

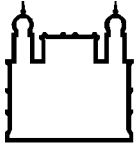
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

EFEITO DE TERAPIAS ANTI-TNF- $\alpha$  SOBRE A RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA PULMONAR CRÔNICA INDUZIDA POR SÍLICA EM  
CAMUNDONGOS

BIANCA TORRES CIAMBARELLA

Rio de Janeiro  
2013



Ministério da Saúde

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

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***BIANCA TORRES CIAMBARELLA***

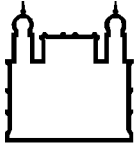
Efeito de terapias anti-TNF- $\alpha$  sobre a resposta inflamatória pulmonar crônica induzida por sílica em camundongos

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

**Orientadora:** Prof. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva

**RIO DE JANEIRO**

2013



Ministério da Saúde

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

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOR: BIANCA TORRES CIAMBARELLA**

**EFEITO DE TERAPIAS ANTI-TNF- $\alpha$  SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
PULMONAR CRÔNICA INDUZIDA POR SÍLICA EM CAMUNDONGOS**

**ORIENTADORA: Prof. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva**

**Aprovada em: 12/07/2013**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Milton Ozório Moraes (Presidente)**

**Prof. Dra. Adriana Ribeiro Silva**

**Prof. Dr. Walter Araujo Zin**

**Prof. Dr. Bruno Lourenço Diaz**

**Prof. Dr. Vinicius de Frias Carvalho**

Rio de Janeiro, 12 de Julho de 2013.

Este trabalho é dedicado ao meu avô Aderito (1927 – 2008), minha avó Marizes, à minha mãe Ângela, aos meus irmãos Luigi e Fabiano e à minha tia Lusia. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Amo vocês para todo o sempre!

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade da vida, das pessoas à minha volta, dos parentes e amigos que me fazem feliz a todo momento;

A minha mãe, amiga, conselheira e orientadora da vida. Agradeço o carinho, amor, incentivo mesmo quando o coração batia apertado por causa das minhas decisões malucas e insensatas;

Aos meus irmãos Luigi e Fabiano, por me agüentarem e me amarem durante todos esses anos, mesmo quando pertubava demais (o que era quase sempre);

Aos meus avós Aderito (*pos-mortem*) e Marizes por me darem a oportunidade de estudar e evoluir. Por acreditarem em minha capacidade e investirem no meu aprendizado;

A minha Tia Lusia pela dedicação incondicional a nossa família, por acordar cedo para fazer meu almoço. Dai, você é realmente espetacular!

Aos eternos amigos e familiares: Simone Sena, Maurício Lamarão, Solange Sanches, Rosimere Almeida, Tiago Barreto, Fernanda Domingues, Thaís Souza, Diego Consendey, Simone Vieira e Fernanda Vieira, Marcos Vieira, Mary Ferreira, Ismar Reynier, Antônio Hamilton Queiroz, Eliane Queiroz pelos momentos de descontração quando mais precisava!

A minha orientadora Dra. Patrícia M. R. e Silva (ou melhor, como ela insistiu nos últimos 8 anos para ser chamada - Pat) pela orientação, dedicação, preocupação, carinho e críticas construtivas que me auxiliaram a chegar onde estou hoje;

Ao Chefe do Laboratório Dr. Marco Aurélio Martins, por permitir que eu realizasse este trabalho no laboratório e acreditar na minha capacidade intelectual;

Ao Dr. Renato Sérgio Balão Cordeiro, por ser o exemplo de pesquisador que eu gostaria de ser e por nos incentivar a sempre buscar informações novas;

Aos amigos do Laboratório de Inflamação que fizeram parte da minha vida todos esses anos, em especial à Pat Trentin, Thiago José Ramos, Diana Dalzy, Andressa Moraes, Natália Andrade, Davidson Dias, Carol Azevedo, Jorgino, Ana Carol Arantes, Rodrigo Azevedo e Tatiana Paula Ferreira aos quais me ajudaram com meus experimentos;

Aos demais componentes do Laboratório de Inflamação que compartilharam dos momentos felizes e de estresses em todos esses anos;

À Osirene Gois Loureiro (Dadá), o laboratório não seria o mesmo sem você, eu não seria a mesma sem você!

À Magda Fráguas, Vinicius de Frias Carvalho, Edna Vallota, Ana Lúcia Pires, Júlio Beltrame pela paciência, ajuda e orientação;

Aos alunos de Iniciação Científica que tive a oportunidade de co-orientar Elaine Sant'Anna, Lívia Lacerda, Yago Sá e Andrey Júnior, mais aprendi do que ensinei;

Ao Dr. David E. Szymkowski, da Xencor, por ter gentilmente cedido o composto XPro 1595 para teste;

Ao Dr. Ulisses Gazos Lopes e à Dra. Thereza Calegari Silva do Laboratório de Parasitologia Molecular da UFRJ por me incentivarem e ensinarem a técnica fundamental para esta tese (Western Blotting);

Ao Dr. Bruno Lourenço Diaz pela dedicação e cuidado em revisar minha tese e discutir pontos importantes do trabalho;

Aos pesquisadores Dr. Milton Ozório Moraes, Adriana Ribeiro Silva, Walter Araujo Zin, Vinicius de Frias Carvalho e Bruno Lourenço Diaz por aceitarem o convite para compor a banca avaliadora;

E por último, mas não menos importante, ao apoio financeiro da Fiocruz, FAPERJ e CNPq que permitiu que esse trabalho fosse realizado.

*“ Que a estrada abra à tua frente,  
que o vento sopra levemente em tuas costas,  
que o sol brilhe morno e suave em tua face,  
que a chuva caia de mansinho em teus campos.  
E até que nos encontremos de novo,  
que a Pureza te guarde na palma de Sua  
mão...”*

*(Prece Irlandesa)*

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 instituições:

- Fundação Oswaldo Cruz;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa de Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ.

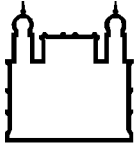
Data de ingresso no Programa de Doutorado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: Junho de 2009.



## ÍNDICE

Ficha catalográfica.....	ii
Resumo .....	xi
Abstract .....	xiii
Abreviações .....	xv
Lista de Figuras .....	xix
1 – Introdução .....	1
1.1 – Sistema respiratório humano .....	1
1.1.1 – Sistema respiratório em roedores .....	2
1.2 – Mecânica pulmonar .....	3
1.2.1 – Receptores Pulmonares .....	5
1.2.2 – Resistência das vias aéreas .....	7
1.2.3 – Elastância .....	7
1.2.4 – Hiper-reatividade das vias aéreas .....	8
1.3 – Pulmão vs. Doença .....	10
1.4 – Silicose .....	11
1.4.1 – Histórico e epidemiologia .....	12
1.4.2 – Formas de silicose e diagnóstico .....	16
1.4.3 – Sílica .....	18
1.4.4 – Patogênese .....	19
1.4.4.1 – Fator de Necrose Tumoral (TNF) .....	23
1.4.4.1.1 – Fator Nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B) .....	25
1.4.5 – Prevenção e tratamento .....	27
1.5 – Inibidores do TNF- $\alpha$ .....	29
1.5.1 – Talidomida .....	29
1.5.2 – Infliximabe .....	31
1.5.3 – XPro 1595 .....	31
1.6 – TNF- $\alpha$ vs. Silicose .....	32
2 – Objetivo .....	35
2.1 – Objetivo Geral .....	35
2.2 – Objetivos específicos .....	35
3 – Material e Métodos .....	36

3.1 – Animais .....	36
3.2 – Indução da Silicose e Tratamentos .....	36
3.3 – Avaliação da Função Pulmonar e Hiperreatividade das Vias Aéreas .....	37
3.4 – Análise Histológica .....	38
3.4.1 – Análise Morfométrica .....	38
3.5 – Quantificação de mediadores inflamatórios por ELISA .....	39
3.6 – Quantificação de colágeno .....	39
3.7 – Imunohistoquímica .....	40
3.8 – Western Blotting .....	40
3.9 – CULTURA DE CÉLULAS .....	41
3.9.1 – Macrófagos Alveolares .....	41
3.9.2 – Células Epiteliais Humanas .....	42
3.9.3 – Fibroblastos Pulmonares .....	42
3.9.4 – Viabilidade celular .....	43
3.10 – Análise Estatística .....	43
4 – Resultados .....	44
4.1 – Efeito da talidomida sobre a silicose experimental em camundongos .....	44
4.1.1 – Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas .....	44
4.1.2 – Morfologia e morfometria do tecido pulmonar .....	44
4.1.3 – Geração de mediadores inflamatórios/fibróticos no tecido pulmonar .....	47
4.1.4 - Células alvos presentes no tecido pulmonar .....	47
4.1.4.1 - Células alvos <i>in vitro</i> .....	51
4.2 – Efeito do infliximabe e XPro-1595 sobre a silicose experimental em camundongos 55	
4.2.1 - Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas .....	55
4.2.2 – Morfologia e morfometria do tecido pulmonar .....	58
4.2.3 – Geração de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar .....	58
4.2.4 – Células alvos presentes no tecido pulmonar .....	62
4.2.4.1 - Células alvos <i>in vitro</i> .....	62
4.3.7 – Avaliação da resposta intracelular desencadeada pela inibição do TNF- $\alpha$ na silicose .....	67
5 – Discussão .....	71
6 – Conclusão .....	79
7 – Referências Bibliográficas .....	81



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EFEITO DE TERAPIAS ANTI-TNF- $\alpha$ SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR CRÔNICA INDUZIDA POR SÍLICA EM CAMUNDONGOS

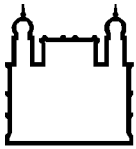
#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO

**Bianca Torres Ciambarella**

A silicose é uma doença de caráter ocupacional, desencadeada pela inalação de partículas de sílica e associada à participação de uma ampla gama de mediadores. O TNF- $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica, que apresenta forma transmembranar (mTNF- $\alpha$ ) e solúvel (sTNF- $\alpha$ ), envolvidas em diversas doenças de caráter inflamatório. No presente estudo avaliamos o efeito de terapias neutralizantes de TNF- $\alpha$ , incluindo a inibição de geração com o composto talidomida, e o bloqueio da ação com o anticorpo infliximabe (Remicade<sup>®</sup>), no modelo de silicose experimental murina. Foi também testado o composto XPro 1595, um inibidor seletivo do sTNF- $\alpha$ . Camundongos Swiss-Webster apresentaram, 28 dias após instilação intranasal de sílica (10 mg), comprometimento da função pulmonar (aumento de resistência e elastância), além de hiper-reatividade à estimulação com metacolina. A análise morfológica e morfométrica revelou intenso infiltrado inflamatório com a presença de fibrose, incluindo aumento na deposição de colágeno e formação de granulomas dispersos no parênquima pulmonar. Vimos, também, aumento na produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ ) e quimiocinas (MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e MIP-2) no tecido pulmonar de camundongos silicóticos comparados aos animais controles. Aumento de células positivas para F4/80 e  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) foi detectado, indicando a presença de macrófagos e miofibroblastos, respectivamente, no pulmão dos animais silicóticos. O tratamento terapêutico com talidomida (25 e 50 mg/kg, v.o.), infliximabe (1,25 mg/kg; i.p.), e com o composto XPro 1595 (10 mg/kg; i.p.), mostrou-se efetivo em reduzir parâmetros importantes do quadro silicótico tais como: i) comprometimento da função pulmonar (aumento de resistência e elastância); ii) componente inflamatório e fibrogênico (deposição de colágeno e formação de granuloma); iii) geração de citocinas inflamatórias/prófibróticas; e iv) presença de células positivas para F4/80 e  $\alpha$ -SMA. De forma complementar, verificamos que o tratamento com infliximabe e com XPro 1595 foi também capaz de reduzir a ativação/translocação para o núcleo do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no pulmão de camundongos silicóticos. Em sistemas biológicos *in vitro*, vimos que macrófagos alveolares murinos (linhagem AMJ2C11) quando incubados com talidomida, infliximabe e XPro 1595 apresentaram diminuição da geração de TNF- $\alpha$  frente à estimulação com sílica (300  $\mu$ g/mL), sem alteração da taxa de viabilidade celular. No sistema de fibroblastos pulmonares, provenientes de camundongos silicóticos, houve redução da resposta proliferativa frente à estimulação com IL-13 (10 - 40 ng/mL) e TNF- $\alpha$  (1 ng/mL). Os três compostos testados não apresentam efeito supressor sobre a produção de IL-8 por células epiteliais pulmonares (linhagem A549) estimuladas com IL-1 $\beta$  (1 ng/mL). Tomados em conjunto, nossos resultados mostram que o tratamento de camundongos silicóticos com compostos neutralizantes da geração ou da ação do TNF- $\alpha$

foram eficazes em inibir o comprometimento da função pulmonar e a resposta fibrogênica associadas ao quadro da silicose experimental murina, o que é indicativo de que o TNF- $\alpha$  constitui um alvo terapêutico importante no contexto desta doença. Mais ainda, mostramos de maneira original que a forma solúvel do TNF- $\alpha$  se coloca como de potencial relevância no que tange a terapia de doenças inflamatórias de caráter fibrótico como a silicose.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EFFECT OF ANTI-TNF- $\alpha$ THERAPY IN CHRONIC LUNG INFLAMMATORY RESPONSE INDUCED BY SILICA IN MICE.

#### ABSTRACT

#### TESE DE DOUTORADO

**Bianca Torres Ciambarella**

Silicosis is an occupational disease, triggered by silica particle inhalation and is associated with a wide range of mediators. TNF- $\alpha$  is a pleiotropic cytokine, which is presented as transmembrane (mTNF- $\alpha$ ) and soluble (sTNF- $\alpha$ ) forms, appearing to be involved in several diseases of inflammatory nature. In the present study we evaluated the effect of TNF- $\alpha$  neutralizing therapies, including both inhibition of its generation by thalidomide and blockade of its action by the monoclonal antibody infliximab (Remicade<sup>®</sup>) on the experimental model of silicosis in mice. The selective inhibitor of sTNF- $\alpha$ , XPro 1595, was also tested. Swiss-Webster mice showed lung function failure (increased resistance and elastance) and hyperreactivity to methacholine aerosolization. Morphological and morphometric analyses revealed an intense inflammatory infiltrate and fibrosis, including increased collagen deposition and granulomas present spread in the lung parenchyma. Elevation in the levels of cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ ) and chemokines (MCP-1, MIP-1 $\alpha$  and MIP-2) in the lung tissue of silicotic mice was also detected as compared to controls. The number of positive cells for F4/80 and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) was shown to be elevated in the lungs of silicotic mice, indicating the presence of macrophages and myofibroblasts, respectively. Therapeutic treatment with thalidomide (25 and 50 mg/kg, po), infliximab (1.25 mg/kg, ip) and compound XPro 1595 (10 mg/kg, ip) inhibited important parameters of silicosis such as: i) lung function impairment (increased resistance and elastance), ii) and inflammatory and fibrogenic components (collagen deposition and granuloma formation); iii) cytokine/chemokine generation and iv) presence of F4/80 and  $\alpha$ -SMA positive cells. In addition, we noted that infliximab and XPro 1595 were also able to reduce nucleus transcription factor NF- $\kappa$ B activation/translocation in lung tissue of silicotic mice. We showed *in vitro* that murine alveolar macrophages (AMJ2C11 cell lineage) when incubated with thalidomide, infliximab and XPro 1595 responded with lower levels of TNF- $\alpha$  after silica (300  $\mu$ g/mL) stimulation. No alteration of cell viability was noted. In the case of lung fibroblasts from silicotic mice, stimulated with IL-13 (10 - 40 ng/ml) and TNF- $\alpha$  (1ng/ml), we showed that reduced proliferative response occurred after incubation with thalidomide, infliximab and XPro 1595. The three compounds have no effect on IL-8 production by human lung epithelial cells (A549) stimulated with silica (300  $\mu$ g/ml). Taken together, our findings show that treatment of silicotic mice with anti-TNF- $\alpha$  therapy, either inhibiting its generation or blocking its activity, was effective to suppress lung function failure and fibrogenesis associated with murine experimental silicosis, which is an indicative that TNF- $\alpha$  is an important therapeutic target in this disease. In addition, we showed for the first

time that the soluble TNF seems to be a potential therapeutic target in the case of lung fibrotic diseases such as silicosis.

