cloreto de cálcio (CaCl₂ - pH 7.2) por 1 h a 4 °C. Após a lavagem, no mesmo tampão, os esferóides foram pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄) diluído em 0,1 M de tampão CACO contendo 3,5% de sacarose e 2,5 mM de cloreto de cálcio (CaCl₂ - pH 7.2), por 30 min em temperatura ambiente. A seguir, foram desidratados em bateria crescente de acetona e a secagem das amostras foi realizada pelo método do ponto crítico com CO₂ (CPD 030, Balzers, Switzerland). Posteriormente, os esferóides foram delicadamente colocados em suportes de alumínio cobertos por uma fita dupla de carbono e revestidos com uma camada de ouro na espessura de 20 nm. As amostras foram analisadas ao microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6390LV com aceleração de voltagem de 15 kV da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz (IOC - Fiocruz).

3.9 Ensaio de Proliferação Celular (Timidina-³H)

Para análise da taxa de proliferação de fibroblastos pulmonares contidos nos esferóides foi utilizada a técnica de incorporação de timidina-³H. Para tanto, a cada dia correspondente da análise da cinética de proliferação (1 - 4 ou 1 - 8 dias) foram adicionados 0,5 µCi de timidina-³H (Metil-³H-Timidina; Amershan) em cada poço. Após 4 h de incubação, os esferóides foram recolhidos e lavados com PBS para retirada do excesso de timidina não incorporada. Na sequência, 100 µL de Triton X-100 (10%; Sigma) e 900 µL de tripsina (1,25 g/L; GIBCO) foram adicionados com o objetivo de dissociar os esferóides e lisar as células para expor o núcleo à leitura. Após 30 min, o material lisado foi transferido para “vials” aos quais haviam sido adicionados 3 mL de líquido de cintilação e a radioatividade quantificada em contador beta (Beckman LS6500 Multi-Purpose Scintillation Counter). Para este ensaio foi utilizado um “pool” de 6 esferóides por grupo, em triplicata, representativo de 3 experimentos.

3.10 Quantificação de Citocinas e Quimiocinas (ELISA)

Para quantificação de citocinas como TGF- β e de quimiocinas como MCP-1 utilizamos a técnica de ELISA (Kit R&D). No dia 3 de cultivo, o sobrenadante dos esferóides foi recolhido e adicionado a placas de 96 poços, as quais foram adicionados 100 μ L/poço do anticorpo de captura diluído em PBS durante 12 h a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes (200 μ L/poço) com tampão 1 (Timerosal 0,02%, KPO_4 0,01 M e Tween 20 0,005%). Após esta etapa, para bloqueio de sítios inespecíficos, a placa foi preenchida (250 μ L/poço) com PBS/BSA 1% por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com tampão 1 (200 μ L/poço). As amostras e os padrões foram diluídos em “Assay Buffer” (Timerosal 0,05%, BSA 0,1% e PBS) e adicionados aos poços (100 μ L/poço). Após o período de incubação “overnight” à 4 °C, procedeu-se a nova sequência de 3 lavagens (200 μ L/poço) com tampão 2 (NaCl 1 mM, Na_3PO_4 0,1 mM, KCl 0,027 mM, timerosal 0,02%, Tween 20 0,005%). A seguir foi acrescentado (100 μ L/poço) o anticorpo detector biotilado (50 μ g/mL), sendo mantida a incubação por 1 h em temperatura ambiente. Os poços foram lavados com o tampão 2 (200 μ L/poço), seguindo-se a etapa de incubação por 1 h em temperatura ambiente com a mistura “neutravidina horseradish peroxidase” (HRP) diluído em “Assay-Buffer” (100 μ L/poço). Após a última lavagem com tampão 2 (200 μ L/poço), foi feita a adição do substrato (100 μ L/poço; K-Blue®) para o desenvolvimento da reação colorimétrica (aproximadamente 5 à 30 min.), que foi interrompida após o acréscimo de 100 μ L/poço de H_2SO_4 (0,19 M). A análise espectrofotométrica foi realizada em leitora de placa no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados obtidos foram expressos em quantidade de mediador (pg) por mililitro (mL). Para este ensaio foi utilizado o sobrenadante de 10 esferóides por grupo, em quadruplicata, representativo de 3 experimentos.

3.11 Quantificação de Colágeno (SIRCOL)

Para a análise quantitativa do colágeno no sobrenadante dos esferóides foi utilizada a técnica de Sircol (Kit Biocolor, UK). O sobrenadante foi recolhido no dia 3 de cultivo, centrifugado a 15000 xg por 1 h a 4 °C. Em seguida, uma alíquota foi retirada e a esta adicionado, o reagente Sirius-Red. Após 30 min, o material foi novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e ao “pellet” foi adicionado o

reagente Alkalín. As amostras foram então colocadas em placas de 96 poços e a absorbância determinada no comprimento de onda de 590 nm, sendo o resultado expresso como μg de colágeno/mL. Para este ensaio foi utilizado o sobrenadante de 10 esferóides por grupo, em quadruplicata, representativo de 3 experimentos.

3.12 Análise Estatística

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

4 Resultados

A silicose é reconhecidamente uma doença de caráter inflamatório restritivo. Tomando por base um modelo de indução de silicose não invasivo, verificamos através da análise morfológica do tecido pulmonar que o pulmão dos animais controles (instilados com salina) apresentou parênquima com arquitetura preservada e íntegra, septos alveolares bem definidos e ausência de espessamento ou qualquer indício de processo inflamatório em curso (Figura 4.1 A). Na condição da silicose experimental, os animais mostraram clara alteração com a presença de infiltrado inflamatório acompanhado da formação de vários granulomas dispersos no parênquima pulmonar. Estes apresentaram bordo definido e aspecto mais frouxo onde pode-se visualizar a presença de infiltrado celular e deposição de matriz extracelular, fenômeno comumente observado na fase aguda da silicose (Figura 4.1 B).

Durante o processo fibrogênico associado ao quadro inflamatório desencadeado pelas partículas de sílica há a participação de diferentes tipos celulares, com destaque para os fibroblastos, que na condição de ativação passam a expressar a proteína α -actina de músculo liso (α -SMA), recebendo a denominação de miofibroblastos. A análise da presença deste antígeno por imunohistoquímica mostrou que não houve detecção de marcação no tecido pulmonar dos animais controles (Figura 4.1 C), enquanto uma marcação intensa foi evidenciada no caso dos animais silicóticos, principalmente nas áreas de formação de granuloma e regiões adjacentes (Figura 4.1 D).

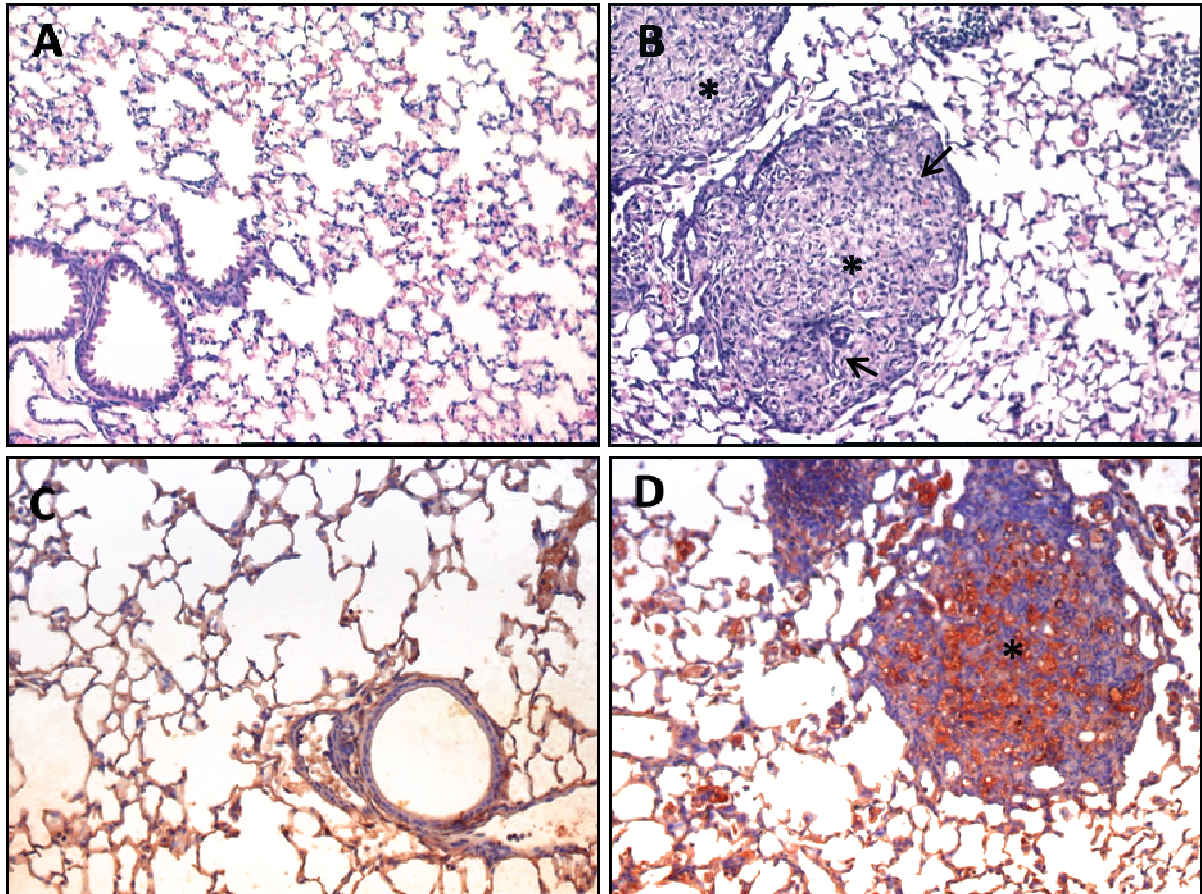


Figura 4.1: Imagens representativas do pulmão de camundongos instilados com salina e sílica (10 mg). (A, C) controles (instilados com salina) e (B, D) silicóticos (instilados com sílica – 10mg). Painéis superiores coloração com hematoxilina e eosina (HE) e painéis inferiores imunohistoquímica para α -SMA. As imagens foram capturadas e analisadas em microscópio de luz (aumento de 200 x) * indica granuloma e a \uparrow o infiltrado celular.

4.1 Avaliação Morfológica e Morfométrica de Esferóides Contendo Fibroblastos Pulmonares Obtidos de Camundongos Normais e Silicóticos

4.1.1 Microscopia de Luz Invertida

Para o estabelecimento de um sistema de cultura de fibroblastos pulmonares em sistema 3D, utilizamos inicialmente células provenientes do pulmão de animais normais. O cultivo dos fibroblastos foi possível prevenindo-se a adesão das células à superfície da placa, mediante revestimento prévio com agarose. Esta substância constitui uma matriz amorfa e não aderente que atua para favorecer as interações homotípicas entre célula-célula, levando à formação de agregados celulares denominados esferóides.