## ABREVIACES

- AKT - serine–threonine kinase (Quinase Serina-treonina);
- AP-1 – Activator Protein 1 (Proteína Ativadora 1);
- ATF2 – Activating transcription Factor 2 (Fator de ativação da transcrição 2);
- ATPase – Enzima de degradação da Adenosina Trifosfato;
- BCA- Bincinchonic acid (cido bincinchoninico);
- Bid – B cell lymphoma 2 interacting protein (Proteína de interação com linfoma de células B 2);
- BSA - Bovine serum albumin (Albumina Sérica Bovina);
- CD - Cluster of Differentiation (Grupo de Diferenciação);
- cIAP - Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein (Proteína Inibitória da Apoptose Celular);
- CIP-17 - C-kinase potentiated Protein phosphatase-1 Inhibitor (Inibidor da fosfatase da Proteína C potenciada);
- COX-2 – Ciclooxygenase-2;
- CREB - cAMP responsive element binding protein (Proteína do elemento ligante de adenosina monofosfato clico);
- Cul4A - Cullin-4 A (Culina 4A);
- D.O. – Densidade ptica;
- DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (Meio Eagle modificado de Dulbecco);
- DNA – cido Desoxirribonucléico;
- DN-TNF – Dominante Negativo do TNF- $\alpha$ ;
- DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crnica;
- EDTA – cido Etileno Diaminotricloroactico;
- EODS – European Occupational Disease Statistics (Estatística das Doenças Ocupacionais Europeias);
- EPI – Equipamento de Proteção Individual;
- EPM – Erro Padrão da Média;
- ERO – Espécie Reativa de Oxignio;
- FADD – Fas-Associated protein death domain (Proteína Fas Associada ao “Domínio de Morte”)
- FGF – Fibroblast Growth Factor (Fator de crescimento de Fibroblasto);
- GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Fator estimulante de colnia de granulócitos e macrófagos);
- H&E - Hematoxilina e Eosina;

HOIL-1 - hemoxidized iron-regulatory protein 2 ubiquitin ligase-1 (Ubiquitina ligase -1 da proteína reguladora de ferro-2 pela heme oxidase);

HOIP - HOIL-1-interacting protein (Proteína de interação com HOIL-1);

ICAM-1 - Intercellular Adhesion Molecule 1 (Molécula de Adesão Intercelular 1);

ICD – TNF-R1's intracellular domain (Domínio Intracelular do TNFR1);

IgG – Imunoglobulina G;

IKK – IκB kinase (Quinase de Inibidor kappa B);

IL (n) – Interleukin (Interleucina);

IFN $\gamma$  – Interferon (Interferon  $\gamma$ );

IP<sub>3</sub> - Inositol trifosfato;

IκB – Inhibitor kappa B (Inibidor kappa B) ;

JNK – c-Jun NH(2)-terminal kinase (Quinase do terminal NH(2) de c-jun);

LC 20 – Light chains of myosin (Segmento Leve de miosina com 20 kDa);

LUBAC - Linear ubiquitin chain assembly complex (Complexo de montagem de ubiquitina linear);

M (n) – Receptor muscarínico (n);

MAPK - Mitogen-activated protein (MAP) kinases (proteína ativada pelo mitógeno);

MARCO - Macrophage receptor with a collagenous structure (Receptor de Macrófago com uma estrutura de Colágeno);

MCP-1 - Monocyte chemotactic protein-1 (Proteína quimiotática de monócito-1);

MIP - Macrophage inflammatory protein (Proteína Inflamatória de Macrófago);

MLCK – Myosin-light-chain kinase (quinase de cadeia leve de miosina)

MMP – Matrix Metalloproteinase (Metaloproteinase de Matriz);

MPO – Mieloperoxidase;

mRNA - Messenger ribonucleic acid (Ácido Ribonucléico mensageiro);

mTNF- $\alpha$  – TNF- $\alpha$  membranar;

MTT – Corante de tetrazólio;

MyD88 - Myeloid differentiation primary response 88 (Resposta primária de diferenciação de mielóides 88);

NADPH-oxidase - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (Oxidase de dinucleotídeo fosfato de adenina e nicotinamida);

NALP3 - NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (Receptor da Família tipo NOD, contendo domínio de piridina 3);

NEMO - NF-kappa-B essential modulator (Modulador essencial de NF- $\kappa$ B);



NF- $\kappa$ B – Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (Fator Nuclear kappa de aumento de cadeia leve de linfócitos B ativados);

NOD – Nucleotide-binding Oligomerization Domain (Domínio de Oligomerização ligados a Nucleotídeo);

p53 – proteína 53;

PBS - Phosphate buffered saline (Salina Tampão Fosfato);

PG (E<sub>2</sub>) – Prostaglandina 2;

PKA – Protein Kinase A (Proteína quinase A);

RHD – Rel homology domain (Domínio de Homologia Rel);

Rho – Ras homolog gene family, member A (Membro A da Família homóloga do gene Ras);

RIP – Receptor-Interacting Protein (Proteína de Interação com o Receptor);

RNA - Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucléico);

SAPK - Stress-activated protein kinases (Proteína ativadora de estresse);

SCARA5 - scavenger receptor class A, member 5 (Membro 5 do Receptor “Scavenger” Classe A);

SEK-1 - stress-activated protein 1 (Proteína quinase ativada por estresse 1);

SODD – Silencer of death domains (proteína silenciadora do “domínio de morte”);

SR – Scavenger receptor;

SRCL - Scavenger receptor with C-type lectin (Receptor “Scavenger” com Lecitina tipo C);

sTNF- $\alpha$  – TNF- $\alpha$  solúvel;

TACE - TNF $\alpha$  Converting Enzyme (Enzima conversora de TNF- $\alpha$ );

TAK-1 – Transforming growth factor- $\beta$  activated kinase-1 (Quinase ativada por TGF- $\beta$ 1);

TGF- $\beta$ 1 □□- Transforming growth factor beta 1 (Fator Transformador de crescimento beta 1);

Th17 – T helper 17 (linfócito T auxiliar 17);

TIMP-1 - Tissue inhibitor of metalloproteinases (Inibidor de metaloprotease de tecido);

TNFR – Tumor Necrosis Factor Receptor (Receptor de Fator de Necrose Tumoral);

TNFR<sup>-/-</sup> – Deficientes para o receptor de TNF;

TNF- $\alpha$  – Tumor Necrosis Factor – alpha (Fator de Necrose Tumoral- alfa);

TRADD – Tumor Necrosis Factor Receptor 1-Associated Death Domain Protein (Proteína do Domínio de Morte Associado ao Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral);

TRAF – TNF receptor-associated factor (Fator Associado ao Receptor de TNF);

VCAM-1 - Vascular cell adhesion molecule 1 (Molécula de adesão de célula vascular 1);

VEGF - Vascular Endothelial Cell Growth Factor (Fator de crescimento de célula endotelial vascular);

$\alpha$ -SMA –  $\alpha$ -Smooth muscle actin (actina de músculo liso do tipo  $\alpha$ );

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estimativa de trabalhadores expostos a poeira contendo partícula de sílica cristalina no mundo .....	14
Figura 1.2 – Prevalência de casos de silicose nas regiões Sul e Sudeste do Brasil .....	16
Figura 1.3: Esquema representativo do processo patológico ocorrido no pulmão após o depósito de sílica no parênquima pulmonar .....	22
Figura 1.4: Esquema representativo do mecanismo de ação do TNF- $\alpha$ .....	27
Figura 1.5: Esquema representativo dos mecanismos de ação dos inibidores de TNF- $\alpha$ .....	34
Figura 3.1 – Esquema indução da silicose experimental e tratamentos .....	37
Figura 4.1: Efeito da talidomida sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos instilados com sílica (10 mg/50 $\mu$ l) .....	45
Figura 4.2: Efeito da talidomida sobre alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos .....	46
Figura 4.3: Efeito da talidomida sobre a deposição de colágeno no pulmão de camundongos silicóticos .....	48
Figura 4.4: Efeito da talidomida sobre a geração de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos silicóticos .....	49
Figura 4.5: Efeito da talidomida sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos silicóticos .....	50
Figura 4.6: Efeito da talidomida sobre a expressão de $\alpha$ -SMA no pulmão de camundongos silicóticos .....	52
Figura 4.7: Efeito da talidomida sobre a ativação de macrófagos alveolares (AMJ2C11) estimulados com sílica <i>in vitro</i> .....	53
Figura 4.8: Efeito da talidomida sobre a viabilidade e proliferação de fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos silicóticos estimulados com IL-13 <i>in vitro</i> .....	54
Figura 4.9: Efeito da talidomida sobre a ativação de células epiteliais humana (A549) estimulados com sílica <i>in vitro</i> .....	56

Figura 4.10: Efeito do infliximabe e do XPro-1595 sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos instilados com sílica.....	57
Figura 4.11: Efeito do infliximabe e do XPro-1595 sobre alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos .....	59
Figura 4.12: Efeito do infliximabe e do XPro1595 sobre a deposição de colágeno no pulmão de camundongos silicóticos .....	60
Figura 4.13: Efeito do infliximabe e do XPro-1595 sobre a geração de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos silicóticos .....	61
Figura 4.14: Efeito do infliximabe e do XPro1595 sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos silicóticos .....	63
Figura 4.15: Efeito do infliximabe sobre a expressão de $\alpha$ -SMA no pulmão de camundongos silicóticos .....	64
Figura 4.16: Efeito do infliximabe sobre a ativação de macrófagos alveolares (AMJ2C11) estimulados com sílica <i>in vitro</i> .....	65
Figura 4.17: Efeito do infliximabe sobre a viabilidade e proliferação de fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos silicóticos estimulados com IL-13 <i>in vitro</i> .....	66
Figura 4.18: Avaliação da resposta proliferativa de fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos instilados com sílica e estimulados com IL-13 ou TNF- $\alpha$ <i>in vitro</i> .....	68
Figura 4.19: Efeito do infliximabe e XPro 1595 sobre a ativação de células epiteliais humanas (A549) estimuladas com sílica <i>in vitro</i> .....	69
Figura 4.20: Efeito do infliximabe e XPro1595 sobre a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no pulmão de camundongos silicóticos .....	70
Figura 6.1 – Esquema do efeito de compostos anti-TNF-a sobre o processo inflamatório na silicose .....	80

## **1 – Introdução**

O pulmão é um órgão vital para a sobrevivência do ser humano, pois permite a eliminação de metabólitos da respiração celular e a biodisponibilidade de oxigênio para o metabolismo celular, através da troca gasosa. No início, Galeno (129 – 200, D.C.) acreditava que a troca gasosa era realizada no coração, onde o sangue passava do ventrículo direito para o esquerdo através de micro-poros e no ventrículo esquerdo ele se misturaria com o ar para formar o “espírito vital”. Entretanto, foi somente em 1628 que Willian Harvey (1578 – 1657), baseado no trabalho de Ibn al-Nafis (1210 – 1288), demonstrou que o sangue passava do ventrículo direito para a artéria pulmonar, passando pelos pulmões e retornando para o coração através das veias pulmonares (1). Dessa forma, qualquer alteração na composição e estrutura pulmonar compromete a sua principal função e conseqüentemente a qualidade de vida do paciente. Neste contexto, insere-se a silicose que é uma doença inflamatória pulmonar, de caráter ocupacional. Ela ocorre devido à inalação de poeira contendo partículas de sílica cristalina. O depósito destas partículas no parênquima pulmonar é capaz de ativar células residentes e desencadear um processo inflamatório com excessiva produção de quimiocinas e citocinas que culmina em deposição de colágeno e formação de granulomas, comprometendo, assim, a função pulmonar. Dentre as citocinas envolvidas nesse processo encontra-se o TNF- $\alpha$ , uma citocina pleiotrópica, pró-inflamatória gerada por diversos tipos celulares que participa na formação do granuloma e depósito de colágeno, através da ativação de células do sistema imunológicos e estruturais como macrófagos e fibroblastos, respectivamente.

### **1.1 – Sistema respiratório humano**

O sistema respiratório tem como principal função permitir a troca gasosa entre o meio ambiente e o sangue, garantindo níveis de oxigênio adequados à sobrevivência celular. Por estar em contato constante com o ar não-estéril do ambiente ele também funciona como uma barreira primária contra patógenos, a partir da ativação da imunidade inata. Para completar, o pulmão, ainda pode desempenhar um papel importante no mecanismo da fala, na filtração de microtrombos (provenientes de veias sistêmicas); no metabolismo de peptídeos, neurotransmissores e de fármacos, seja inalatório ou sistêmicos (2). Em humanos o pulmão direito está dividido em 3 lobos por fissuras transversas e oblíquas (superior, médio e inferior) e o esquerdo em 2 lobos divididos por uma fissura oblíqua (superior e inferior), separado pela

língua (2-4). Para desempenhar essas funções, há um sistema que comporta e conecta diferentes estruturas. Didaticamente, o sistema respiratório está dividido em duas principais regiões: i) porção condutora, que por sua vez divide-se em trato respiratório superior (nariz, faringe e laringe) que possui como principal função filtrar, aquecer e umidificar o ar inalado, e trato respiratório inferior (traquéia e brônquios principais). Os brônquios principais ao penetrarem nos pulmões dirigem-se para baixo e para fora e ao se ramificarem dão origem aos brônquios lobares ou de segunda ordem. As ramificações seguintes de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> gerações são chamadas de brônquios segmentares. A continuidade das divisões forma estruturas cada vez menores que dão origem a uma estrutura ainda mais complexa que são os brônquios pequenos (5<sup>a</sup> – 11<sup>a</sup> gerações), que podem chegar a 1 mm de diâmetro. A partir da 12<sup>a</sup> geração os brônquios pequenos se transformam em bronquíolos terminais, que por sua vez, dão origem aos bronquíolos respiratórios (primeira geração que possuem alvéolos em sua parede) que marcam, então, o início da segunda região, ii) a porção respiratória, constituída por ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos (23<sup>a</sup> geração) que compõem no seu todo o parênquima pulmonar (2,4-5). É na porção respiratória onde ocorre a principal função dos pulmões - a troca de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> entre os gases alveolares e o sangue.

Cada região possui composições celulares diferenciadas, a porção que vai da traquéia até os bronquíolos respiratórios é revestida pelas células epiteliais colunares ciliares, células caliciformes e as glândulas submucosas, que são responsáveis pela depuração mucociliar e produção de muco. Na junção entre os bronquíolos e os alvéolos encontram-se as células não ciliadas de clara, responsáveis pela produção de surfactante. Já as células que formam os ductos alveolares e alvéolos são chamadas de pneumócitos tipo I, que são responsáveis pela formação da membrana alvéolocapilar e são relativamente desprovidas de organelas, e os pneumócitos tipo II, se encontram principalmente na junção entre os alvéolos. Estas células possuem núcleos grandes e microvilos e ainda contém corpos lamelares osmiofílicos estriados, responsáveis por armazenar o surfactante produzido pelas mesmas (2).

### **1.1.1 – Sistema respiratório em roedores**

A utilização de animais de experimentação, com especial ênfase em roedores, possui ampla aplicação na pesquisa básica de forma a permitir que sejam respondidas diversas questões, dentre elas, o estudo de eficácia, segurança farmacológica e toxicológica de fármacos recém sintetizados. Estes estudos são necessários para descrever os efeitos adversos

do fármaco, assim como proteger os participantes da triagem clínica (6). Para isso, é necessário um conhecimento aprofundado da fisiologia destes animais. No caso de camundongos, animais utilizados no presente estudo, o pulmão possui capacidade total com cerca de 1 mL. Estes animais também possuem 2 pulmões, onde o direito divide-se em 4 lobos (superior, médio, inferior e pós-cava) e o esquerdo não possui divisão (7). Em 1996, Valarius (8) descreveu que o calibre dos brônquios de roedores é inversamente proporcional ao seu tamanho, ou seja, o diâmetro relativo do brônquio central diminui de acordo com o aumento do volume pulmonar e do peso corporal do roedor, e conseqüentemente, a resistência das vias aéreas era reduzida e a freqüência respiratória aumentada. Em camundongos, o desenvolvimento das vias aéreas diverge dos humanos, pois dá-se de forma monopodial, iniciando-se a partir da ramificação da traquéia formando os brônquios principais e em seguida, dividindo-se para formar os lobos direito e esquerdo do pulmão. Nesses animais não é possível a identificação de brônquios e bronquíolos, pois os mesmos não possuem cartilagem e os bronquíolos terminais geralmente dividem-se nos ductos alveolares. (9). Além da diferença de proporção entre o calibre (diâmetro) das vias aéreas de camundongos e humanos, os camundongos possuem cerca de 4-6 ramificações a menos que os humanos e, o parênquima representa 18% do volume total do órgão, 6% a mais que em humanos (12% do volume total do pulmão). Todavia, camundongos possuem alvéolos de tamanho reduzido, o que implica em diminuição da superfície para troca gasosa (7,9) e conseqüentemente na necessidade de uma freqüência respiratória acelerada como forma de manter a homeostasia.

## **1.2 – Mecânica pulmonar**

O mecanismo de ventilação consiste na caixa torácica, músculos intercostais, diafragma e componentes elásticos e colágenos dos pulmões, importante para a movimentação do órgão. A troca gasosa que ocorre nos pulmões através da difusão do ar do meio externo para o interno e vice-versa é dependente de dois processos iniciais: a inspiração e a expiração. Para que ocorra a inspiração o diafragma se contrai através de estímulos nos nervos frênicos e tensiona para baixo (aproximadamente 1,5 cm quando a respiração é tranquila e entre 6 a 7 cm durante a respiração profunda) a superfície inferior dos pulmões. Simultaneamente, os músculos intercostais internos paraesternais que conectam o esterno inferior as costelas são inclinados para baixo e para frente. Este movimento faz com que as costelas e o esterno afastem-se para fora (ação em alça de balde) e para frente (ação de

bombeamento), respectivamente. Aumentando o diâmetro ântero-posterior do tórax e dessa forma, a pressão alveolar diminui e os alvéolos se expandem gerando um gradiente de pressão entre a boca e os alvéolos, fazendo com que o ar entre nos pulmões (2,4). A expiração geralmente é um processo passivo, onde ocorre a retração dos tecidos distendidos e a liberação da energia armazenada devido a inspiração. Porém, na expiração forçada, os músculos abdominais, oblíquo interno e externo e o músculo transverso do abdome ao contraírem, empurram o diafragma para cima. De forma semelhante, os músculos intercostais internos paraesternais tracionam as costelas para cima e para dentro, diminuindo o volume torácico e conseqüentemente aumentando a pressão intrapleural e alveolar, expulsando o ar de dentro dos pulmões (2,4).