Inicialmente avaliamos a cinética de formação dos esferóides, tendo como condição experimental a presença ou não da citocina pró-fibrótica IL-13 adicionada no tempo inicial da cultura. O intervalo de tempo escolhido para análise variou de 1 a 4 dias de cultura. Como primeira avaliação, focamos nos aspectos morfológicos gerais, através do sistema de microscopia de luz invertida, seguindo-se as etapas de captura das imagens e análise. Verificamos que no primeiro dia de análise, os esferóides contendo fibroblastos de camundongos normais mediam cerca de 120 μm de diâmetro com aspecto frouxo e pouca definição de bordos (Figura 4.2 A). Nos dias subsequentes, foi observada uma maior compactação das células e um melhor delineamento do contorno dos esferóides, fenômeno que se intensificou com o passar do tempo (Figura 4.2 B, C e D). Na condição de estimulação com IL-13 (40 ng/mL), verificamos um comportamento similar dos esferóides nos vários tempos analisados (Figura 4. 2 E – H). O diâmetro desses esferóides mostrou-se sempre maior quando comparado ao daqueles incubados apenas com meio. Visando uma análise quantitativa deste processo, foi realizada a aferição do diâmetro médio dos esferóides utilizando-se como ferramenta o sistema de análise de imagem e o programa Image-Pro Plus. Os esferóides de ambos os grupos, normal não estimulado e normal estimulado com IL-13, apresentaram diâmetro médio maior nos tempos iniciais de cultura e redução significativa nos tempos subsequentes da análise (Figura 4.3). Sendo verificado no caso da estimulação dos esferóides com IL-13 diâmetro sempre superior àquele dos incubados com meio (Figura 4.3).

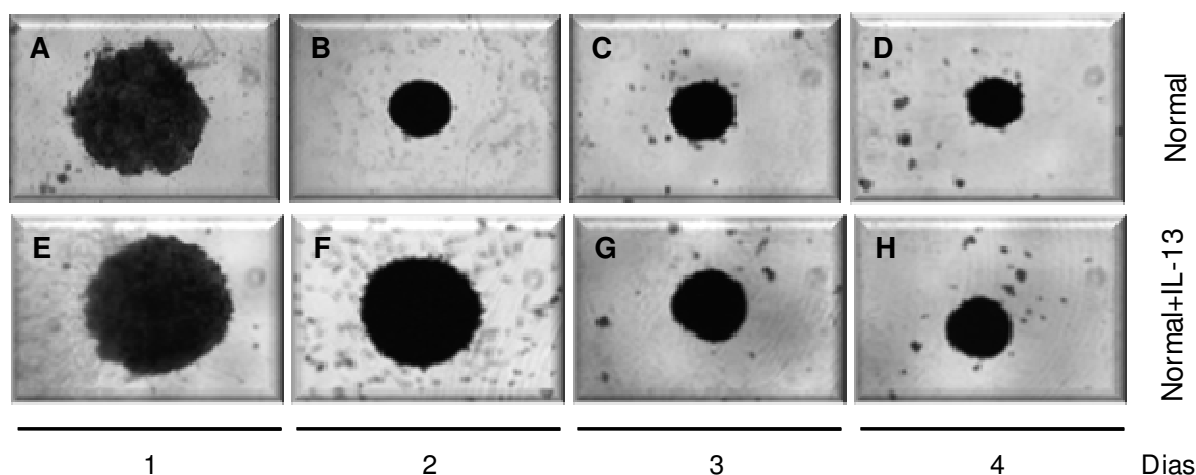


Figura 4.2: Imagens representativas de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais. As análises foram realizadas no período de 1 - 4 dias de cultivo de esferóides normais (A-D) e os estimulados com IL-13 (40 ng/mL) (E-H) *in vitro*, através de microscópio de luz invertida (Aumento 4x).

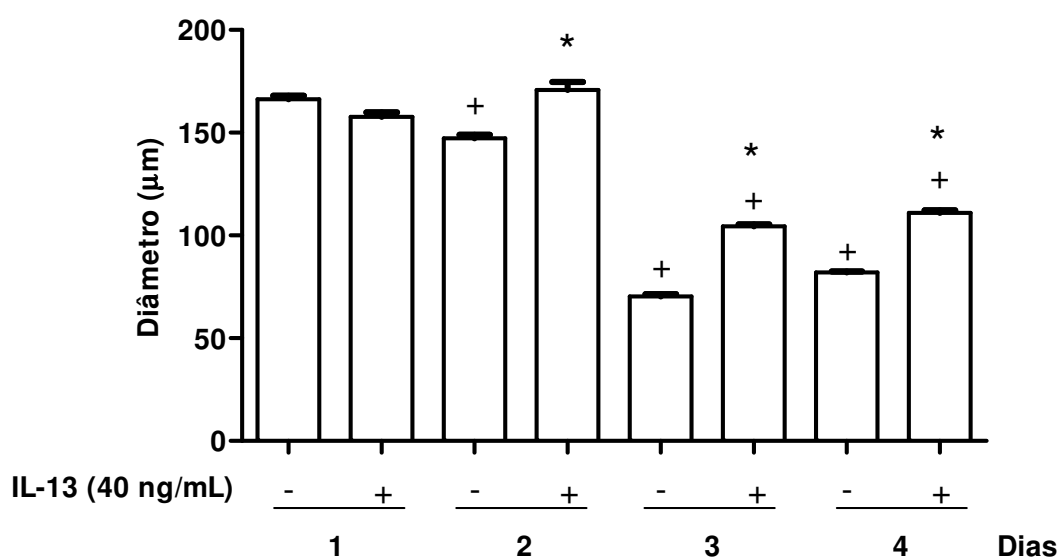


Figura 4.3: Avaliação do diâmetro médio de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais. As análises foram realizadas no período de 1 - 4 dias de cultivo de esferóides não-estimulados (-) e os estimulados (+) com IL-13 (40 ng/mL) *in vitro*, através de microscópio de luz invertida (Aumento 4x). As colunas representam o diâmetro médio \pm EPM (n=9 de esferóides). +p < 0,05 comparado aos respectivos grupos do dia 1; *p < 0,05 comparado aos respectivos grupos estimulados com meio.

Alguns autores associam o processo de redução progressiva do tamanho/diâmetro dos esferóides ao processo de morte celular (Vaheiri, 2009). Desta forma, realizamos um ensaio de cinética de formação dos esferóides por um tempo mais estendido (8 dias), sob a re-estimulação com a mesma concentração de IL-13 a partir do dia 4 de cultivo. Como pode ser observado na Figura 4.4, confirmando dados anteriores, vimos que os esferóides com células normais não estimuladas (Figura 4.4 A - D) e de esferóides com células estimuladas com IL-13 (Figura 4.4 E - H) mostraram comportamento de redução progressiva de tamanho ao longo do tempo. Uma nítida estabilização do processo foi notada após o dia 5 de cultivo, tanto com os esferóides de células não estimuladas (Figura 4.4 I - M) como com os de células estimuladas com IL-13 (Figura 4.4 N - Q). A re-estimulação com IL-13 revelou a capacidade dos esferóides em aumentar de tamanho, muito embora os de células normais que já haviam recebido um estímulo anterior de IL-13 mostraram-se sempre mais responsivos (Figura 4.4 N - Q) em comparação aos controles (Figura 4.4 E - M). A aferição do diâmetro reforçou nossas observações prévias (Figura 4.5).

Na etapa seguinte, foi realizada a avaliação comparativa da resposta de esferóides contendo fibroblastos de animais silicóticos e normais, utilizando-se condição experimental similar de ausência ou presença de IL-13 (40 ng/mL). O protocolo experimental de análise entre os dias 1 - 4 mostrou que os esferóides silicóticos apresentaram uma cinética de formação similar àquela verificada no caso dos esferóides normais (Figura 4.6 A - D), porém com tamanho maior (Figura 4.6 E - H). Na presença da estimulação com IL-13 (40 ng/mL), verificou-se que ambas as populações de esferóides apresentaram tamanho maior em comparação aos respectivos controles (incubados com meio), sendo que os silicóticos (Figura 4.6 N - Q) apresentaram resposta claramente exacerbada em relação àquela dos controles (Figura 4.6 I - M).

A análise quantitativa do diâmetro médio confirmou nossos achados prévios, indicando que o grupo dos esferóides silicóticos, na presença ou na ausência de IL-13, apresentaram tamanho sempre superior àquela dos normais (Figura 4.7).

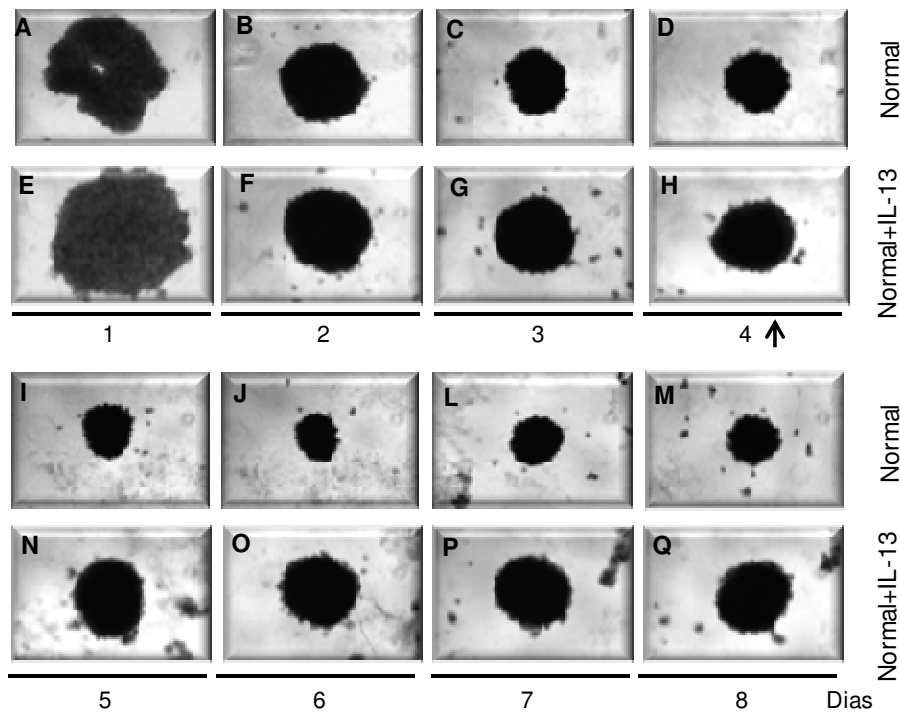


Figura 4.4: Imagens representativas de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais. As análises foram realizadas no período de 1 - 8 dias após a estimulação com IL-13 (40 ng/mL) *in vitro*, através de microscópio de luz invertida (Aumento 4x). A ↑ indica re-estimulação dos esferóides com IL-13 (40ng/mL).