O controle da respiração ocorre de duas formas complementares: a) o primeiro se dá através do controle químico da ventilação que é realizado através de quimiorreceptores (centrais e periféricos, localizados fora do pulmão) que detectam as pressões parciais de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, assim como o pH arterial. O quimiorreceptor central está localizado na superfície ventrolateral da medula oblongata (bulbo) e é sensível à concentração de CO<sub>2</sub> e ao pH do líquido cerebrospinal, porém não responde à pressão parcial de O<sub>2</sub> e não é diretamente afetado pelo pH sanguíneo. Já os quimiorreceptores periféricos localizam-se dentro dos corpos carotídeos e aórticos, são sensíveis à diferença de pressão parcial de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, assim como à variação da concentração de H<sup>+</sup> (2); b) o segundo controlador da respiração regula a ventilação através de neurônios localizados na ponte e na medula oblongata, chamados de centros respiratórios. Os neurônios localizados na ponte possuem 3 funções principais: i) gerar potenciais de ação que resultam em impulsos nervosos no diafragma e músculos inspiratórios; ii) exercer efeito excitatório sobre a área inspiratória do bulbo, prolongando o potencial de ação e iii) inibir a inspiração, dessa forma, regular o volume da inspiração e, conseqüentemente a freqüência respiratória (4,10). Na medula oblongata, encontra-se o grupo respiratório dorsal, neurônios responsáveis pela inspiração através da recepção de estímulos de quimiorreceptores centrais e periféricos, ou seja, são responsáveis pelo ritmo básico da ventilação (2,4).

Além desses dois controles principais da respiração, temos também a participação de neurônios motores do córtex que medeiam o controle voluntário da respiração, sendo capazes de induzir a hiperventilação e reduzir à metade a pressão parcial de CO<sub>2</sub>. Concomitantemente, o sistema límbico e o hipotálamo podem influenciar a freqüência respiratória (2,4).



A troca de gases é realizada através do processo de difusão passiva e é regida pela lei de Fick, onde a velocidade de transferência do gás através de um tecido é inversamente proporcional à espessura do tecido e proporcional a área desse tecido assim como, à diferença de pressão parcial entre os dois ambientes. A velocidade de transferência é proporcional à solubilidade do gás e inversamente proporcional a raiz quadrada do peso molecular, o que significa dizer que o O<sub>2</sub> se difunde 20 vezes mais devagar que o CO<sub>2</sub>, pois sua solubilidade no líquido é bem menor, apesar de pesos moleculares parecidos (2,4). Como o pulmão de um indivíduo adulto possui cerca de 300 milhões de alvéolos e com espessura entre 0,2 µm e 0,3 µm, garante o ambiente ideal para que essa difusão ocorra. Entretanto, entre os fatores que podem influenciar na troca gasosa, devem ser levados em consideração: a Lei de Henry que considera a necessidade da molécula a ser difundida não reagir com o líquido, onde a concentração parcial de um gás é proporcional a concentração do gás no líquido, permitindo que a molécula se desloque em direção ao líquido e o peso molecular de cada gás.

É na membrana alvéolo-capilar, formada pelo epitélio alveolar e o endotélio capilar, que o processo de difusão ocorre. Nesta, o oxigênio proveniente do ar inspirado e que chega aos sacos alveolares, e o gás carbônico proveniente do metabolismo celular que circulam pelo capilar, difundem-se dos capilares para a corrente sanguínea ou vice-versa de forma dependente de um gradiente de concentração e pressão. A troca gasosa é limitada por dois fatores: a *perfusão*, onde a absorção de um gás é dependente do fluxo sanguíneo do capilar pulmonar e a *difusão*, onde a troca gasosa é limitada pela propriedade de difusão da barreira hematogásica. Ao atingirem a circulação sanguínea, tanto o O<sub>2</sub> quanto o CO<sub>2</sub> necessitam serem transportados devido a sua baixa capacidade de dissolução no sangue. Enquanto o oxigênio pode ser carregado dissolvido no sangue ou acoplado com a hemoglobina presente nas hemácias (1,34 mL de oxigênio/hemoglobina), o gás carbônico também pode ser carregado na forma de bicarbonato (~60% do CO<sub>2</sub> é carregado dessa forma) (2,4).

### **1.2.1 – Receptores Pulmonares**

Além dos quimiorreceptores centrais e periféricos que atuam no controle da ventilação, também podemos citar outros receptores que atuam no processo da fisiologia respiratória e auxiliam na geração de uma resposta física frente à um estímulo. Dentre eles podemos citar:

Receptores de estiramento: Possuem como principal função controlar a capacidade de insuflação do pulmão, evitando que a respiração seja muito profunda e a frequência respiratória baixa (lenta), e assim, atrasando o ciclo seguinte. Esses receptores localizam-se principalmente na musculatura lisa da parede brônquica;

Receptores irritantes: Respondem pela indução da tosse, hiperpnéia, constrições de brônquios e laringe, respirações e suspiros profundos, são estimulados por gases e poeiras irritantes, como a fumaça de cigarro e a partícula de sílica. Eles se localizam por toda a extensão das vias aéreas, entre as células epiteliais;

Proprioceptores: Responsáveis pela adaptação da respiração frente ao aumento de carga. Estão envolvidos na sensação de dispnéia quando é necessário grande esforço respiratório para movimentar os pulmões e a parede torácica, como ocorre no caso de doenças pulmonares obstrutivas crônicas (por exemplo, a asma). São capazes de regular o volume corrente e a frequência respiratória até atingir valores ideais. Esses receptores estão localizados nos órgãos tendinosos de Golgi, fusos musculares e articulações costovertebrais dos músculos respiratórios;

Receptores de dor e temperatura: Causadores de breves períodos de apnéia, seguida de hiperventilação quando estimulados. Assim como o aumento da temperatura também pode levar a hiperventilação por ativação destes receptores;

Receptores nasais e de vias aéreas superiores: Similares aos receptores irritantes que respondem a estímulos químicos e mecânicos, levando a broncoconstrição, tosse e espirros. Geralmente localizam-se no nariz, nasofaringe, laringe e traquéia;

Barorreceptores arteriais: São responsáveis pela depressão da respiração quando estimulados. Estão situados nos seios carotíco e na parede da aorta e o aumento da pressão sanguínea arterial gera hipoventilação reflexa;

Dentro do mecanismo da respiração e conhecendo a fisiologia pulmonar, devemos considerar a função pulmonar como um fator importante, pois ela determina quais são as condições reais fisiopatológicas do pulmão através de dois parâmetros principais: i) a resistência das vias aéreas e ii) a elastância do parênquima pulmonar (4).

### **1.2.2 – Resistência das vias aéreas**

A resistência pulmonar total é a soma da resistência do tecido pulmonar, que normalmente representa 10% da resistência pulmonar total, e a resistência das vias aéreas (11). A resistência das vias aéreas é calculada através da soma da resistência de cada via aérea e varia de acordo com o tamanho, a frequência respiratória, o volume pulmonar e o fluxo de ar. Dessa forma, como descreve a equação de Poiseuille, a resistência é inversamente proporcional a quarta potência do raio, neste caso, das vias aéreas. Isto significa dizer que quanto maior o raio, menor a resistência (4,7,11).

Assim, vários fatores influenciam a resistência das vias aéreas, como por exemplo, a característica do fluxo de ar e a frequência respiratória. Neste caso, o aumento da frequência respiratória diminui a resistência das vias aéreas. Um fluxo de ar turbulento, como encontrado em vias aéreas superiores, ou seja, de alto calibre (Ex.: traquéia, brônquios e bifurcações dos brônquios), em conjunto com o aumento do volume de ar confere um aumento da resistência das vias aéreas quando se compara com as vias aéreas inferiores, (Ex.: bronquíolos respiratório) que apresentam fluxo de ar laminar (4,11).

Sendo assim, podemos definir a resistência das vias aéreas como a diferença de pressão entre os alvéolos e a entrada de ar, dividida pela taxa de fluxo de ar. Em humanos, a mensuração da resistência das vias aéreas é realizada até a sétima geração da árvore brônquica, uma vez após este nível os valores brutos da resistência são insignificantes (4,7,11). No caso de camundongos, por exemplo, a existência de vias aéreas menores, faz com que o fluxo de ar seja laminar.

Alterações da resistência das vias aéreas estão geralmente associadas à alteração do calibre das mesmas, dessa forma, a excessiva produção de muco e conseqüente deposição nas vias aéreas, assim como a presença de granulomas pressionando as vias aéreas levam à diminuição do calibre das mesmas e aumentam os índices de resistência pulmonar (4,11-12).

### **1.2.3 – Elastância**

As propriedades elásticas do pulmão conferem ao mesmo a capacidade de distensão, que permitirá a entrada do ar inspirado, e retração, que tem como função expelir o ar de dentro dos pulmões. A capacidade de estiramento pulmonar que corresponde a variação de

volume pulmonar por unidade de variação da pressão transpulmonar (diferença de pressão entre o lado interno e externo do pulmão) é denominada complacência pulmonar. Esta propriedade é normalmente avaliada através da *complacência dinâmica* que é a diferença entre o volume pulmonar e a pressão esofágica no final da inspiração e da expiração, onde os pulmões estão aparentemente em sua fase estacionária (2,4,11).

Outra forma de avaliar as propriedades elásticas essenciais do pulmão para que ocorra a ventilação se dá através da elastância, que é definida como o inverso da complacência, dessa forma, é definida como a reatância do parênquima pulmonar à entrada do ar atmosférico (13,14). De forma semelhante à complacência, para obterem-se os valores de elastância durante a respiração normal, são considerados os parâmetros de pressão transpulmonar e o volume de ar mobilizado. As alterações nos valores referenciais deste parâmetro estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças pulmonares. Elevados níveis de elastância estão relacionados ao aumento no conteúdo de tecido fibroso, como por exemplo, com o depósito excessivo de colágeno na fibrose intersticial difusa e nas pneumoconioses, que restringem os alvéolos de inflarem-se. Por outro lado, em doenças como o enfisema pulmonar que se caracteriza por um processo de lesão e destruição do parênquima pulmonar, verificam-se valores reduzidos de elastância devido a quebra de fibras elásticas do pulmão por enzimas como metaloproteases de matriz (4,13,15).

Além dos fenômenos citados anteriormente, outras situações podem alterar a função pulmonar de um indivíduo, como é o caso da hiper-reatividade das vias aéreas (16).

#### **1.2.4 – Hiper-reatividade das vias aéreas**

Nas doenças pulmonares podemos observar freqüentemente alterações das vias aéreas que podem induzir o fenômeno de hiper-reatividade, que consiste em uma resposta de contração excessiva do músculo liso das vias aéreas causado por um estímulo que, em geral, causaria pouca ou nenhuma resposta contrátil da musculatura lisa em condições de homeostasia (14). A hiper-reatividade é caracterizada por dois componentes principais: i) a sensibilidade, que está relacionada à concentração mínima de um agente broncoconstritor necessária para indução do broncoespasmo e a ii) reatividade, que consiste na alteração do calibre da via aérea conforme o aumento da concentração do agente broncoconstritor (11).

Até o presente momento, dois tipos de hiper-reatividade das vias aéreas foram descritos: o primeiro reflete, pelo menos em parte, uma reação inflamatória crônica e é caracterizado por uma resposta persistente; o segundo está relacionado com uma inflamação aguda e ocorre de forma intermitente. O fenômeno de hiper-reatividade tem sido freqüentemente associado à ocorrência de doenças pulmonares de caráter inflamatório, como a asma brônquica, e/ou ainda com doenças de caráter inflamatório e ocupacional como as pneumoconioses (14,17).

A natureza dos estímulos que levam à contração das vias aéreas pode variar bastante, entretanto existem dois tipos principais: i) e os estímulos que atuam de forma direta, como exemplos, as aminas vasoativas histamina e serotonina, que são capazes de se ligarem a receptores específicos presentes em células musculares lisas. Entretanto, a serotonina, atua ativando subtipos específicos de receptores membranares apenas em roedores; ii) os estímulos que atuam de forma indireta, como, por exemplo, antígenos, que podem agir estimulando alguns tipos celulares, como os mastócitos, a liberar mediadores capazes de induzir a contratilidade da musculatura lisa das vias aéreas. Este tipo de estímulo, ainda pode ser gerado através de estímulos químicos, como adenosina monofosfato ou por estímulos que alteram o ambiente físico das células das vias aéreas, como, por exemplo, exercício, ar frio e hiperventilação (17,18). Ainda no contexto de mediadores indiretos, podemos chamar atenção para outra classe de mediadores farmacológicos que são utilizadas em testes de funcionalidade pulmonar. Eles são chamados de agonistas colinérgicos (metacolina, acetilcolina e carbacol) e atuam através da ligação a receptores específicos do tipo muscarínico presentes na superfície da membrana celular, gerando efeitos broncoconstritores (19). A ligação destes mediadores ao receptor do tipo  $M_3$ , presente nas células musculares lisas das vias aéreas leva à ativação da proteína  $G_q$ , que por sua vez, libera a subunidade  $\alpha$ , que ativa fosfolipase C, responsável por liberar diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $IP_3$ ). O  $IP_3$  ao se ligar em seu receptor no retículo sarcoplasmático libera  $Ca^{+2}$  no citoplasma. O cálcio liberado favorece a formação do complexo cálcio-calmodulina, que ativa a cadeia leve de miosina quinase (MLCK) e através da fosforilação da cadeia leve de miosina, ocorre a ativação da miosina ATPase, como consequência, há a ligação da miosina à actina resultando no processo de contração muscular (16,20). Os receptores  $M_1$  e  $M_2$  também estão presentes nas vias aéreas atuam como agonistas broncoconstritores através da estimulação do gânglio parassimpático e do nervo parassimpático terminal, respectivamente (21). De forma complementar, An e Fredberg (2007) revisaram que o mecanismo de estiramento da célula do

músculo liso através de flutuações de forças poderiam ativar RhoA e conseqüentemente a p38 MAPK (14).

O processo de transdução de sinalização intracelular para a contração de músculo liso das vias aéreas também pode ocorrer de forma independente de cálcio, que ocorre principalmente através da inibição da cadeia leve de miosina fosfatase (MLCP), que é responsável por desfosforilar o segmento leve com 20 KDa (LC 20) e desativar a cadeia de miosina. Sua inibição permite que uma grande quantidade de LC 20 seja fosforilada após um determinado estímulo, aumentando a força de contração (20). As principais vias de inibição da MLCP é através da via de sinalização de RhoA/Rho quinase e da CPI-17, que fosforilam a subunidade de ligação da miosina da MLCP impedindo a desfosforilação da MLCK.

### **1.3 – Pulmão vs. Doença**

O processo de inalação do ar descrito anteriormente também permite a exposição de diversos agente agressores incluindo patógenos, poluentes, substâncias antigênicas e outros xenobióticos. Além disso, o ambiente pulmonar quente e úmido, com ampla área de exposição, fornece condições ideais para a proliferação de microorganismos (2). Com a finalidade de manter sua integridade, indispensável ao fenômeno de trocas gasosas que se dá ao nível dos alvéolos e capilares, o pulmão no curso do processo evolutivo, manteve um sistema de detoxicação e de defesa particularmente adaptativos e eficazes. Nas narinas e na nasofaringe, encontramos algumas barreiras físicas, como pelos, cílios e muco, responsáveis por impedir que partículas iguais ou maiores que 10 µm penetrem nas vias aéreas inferiores. Apenas as partículas menores ou iguais à 5 µm são capazes de chegar a traquéia (2). Os cílios são estruturas alongadas existentes nas células epiteliais e possuem como principal função a remoção das partículas através de batimentos metacrônicos que permitem a movimentação do muco e partículas agregadas em direção a boca. Esse processo é denominado depuração mucociliar (2). O muco é constituído por glicoproteínas ricas em mucina (carboidrato responsável pela característica física, semelhante a um gel, do muco) e uma fase iônica solúvel, ambos produzido por células caliciformes, presentes no epitélio e glândulas submucosa e células epiteliais. Além disso, o muco possui outros fatores que também auxiliam na proteção pulmonar, como exemplos podemos citar antiproteases, como a  $\alpha_1$ -antitripsina que é responsável pela inibição de proteases como tripsina e elastase produzidas

por bactérias e neutrófilos, e a proteína A do surfactante, que possui um papel importante sobre a tensão superficial e sobre a fagocitose por células do sistema imune (2).

Além das barreiras físicas, existem também células residentes que participam do combate a corpos estranhos, essas células são chamadas de macrófagos alveolares. Esses macrófagos são fagócitos mononucleares, do sistema imune inato, responsáveis pela fagocitose de microorganismos e partículas estranhas ao organismo. O material orgânico fagocitado costuma ser digerido enquanto o material inorgânico permanece sequestrado no interior da célula. Além da fagocitose, os macrófagos alveolares também são responsáveis pela depuração de proteínas do surfactante, atuam como célula apresentadora de antígenos e suprimem respostas imunes desnecessárias, através da produção de citocinas antiinflamatórias como a IL-10. Apesar de todo o mecanismo de defesa descrito acima, as estruturas alveolares são bastante finas e com grande susceptibilidade a respostas de natureza inflamatória. Isto tem por conseqüência a ocorrência de uma ampla gama de doenças inflamatórias, que podem ser classificadas de uma maneira mais geral em obstrutivas e restritivas (2,5,10).

Nas doenças obstrutivas observa-se presença de edema peribrônquico, que altera a fisiologia pulmonar, levando ao aumento da resistência das vias aéreas ao fluxo de ar, em conseqüência de obstrução total ou parcial as vias aéreas. E ainda, no processo obstrutivo podem levar à contração do músculo liso brônquico e ao estreitamento das vias aéreas pela perda da tração radial devida à destruição do parênquima. Já nas doenças restritivas a expansão do pulmão é restringida devido a alterações no parênquima que repercutem na capacidade vital e na redução do volume pulmonar (2,23). No desenvolvimento da silicose, devido ao depósito de colágeno e, conseqüente formação dos granulomas no parênquima pulmonar observa-se inicialmente uma doença com características restritivas. Entretanto, em uma fase mais tardia com o avanço da doença e crescimento dos granulomas e, conseqüentemente, a coalescência dos mesmos, há uma pressão nas vias aéreas que obstrui o fluxo de ar caracterizando a silicose também como uma doença obstrutiva (24-27).

#### **1.4 – Silicose**

*“A poeira, que é agitada e batida devido à escavação penetra na traquéia e nos pulmões e produz dificuldade em respirar.”* Foram com essas palavras que Georg Agricola descreveu a silicose em 1556. A silicose é uma doença pulmonar de caráter ocupacional

descrita desde a antiguidade, e é classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como pneumoconiose, sendo esta, definida como pneumopatias relacionadas etiologicamente a inalação de poeira em ambientes de trabalho. A silicose é uma doença irreversível caracterizada por alveolite e fibrose difusa, sendo considerada uma doença restritiva, e por consequência apresenta redução da função pulmonar, principalmente nos parâmetros de elastância e resistência das vias aéreas (28). Ela é causada pela inalação de poeira contendo partículas de sílica cristalina, que está presente em cerca de 60% da crosta Terrestre. Apesar do empenho para eliminação da silicose, de acordo com a EODS (European Occupational Disease Statistics), até 2001 a silicose era a sexta doença mais freqüente. E apesar de possuir métodos preventivos eficientes, não possui tratamento eficaz, portanto ainda é amplamente distribuída por todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento (29,30).

#### **1.4.1 – Histórico e epidemiologia**

Acredita-se que os primeiros casos de silicose provavelmente tenham surgido na idade da pedra, quando o homem começou a explorar a crosta Terrestre e a fabricar instrumentos. Porém, somente em aproximadamente 430 a.C., após a observação de mineiros, que Hipócrates descreveu as primeiras doenças pulmonares relacionadas atividades ocupacional. Em 1556, Georg , “Agrícola” (1494 – 1555) voltou a relatar a correlação entre doença pulmonar e à exposição à poeira. Em 1807, Visconti utilizou pela primeira vez o termo silicose para denominar a doença, devido à revolução industrial no século XVII, período o qual, ocorreu aumento da exposição à sílica e consequente elevação no número de casos de pacientes portadores de pneumoconioses, especialmente no setor metalúrgico. A partir de então, enfatizaram-se pesquisas com a finalidade de compreender os riscos profissionais e o desenvolvimento da doença em atividades como indústria de cerâmica, cortes de pedras e fundição (30-32).

Durante a segunda Guerra Mundial, com o aumento de ocupação laboral em estaleiros, houve uma recrudescência de casos de silicose. Assim, no período pós-guerra tanto na Europa quanto nos Estados Unidos foram aprovadas leis severas referentes à saúde do trabalhador, como o estabelecimento dos níveis máximos de exposição às partículas de sílica pelos órgãos governamentais, resultando em uma significativa diminuição na prevalência dessa doença. Como, ainda hoje, a sílica cristalina é utilizada em diversos processos industriais, mesmo com as medidas preventivas e os limites de exposição estabelecidos já foram observados casos de



bronquite industrial, hipersecreção de muco, decréscimo da função pulmonar e aumento da incidência de câncer (31-35). As ocupações que manipulam sílica amplamente distribuída pelo globo terrestre e com isso, a silicose é verificada de forma abrangente em todo o mundo. Os países desenvolvidos possuem menor incidência, uma vez que há conscientização das empresas e trabalhadores para o cumprimento dos atos preventivos e incentivo para a substituição de algumas operações. No entanto, nos países em desenvolvimento, onde as condições de trabalho são precárias e as exposições são pouco controladas, observam-se índices de incidência e prevalência significativamente superiores (35,36).

Dados estatísticos mostram que entre 1991 a 1995, na China, ocorreram mais de 500.000 casos de silicose, com cerca de 6.000 novos casos e mais de 24.000 mortes a cada ano, a maioria entre trabalhadores de exposição prolongada (35). Entre 2001 a 2010, apenas na cidade de Guangzhou, na China, ocorreram 380 casos de doenças ocupacionais, destas, 20% foram identificadas como pneumoconiose e 77,6% deles, eram silicose (37). Em 2010, Wang e Zhang relataram 23.812 novos casos de pneumoconiose distribuído por todo o País, destes 9870 casos eram de silicose (38).

No Vietnã a incidência de silicose é cerca de 90% de todas as doenças ocupacionais, Em 2003, Lan e colaboradores estimaram cerca de 40 a 350 mil trabalhadores expostos a poeira de sílica distribuídos em 61 províncias no País (39). Na Índia há uma prevalência de 55% em grupos de trabalhadores de pedreiras de rochas sedimentárias de xisto, principalmente entre jovens. Athavale e colaboradores descreveram, em 2011, a incidência de 30,4% de silicose em trabalhadores de moinho de farinha com idade entre 22 e 75 anos que ficaram expostos por um período entre 6 e 45 anos, sendo 75% com exposição superiores a 10 anos (40). Neste ano (2013), Jindal relatou aproximadamente 11,5 milhões de trabalhadores expostos a poeira contendo sílica distribuídos em atividades regulares ou não (41). Na África, em 2008, estimava-se que 2,7% da população estava empregada no setor de mineração (248). Na África do Sul, com a aprovação da lei “Miner’s Phthisis Allowance”, artigo nº 34 de 1911, houve um decréscimo de 480 mil trabalhadores em 1988 para aproximadamente 160 mil trabalhadores com silicose em 2006, onde a grande parte destes trabalhadores era residente de Moçambique e Lesoto (42).

Em 2003 nos Estados Unidos, a OSHA estimou aproximadamente 2 milhões de trabalhadores expostos à poeira de sílica cristalina, distribuídos em ocupações como indústria e construção (43,44). Apesar disso, em 2005, Yassin e colaboradores descreveram redução da quantidade de partícula de sílica suspensa no ambiente de trabalho no período entre 1988 e

2003 quando comparado ao período de 1979 a 1987, o que levou a redução no número de casos de silicose(45). No período que compreendeu os anos entre 1996 e 2006 houve cerca de 750 novos casos de silicose relatados somente nos estados de Michigan e Nova Jersey. ainda hoje ocupações como produção industrial e construção continuam sendo a principal geradora de partículas de sílica livre (46,47). Entre 1968 e 2006 foram relatadas cerca de 16.650 mortes associada à silicose. Anualmente, aproximadamente 1140 trabalhadores a cada 9 milhões de habitantes morrem devido à silicose. Entretanto, esses índices apresentaram redução de 85% quando comparamos os períodos compreendidos entre 1968-1972 (1.034 mortes/ano) a 2002-2006 (156 mortes/ano) (48).

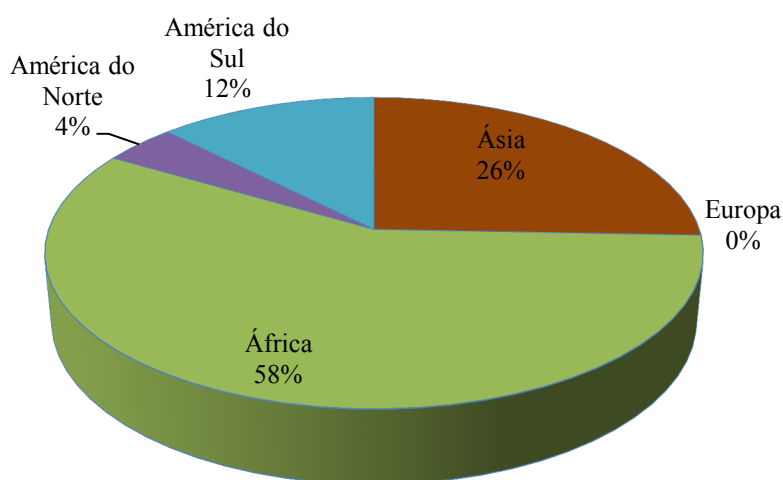


Figura 1.1 – Estimativa de trabalhadores expostos a poeira contendo partícula de sílica cristalina no mundo.

No Brasil, a silicose é a pneumoconiose de maior prevalência, embora tenham ocorrido nítidas melhorias em alguns setores na última década após a implementação da Iniciativa de Eliminação da Silicose nas Américas em 1995 (acordo realizado entre a OMS, a OPAS, a OIT, o Chile, o Brasil e o Peru). Os dados disponíveis sobre a ocorrência da silicose no Brasil referem-se a alguns ramos de atividade em situações focais. Apesar da ocorrência de silicose ser relatada desde 1886, os primeiros estudos epidemiológicos foram realizados em 1940 quando Teixeira e colaboradores observaram que dos 2.197 trabalhadores expostos à poeira de sílica em minas de ouro de Morro Velho (MG) 304 apresentaram quadro clínico compatível à silicose (49). Entre 1952 e 1954, acreditava-se que aproximadamente 40.000 e 80.000 trabalhadores estavam expostos à poeira contendo partículas de sílica nos Estados do

Rio de Janeiro e São Paulo, respectivamente (50,51). Em 1979, dos 3440 trabalhadores, pacientes de 27 Hospitais de Tisiologia nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, 119 apresentaram silicose (51). Em 1981, um estudo realizado por Nogueira e colaboradores, na cidade de Jundiaí (SP) mostrou que do total de 76 trabalhadores da indústria de cerâmica de Jundiaí do sexo masculino, com idade média de  $41,28 \pm 7,09$  anos, 56 indivíduos (o que representa 76,68% da população amostral) apresentaram alterações radiológicas bem definidas, características de silicose.

Como os estudos epidemiológicos de doenças ocupacionais no Brasil são escassos, somente em 2002 Carneiro e colaboradores demonstraram, que 126 indivíduos, apresentaram silicose após um estudo retrospectivo de um período entre janeiro de 1989 à dezembro de 2000 com 300 pacientes do Ambulatório de Doenças Profissionais do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (53). Em 2001, 2.065.929 de trabalhadores (5,6%) vinculados a empregos formais foram considerados definitivamente expostos à sílica, durante aproximadamente 30% de sua jornada de trabalho, incluindo-se atividades como construção civil, mineração em geral e indústria metalúrgica, dentre outras (54). Em 2006, Carneiro e colaboradores avaliaram a prevalência de silicose em 140 ex-mineiros que trabalharam em minas de ouro entre 1933 e 1986 nas Regiões de Nova Lima e Raposos, em Minas Gerais, com média de 15,8 anos de exposição à poeira de sílica e observaram que 83 apresentavam silicose (55). Ainda em Minas Gerais, apenas no período de abril a dezembro de 2002 na região de Joaquim Felício, 7,1% dos 70 trabalhadores de lapidários de pedra semipreciosa apresentaram silicose (56). Castro e colaboradores, em 2007, descreveram a relação entre o número das internações hospitalares na rede pública de saúde por pneumoconioses, sua frequência e distribuição, no período entre 1993 e 2003, quando foi observado um aumento de prevalência nas regiões Sul e Sudeste (57). Neste estudo, entretanto, não foram contabilizados trabalhadores não-vinculados a empregos formais e com estágio menos avançado da doença, logo não indica o total de casos de pneumoconioses em trabalhadores brasileiros. Somente em Campinas, entre 1978 e 2003 foram detectados 1147 casos de pneumoconioses, sendo destes 92,5% de silicose (58). Em 2011, utilizando um estudo transversal de 100 ex-mineiros que trabalharam em minas de cobre no Estado de Rio grande do Sul, observou-se que 35% desses trabalhadores desenvolveram silicose e apresentavam idade superior a 40 anos com período médio de exposição 14,5 anos (59). No mesmo ano foi publicado um estudo realizado no período entre 2005 e 2007, em São Thomé das Letras (MG), que mostrou incidência de casos de silicose em 46 dos 185 trabalhadores analisados. Estes pertenciam a ocupações de extração e beneficiamento, sendo ainda, descritos 8 casos de

silicose acelerada na área de beneficiamento (60).Atualmente, o número de trabalhadores expostos ainda é superior a 6.000.000 com registro de prevalência distribuída principalmente, na região Sul e Sudeste devido ao desenvolvimento industrial e do tipo de ocupação desenvolvida.

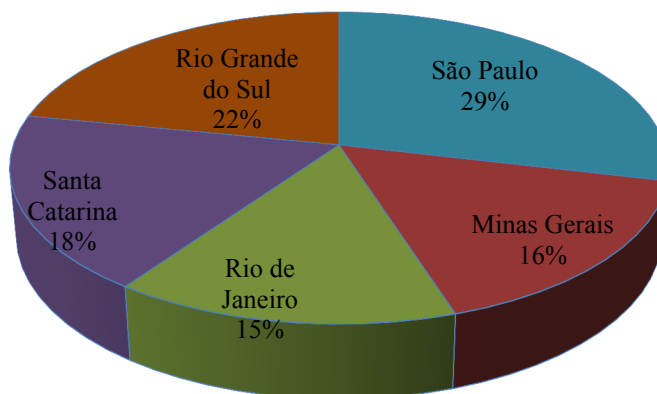


Figura 1.2 – Prevalência de casos de silicose nas regiões Sul e Sudeste do Brasil.

#### 1.4.2 – Formas de silicose e diagnóstico

A silicose pode ser classificada em três diferentes formas clínicas: i) silicose aguda ou silicoproteinose, que geralmente ocorre em profissionais que trabalham com jateamento de areia e moagem de pedra (43,61,62), e é caracterizada por inflamação intersticial com a presença de neutrófilos e corpos lamelares em macrófagos alveolares e hipertrofia dos pneumócitos tipo 2, assim como, excessiva produção de material protéico e surfactante, que se deposita nos alvéolos. Geralmente ocorre de 4 a 5 anos após a exposição. (32,63,64). ii) silicose acelerada pode ser considerada uma silicose em fase intermediária, já que suas características podem variar de alterações morfológicas similares às verificadas na silicose aguda, com presença de um exudato alveolar rico em lipoproteínas à inflamação crônica e com o desenvolvimento rápido e progressivo das lesões (64). No espaço intersticial observa-se espessamento dos septos alveolares decorrente de hiperplasia e hipertrofia de pneumócitos do tipo 2 e um intenso infiltrado de macrófagos com corpos lamelares e partículas de sílica (63) manifestando-se de cinco a dez anos após a exposição. Geralmente ocorre em ocupações como escavação de poços e corte de pedras (43,62); Tanto na silicose aguda, quanto na

acelerada o indivíduo é exposto a altas concentrações de partículas de sílica recém fraturada em um curto período. iii) silicose crônica é a manifestação mais comum da doença. Como atividades relacionadas encontram-se a indústria de beneficiamento e de transformação de minerais. Seu desenvolvimento é lento e progressivo, depende de uma exposição diária a pequenas concentrações de partículas de sílica podendo demorar de 10 a 20 anos para a doença se manifestar. Está associada a um processo inflamatório crônico, resultando no desenvolvimento da fibrose pulmonar. A persistência das partículas de sílica nos pulmões devido à ineficiência na sua eliminação, leva à manutenção do processo inflamatório com deposição de colágeno, sendo dessa forma, caracterizada como uma doença nodular, com lesões hialinizadas com frequente presença de sílica nos nódulos. Os granulomas estão localizados, em sua maioria na parte superior do pulmão e na pleura e com a exposição continuada aumentam de tamanho e densidade (32,43,61,62).

Geralmente, a silicose encontra-se associada a outras doenças de grande relevância na saúde pública como: tuberculose (32,65-68); neoplasias (32,66,69); e doenças autoimunes (66,70), o que complica ainda mais o estado de saúde do paciente e ainda dificulta o diagnóstico da doença.

O diagnóstico das pneumoconioses tem como base a história clínica e ocupacional do paciente e avaliação da função pulmonar e a radiografia simples de tórax, que deve ser avaliado por dois pneumologistas diferentes de acordo com a classificação da Organização Internacional do Trabalho (OIT). Segundo este Órgão, os nódulos podem ser classificados em 12 subcategorias (0/-, -0/0, 0/1, 1/0, 1/1, 1/2, 2/1, 2/2, 2/3, 3/2, 3/3, 3/+), onde a categoria 0 está relacionada a pequenas opacidades, relativamente raras; a categoria 1 compreende um número reduzido de pequenas opacidades; a categoria 2, caracteriza-se por numerosas opacidades de tamanho pequeno com alteração da estrutura normal dos pulmões, enquanto na categoria 3 observam-se numerosas opacidades com destruição total ou parcial da estrutura pulmonar. Com base nessa classificação, no Brasil, para o diagnóstico de silicose é necessário que a leitura da radiografia seja realizada por no mínimo dois leitores experientes e quando o resultado for igual ou maior que 1/0 (52,55). Entretanto, recentemente testes mais sofisticados como ressonância magnética, tomografia computadorizada de alta resolução têm sido igualmente empregados (32,61-64,71).