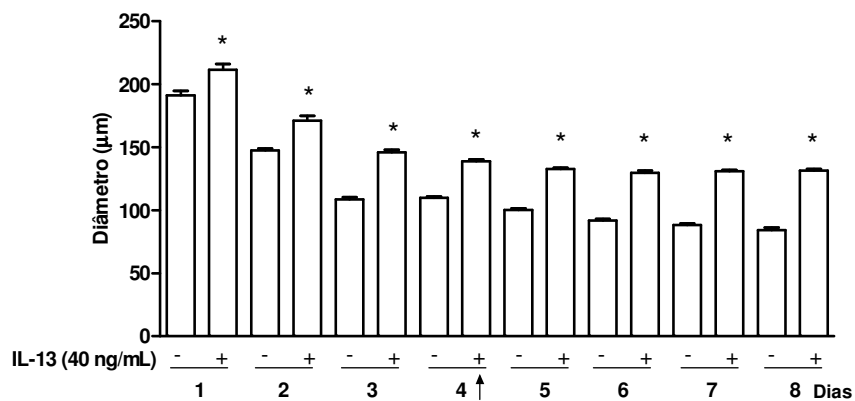


Figura 4.5: Avaliação do diâmetro médio de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais. As análises foram realizadas no período de 1 – 8 dias após a estimulação com IL-13 (40 ng/mL) *in vitro*, através de microscópio de luz invertida (Aumento 4x). As colunas representam o diâmetro médio \pm EPM (n=9). *p < 0,05 comparado aos respectivos grupos não estimulados. A ↑ indica a re-estimulação com IL-13 (40ng/mL).

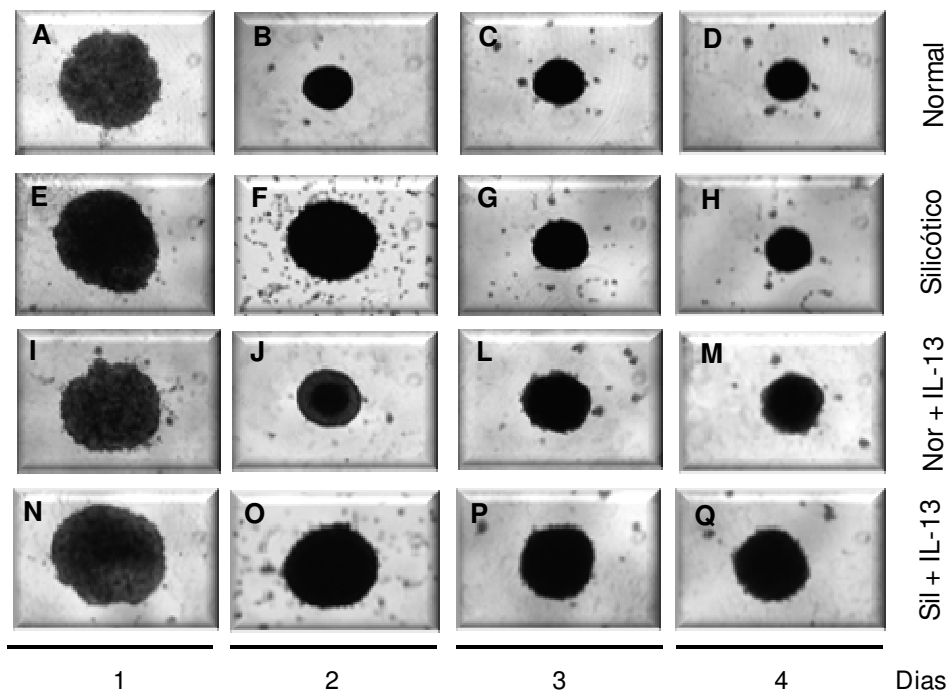


Figura 4.6: Imagens representativas de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais e silicóticos. As análises foram realizadas no período de 1 - 4 dias após a estimulação com IL-13 (40 ng/mL) *in vitro*, através de microscópio de luz invertida (Aumento 4x).

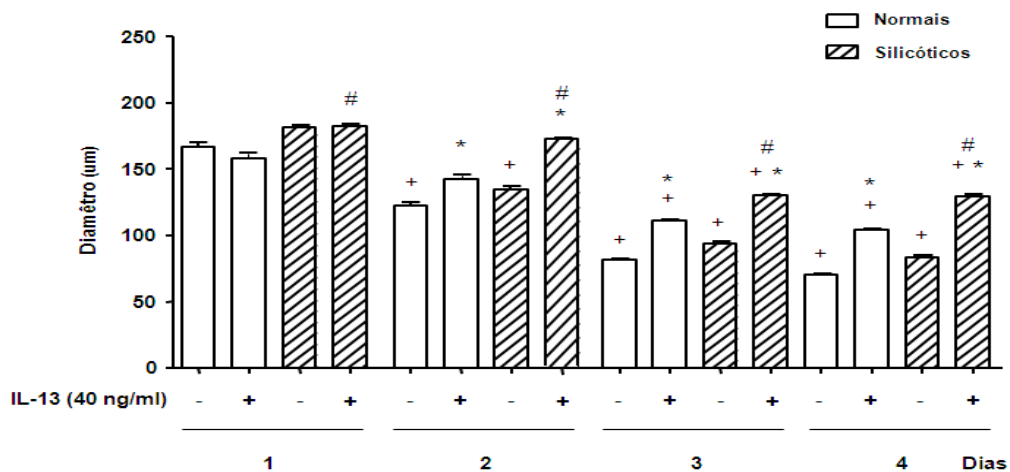


Figura 4.7: Avaliação do diâmetro médio de esferóides contendo fibroblastos pulmonares de camundongos normais e silicóticos. As análises foram realizadas no período de 1 – 4 dias após a estimulação com IL-13 (40 ng/mL) *in vitro*, através de microscópio de luz invertida (Aumento 4x). As colunas representam o diâmetro médio de esferóides \pm EPM (n=9). +p < 0,05 comparado aos respectivos grupos do dia 1; *p < 0,05 comparado aos respectivos grupos controles não estimulados; # comparado ao grupos controles estimulados com IL-13.

4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização morfológica ultraestrutural dos esferóides de fibroblastos pulmonares de animais normais e silicóticos foi analisada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Conforme ilustrado na Figura 4.8 A e B, os esferóides constituídos por células isoladas de animais normais, incubados apenas em meio de cultura por 3 dias, apresentaram as seguintes características morfológicas: aspecto geral predominantemente arredondado ou helicoidal, contendo algumas células arredondadas aderidas a sua superfície em quantidade variável. Quando os esferóides foram observados em detalhe, através de imagens geradas em grandes aumentos, foi verificado que a maioria das células apresentava morfologia fusiforme, bem individualizadas que estabelecem contato estreito entre suas membranas, com pouco material no espaço intercelular e com superfície ligeiramente rugosa (Figura 4.8 A'). Além disso, a organização celular destes esferóides mostra que os contatos das células arredondadas com os fibroblastos de morfologia fusiforme ou estrelada, que constituem o próprio esferoide, e os contatos entre essas células são mantidos através de microfilopódios (Figura 4.8 A')..

Esferóides obtidos na condição de estimulação com a citocina IL-13 (40ng/mL) apresentaram uma superfície mais homogênea e lisa em função do material presente entre as células (Figura 4.9 A e A'). Raras células arredondadas aderidas à sua superfície são observadas quando comparados aos do grupo controle (Figura 4.9 A e B). A análise em maior aumento revelou que o esferóide é constituído por células com aspecto fusiforme a estrelado (Figura 4.9 A' e B') e com pontos de adesão entre as células sendo realizado através de expansões da membrana plasmática (Figura 4.9 A') ou microfilopódios longos (Figura 4.9 B') permitindo assim, a manutenção do contato célula-célula.

A análise ultraestrutural de esferóides de células provenientes de animais silicóticos, incubados apenas com meio de cultura após 3 dias de cultivo, mostrou que estes apresentaram uma superfície bastante compacta e muito homogênea (Figura 4.10 A e B). Os esferóides, neste caso, continham poucas células arredondadas aderidas a sua superfície, porém foram observadas estruturas de tamanhos e formas variadas em contato com a sua superfície (Figura 4.10 A e B). A Figura 4.10 B' indica que algumas dessas estruturas são debris celulares. Além disso, a observação da superfície dos esferóides em grande aumento revelou a

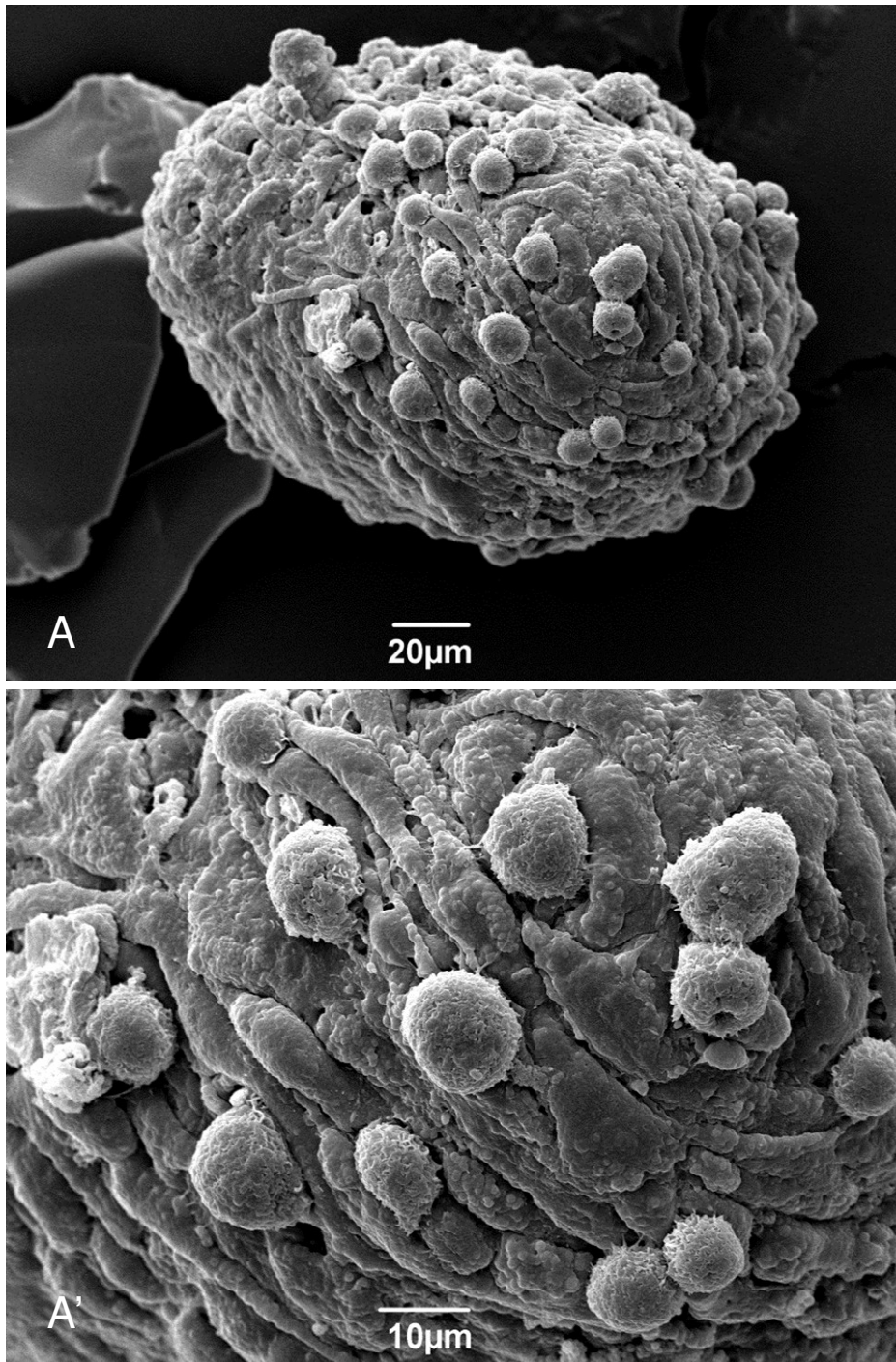


Figura 4.8 (A, A'): Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais incubados com meio (dia 3 de cultivo).