### 1.4.3 – Sílica

A sílica é um mineral formado por dois átomos de oxigênio e um de silício ( $\text{SiO}_2$ ) que não possui cor nem odor tendo ponto de fusão à 1.600 °C. Apesar da sílica manter a sua fórmula molecular, ela pode apresentar duas estruturas moleculares básicas diferindo apenas na organização de suas estruturas: a forma amorfa, menos tóxica, possui um rearranjo aleatório dos átomos e está presente em lã de vidro, sílica gel, e no vidro. Enquanto a forma cristalina, também chamada de forma livre, sendo considerada a mais tóxica, possui um rearranjo tetraédrico de quatro átomos de oxigênio ao redor de um átomo de silício, dessa forma, o compartilhamento dos átomos de oxigênio de um tetraedro com outro átomo de silício proporciona a formação de uma rede cristalina tridimensional e é encontrada em granito, arenito, areia e quartzo (26,45,72,73). Esta possui oito diferentes rearranjos estruturais, entretanto, apenas três são considerados mais importantes: a-quartzo, tridimita e cristobalita. Por ser um composto extremamente difundido pela crosta terrestre, cerca de 60% de seu peso, a sílica está distribuída por diversas atividades como agricultura, mineração, construção, jateamento de areia, produção de ferro, aço, borracha, tintas, sabões, entre outras.

Por possuir alto ponto de fusão, a sílica possui alta resistência à variação de temperaturas e é quimicamente resistente a reagentes comuns. Possui uma grande capacidade de ligar-se a metais dando origem aos silicatos como talco, feldspato, caulim, entre outros. Sua reatividade depende de sua forma, pré-processamento e estado de subdivisão. Já foi descrita a capacidade da sílica formar radicais livres de oxigênio como o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e radicais hidroxilas ( $\cdot\text{OH}$ ) através da reação de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$ ) e que estes estão em níveis aumentados em poeiras contendo sílica cristalina gerada recentemente, como por exemplo, em atividades como jateamento de areia, escavação de túneis, entre outras (63). A exposição da molécula de sílica à água, como por exemplo, no corte de peças de mármore, forma compostos como hidróxido de silício ( $\text{SiOH}$ ) e poli(2-vinilpiridina-N-óxido) responsáveis pela redução da toxicidade das partículas de sílica devido à diminuição da geração de radicais livres de oxigênio, principalmente  $\cdot\text{OH}$ . Porém, não é apenas a quantidade de partícula inalada, mas também o seu tamanho que determinam o desenvolvimento da silicose.

A partir de 1992, órgãos governamentais, como a International Organization for Standardization (ISO), e o Comité Européen de Normalisation (CEN) passaram a classificar e estipular a quantidade de partículas passíveis de serem inaladas no ambiente de trabalho. Dessa forma, a classificação foi a seguinte: i) fração de particulado inalável, partículas de até

100  $\mu\text{m}$  capazes de penetrar pelo nariz e boca; ii) fração de particulado torácico, são partículas inaláveis com até 25  $\mu\text{m}$  que podem penetrar nas vias aéreas superiores e iii) a fração de particulado respirável, são partículas menores que 10  $\mu\text{m}$  capazes de penetrar pelas vias aéreas inferiores e se depositarem nos alvéolos (73). Sendo assim, as partículas maiores de 10  $\mu\text{m}$  depositam-se rapidamente enquanto as menores que 5  $\mu\text{m}$  permanecem em suspensão, permitindo a sua inalação. As maiores que 3  $\mu\text{m}$  geralmente são eliminadas através do sistema mucociliar das vias aéreas superiores, enquanto que as menores depositam-se nos alvéolos, levando à ativação das células residentes, disparando assim o processo inflamatório (74). Dados complementares mostraram, ainda, que a resposta inflamatória avaliada 6 meses após a provocação com sílica mostrou clara dependência do tamanho da partícula inalada, uma vez que partículas de tamanho igual a 1.8  $\mu\text{m}$  induziram resposta muito mais acentuada do que aquelas de 0,74  $\mu\text{m}$  (75), provavelmente devido a capacidade de eliminação das partículas pelas células do sistema imune, como macrófagos.

#### **1.4.4 – Patogênese**

Caracterizada pelo desenvolvimento de um processo inflamatório e fibrogênico intenso associada à ineficácia do sistema de esteira mucociliar ascendente em remover as partículas de sílica, levando, assim, a formação de granulomas, a silicose é uma doença crônica progressiva e irreversível (26,73,76). O depósito de sílica nos pulmões ativa, inicialmente, as células residentes, principalmente macrófagos, células epiteliais e fibroblastos (77).

Os macrófagos alveolares são encontrados, em geral, localizados no interior dos alvéolos e constituem uma das primeiras células residentes que entram em contato com o agente agressor. Apresentam-se em número elevado nas vias aéreas, no interstício pulmonar e dentro dos alvéolos, constituindo, assim, importantes células efetoras do processo de imunidade inata. Seu papel é fundamental para a eliminação de partículas inaladas, pois atua, juntamente com as células epiteliais, através de dois processos: o processo químico, que ocorre quando a partícula inalada é lipofílica ou é solúvel no fluido de revestimento epitelial; e o processo físico que compreende a fagocitose, drenagem para os linfonodos (78). Por não serem capazes de sofrer opsonização, acredita-se que as partículas de sílica são reconhecidas por receptores de reconhecimento endocítico padrão, como a família de receptores

“scavenger”, que inclui: SR-AI/II, MARCO, SRCL, SR com lecitina tipo C e SCARA5 (78-80).

Apesar de haver evidências de que a ligação da partícula de sílica nos receptores “scavengers” atua atenuando a resposta inflamatória (81), o estresse oxidativo causado pelo contato de grandes quantidades de partículas de sílica com essas células, liberando espécies reativas de oxigênio formadas durante a ruptura ou esmagamento da sílica (com meia-vida de cerca de 1-2 dias) (82-84), induz a liberação de cálcio do retículo endoplasmático, levando a ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e AP-1, que dão início à síntese de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, as interleucinas (IL)-1, -6 e -8 e o TNF- $\alpha$  (78,84-86). Dois estudos, realizados em 2008, mostram que a endocitose das partículas de sílica induz a ativação do inflamossoma NALP3, e que este processo estaria associado ao dano do lisossoma, desestabilização da membrana e o influxo de potássio (87,88), contribuindo para o desenvolvimento da silicose. O NALP-3 é um receptor citoplasmático que pertence à família dos receptores do tipo NOD. Quando ativado ele oligomeriza-se e transforma-se no inflamossoma NALP3, este, por sua vez, ativa caspase-1 que conseqüentemente cliva pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 em IL-1 $\beta$  e IL-18, respectivamente (89). Essas citocinas são capazes de: i) ativar células endoteliais e neutrófilos a expressar moléculas de adesão como ICAM-1 e VCAM-1, facilitando o recrutamento de leucócitos para o interstício alveolar; ii) ativar e estimular a proliferação de linfócitos; iii) induzir resposta inflamatória sistêmica (90-94). Por sua vez, os linfócitos ativados produzem citocinas (como a linfotóxina e o IFN- $\gamma$ ) responsáveis pela quimiotaxia e ativação de monócitos e neutrófilos (78,95,96). Em 2006, Wu e colaboradores descreveram a redução da frequência e função de células T regulatórias em pacientes silicóticos (97). Em 2010, Liu e colegas demonstraram que em uma fase aguda, linfócitos T regulatórios (Treg) são capazes de aumentar a resposta Th2 em detrimento da resposta Th1, entretanto, em uma fase crônica, a depleção dessas células em um modelo murino de silicose foi capaz de reduzir a fibrose pulmonar induzida por partícula de sílica (98). Song e colaboradores (2012) mostraram em um modelo murino que linfócitos Th17 também são importantes para o desenvolvimento da silicose e ainda que a depleção de células Treg reduzem a diferenciação dos linfócitos em Th17 e a produção de IL-17, citocina associada ao recrutamento de neutrófilo e a indução da produção de citocinas, conferindo ao linfócito e ao neutrófilo importantes papéis no desenvolvimento da silicose (96).



Além de iniciarem a produção de espécies reativas de oxigênio e mieloperoxidase (MPO) (no caso dos neutrófilos) através da ativação de NADPH-oxidase, os macrófagos e neutrófilos também são responsáveis pela produção de enzimas capazes de degradar a matriz extracelular como metaloproteases 2 e 9 (MMPs), o que leva à lesão de células endoteliais e pneumócitos tipo 1 assim como hipertrofia e hiperplasia de pneumócitos tipo 2, que juntamente com as células epiteliais e os macrófagos produzem citocinas prófibrogênicas como TGF- $\beta$ , IL-13 e TNF- $\alpha$  responsáveis por recrutar e ativar fibroblastos, células que normalmente se encontram no estroma de vários tecidos, e, no caso do pulmão, estão presentes na adventícia de estruturas vasculares e nas vias respiratórias (91-94). A população de fibroblastos ativada é heterogênea, dentre elas, estas células podem apresentar um fenótipo diferenciado com produção de IL-6, MCP-1, COX-2 e PGE<sub>2</sub>; que ocupa grande parte da lesão durante o período ativo do processo de fibrose (99). Um desses fenótipos corresponde ao miofibroblasto que se caracteriza por ser uma célula com alta plasticidade fenotípica, por possuir função primária no processo de reparo e remodelamento, ou seja, atuante na regulação da degradação da matriz via secreção das metaloproteases e substituição por matriz recém sintetizada. Nesta condição, estas células passam a expressar a proteína  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) 77,100) e adquirem características morfológicas, com clara presença de fibras de estresse (101,102).

Outro ponto bem abordado na literatura é a capacidade das partículas de sílica levarem células à apoptose ou à necrose. Em 2005, Wang e colaboradores mostraram que a partícula de sílica era capaz de ativar o fator de transcrição p53 através da transativação da proteína p53 e fosforilação da serina 392 (103). Esta proteína possui como principal função bloquear o ciclo celular caso haja algum dano no DNA, para isso, ela se liga ao DNA e ativa a transcrição de p21. A proteína p21 se liga aos complexos de Cdk e bloqueia sua atividade cinásica, necessários para que a célula entre e progrida na fase S. Além disso, a p53 pode ativar a transcrição dos genes codificadores de proteínas que promovem a liberação do citocromo c da mitocôndria, como por exemplo, as proteínas da família Bcl-2 (Bax e Bak) e levar a célula à apoptose(104). Joshi e Knecht descreveram, este ano (2013), a seqüência temporal dos eventos que levam à apoptose de macrófagos que fagocitaram a partícula de sílica (105). Neste trabalho, os autores demonstram que a resposta celular frente à exposição a partícula de sílica é rápida, quando 30 minutos após verifica-se a ocorrência de extravasamento do conteúdo do fagolisossomo, seguido de hiperpolarização mitocondrial (3-6 horas), ativação das caspases e formação de vacúolo celular. Entre 30 minutos e 2 horas, após

o início do processo de apoptose, ocorre a condensação nuclear e a expressão de fosfatidilserina na membrana. A ativação da cascata de caspases pode ocorrer por diversos mediadores, entre eles o  $TNF-\alpha$ , e esse processo pode estar relacionado ao fato das partículas de sílica desencadearem uma resposta auto-imune, devido ao reconhecimento inespecífico do DNA do próprio indivíduo (77).

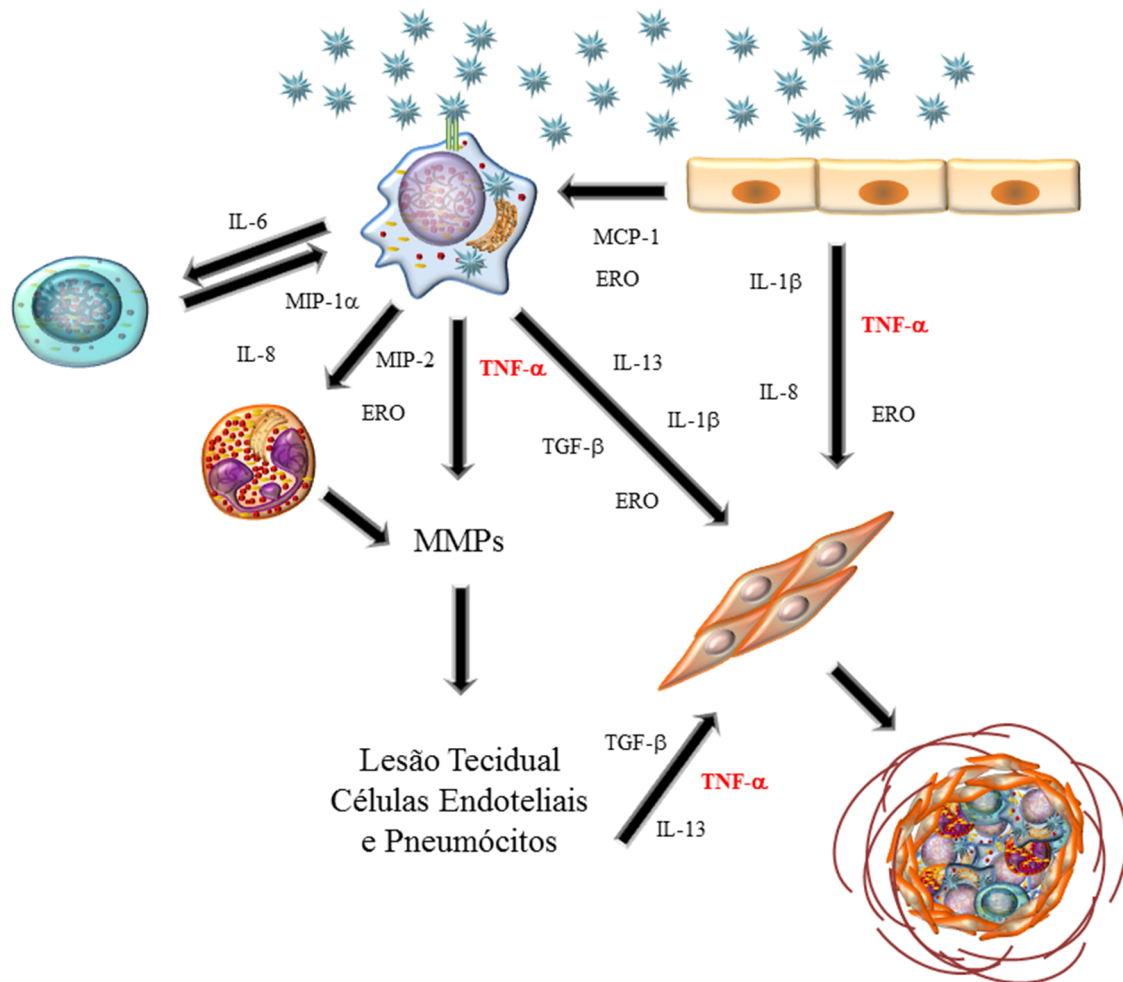


Figura 1.3: Esquema representativo do processo patológico ocorrido no pulmão após o depósito de sílica no parênquima pulmonar. Macrófagos; Linfócitos; Neutrófilos; células epiteliais; Fibroblastos; Partícula de sílica; Granuloma.

#### 1.4.4.1 – Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O TNF foi descrito inicialmente em 1893, por Coley, que o definiu como um elemento importante no processo de indução de necrose em tumores. Entretanto, foi somente em 1975, que ele foi caracterizado como uma toxina endógena e recebeu a denominação de TNF (106). Em 1984, Pennica e colaboradores foram os primeiros a isolar esta proteína de macrófagos (107). Atualmente, fazem parte da família do TNF as seguintes citocinas: TNF-alfa, TNF-beta, ligante CD40, ligante Fas, ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF e LIGHT (111).

O TNF- $\alpha$  é uma proteína trimérica transmembranar, e em humanos, o gene desta proteína que possui 233 aminoácidos, está localizado no cromossomo 6, enquanto em camundongos está localizado no cromossomo 17, dando origem a uma proteína com 235 aminoácidos e de massa molecular equivalente a 26 kDa (108-111). Inicialmente, o TNF- $\alpha$  é sintetizado em sua forma transmembranar para, em seguida, ser clivado em sua forma solúvel (com massa molecular equivalente a 17 kDa.) por uma metaloprotease chamada TACE (“TNF- $\alpha$  Converting Enzyme”). Origina-se, então, a proteína funcional do TNF- $\alpha$  com 157 e 156 aminoácidos, em humanos e camundongos, respectivamente. A sua forma biologicamente ativa homotrimérica possui massa molecular de 52 kDa. (108-113).

Apesar de ser produzido por diversas células, como fonte principal de TNF- $\alpha$  encontram-se principalmente os macrófagos e monócitos (114). O TNF- $\alpha$  possui várias funções fisiológicas e patológicas como, por exemplo, indução de células tumorais à necrose e à apoptose; regulação do ciclo do sono; desenvolvimento embrionário; desenvolvimento linfóide; assim como na defesa contra patógenos (111,114). Ele também possui características pirogênicas, onde pequenas quantidades de TNF- $\alpha$  podem causar febre, caquexia e depressão. Por fim, mas não menos importante, o TNF- $\alpha$  também atua nas respostas inflamatórias aguda e crônica, modulando propriedades vasculares (111,114), angiogênese (115), indução de migração de leucócitos, modulação da expressão de moléculas de adesão (116-118), indução da gênese de outras citocinas e estimulação da proliferação e ativação de fibroblastos (119). Estes fenômenos em conjunto são importantes dentro do contexto inflamatório e fibrótico associado a diversas doenças. Devido ao seu leque de atuação, é considerado como uma citocina pleiotrópica e pró-inflamatória, (110,111,114,120), desencadeando seus efeitos mediante interação com receptores específicos.

O TNF- $\alpha$  liga-se especificamente a dois tipos receptores transmembranares que

possuem 28% de homologia, principalmente na porção extracelular, e um domínio rico em cisteína. A porção intracelular de seus receptores quase não possui homologia, o que confere a diferença de sinalização entre eles (108). O receptor do tipo 1, TNFR1 (ou TNF-R55, TNFRSF1a, p55TNFR ou CD120a), é o responsável por desencadear a maioria das respostas celulares produzidas pelo TNF- $\alpha$  e possui massa molecular igual a 55 kDa. É fortemente ativado por ambas as formas de TNF- $\alpha$  (mTNF- $\alpha$  e sTNF- $\alpha$ ) e diferentemente do TNFR2, possui em porção intracelular um “domínio de morte” (111). A ligação do TNF- $\alpha$  ao TNFR1 resulta na indução de uma cascata de sinalização iniciada pela liberação da proteína silenciadora do “domínio de morte” (SODD) do domínio intracelular do TNFR1 (ICD). O ICD é reconhecido pela proteína adaptadora do receptor do TNF- $\alpha$  associada ao “domínio de morte” (TRADD), o qual recruta proteínas adaptadoras, como a Proteína de Interação com o Receptor (RIP), o Fator Associado ao Receptor de TNF- $\alpha$  (TRAF, principalmente TRAF-2 e TRAF-5) e a proteína FAS associada ao “domínio de morte” (FADD). A partir deste momento, duas vias são iniciadas. O TRAF recruta as proteínas inibitórias da apoptose celular 1 e 2 (cIAP-1 e cIAP-2), que formam um complexo de sinalização do receptor de TNF- $\alpha$  (TNF-RSC) juntamente com o complexo de montagem de ubiquitina linear (LUBAC), formada pelas proteínas HOIL-1, HOIP e Sharpin que são responsáveis pela poliubiquitinação de RIP que, por sua vez, ativa TAK1 (quinase ativadora de TGF- $\beta$  1) e por conseguinte, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  que fosforilam I $\kappa$ B $\alpha$  e libera o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, responsável pela transcrição de genes de citocinas próinflamatórias (111,121). TAK1 também é capaz de ativar JNK e p38, resultando na fosforilação de c-jun e ATF2 com subsequente formação do complexo c-jun/ATF2, um fator de transcrição também chamado de proteína ativadora 1 (AP-1). Já a ativação de FADD e a desubiquitinação de RIP1 leva ao recrutamento e ativação da caspase 8 que por sua cliva a proteína próapoptótica Bid. Sua forma clivada transloca para a mitocôndria e reduz o potencial da membrana mitocondrial, resultando na liberação do citocromo c que, em ação conjunta com o fator ativador de protease apoptótica (Apaf 1), se liga ao iniciador da pró-caspase 9 formando o complexo apoptossoma, responsável pela ativação de caspases, dentre elas, a 3 e a 7 o que resulta na apoptose celular (111).

O segundo receptor, o TNFR2 (ou TNF-R75, TNFRSF1b, p75TNFR ou CD120b) possui massa molecular de 75 kDa. Por não possuir o domínio de morte, seu mecanismo de ação é um pouco diferenciado. A ligação do TNF- $\alpha$ , ao TNFR2, não é capaz de induzir apoptose, entretanto, é capaz de formar o complexo TRAF-2/TRAF-5 e levar à ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e AP-1 (111). Entretanto, quando este receptor apresenta-

se em níveis elevados é capaz de ativar, subseqüentemente, a cascata intracelular do TNFR1, desencadeando a resposta celular (109,119,122-124).

Mais ainda, ambos os receptores podem existir na corrente sanguínea em sua forma solúvel, após a sua clivagem por proteases (metaloproteases). Acredita-se que possuam como função antagonizar o efeito do TNF- $\alpha$  ou, ainda, servir de reservatório que contribuiria para manutenção níveis basais disponíveis de TNF- $\alpha$  (125).

Em 2006, Fichtner-Feigl e colaboradores demonstraram, que a ligação do TNF- $\alpha$  ao TNFR1 e consequente ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B leva ao aumento na síntese do receptor  $\alpha$ 2 da citocina IL-13 (IL13R $\alpha$ 2), e que a ligação da IL-13 a esse receptor ativa o fator de transcrição AP-1, sendo este o responsável pela transcrição de TGF- $\beta$ , que é uma citocina que possui reconhecida ação prófibrótica (92).

#### **1.4.4.1.1 – Fator Nuclar-kappa B (NF- $\kappa$ B)**

O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição que regula mais de 200 genes que codificam imunoreceptores, quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão (111). Ele também atua participando nos processos de proliferação celular, apoptose, angiogênese, estresse oxidativo, dentre outros (111,126). O NF- $\kappa$ B pode ser formado por homo ou heterodímero dos cinco membros da família do NF- $\kappa$ B, que consiste em: p65 (RelA), RelB, c-REL, NF- $\kappa$ B1 (p50/p105) e NF- $\kappa$ B2 (p52). As proteínas do NF- $\kappa$ B podem ser divididas em dois grupos: o primeiro inclui RelA, RelB e c-Rel que contêm domínios transativadores potentes (TDs), o que permite que atuem como proteínas transativadoras, ou seja ativando a transcrição gênica. enquanto o segundo inclui as proteínas p50 e p52, que não possuem TDs e, portanto, não são capazes de ativar a transcrição gênica, reprimindo a ativação do NF- $\kappa$ B. Dessa forma, a associação dos membros da família do NF- $\kappa$ B determinará sua função. (126,127). A família do NF- $\kappa$ B compartilha 300 aminoácidos altamente conservados chamados de Domínio de Homologia Rel (RHD) que é responsável por sua dimerização e sua ligação ao DNA e ao I $\kappa$ B (126).

O NF- $\kappa$ B está localizado inicialmente em sua forma inativa no citosol, ligado a seu inibidor I $\kappa$ B, e pode ser ativado por duas vias: A via clássica, que é iniciada através da ligação do TNF- $\alpha$  a seu receptor, e conforme descrito anteriormente, levando à ativação e

fosforilação do complexo IκB quinase (IKK). Este é formado pelas proteínas IKKα, IKKβ e NEMO que são responsáveis pela fosforilação de dois resíduos de serina na porção N-terminal da proteína IκB e consequente liberação do NF-κB. No citoplasma, durante a degradação de IκB, a proteína quinase A (PKA) fosforila a serina 276 do NF-κB, que é essencial para a o recrutamento da proteína ligante ao elemento de resposta a adenosina 3,5 monofosfato cíclica (CREB) e da porção p65, assim como, ativar a transcrição gênica (126). Normalmente essa via ativa os complexos p50/p65 e p50/c-Rel do NF-κB a translocarem para o núcleo (128). Além da PKA, mitógenos e a proteína quinase ativada por estresse 1 (SEK-1) também são responsáveis pela fosforilação da serina 276 do NF-κB. A fosforilação da serina 529 pela caseína quinase II e da serina 536 pelo IKK, após a estimulação com TNF-α, aumenta a atividade transcripcional do NF-κB. Além de fosforilação, o NF-κB também pode sofrer acetilação e/ou metilação, o que pode alterar sua função (126). A via alternativa de ativação do NF-κB é desencadeada pela ação de linfotoxinas, fator de ativação de células B, ligante CD40 ou vírus. Esta via é independente de NEMO e dependente de TRAF e quinase indutora de NF-κB (NIK), que ativam homodímero de IKKα, que cliva p100 em p52, que, por sua vez, transloca para o núcleo como heterodímero p52/RelB e inicia a transcrição. Outros fatores como radiação ultravioleta e NADPH oxidase também podem ativar a via alternativa do NF-κB (126,128).

A regulação da transcrição pelo NF-κB se dá através da ligação direta do NF-κB à região promotora, podendo ativar genes como a ciclina D1 e c-myc, que estão envolvidos no processo de proliferação celular, garantindo assim a continuidade da resposta inflamatória (127). De forma interessante, na silicose experimental foi observado que a inibição do NF-κB, através da utilização de uma composto sintético, Bay 11-7085, foi responsável pela redução da inflamação e deposição de colágeno no pulmão de camundongos (129).

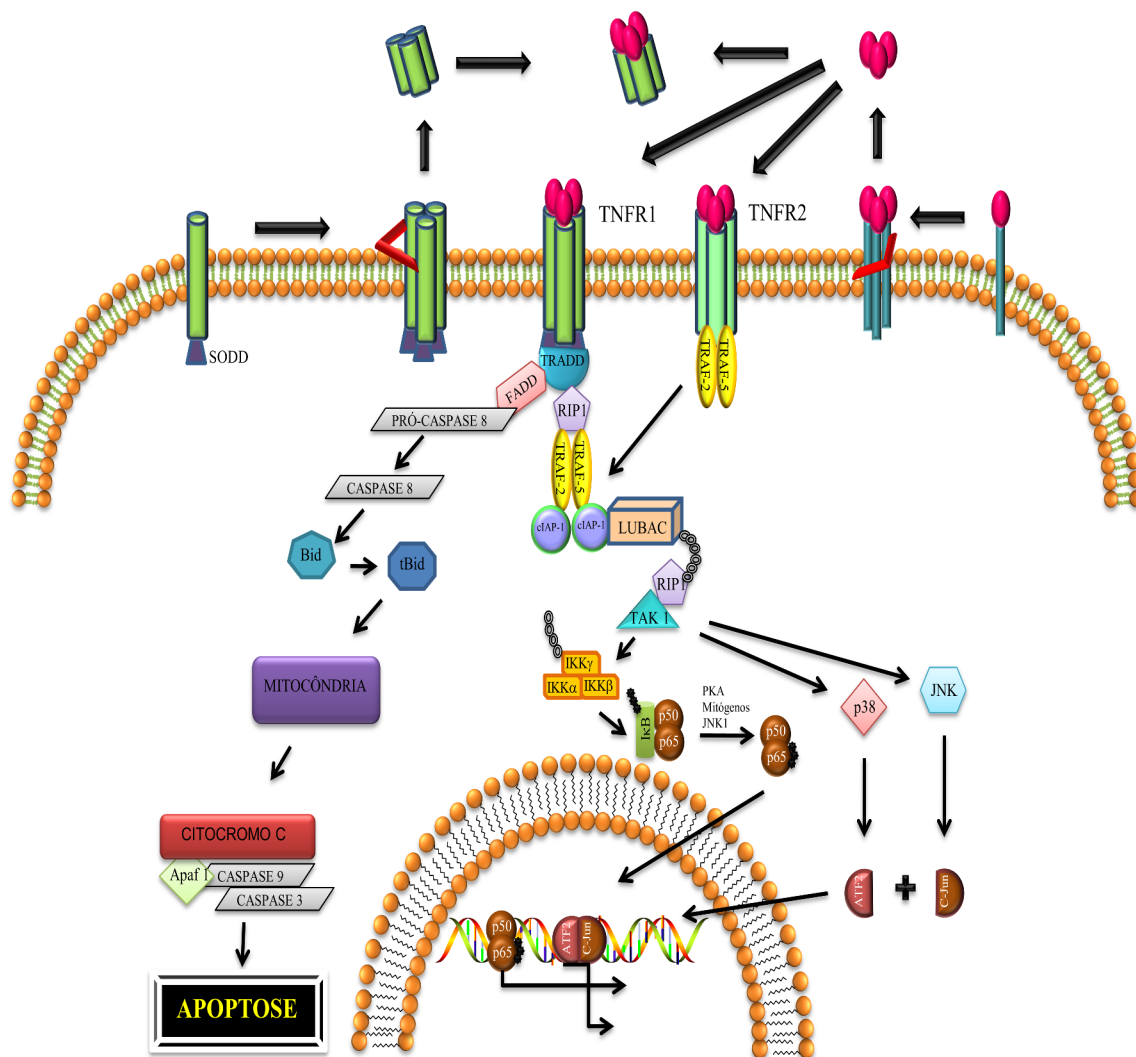


Figura 1.4: Esquema representativo do mecanismo de ação do TNF- $\alpha$ . Adaptado de Chu *et al*, 2013 (111).

### 1.4.5 – Prevenção e tratamento

Apesar do decréscimo da prevalência da silicose com o passar dos anos, principalmente após a implementação de planos de prevenção (74), ainda hoje, sua incidência é grande, em grande parte devido à má utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs) e do controle da poeira no ambiente de trabalho. As ações preventivas designadas pela OMS incluem o controle da fonte de poeira através da eliminação ou substituição de materiais, modificação ou substituição de processos e equipamentos, manutenção dos equipamentos, utilização de métodos úmidos e alteração das práticas de trabalho (26,30,32,62). Além disso, é importante que haja o acompanhamento da trajetória da

transmissão da poeira através do isolamento da fonte ou dos trabalhadores, utilizando sistemas fechados e/ou cabines de exaustão. Assim como, o treinamento dos trabalhadores sobre Boas Práticas de Trabalho, higiene pessoal, utilização de EPIs como capacetes que forneçam ar externo puro, máscara para completa filtração do ar, limpeza periódica do local de trabalho, estocagem e rotulagem, fixação de sinais de alerta e áreas restritas, monitoramento ambiental e sistemas de alarme, além de monitoração regular através da realização de radiografia de tórax regularmente (36,74,131).

Diversos estudos sugerem um tratamento antifibrótico para a silicose, entretanto, até o momento nenhum se mostrou realmente eficaz em reverter o processo inflamatório causado pela inalação da partícula de sílica (132-137). No Brasil, não foi estipulado protocolo medicamentoso específico para o tratamento das pneumoconioses fibrogênicas, como a silicose. Entretanto, devem-se tomar medidas para o tratamento usual de co-morbidades associadas a estas disfunções, por exemplo, doença pulmonar crônica obstrutiva, tuberculose e câncer. O Ministério da Saúde também não indica o uso de corticosteróides, mesmo nos casos com evolução progressiva independente do afastamento da exposição ao agente fibrogênico (62).

Como até o momento a silicose não possui um tratamento curativo, estudos são constantemente incentivados a fim de descobrir um tratamento eficaz. Porém, de forma a melhorar a condição de vida do paciente, sugere-se medidas como a interrupção da exposição à sílica em estágio inicial da doença; a oxigenioterapia, pois pacientes pneumoconióticos podem evoluir para insuficiência respiratória crônica; e nos casos mais graves o transplante de pulmão passa a ser uma alternativa, porém ainda há um risco muito grande tanto para o doador quanto para o paciente, que é de não sobreviver após a operação devido a complicações pós-cirúrgicas (32,138).

Várias modalidades de tratamento têm sido testadas com o objetivo de reduzir a resposta inflamatória à sílica. Em alguns casos recomenda-se a lavagem broncoalveolar para remoção das partículas e o uso de alumínio como modificador das propriedades superficiais das partículas, até o uso de corticosteróides e imunossupressores e uso de broncodilatadores. Entretanto nenhuma destas abordagens mostrou-se eficaz na melhoria do quadro clínico e dos parâmetros de função pulmonar (32,62,139). Alguns estudos demonstram também que a eficiência da tetrândrina, um alcalóide utilizado na China para o tratamento da artrite reumatóide e da silicose, que atua na inibição da ativação de macrófagos e fibroblastos. Sua associação com antifibróticos, como o óxido-N-polivinilpiridina, potencializa sua ação e



diminui os efeitos adversos (140,141). Nos últimos anos, a terapia com células-troncos também se mostrou promissora para o tratamento da silicose, já que reduziu diversos parâmetros da doença, como redução da expressão de citocinas, deposição de colágeno, área do granuloma e melhora da função pulmonar em camundongos (134,136). Desde 2009, Wang e colegas vem descrevendo a importância do receptor “scavenger” CD36, que quando ativado é responsável por regular a quebra do TGF- $\beta$ 1 latente (inativo) em TGF- $\beta$ 1, uma citocina com um papel importante no desenvolvimento da silicose (132,135). Entretanto, o estudo destes potenciais tratamentos têm sua eficiência atestada somente em modelos experimentais, o que implica que ainda há um longo caminho para que se tornem alternativas para o tratamento da silicose em humanos.

## **1.5 – Inibidores do TNF- $\alpha$**

A inibição do TNF- $\alpha$  se tornou uma ferramenta importante para diversas doenças, como a artrite reumatóide e doença de Crohn (142). Dessa forma, vários compostos são utilizados tanto em estudos clínicos quanto em modelos experimentais animais. Podemos dividi-los em basicamente dois grupos: os inibidores de TNF- $\alpha$  sintéticos, como a talidomida e os imunobiológicos, como o Infliximabe e o Etanercepte (143). O tipo de terapia utilizada geralmente depende do quadro clínico do paciente e as vantagens de cada inibidor.