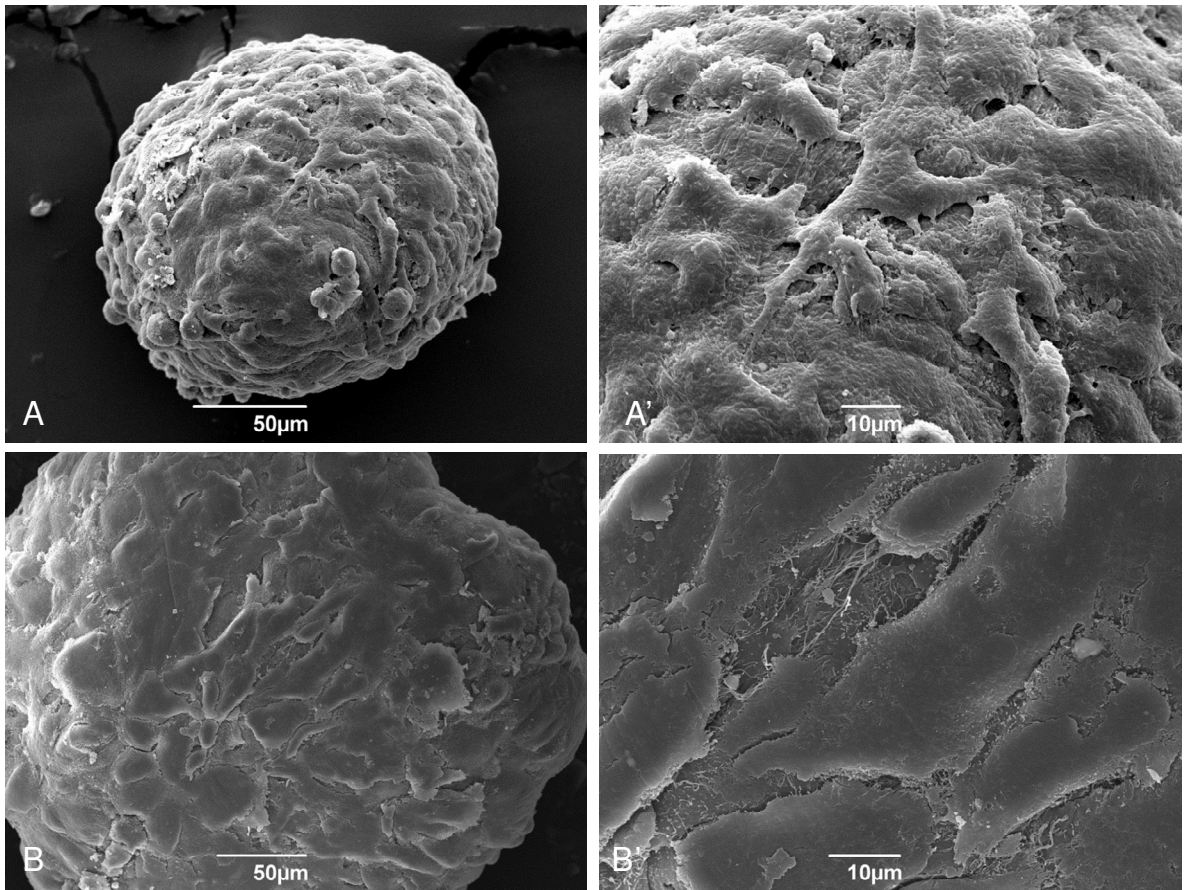


Figura 4.9 (A, A', B, B'): Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais estimulados com IL-13 (40 ng/mL) (dia 3 de cultivo).

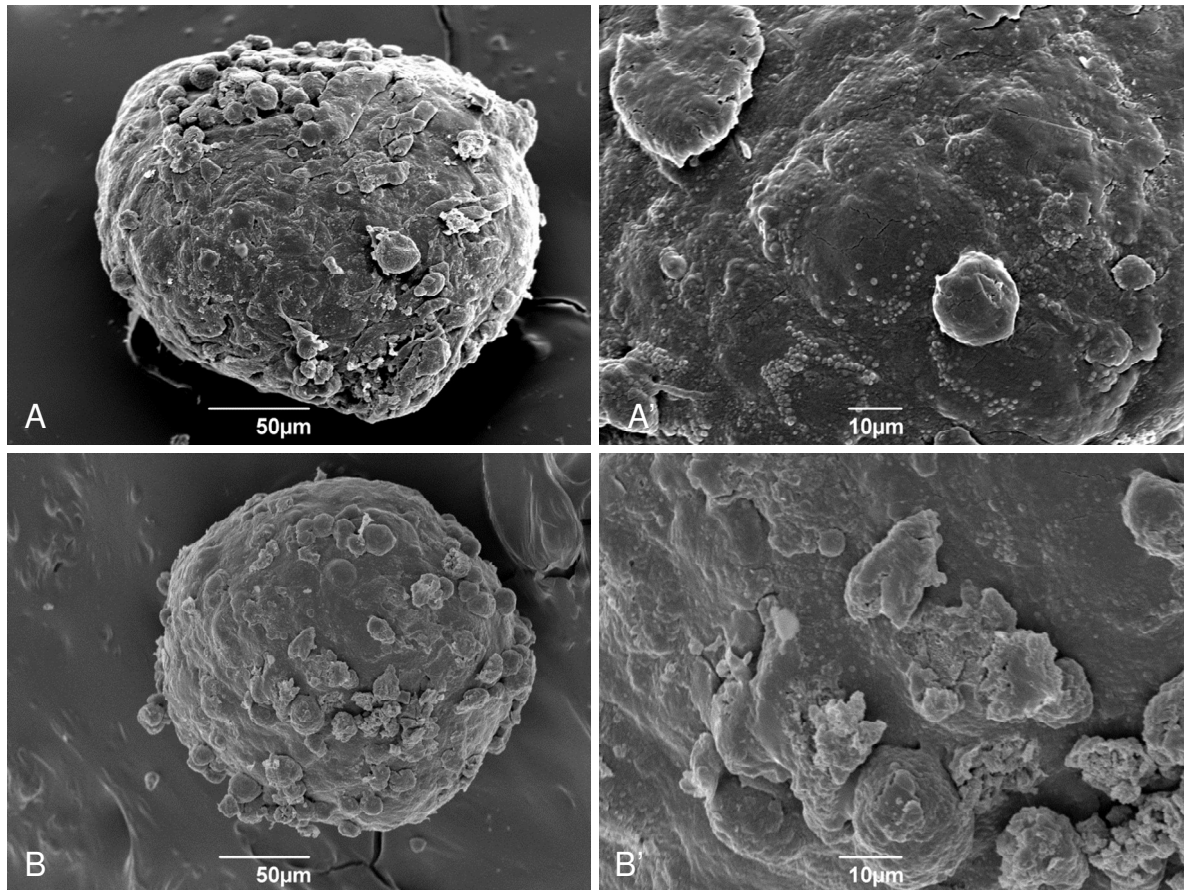


Figura 4.10 (A, A', B, B'): Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos silicóticos incubados com meio (dia 3 de cultivo).

presença de microgranulosidades de tamanho não homogêneo, distribuídas sob a forma de ilhotas, com maior concentração de grânulos na sua periferia (Figuras 4.10 A' e B').

A formação de esferóides a partir de fibroblastos obtidos dos animais silicóticos estimulados com IL-13 analisados por MEV mostrou a manutenção da organização celular similar àquela verificada no caso dos esferóides de células normais estimulados com IL-13. A diferença ultraestrutural entre esses grupos foi o aspecto morfológico dos esferóides de animais silicóticos estimulados com IL-13 que adquiriram forma mais arredondada e mais compacta, conferindo um aspecto liso a superfície desses esferóides e ainda, ausência de células arredondadas aderidas à sua superfície (Figuras 4.11 A e B). Em detalhe pode ser observada a presença de microgranulações, porém com distribuição aleatória sobre a superfície dos esferóides (Figuras 4.11 A' e B').

4.2 Avaliação da Funcionalidade de Esferóides Contendo Fibroblastos Pulmonares Obtidos de Camundongos Normais e Silicóticos

Considerando-se ter a IL-13 a capacidade de estimular diretamente a proliferação de fibroblastos, essa propriedade foi analisada utilizando-se o ensaio clássico de incorporação de timidina marcada com trício. Inicialmente, a análise de esferóides contendo células provenientes de animais normais mostrou uma diminuição progressiva na resposta proliferativa ao longo dos tempos analisados (Figura 4.12). Frente à estimulação com IL-13 (40 ng/mL) foi verificada resposta de proliferação com perfil temporal similar, porém em níveis sempre significativamente maiores aos observados no caso das células controles. Quando foi feita a análise na condição de re-estimulação com IL-13, verificamos que as células mantiveram-se responsivas conforme atestado pelo marcado aumento na resposta de proliferação celular em relação àquela dos controles (Figura 4.12). Na sequência, avaliamos a resposta dos esferóides silicóticos estimulados com IL-13. Apesar dos níveis basais de proliferação serem equivalentes entre os esferóides silicóticos e os controles, na condição de estimulação com IL-13 valores significativamente superiores foram notados no caso dos esferóides de células silicóticas, à exceção do dia 2 de cultivo (Figura 4.13).