### **1.5.1 – Talidomida**

A talidomida ( $\alpha$ -ftalimida-glutarimida) é um derivado do ácido glutâmico e possui dois anéis imidazólicos (glutarimida e ftalimida). Possui dois isômeros: o isômero S, responsável pela teratogenicidade e o isômero R, responsável pelo seu efeito sedativo (144). Este composto foi inserido no mercado pela empresa alemã Grünenthal, em 1954, como agente sedativo. Inicialmente, se mostrou um medicamento perfeito, pois testes pré-clínicos em camundongos e ratos não demonstraram nenhum efeito tóxico, mesmo quando administrado em altas concentrações. Dessa forma, a talidomida foi amplamente utilizada em pacientes grávidas em função de sua propriedade antiemética. Entretanto, em 1961, comprovou-se a ocorrência de má formação fetal quando da administração da talidomida em pacientes que se encontravam nos três primeiros meses de gravidez e, devido ao efeito teratogênico, o composto foi retirado do mercado. Entretanto, em 1965, o interesse pela

talidomida recrudescer com vistas ao tratamento portadores de hanseníase, quando foi observada uma significativa melhora condição clínica destes pacientes (145-147). Diversas hipóteses surgiram para justificar a causa da sua atividade teratogênica, dentre elas, a capacidade da talidomida em induzir o estresse oxidativo com conseqüente oxidação do DNA, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como superóxido, dano a proteínas e lipídeos durante o desenvolvimento embrionário (147-150). Outra hipótese proposta por D'Amato e colegas, em 1994, quando observaram que a talidomida era capaz de inibir a angiogênese induzida pelo fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF-2) (151). Como este é um processo essencial para o desenvolvimento de membros superiores e inferiores, sua inibição pela talidomida poderia determinar a morte celular e a teratogênese. Em 2010, Ito e colaboradores demonstraram, em experimentos realizados em embriões de peixe zebra e aves, que a capacidade teratogênica da talidomida estava associada a sua ligação à proteína cereblon, que forma um complexo através da ligação de ubiquitinas com a proteína ligante de dano do DNA 1 e a Cul4A, responsáveis expressão do fator de crescimento de fibroblasto (FGF-8) e conseqüente desenvolvimento de membros durante a fase embrionária (152). Sendo assim, a administração da talidomida em pacientes grávidas, ou mesmo a concepção após o início do tratamento é desaconselhável. Como ainda não há evidências que mostram a ausência de risco teratogênico para o feto caso o pai esteja sob tratamento com a talidomida, orienta-se que o mesmo também evite o ato sexual sem proteção (147).

Em contrapartida aos efeitos teratogênicos, diversos estudos demonstraram que a talidomida possui um papel anti-inflamatório (153), imunomodulatório (154); e antiangiogênico (151). E atualmente é indicado como tratamento de doenças inflamatórias como mieloma múltiplo (155,156) e hanseníase (157). Em 1993, Moreira e colaboradores demonstraram o efeito supressor da talidomida sobre a produção de TNF- $\alpha$ , quando foi verificada a diminuição do tempo de meia-vida do RNA mensageiro deste fator de aproximadamente 30 min para 17 min (158). Além disso, a talidomida pode inibir a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B impedindo a transcrição de algumas citocinas pró-inflamatórias importantes no contexto da sílicose incluindo IL-6, TGF- $\beta_1$  e o próprio TNF- $\alpha$ , além de inibir a expressão de algumas moléculas de adesão, como ICAM-1 (146,159,160). Estas ações em conjunto contribuem para a redução do processo inflamatório.

### **1.5.2 – Infliximabe**

O infliximabe (Remicade<sup>®</sup>), assim como o adalimumabe, certolizumabe pergol e golimumabe, é classificado no grupo dos medicamentos imunobiológicos. Ele é um anticorpo monoclonal quimérico anti-TNF- $\alpha$ , que possui a porção Fc (IgG1k) derivado de anticorpos humano e a porção Fv (variável) derivada de anticorpos de camundongo. Esta porção é caracterizada pela grande afinidade e capacidade de neutralização, e ligar-se às duas formas de TNF- $\alpha$ , transmembranar e solúvel, impedindo, assim, a ação do TNF- $\alpha$  em seus receptores (161). Essa inibição leva à lise de células produtoras de TNF- $\alpha$ , via ativação do sistema complemento (142), e é capaz de induzir apoptose de células inflamatórias (162,163). Apesar de ser um medicamento de alto custo, atualmente, o infliximabe é amplamente aplicado para o tratamento da artrite reumatóide (142,164), doença de Crohn (165), psoríase (166), dentre outras.

Entretanto, alguns autores vêm descrevendo alguns efeitos colaterais relacionados ao uso do infliximabe, como o aumento da predisposição ao enfisema pulmonar, doenças auto-imune, infecções oportunistas e reativação de infecções latentes; principalmente se o paciente já apresentou diagnóstico de tuberculose (167,168). Acredita-se que este efeito está, provavelmente, relacionado ao fato do infliximabe se ligar fortemente à ambas as formas do TNF- $\alpha$ , principalmente a forma transmembranar, já que esta forma está mais relacionada com a resposta do sistema imune. Confirmando esses dados, a administração de Etanercepte, anticorpo anti TNF- $\alpha$ , que possui menor afinidade à porção transmembranar do TNF- $\alpha$ , leva a resolução do processo inflamatório, sem que observemos infecções recorrentes (169).

### **1.5.3 – XPro 1595**

Por ser uma citocina pleiotrópica e atuar em processos fisiológicos e patológicos do organismo, a inibição o TNF- $\alpha$  pode acarretar em efeitos colaterais significativos para o indivíduo, como o desenvolvimento de enfisema pulmonar em pacientes com artrite reumatóide tratados com Infliximabe e a reincidência de tuberculose (167,168). Nas últimas décadas, vem sendo demonstrado que as formas transmembranar e solúvel do TNF- $\alpha$  possuem papéis distintos em processos fisiopatológicos. Enquanto o TNF- $\alpha$  transmembranar está envolvido na manutenção do sistema imune, o TNF- $\alpha$  solúvel está diretamente relacionado ao processo inflamatório frente ao contato com o antígeno (170,171). Dessa

forma, a indústria farmacêutica Xencor, investiu em uma nova classe de medicamentos, chamados de Dominante Negativo do TNF- $\alpha$  (DN-TNF). Essa nova molécula, chamada de XPro 1595, é uma proteína baseada na seqüência de 157 aminoácidos do TNF- $\alpha$  solúvel humano, que sofreu modificações estruturais limitantes para sua ligação às porções Y87H e A145R dos receptores R1 e R2 do TNF- $\alpha$  (172,173). O mecanismo de ação está baseado na necessidade do TNF- $\alpha$  em se apresentar na forma de homotrímeros para que possa se ligar a seus receptores. Nessa condição, o DN-TNF é capaz de se intercalar às subunidades do TNF- $\alpha$  solúvel e formar heterotrímeros incapazes de se ligarem aos receptores (171,172). Diversos estudos apontam que esta molécula é capaz de reduzir o processo inflamatório, sem comprometer a o sistema imunológico do indivíduo, o que garante uma grande vantagem quando comparado com os anticorpos monoclonais utilizados atualmente na clínica (174-176).

### **1.6 - TNF- $\alpha$ vs. Silicose**

Dados da literatura demonstram o papel importante do TNF- $\alpha$  no componente inflamatório de diversas doenças, incluindo disfunções pulmonares como verificado no quadro de hiper-reatividade das vias aéreas (177-179).

O TNF- $\alpha$  possui uma ampla gama de efeitos biológicos que incluem desde a indução de migração de leucócitos, modulação da expressão de moléculas de adesão (116-118), assim como ativação de fibroblastos (119) e angiogênese (115), fenômenos que em conjunto são importantes dentro do contexto inflamatório e fibrótico associado a diversas doenças.

De fato, há na literatura relatos que apontam para a implicação do TNF- $\alpha$  em diversas disfunções. Um importante exemplo é a artrite reumatóide, uma vez que foi demonstrado que esta doença apresentava expressão aumentada de TNF- $\alpha$ , e que o tratamento com anticorpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$ , assim como o bloqueio de ambos os receptores para TNF- $\alpha$ , mostram-se extremamente eficientes em inibir a prevalência da artrite reumatóide (180-182). Ao nível pulmonar, foi demonstrado que o TNF- $\alpha$  participa no desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), quando foram detectados aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  no lavado broncoalveolar, no catarro induzido e no tecido de biópsia proveniente de pacientes portadores da doença. Em associação, foi identificado que o polimorfismo no gene que codifica o TNF- $\alpha$  leva à predisposição de indivíduos fumantes a desenvolver o quadro de

DPOC (183). Na condição da asma brônquica também foram obtidas evidências de um papel relevante para o TNF- $\alpha$ , quando foi detectado aumento nos níveis do mRNA e da proteína ao nível pulmonar. De forma interessante, uma correlação foi feita entre a ocorrência destes fenômenos e o quadro de hiper-reatividade pulmonar, tanto experimentalmente em camundongos como em humanos (110,116,184,185). O envolvimento do TNF- $\alpha$  foi proposto em doenças de caráter fibrótico com base na observação de diminuição no depósito de colágeno em animais tratados com anticorpo anti-TNF- $\alpha$  no desenvolvimento da resposta silicótica em camundongos, provavelmente, pela capacidade do TNF- $\alpha$  juntamente com a IL-13 serem capazes de ativar a transcrição do TGF- $\beta$  (177,186). Além disso, Yucesoy e colaboradores, em 2001, identificaram a existência de polimorfismo no gene que codifica o TNF- $\alpha$  em trabalhadores de minas portadores de silicose (187).

Verificamos anteriormente que tanto o comprometimento da função pulmonar e a hiper-reatividade das vias aéreas, bem como a deposição excessiva de tecido fibrótico e presença de granulomas na silicose mostraram-se dependentes da ação do TNF- $\alpha$ , conforme atestado através da supressão destes fenômenos em animais nocautes para o receptor tipo I desta citocina (28). Dessa forma, fármacos que fossem capazes de inibir a sua ação podem indicar um potencial tratamento para a silicose, dentre eles podemos citar a Talidomida e os medicamentos biológicos como o Infliximabe, Etanercepte, Adalimumabe, Certolizumabe pergol e Golimumabe.

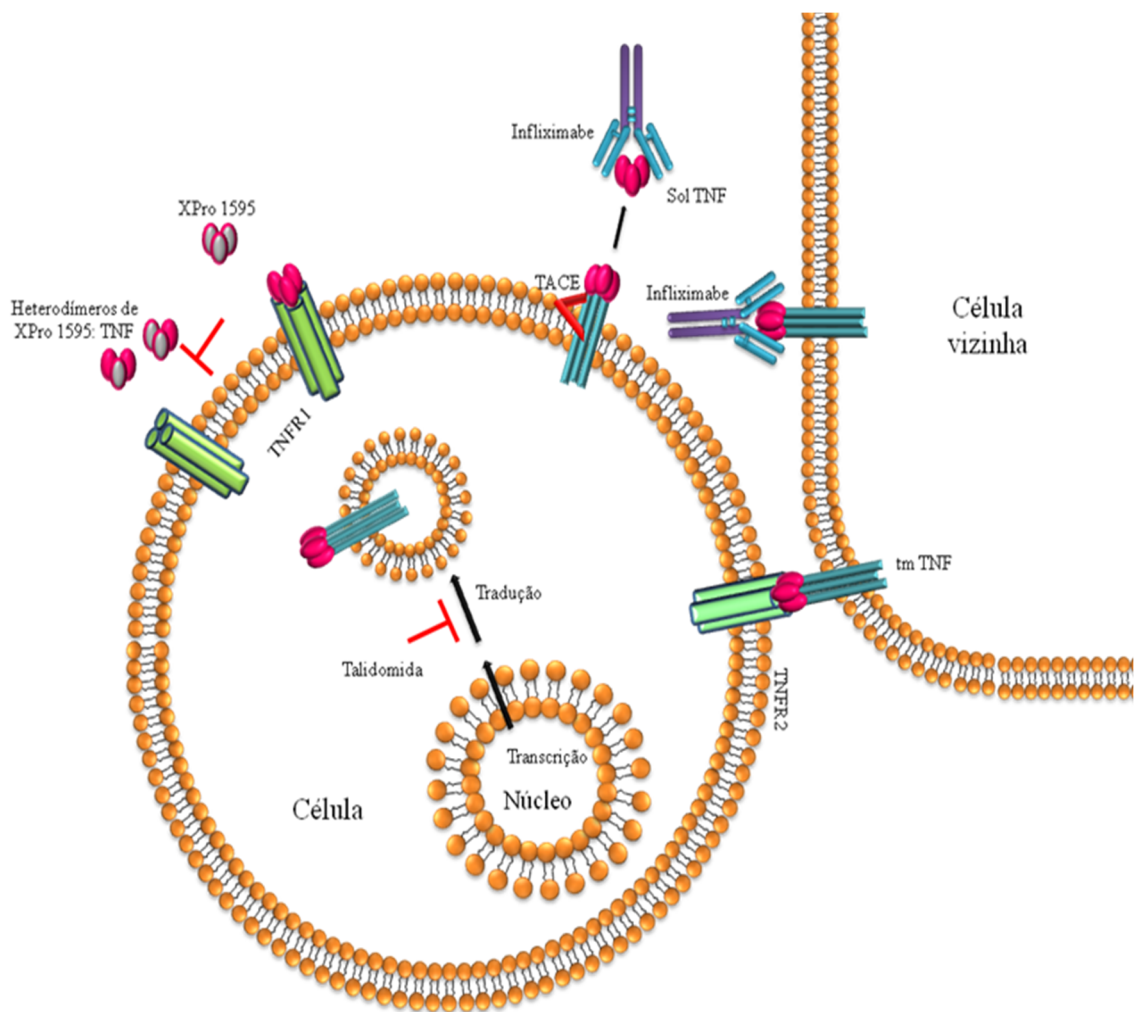


Figura 1.5: Esquema representativo dos mecanismos de ação dos inibidores de TNF- $\alpha$ . A Talidomida, responsável por reduzir a meia-vida do mRNA do TNF- $\alpha$  e conseqüentemente a quantidade de proteína traduzida; O Infiximabe, capaz de se ligar a ambas as moléculas de TNF- $\alpha$  e o XPro 1595, um dominante negativo do TNF- $\alpha$  que inibe seletivamente a ação do TNF- $\alpha$  solúvel. Adaptado de McCoy et al, 2008 (188).

## **2 – Objetivo**

### **2.1 – Objetivo Geral**

Com base no exposto anteriormente e utilizando o modelo experimental da silicose em camundongos, tivemos por objetivo investigar o efeito do tratamento com compostos que inibem a geração e a ação do TNF- $\alpha$  incluindo a talidomida e o infliximabe (Remicade<sup>®</sup>), respectivamente. De forma adicional, avaliamos o efeito do composto XPro 1595, um inibidor dominante negativo que neutraliza seletivamente a forma solúvel do TNF- $\alpha$ , no quadro da silicose.

### **2.2 – Objetivos específicos**

Para responder às nossas perguntas resolvemos avaliar o efeito do tratamento com talidomida, infliximabe e XPro 1595 sobre os parâmetros:

- I. De função pulmonar (resistência e elastância) e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos, 28 dias após estimulação com sílica;
- II. Das alterações morfológicas no parênquima pulmonar de camundongos, 28 dias após estimulação com sílica;
- III. Do conteúdo de matriz extracelular (colágeno) no tecido pulmonar de camundongos, 28 dias após estimulação com sílica;
- IV. Da produção de mediadores pró-inflamatórios e prófibróticos no tecido pulmonar de camundongos, 28 dias após estimulação com sílica;
- V. Da resposta de macrófagos e fibroblastos no tecido pulmonar de camundongos, 28 dias após estimulação com sílica;
- VI. Da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no tecido pulmonar de camundongos, 28 dias após estimulação com sílica;
- VII. Da ativação e viabilidade de macrófagos, células epiteliais e fibroblastos *in vitro*.

### **3 – Material e Métodos**

#### **3.1 – Animais**

Foram utilizados camundongos da cepa Swiss-Webster, machos, pesando entre 18 a 20 gramas, provenientes do Centro de Experimentação e Controle de Animais de Laboratório (CECAL). Os mesmos foram mantidos em estantes climatizadas com temperatura e umidade controladas ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $50 \pm 10\%$ , respectivamente), sendo submetidos ao ciclo de claro e escuro de 12 horas e livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz sob Licença nº L-034/09.

#### **3.2 – Indução da Silicose e Tratamentos**

Para a indução da silicose, os camundongos foram anestesiados mediante aerolização de uma mistura contendo isoflurano (0,5%) e ar atmosférico, até completa sedação. Em seguida, os animais foram instilados por via intranasal com 10 mg sílica ( $\text{SiO}_2$ ; partícula:  $0,5\text{-}10\ \mu\text{m}$  ~80% -  $1\text{-}5\ \mu\text{m}$ ; Sigma-Aldrich, EUA) ou salina (NaCl 0,9%) estéril, em um volume final de  $50\ \mu\text{L}$ , gotejados em ambas as narinas com auxílio de uma pipeta automática. Os tratamentos realizados seguiram administração terapêutica, com esquemas variando conforme o fármaco em questão. A talidomida ((RS)-2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1H-isoindole-1,3(2H)-dione –  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$ ; FUNED, Brasil) foi administrada nas doses de 25 e 50mg/kg por via oral diariamente, durante 7 dias consecutivos, iniciando-se 21 dias pós-sílica. O infliximabe (Remicade<sup>®</sup> –  $\text{C}_{6428}\text{H}_{9912}\text{N}_{1694}\text{O}_{1987}\text{S}_{46}$ ; Janssen, EUA) foi administrado nas doses de 1,25 mg/kg por via intraperitoneal, nos dias 7, 14 e 21 pós-sílica. O antagonista da forma solúvel do TNF, XPro 1595 (10mg/kg - Xencor, EUA) foi administrado por via intraperitoneal nos dias 21, 22, 25 e 27 pós-sílica (tratamento terapêutico) e nos dias -1, 1, 5, 8, 11, 15, 18, 22 e 27 pós-sílica (tratamento profilático). Todas as análises foram realizadas 28 dias após a indução da silicose (Figura 3.1). Para este trabalho, utilizamos um total de 270 camundongos.