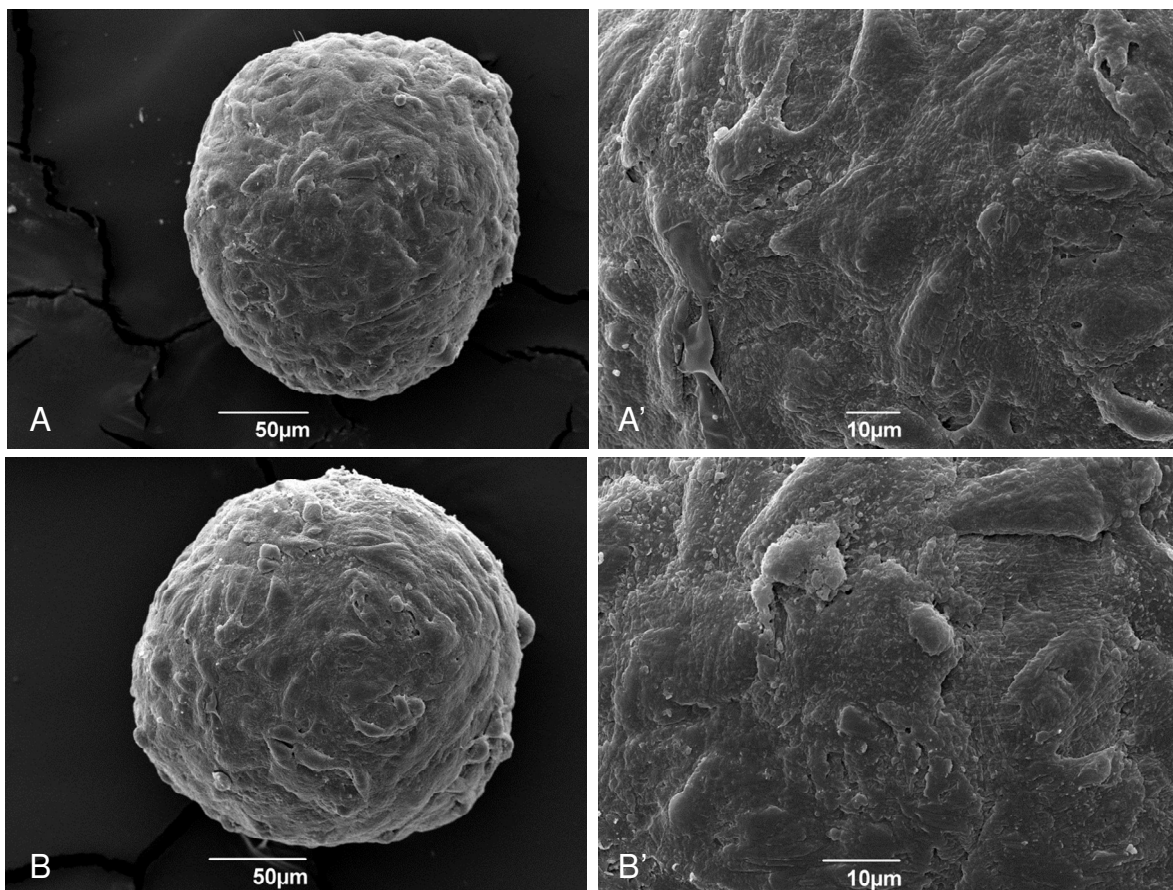


Figura 4.11 (A, A', B, B'): Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos silicóticos estimulados com IL-13(40 ng/mL) (dia 3 de cultivo).

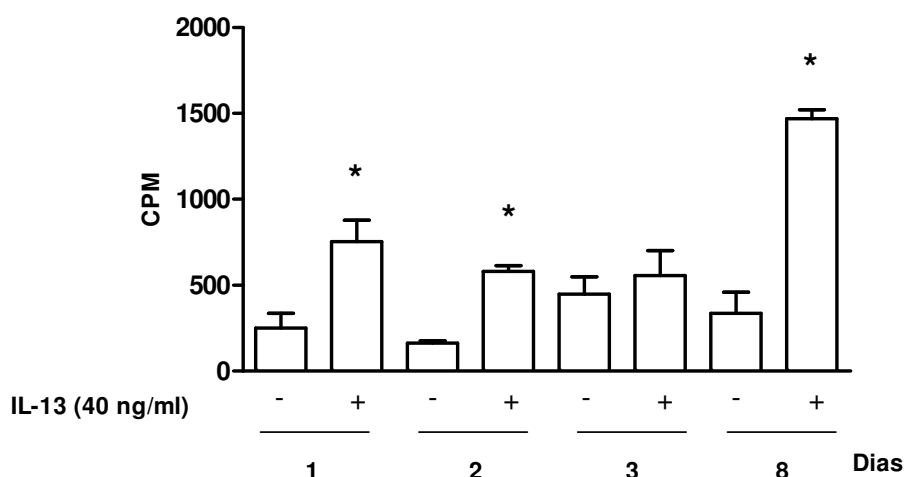


Figura 4.12: Avaliação da proliferação de fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais contidos em esferóides. As análises foram realizadas no período de 1 - 3 e 8 dias após a estimulação com IL-13 (40 ng/mL) *in vitro*, através de microscópio de luz invertida (Aumento 4x). As colunas representam média \pm EPM de (n=6) em triplicata. *p < 0,05 comparado aos respectivos grupos controles não estimulados.

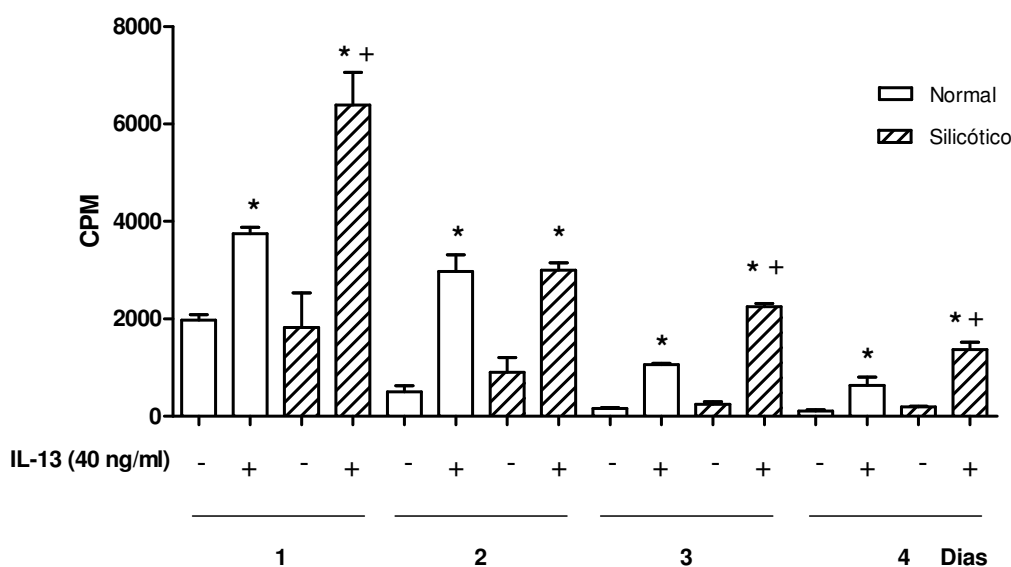


Figura 4.13: Avaliação da proliferação de fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais e silicóticos contidos em esferóides. As análises foram realizadas 1 – 4 dias após a estimulação com IL-13 (40 ng/mL) *in vitro*, através de microscópio de luz invertida (Aumento 4x). As colunas representam média \pm EPM de (n=6) em triplicata. *p < 0,05 comparado aos respectivos grupos controles não estimulados; +p < 0,05 comparado aos respectivos grupos controles estimulados com IL-13.

Dados da literatura indicam que no processo de fibrose há geração de mediadores capazes de induzir a diferenciação e proliferação de fibroblastos, com destaque para o TGF- β (Uh, 1998). Neste sentido, avaliamos a resposta da produção de TGF- β gerado pelos fibroblastos de animais normais e silicóticos contidos nos esferóides frente à estimulação ou não com IL-13. Como pode ser observado na Figura 4.14, a incubação com IL-13 levou ao aumento nos níveis de TGF- β liberado no sobrenadante dos esferóides, no dia 3, com valores percentuais de aumento de $179,8 \% \pm 57,5 \%$ e de $116,87\% \pm 6,37\%$ (média \pm SEM) para os grupos normais e silicóticos, respectivamente.

Ainda tomando por base a funcionalidade destas células foi quantificado no sobrenadante dos esferóides o MCP-1, uma quimiocina cuja função é atrair monócitos da corrente sanguínea para se diferenciarem em macrófagos. Analisando a Figura 4.15, notamos um perfil de secreção semelhante ao ocorrido na detecção para o TGF- β , porém em níveis bem mais elevados. Os grupos estimulados com IL-13 apresentaram um aumento nos níveis de secreção, tanto para TGF- β quanto para MCP-1, quando comparados aos seus respectivos controles, entretanto o mesmo não pode ser observado entre os grupos não estimulados.

Na condição de lesão tecidual, foi relatado que os fibroblastos se apresentam ativados (miofibroblastos), condição que lhes confere a capacidade de secretar quantidades elevadas de componentes de matriz extracelular, de forma a auxiliar no processo de reparo tecidual (Adler, 1989). O colágeno coloca-se como um dos componentes de matriz extracelular em destaque (Mcanulty, 2007). Verificamos que os esferóides de animais silicóticos apresentaram níveis basais de colágeno liberado superiores em comparação aos dos controles (Figura 4. 21). Frente à estimulação com IL-13, detectamos aumento nos níveis de colágeno secretado no sobrenadante dos esferóides controles, sem que qualquer alteração tenha sido notada na condição dos esferóides silicóticos.

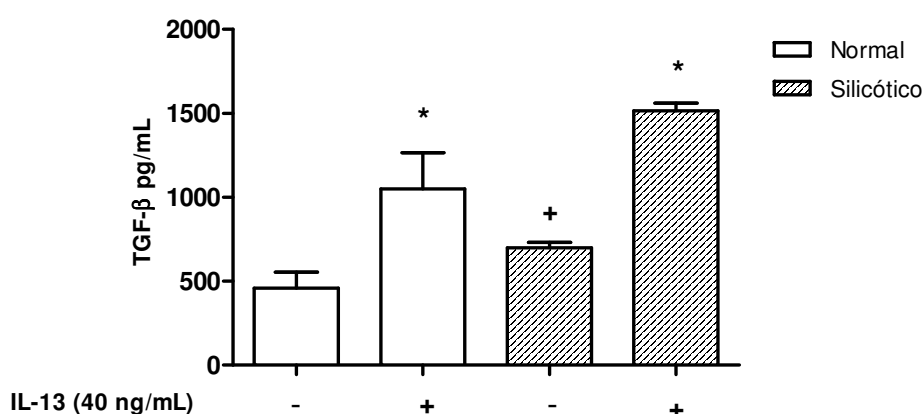


Figura 4.14: Quantificação dos níveis de TGF- β no sobrenadante de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais e silicóticos. As análises foram realizadas 3 dias após a estimulação com IL-13 (40 ng/mL) *in vitro*, através de microscópio de luz invertida (Aumento 4x). As colunas representam a média \pm EPM de esferóides (n=10), em quadruplicata representativo de 3 experimentos. +p < 0,05 comparado ao grupo controle não estimulado; *p < 0,05 comparado aos respectivos grupos controles não estimulados.

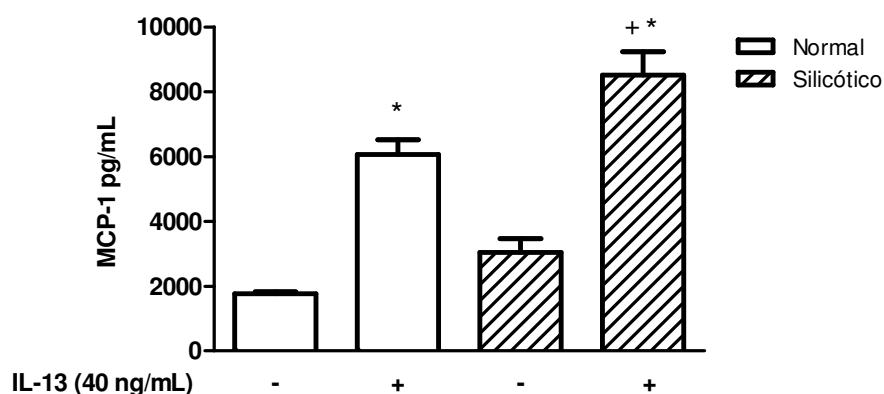


Figura 4.15: Quantificação dos níveis de MCP-1 no sobrenadante de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais e silicóticos. As análises foram realizadas 3 dias após a estimulação com IL-13 (40 ng/mL) *in vitro*, através de microscópio de luz invertida (Aumento 4x). As colunas representam a média \pm EPM de esferóides (n=10), em quadruplicata representativo de 3 experimentos. +p < 0,05 comparado ao grupo controle estimulado; *p < 0,05 comparado aos respectivos grupos controles não estimulados.

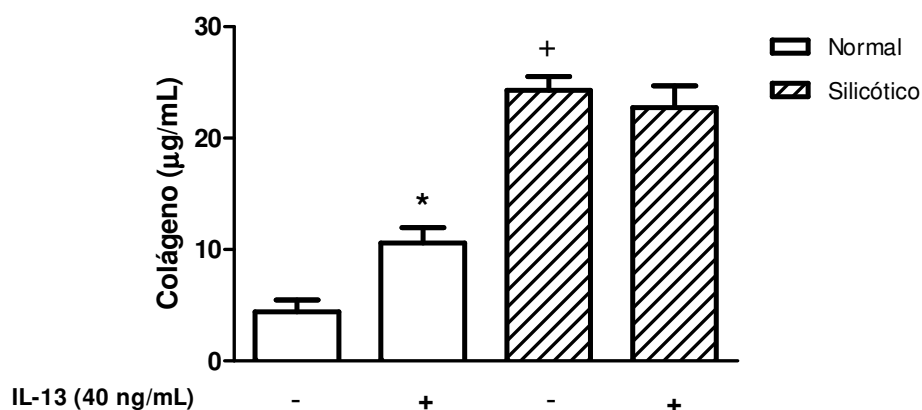


Figura 4.16: Quantificação de colágeno no sobrenadante de esferóides contendo fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos normais e silicóticos. As análises foram realizadas 3 dias após a estimulação com IL-13 (40 ng/mL) *in vitro*, através de microscópio de luz invertida (Aumento 4x). As colunas representam a média \pm EPM de esferóides (n=10), em quadruplicata representativo de 3 experimentos. +p < 0,05 comparado ao grupo controle não estimulado; *p < 0,05 comparado aos respectivos grupos controles não estimulados.

5 Discussão

O desencadeamento do processo fibrótico pulmonar e seu impacto sobre o desenvolvimento da silicose são fenômenos ainda pouco compreendidos, em grande parte devido à falta de sistemas que reproduzam o processo em condições experimentais controladas. Ao longo dos anos, vários modelos de silicose experimental foram desenvolvidos com o intuito de melhor caracterizar o quadro da doença, buscando ao máximo reproduzir as condições encontradas em humanos (Arras e cols., 2001; Borges e cols., 2001; Ortiz e cols., 2001; Desaki e cols., 2002). Em camundongos, estudos apontaram que há uma dependência da cepa utilizada, com diferenças quanto à intensidade da lesão tecidual, tamanho e quantidade de granulomas (Zeidler e cols., 2004). Várias pesquisas utilizando os modelos “*in vivo*” e “*in vitro*” têm sido aplicadas na busca por terapias anti-fibróticas que possam auxiliar no tratamento contra a silicose. Até o presente momento o uso de corticóides clássicos, por exemplo, não é eficaz em todos os pacientes silicóticos, o que determina muitas vezes a necessidade de intervenções drásticas, como o transplante de pulmão. Além disso, deve ser considerado o fato de que a terapia clássica com corticóides implica na ocorrência de uma ampla gama de efeitos colaterais indesejáveis, tais como atrofia de supra-renal, osteoporose, hipertensão, dentre outros (Turkeltaub, 1976). Nesse sentido, alguns trabalhos realizados no Laboratório de Inflamação do IOC tem mostrado a aplicabilidade de novos compostos na melhoria da função pulmonar, do quadro inflamatório e fibrótico da silicose (Ciambarella, 2009)

Modelos de cultivo celular bidimensional (2D), apesar de fornecerem subsídios referentes a diferentes tipos celulares, têm sido mostrado por vários autores não serem capazes de traduzir a complexidade verificada na condição “*in vivo*” (Abbott, 2003). Dados na literatura revelam que processos como crescimento, migração, proliferação e eventos de sinalização celular são prejudicados pelo cultivo 2D. Essas dificuldades seriam devido à forma de adesão que as células interagem umas com as outras e com a superfície de contato, plástico ou vidro, forçando que se adaptem de forma artificial a estas superfícies e apresentem características distintas daquelas observadas “*in vivo*”. (Elsdale e cols., 1972; Hynes, 1999). Desta forma, visando obter “*in vitro*” condições similares às aquelas observadas “*in vivo*” e diminuir o uso de animais de laboratório vários trabalhos estão sendo desenvolvidos utilizando o modelo de cultivo celular tridimensional (3D) (Pampaloni e cols., 2007).

Alguns trabalhos com linhagens de células epiteliais mostram que padrões de diferenciação celular e de expressão gênica são diferentes entre os cultivos 2D e 3D. Células de melanoma cultivadas em substratos planos controlam positiva e negativamente outros genes quando comparados com células de melanoma cultivadas como esferóides em 3D. Interessante, que os genes que são regulados positivamente nos esferóides são também regulados desta maneira em tumores. (Ghosh e cols., 2005). O padrão de migração também apresenta diferenças entre os dois modelos. Fibroblastos que migram no substrato de cultura 2D apresentam uma distribuição diferente de proteínas transmembranares de adesão quando comparada com fibroblastos na cultura em 3D (Walpita e col., 2002; Meshel e cols., 2005).

Estas são algumas das diferenças relevantes entre os dois modelos que nos fizeram buscar o estabelecimento do sistema de cultura de células em 3D, utilizando fibroblastos pulmonares provenientes de animais normais e silicóticos. Vale destacar que somos pioneiros no estabelecimento de cultivo de fibroblastos em 3D associado à investigação da silicose. Este sistema "*in vitro*" abre novas perspectivas para exploração de terapias alternativas anti-fibróticas para aplicação clínica na silicose.

Tem sido descrito que processos fibróticos, como a silicose, estão associados à migração e intensa proliferação de fibroblastos, fenômenos estes dependentes de fatores pró-fibróticos, como o TGF- β e TNF- α (Bataller e col., 2005). No entanto, dados do nosso laboratório mostraram níveis aumentados da citocina IL-13 no pulmão dos animais silicóticos, compatíveis com a progressão da doença (Ferreira, 2009). Este achado mostrou-se bastante interessante, uma vez que, já foi descrito que além dos fatores classicamente conhecidos, a IL-13 também atuaria como um mediador pró-fibrótico em diferentes condições fisiopatológicas, através de sua habilidade em ativar diretamente fibroblastos pulmonares e macrófagos (Jakubzick e cols., 2003a; b). Desta forma, considerando-se a importância desta citocina em processos fibróticos, decidimos utilizá-la no modelo de cultura de fibroblastos em 3D para verificar a reatividade destas células dentro do sistema.

Nesse contexto, foi desenvolvido o modelo de fibroblastos pulmonares de camundongos adultos, em 3D, utilizando-se ferramentas experimentais que permitissem a sua caracterização morfológica e funcional. Inicialmente observamos por microscopia de luz invertida, que os fibroblastos de camundongos normais, tanto na presença como na ausência de IL-13 (40 ng/mL), foram capazes de formar esferóides já no dia 1 de cultura, apresentando tamanho/diâmetro superior àquele encontrado nos demais tempos avaliados. Este fenômeno poderia estar associado

ao próprio processo de estabelecimento conformacional da esfera que resulta na complexidade do sistema. Além disso, notamos que os esferóides de células estimuladas com IL-13 mostraram-se, a partir do dia 2, em tamanho/diâmetro maior do que o de células não estimuladas, significando que a presença de IL-13 poderia estar promovendo a proliferação de fibroblastos, conforme descrito anteriormente, em outras condições experimentais. Todavia, nos deparamos com uma diminuição no tamanho/diâmetro dos esferóides em tempos mais tardios da cinética (dias 3 e 4), fenômeno descrito na literatura como consequência de um possível processo de morte celular no sistema de agregados celulares, denominado nemosis (Vaheri, 2009).

Visando melhor entender este evento, estendemos o intervalo de tempo de análise de 1 - 4 dias para 1 - 8 dias e fizemos uma re-estimulação com IL-13 (40 ng/mL) no dia 4 da cinética inicial. Observamos que nos tempos iniciais da cinética (dia 1 - 4) as mesmas características referentes ao tamanho/diâmetro apresentadas no ensaio anterior foram reproduzidas, porém quando observamos a partir do dia 5, período após a nova estimulação com IL-13, vimos que ocorreu uma estabilização da redução do tamanho/diâmetro que se estendeu até o último dia de análise (dia 8), sugerindo assim uma condição de viabilidade celular.

Verificada a reprodutibilidade do modelo de cultura em 3D com células normais, voltamos nossa atenção para realização da análise da população de células silicóticas na presença ou não da citocina IL-13. Nossos dados mostraram que os esferóides formados a partir de células silicóticas, em condição basal, apresentaram a partir do dia 2 tamanho/diâmetro superior ao dos esferóides de células normais. Na condição de estimulação com IL-13, os esferóides de células provenientes de animais silicóticos apresentaram valores quanto ao tamanho significativamente maiores do que os não estimulados. Este resultado pode ser explicado a partir de relatos da literatura indicativos de que, em condição de lesão tecidual, os fibroblastos mostram-se ativados, apresentando maior capacidade proliferativa e de produção de componentes da matriz extracelular (Adler e cols., 1989), o que estaria mantendo o diâmetro dos esferóides de células silicóticas em tamanho/diâmetro superior.

De maneira interessante, notamos através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que esferóides normais estimulados com a IL-13, apresentaram células fusiformes menos individualizadas, bem como aspecto de maior compactação. Esses dados sugerem uma produção mais acentuada de

componentes de matriz extracelular, quando comparado aos esferóides contendo células normais não estimuladas. A análise dos esferóides contendo células silicóticas não estimuladas apresentou uma superfície com poucas células arredondadas e com ausência de células individualizadas, diferente do observado em esferóides controles. No contexto da silicose, isto pode ser devido ao fato de que as células são provenientes de uma condição de doença pré-estabelecida, mostrando que estas possivelmente estivessem em estado de ativação fisiológica. Ao estimular os esferóides contendo células silicóticas com IL-13, evidenciamos uma compactação ainda mais acentuada quando comparada aos esferóides contendo células normais nas mesmas condições, não sendo ainda observadas células individualizadas. Estes fenômenos podem ser decorrentes de uma maior responsividade destas células à estimulação com IL-13, o que conseqüentemente levaria a uma exacerbação da produção de componentes de matriz. Dados na literatura mostram que fibroblastos pulmonares provenientes de animais sensibilizados com ovoalbumina (asmáticos) são mais responsivos no remodelamento das vias aéreas, sendo notado expressivo aumento da população destas células, bem como aumento da expressão de α -SMA, de mediadores (TGF- β e VEGF) e de fibronectina (Sugiura, 2007).

Para tentar melhor caracterizar o perfil evidenciado na análise morfológica avaliamos a funcionalidade destas células. Verificamos que o perfil de resposta de proliferação dos esferóides normais, na presença ou não de IL-13, mostrou uma progressiva queda até o dia 3 da cultura, sendo notada, entretanto, taxa de proliferação sempre mais elevada no grupo estimulado com IL-13 corroborado pela incorporação de timidina e indiretamente pela dosagem aumentada de fatores pró-fibróticos como o TGF- β e o MCP-1. Observamos ainda que no dia 8, a proliferação das células estimuladas foi significativamente superior à resposta daquelas não estimuladas, possivelmente devido à condição de re-estimulação com a IL-13. Estes achados estão coerentes com aqueles obtidos a partir da análise em sistema de microscopia de luz, e claramente indicam estarem as células constituintes dos esferóides viáveis e aptas a responder quando estimuladas. Evidenciamos, ainda, que os esferóides com células silicóticas apresentaram taxa proliferativa basal superior a dos controles normais e, que quando estimulados com IL-13 a resposta foi igualmente superior. Em conjunto estes dados sugerem que os esferóides constituídos por fibroblastos provenientes de animais silicóticos apresentam-se em uma condição de ativação quando comparados aos controles. Estes resultados

encontram respaldo em estudos realizados em cultura primária de fibroblastos pulmonares obtidos de animais sensibilizados e desafiados antígenicamente, quando foram observadas respostas proliferativa e secretória exacerbadas em relação a das células controles (Sugiura, 2007).

Resultados de funcionalidade foram interessantes para o nosso estudo, e corroboraram com as análises morfológicas. Avaliando a resposta secretória dos fibroblastos contidos em esferóides, vimos que os esferóides contendo fibroblastos de animais normais e silicóticos, na presença de IL-13, secretaram níveis mais elevados de TGF- β e MCP-1 em comparação aos controles não estimulados. Entretanto, verificamos uma importante elevação nos níveis basais de TGF- β no sobrenadante do grupo de esferóides contendo fibroblastos silicóticos não estimulados, reforçando assim os dados descritos anteriormente indicativos de maior reatividade destas células. Quanto ao colágeno, notamos níveis basais bastantes elevados no sobrenadante do grupo de esferóides contendo fibroblastos silicóticos em comparação ao grupo normal. Na condição de estimulação com IL-13, o grupo silicótico não apresentou alteração nos níveis de colágeno em relação àqueles apresentados pelo respectivo grupo basal, diferente do verificado nos controles. Poderíamos especular que este fenômeno poderia estar associado a uma saturação no processo de produção do colágeno pelas células, à dessensibilização dos receptores para IL-13 ou, ainda, à dificuldade de secreção de colágeno para o meio frente ao adensamento da superfície externa do esferóides associada a uma produção exagerada de componentes de matriz extracelular. Experimentos adicionais fazem-se necessários para melhor compreender este fenômeno.

6 Conclusões

- Fibroblastos pulmonares de camundongos adultos, instilados intranasalmente com salina ou partículas de sílica, foram capazes de formar e se estabelecer, com reprodutibilidade, como esferóides em sistema de cultivo 3D *in vitro*;
- A evidenciação de que fibroblastos provenientes de animais silicóticos geram esferóides maiores e mais densos do que os normais reforça a ideia da condição de ativação dessas células representado pelo aumento da proliferação celular e da produção de elementos da matriz extracelular;
- A estimulação de ambas as populações de fibroblastos (normais e silicóticos) com IL-13 aumentou a taxa de proliferação celular e secreção de fatores pró-fibróticos como o TGF- β e MCP-1 demonstrando assim maior maturidade dessas células a IL-13;
- A redução do tamanho dos esferóides nas diferentes condições experimentais durante os quatro primeiros dias de cultivo, e a manutenção do tamanho nos períodos adicionais sob re-estimulação por mais quatro dias, sugeriu que seja realizado um estudo mais aprofundado empregando ferramentas que possam corroborar, ou não, com a hipótese de morte celular preconizada em outros modelos de estudo;
- A análise ultraestrutural por MEV mostrou, indiscutivelmente, diferenças morfológicas marcantes entre esferóides obtidos de animais normais e silicóticos, na condição de estimulação com IL-13, o que reforçou a hipótese de maior proliferação celular e produção de proteínas de matriz nos modelos experimentais. Uma abordagem imunohistológica para revelação de fibronectina e colágeno nesses grupos poderia dar mais sustentabilidade a essa hipótese, associada a estudos sistematizados por microscopia eletrônica de transmissão.
- O sistema de cultura de fibroblastos pulmonares em 3D mostrou-se adequado para o estudo da silicose "*in vitro*", abrindo novas perspectivas para busca por compostos com atividade antifibrótica.

7 Perspectivas do Trabalho

Os resultados obtidos quando da análise da reatividade de fibroblastos pulmonares provenientes de animais normais e silicóticos no modelo 3D mostram-se desafiadores, nos motivando ao uso de estratégias experimentais adicionais que possam corroborar as hipóteses decorrentes de nossos achados.

A diminuição do tamanho/diâmetro dos esferóides (normais e silicóticos) ao longo do ensaio de cinética (4 dias) indica a necessidade de análise do processo de morte celular neste modelo. Dados descritos anteriormente, utilizando o modelo 3D com outros tipos celulares, mostraram a ocorrência de necrose, apoptose ou ainda de um tipo de morte celular denominada nemosis. Várias técnicas poderiam ser utilizadas para esta análise incluindo a citometria de fluxo (anexina V e iodeto de propídio); western blot (tipos específicos de caspases); imunohistoquímica (BAX e BCL-2); técnica de TUNEL, dentre outras.

A análise ultraestrutural por MEV revelou diferenças marcantes entre os grupos analisados sugerindo uma produção aumentada de componentes de matriz, principalmente no grupo silicótico estimulado com IL-13. A utilização de técnicas como imunocitoquímica para componentes de matriz extracelular (fibronectina e colágeno) poderiam corroborar e sustentar os achados provenientes da análise em MEV e auxiliar na compreensão acerca dos achados indicativos de níveis iguais de colágeno sendo detectados no sobrenadante de esferóides com células obtidas de camundongos silicóticos na condição de estimulação ou não com IL-13.

Além disso, a análise de outras citocinas como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) ou ainda do fator induzido por hipóxia (HIF-1) poderiam contribuir para nossas análises.

8 Referências Bibliográficas

Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature*. 2003; 424: 870-887.

Adler KB, Low RB, Leslie K. O. Biology of disease: contractile cells in normal and fibrotic lung. *Lab Invest*. 1989; 60: 473-485.

Aires MM. *Fisiologia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Akira M. High-resolution CT in the evaluation of occupational and environmental disease. *Radiol Clin North Am*. 2002; 40(1):43-59.

Antao VC, Pinheiro GA, Terra-Filho M, Kavakama J, Müller NL. High-resolution CT in silicosis: correlation with radiographic findings and functional impairment. *J Comput Assist Tomogr*. 2005; 29(3):350-356.

Arcangeli G, Cupelli V, Giuliano G. Effects of silica on human lung fibroblast in culture. *Sci Total Environ*. 2001; 270(1-3): 135-139.

Arras M, Huaux F, Vink A, Delos M, Coutelier JP, Many MC, Barbarin V, Renaud JC, Lison D. Interleukin-9 reduces lung fibrosis and type 2 immune polarization induced by silica particles in a murine model. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 24(4): 368-375.

Banks DE, Cheng YH, Weber SL, Ma JK. Strategies for the treatment of pneumoconioses. *Occup Med*. 1993; 8(1): 205-232.

Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005; 115(2): 209-218.

Borges VM, Falcao H, Leite-Junior JH, Alvim I, Teixeira GP, Russo M, Nobrega AF, Lopes MF, Rocco PM, Davidson WF et al. Fas ligand triggers pulmonary silicosis. *J Exp Med*. 2001; 6; 194(2): 155-164.

Boudreau NJ & Jones PL. Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come. *Biochem J.* 1999; 339: 481-488.

Brown T. Silica exposure, smoking, silicosis and lung cancer-complex interactions. *Occup Med.* 2009; 59: 89 - 95.

Caramori G, Adcock I. Pharmacology of airway inflammation in asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* 2003; 16(5): 247-277.

Carneiro APS, Barreto SM, Siqueira AL, Cavariani F, Forastiere F. Continued exposure to sílica after diagnosis of silicosis in Brazilian gold miners. *Am J Ind Med.* 2006; 49: 811-818.

Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly L A, Carter AB, Rothman PB, Flavell RA, Sutterwala FS. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2008; 105(26): 9035 - 9040.

Castranova V, Vallyathan V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environ Health Perspect.* 2000; 108 Suppl 4: 675-684.

Castranova V. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(7): 916-925.

Cherniak M. *The Hawk's Nest Incident: America's Worst Industrial Disaster.* New Haven, CT: Yale University Press, 1986.

Chong S, Lee KS, Chung MJ, Han J, Kwon OJ, Kim TS. Pneumoconiosis: comparison of imaging and pathologic findings. *Radiographics.* 2006; 26(1): 59-77.

Ciambarella BT. Papel do TNF-alfa na resposta inflamatória pulmonar causada pela inalação de partículas de sílica em camundongos. Rio de Janeiro. Tese [Mestrado em Biologia Celular e Molecular] – Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ; 2009

Cooper GS, Miller FM, Germolec DR. Occupational exposures and autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.* 2002; 2: 303-313.

Corbel M, Belleguic C, Boichot E and Lagente V. Involvement of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. *Cell Biol Toxicol.* 2002; 18(1): 51-61.

Corbel M, Caulet-Maugendre S, Germain N, Lagente V and Boichot E. Enhancement of gelatinase activity during development of subepithelial fibrosis in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33(5): 696-704.

Crapo JD, Harmsen AG, Sherman MP, Musson RA. Pulmonary Immunobiology and Inflammation in Pulmonary Diseases – NHLBI Worksshop Summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162: 1983-1986.

Crystal RG, Bitterman PB, Mossman B. Future research directions in idiopathic pulmonary fibrosis: summary of a national heart, lung, and blood institute working group. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166: 236-246.

Cruz-Orive LM and Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol.* 1990; 258: L148-156.

Davis GS. The pathogenesis of silicosis: state of the art. *Chest.* 1986; 89: 166-169.

Desaki M, Sugawara I, Iwakura Y, Yamamoto K, Takizawa H. Role of interferon gamma in the development of murine bronchus-associated lymphoid tissues induced by silica in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 15; 185(1):1-7.

Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: Role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest.* 2003; 83: 1689-1707.

Ding M, Chen F, Shi X, Yucesoy B, Mossman B, Vallyathan V. Diseases caused by silica: mechanisms of injury and disease development. *Int Immunopharmacol.* 2002; 2: 173-182.

Dutta RC, Dutta AK. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. *Biotechnol Adv.* 2009; 27: 334-339.

Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol.* 1972; 54: 626-637.

Eyden B. The myofibroblast: A study of normal, reactive and neoplastic tissues, with an emphasis on ultrastructure. Part 1 - Normal and reactive cells. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2005; 37: 109-204.

Ferreira TPT. Efeito do tratamento com a proteína quimérica IL-13PE sobre a inflamação pulmonar induzida por partículas de sílica em camundongos. Rio de Janeiro. Tese [Mestrado em Biologia Humana e Experimental] – Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2009.

Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature.* 2009; 4(3): 309-324.

Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic. Biol Med* 2003; 34(12): 1507-1516.

FUNDACENTRO, [cited; Available from: <http://www.fundacentro.gov.br>] 2008

Ghosh S, et al. Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. *J Cell Physiol.* 2005; (204): 522-531.

Glimelius B, Norling B, Nederman T, Carlsson J. Extracellular matrices in multicellular spheroids of human glioma origin: increased incorporation of proteoglycan and fibronectin as compared to monolayer cultures. *APMIS.* 1988; 96: 433-444.

Godleski J. The Pneumoconiosis: silicosis and silicatosi. In: Saldana, Pathology of Pulmonary Disease. Philadelphia. 1994.

Goodman GB, Kaplan PD, Stachura I, Castranova V, Pailles WH, Lapp NL. Acute silicosis responding to corticosteroid therapy. *Chest.* 1992; 101(2): 366-370.

Gossart S, Cambon C, Orfila C, Seguelas MH, Lepert JC, Rami J, Carre P, Pipy B. Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF-alpha production in rat lung inflammation induced by silica. *J Immunol.* 1996; 156(4): 1540-1548.

Greenberg MI, Waksman J, Curtis J. Silicosis: a review. *Dis Mon.* 2007; 53(8): 394-416.

Guyton AC & Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.

Hamilton R. F Jr.; Thakur S. A.; Mayfair J. K.; Holian A. MARCO mediates silica uptake and toxicity in alveolar macrophages from C57BL/6 mice. *J Biol Chem.* 2006; 281(45): 34218-34226.

Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* 2008; 9(8): 847-656.

Huax F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007; 7(2): 168-173.

Hunter D. *The disease of occupations.* Boston: MA; 1962.

Hynes RO. Cell adhesion: old and new question. *Trends Cell Biol.* 1999; 9: m33-m77.

Jagirdar J, Begin R, Dufresne A, Goswami S, Lee TC, Rom WN. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154 (4 Pt 1): 1076-1081.

Jakubzick C, Choi ES, Joshi BH, Keane MP, Kunkel SI, Puri RK, Hogaboam CM. Therapeutic attenuation of pulmonary fibrosis via targeting of il-4- and il-13-responsive cells. *J Immunol.* 2003a; 1;171(5): 2684-2693.

Jakubzick C, Choi ES, Kunkel SI, et. al. Impact of interleukin-13 responsiveness on the synthetic and proliferative properties of th1- and th2-type pulmonary granuloma fibroblasts. *Am J. Pathol* 2003b; 162(5): 1475-1486.

Jimenez S, Hitraya E, Varga J. Pathogenesis of scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am.* 1996; 22: 647-674.

Junqueira JC & Carneiro J. *Histologia Básica : Texto e Atlas.* 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Keane MP, Strieter RM. The importance of balanced pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease. *Respir Res.* 2002; 3:5.

Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M & Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng.* 2003; 83: 173-180.

Kennedy MC. Aluminium powder inhalations in the treatment of silicosis of pottery workers and pneumoconiosis of coal-miners. *Br J Ind Med.* 1956; 13(2): 85-101.

Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids; intermediates between monolayer culture and in vivo tumours. *Cell Biol Int.* 1999; 23(3): 157-161.

Laurent GJ. Regulation of matrix turnover: fibroblasts, forces, factors and fibrosis. *Biochem Soc Trans.* 2008; 5: 311-315.

Levitzky MG. *Fisiologia Pulmonar.* 6 ed. São Paulo: Manole; 2004.

Liu B, Connolly MK. The pathogenesis of cutaneous fibrosis. *Semin Cutan Med Surg.* 1998; 17: 3-11.

Lloyde CM & Robinson DS. Allergen-induced airway remodeling. *Eur Respir J.* 2007; 29: 1020-1032.

Mariani TJ, Roby JD, Mecham RP, Parks WC, Crouch E, Pierce RA. Localization of type I procollagen gene expression in silica-induced granulomatous lung disease and implication of transforming growth factor-beta as a mediator of fibrosis. *Am J Pathol.* 1996; 148(1): 151-164.

Mattey DL, Dwes PT, Nixon NB. Transforming growth factor- β 1 and interleukin 4 induced α -smooth muscle actin expression and myofibroblast in vitro: modulation by basic fibroblast growth factor. *Ann Rheum Dis.* 1997; 56: 426-431.

Mauch C. Regulation of connective tissue turnover by cell-matrix interactions. *Arch Dermatol Res.* 1998; 290: 30-36.

Mcanulty RJ, Campa JS, Cambrey AD, Laurent GJ. The effect of transforming growth factor- β on rates of procollagen synthesis and degradation in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1091: 231-235.

Mcanulty RJ, Laurent GJ. Fibroblasts. In: Barnes P, Drazen J, Rennard S, Thomson N, editors. Asthma and COPD: basic mechanisms and clinical management. Academic Press. 2002; p. 139-144.

Mcanulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 666-671.

MesheL AS, Wei Q, Adelstein RS & Sheetz MP. Basic mechanism of three-dimensional collagen fibre transport by fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2005; (7): 157-164.

More M. Crystalline silica: occurrence and use. *Indoor Built Environ.* 1999; 8(2): 82-88.

Muetterties M, O'Halloran Schawarz L, Wang R. Sandblasters. In: Greenberg M editor. Occupational, Industrial, and Environmental Toxicology. Philadelphia, Mosby, 2003.

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Work-related lung disease surveillance. NIOSH; 2002

Occupational Safety and Health Administration (OSHA). Occupational Exposure to Crystalline Silica. [<http://www.osha.gov/pls/oshaweb/>]; 2004.

Organização Mundial da Saúde, OMS.[http://www.who.int/occupational_health]; 1986.

Ortiz LA, Iasky J, GozaL E, Ruiz V, Lungarella G, Cavarra E, Brody AR, et al. Tumor necrosis factor receptor deficiency alters matrix metalloproteinase 13/tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression in murine silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163(1): 244-252.

Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 839-845.

Parkes WR. Aerosols: their deposition and clearance. In: Parkes WR, editor. *Occupational Lung Disorders.* Oxford, UK. Butterworth-Heinemann. 1994.

Peretz A, Checkoway H, Kaufman JD, Trajber I, Lerman Y. Silica, silicosis, and lung cancer. *Irs Med Assoc J.* 2006; 8: 114-118.

Perez-Ramos J, de Lourdes Segura-Valdez M, Vanda B, Selman M, Pardo A. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160(4): 1274-1282.

Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19(6):

Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 15; 5(3): 334-337.

Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Sappino AP, Vassalli P. Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature.* 1990; 344(6263): 245-247.

Rimal B, Greenberg AK, Rom WN. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Curr Opin Pulm Med.* 2005; 11(2): 169-173.

Robbins & Cotran. *Fundamentos de Patologia.* 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.

Sakae RS, Leme AS, Dolhnikoff M, Pereira PM, do Patrocínio M, Warth TN, Zin WA, Saldiva PH and Martins MA. Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacholine. *Am J Physiol.* 1994; 266: L23-29.

Schwarz LB. Cellular inflammation in asthma: neutral proteases of mast cells. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 14(2): 51-58.

Silicosis and Silicate Disease Committee. Diseases associated with exposure to silica and nonfibrous silicate minerals. *Arch Pathol Lab Med.* 1988; 112(7): 673-720.

Sugiura H. Cultured lung fibroblasts from ovalbumin-challenged “asthmatic” mice differ functionally from normal. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007; 37:424-430.

Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1971; 46: 113-120.

Terra Filho M. & Santos UP. Silicose. *J Bras Pneumol.* 2002; 32: S41-S47.

Timmins NE, Hardling FJ, Smart C, Brown MA, Nielsen LK. Method for the generation and cultivation of functional three-dimensional mammary constructs without exogenous extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* 2005; 320:207-210.

Uh ST, Inoue Y, King TE Jr. Morphometric analysis of insulin-like growth factor-I localization in lung tissues of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 158: 1626-1635.

Vaheri A. et al., Nemozis, a novel way of fibroblast activation, in inflammation and cancer. *Exp Cell Res.* 2002; 1-4

Walpita D & Hay E. Studing actin-dependent processes in tissue culture. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; (3): 137-141.

Yamada K.M, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell .* 2007; 130: 601-610.

Zeidler P, Hubbs A, Battelli I, Castranova V. Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *J Toxicol Environ Health*. 2004; 9; 67(13): 1001-1026.