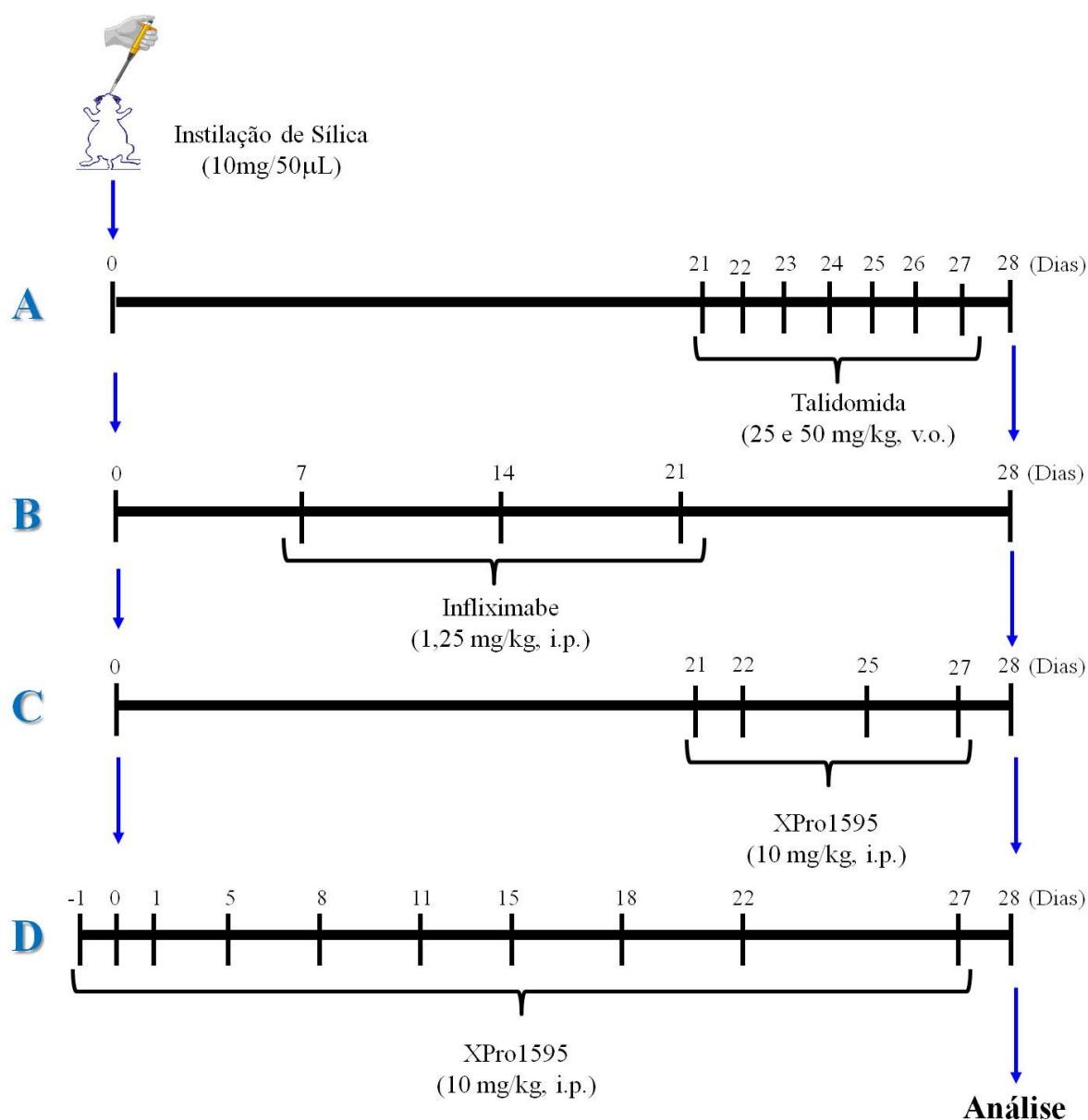


Figura 3.1 – Esquema indução da silicose experimental e tratamentos **A** – Talidomida; **B** – Infiximabe; **C** – XPro 1595 (Terapêutico); **D** – XPro 1595 (Profilático).

### 3.3 – Avaliação da Função Pulmonar e Hiperreatividade das Vias Aéreas

Os parâmetros de resistência (cmH<sub>2</sub>O/mL/s) e elastância (mL/cmH<sub>2</sub>O), referentes a avaliação da função pulmonar, foram mensurados em pletismógrafo barométrico de corpo inteiro invasivo (Buxco Research System). Para tanto, os camundongos foram anestesiados com Nembutal (Pentobarbital) (60mg/kg, i.p.) e curarizados com brometo de pancurônio (Pavulon®, 1 mg/kg). Em seguida, os animais foram traqueostomizados, dispostos em câmaras individualizadas e aquecidas (37°C), e feita inserção de uma cânula para captura da

pressão esofagiana. A cânula traqueal foi conectada a um ventilador mecânico, com fluxo (2 - 5 mL) e volume (200 µL) corrente sendo mantidos constantes, para registro dos parâmetros da função pulmonar (FinePointe RC; Buxco Eletronics). Após a estabilização dos valores de resistência e elastância, os animais foram submetidos à aerolização com PBS e ao agente broncoconstrictor metacolina (3-27 mg/mL), sendo em seguida feita a medida da função pulmonar por um período de 5 minutos. Os valores de resistência e elastância foram registrados e avaliados no Software Buxco Biosystem XA (189).

### **3.4 – Análise Histológica**

Após a avaliação da função pulmonar, os animais foram eutanasiados com pentobarbital (250 mg/kg); exsangüinados através de um corte na veia cava abdominal e o pulmão foi perfundido com solução de salina (NaCl 0,9%) através da inserção de um escalpe no coração (ventrículo direito). Para a análise histológica, o lobo esquerdo foi infundido com 1 mL de solução Milloning (155 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 105mM NaOH; Formol 10%, qsp H<sub>2</sub>O destilada 1L) sendo mantido imerso em igual solução por no mínimo 48 horas antes do processamento. O lobo direito foi retirado, congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C para posteriores análises. Após a etapa de fixação, o pulmão foi desidratado através de sucessivos banhos em soluções com concentrações crescentes de etanol (70 a 100%), por aproximadamente 10 minutos em cada etapa. O material foi clarificado em xilol por aproximadamente 15 minutos e submetido a sucessivos banhos de parafina até a sua inclusão e confecção dos blocos. As amostras de tecido foram cortadas em micrótomo (Leica – RM 2125RT) na espessura de 5 µm, e submetidas à coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) e Picrosirius (190,191). As análises foram realizadas por microscopia de campo claro em microscópio (Olympus U-TV1X), acoplado a uma câmera de vídeo (Olympus Q Color 3 – 0044C-194), e a captura realizada mediante o uso de um “software” de análise (Q Capture) (versão 3.1). As imagens foram analisadas através do software Image-Pro plus (Media Cybernetics) (versão 6.2.1.491).

#### **3.4.1 – Análise Morfométrica**

Foi utilizado um retículo contendo 100 pontos e 50 linhas paralelas que foi fixado na ocular do microscópio. Através da utilização da objetiva de 20x foi realizada a contagem dos

pontos coincidentes com área onde haja presença de granuloma, feita em dez campos aleatórios e não coincidentes. O número de pontos contados foi dividido pelo número total de pontos no retículo, obtendo-se assim a fração da área do campo pulmonar ocupado por granuloma, sendo o resultado expresso sob a forma de percentual (192,193).

### **3.5 – Quantificação de mediadores inflamatórios por ELISA**

As amostras foram homoganeizadas em uma solução de lise (PBS 1x, Triton 100-X 0,1%; complete<sup>®</sup>) e o sobrenadante foi plaqueado em placas de 96 poços, às quais foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo de captura diluído em tampão (NaCl 1,5M, H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 0,5M e NaOH 1N; pH=7,4) pelo período de incubação de 12 horas a 4°C. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes (200 µL/poço) com tampão 1 (timerosal, KPO<sub>4</sub> 1M e Tween 20 0,005%). Após esta etapa, para bloqueio de sítios inespecíficos, a placa foi preenchida (250 µL/poço) com PBS/albumina sérica bovina (BSA, 1%) por 1 hora à 20°C. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com tampão 1 (200 µL/poço). As amostras de pulmão ou sobrenadante e os padrões foram diluídos em tampão 2 (2% de soro fetal bovino - SFB em PBS) e adicionados aos poços (100 µL/poço). Após o período de incubação (2 horas a 37°C), procedeu-se a nova sequência de 3 lavagens (200 µL/poço) com tampão 1. A seguir foi acrescentado 100 µL/poço do anticorpo detector biotinizado (100 µg/mL), sendo mantida a incubação por 1 hora a 20°C. Os poços foram lavados com o tampão 1 (200 µL/poço), seguindo-se a etapa de incubação por 1 hora a 20 °C (50 µL/poço) com a mistura neutravidina-HRP diluído no tampão 2. Após a última lavagem com tampão 1 (200µL/poço), foi feita a adição do substrato (K-Blue<sup>®</sup>) (100 µL/poço) para o desenvolvimento da reação colorimétrica (aproximadamente 5 a 30 minutos), que foi interrompida após acréscimo de 100 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,19 M). A análise espectrofotométrica foi realizada em leitora de placa no comprimento de onda de 450 nm.

### **3.6 – Quantificação de colágeno**

Foi utilizado o kit Sircol<sup>®</sup> (Biocolor, Inglaterra). As amostras foram previamente maceradas em 1 mL de solução de homogeneização (Tris-Base 0,05M + NaCl 1M + inibidores de protease – Complete, Roche, pH 7.5) e incubados “overnight” à 4°C. Após esse período, as amostras foram submetidas à centrifugação por 15.000 *x g* por 60 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi recolhido e com 20  $\mu\text{L}$  foi realizada a reação. Inicialmente foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  do reagente Sircol dye às amostras. As mesmas permaneceram sob agitação por 30 minutos a temperatura ambiente e após esse período foram centrifugadas à 12.000  $\times g$  por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet ressuspenso em 250  $\mu\text{L}$  do reagente Alkaline. Em seguida, homogeneizado por 10 minutos e 200  $\mu\text{L}$  da amostra final foram transferidos para placas de 96 poços. A análise foi realizada em espectrofotômetro à 555 nm e o resultado expresso em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tecido.

### **3.7 – Imunohistoquímica**

Cortes histológicos foram fixados sobre lâminas filmadas com poli-L-lisina, desparafinizados no xilol e hidratados com sucessivos banhos com etanol (100% a 70%). Em seguida, foi realizada a reconstituição antigênica através de incubação com uréia 3 M por 15 minutos. Seguiram-se, então, sucessivas lavagens com TBS 1X (Tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,5 M, pH 7,6) e bloqueio da peroxidase endógena através da incubação com  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 3% em metanol por 15 minutos. Posteriormente, uma solução de Tris-HCL + BSA 2% por 2 horas a fim de bloquear antígenos inespecíficos. Após, os cortes foram incubados “overnight” com o anticorpo primário (F4/80, 1:100 – MCAP497, Serotec, USA ou  $\alpha$ -SMA, 1:800 – A2547, Sigma, USA) à 4°C. Posteriormente, os cortes passaram por sucessivas lavagens com TBS 1X e foram incubados a temperatura ambiente por 2 horas com os respectivos anticorpos secundário (anti-IgG de camundongo - STAT72, Serotec, USA - para F4/80 e anti-IgG de cabra - HAF007, R&D, USA - para  $\alpha$ -SMA). Foram novamente lavados, revelados com 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) entre 10 a 20 minutos e contra-corados com hematoxilina de Mayer por 1 minuto. As lâminas foram montadas utilizando um meio aquoso contendo gelatina. As imagens foram capturadas com o auxílio do “software” de análise (Q Capture) (versão 3.1). E, então, analisadas através da quantificação do número de “pixel” da cor que indicava a marcação. pelo software Image-Pro plus (Media Cybernetics) e o resultado expresso por  $\text{pixel}/\mu\text{m}^2$ .

### **3.8 – Western Blotting**

Para a detecção de NF- $\kappa$ B foi realizada em amostras de proteínas citoplasmáticas e nucleares, utilizando tecido pulmonar (20 mg) homogeneizados em 500  $\mu\text{L}$  do tampão de lise

1 (10 mM de HEPES (pH 7.6); 15 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM EDTA; 5 mM de β-mercaptoetanol; 0,2% Nonidente P-40), seguida de incubação por 10 minutos em banho de gelo e centrifugação à 800 xg por 30 segundos. O sobrenadante foi recolhido (extrato citoplasmático) e feita adição ao “pellet” de 500 µL do tampão de lise 2 (50 mM HEPES (pH 7.6); 400 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 10% Glicerol; 5 mM de β-mercaptoetanol). Após homogeneização, incubação em banho de gelo por 30 minutos e centrifugação a 800 xg por 10 minutos sendo recolhido o sobrenadante (extrato nuclear). Para a quantificação de proteína foi utilizada a técnica de BCA (#C2284 e #B9643, Sigma-Aldrich, USA). De forma sucinta, foi feita adição de 200 µL da solução contendo cobre e ácido bincinchonico, na proporção 1:60 às amostras, incubação por 30 minutos à 37°C e feita a leitura em espectrofotômetro à 562 nm. Para a técnica de eletroforese, foi utilizado o gel de poliacrilamida (10%) ao qual foram adicionados o extrato citoplasmático (10 µg de proteína) e nuclear (30 µg), posteriormente submetidos à uma diferença de potencial de 80V. Em seguida, as proteínas separadas através do peso molecular foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que foi bloqueada com BSA 5% por 1 hora e incubada com o anticorpo primário (NF-κB p65 #SC-372, Santa Cruz e fosfo-NF-κB p65 (ser 276) #3037, Cell Signalling) “overnight”. As membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com TBST 0,15% (0,015 M Tris-HCl; 0,14 M NaCl; 0,15% Tween 20 – pH 7,6) e incubadas com o anticorpo secundário (IgG anti-coelho conjugado HRP, #HAF008, R&D System) por 2 horas. O ciclo de lavagem com TBST 0,15% foi repetido 3 vezes. Para detecção das bandas foi utilizado ECL (# RPN 2107, GE Healthcare Amersham) e revelação com filme (#8689358, Perkinelmer) e soluções (Revelador: #8610248 e Fixador: #1562826) Kodak. Após completa secagem do filme, o mesmo foi escaneado e feita detecção da densidade das n bandas através do programa Image J (1.43u). O valor de densidade da banda de NF-κB fosforilado (p-NF-κB p65) foi dividido pelo valor da respectiva banda de NF-κB p65, sendo o resultado expresso em unidades arbitrárias.

### **3.9 – CULTURA DE CÉLULAS**

#### **3.9.1 – Macrófagos Alveolares**

Foi utilizada a linhagem de macrófagos alveolares murinos AMJ2C11 proveniente do banco de célula da UFRJ. As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 5% de SFB, penicilina (1x10<sup>6</sup> U/mL) e estreptomicina (0,2 g/mL) e para a realização do experimento foi utilizada a concentração de 0,25 x 10<sup>6</sup> células/ poço. As células foram

incubadas em meio DMEM com 2% de SFB “overnight” à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foi realizada substituição do meio e incubação com diferentes concentrações de talidomida (10<sup>-9</sup> à 10<sup>-3</sup> M; FUNED), infliximabe (1 a 100 µg/mL; Janssen) e XPro 1595 (1 - 100 µg/mL; Xencor) por 1 hora. Em seguida, as células foram estimuladas com sílica (300 µg/mL; Sigma) por um período 6 horas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, o sobrenadante foi recolhido, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C para quantificação da produção de TNF-α.

### **3.9.2 – Células Epiteliais Humanas**

Foi utilizada a linhagem de pneumócitos tipo II (A549) derivados de adenocarcinoma pulmonar humano proveniente do Banco de Células da UFRJ. As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, penicilina (1x10<sup>6</sup> U/mL) e estreptomicina (0,2 g/mL), e para a realização do experimento foi utilizada a concentração de 0,5 x 10<sup>4</sup> células/poço. As células foram incubadas em meio DMEM com 2% de SFB “overnight” à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foi realizada substituição do meio e incubação com diferentes concentrações de talidomida (10<sup>-9</sup> à 10<sup>-3</sup> M; FUNED), infliximabe (1 a 100 µg/mL; Janssen) e XPro 1595 (1 - 100 µg/mL; Xencor) por 1 hora. Posteriormente, as células foram estimuladas com sílica (300 µg/mL; Sigma) por um período 24 horas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final, o sobrenadante foi recolhido e armazenado em freezer -80°C para quantificação da produção de IL-8.

### **3.9.3 – Fibroblastos Pulmonares**

Os fibroblastos pulmonares foram obtidos de ambos os pulmões de camundongos instilados com sílica (7 dias), a partir de processo de digestão enzimática por collagenase tipo I (1 mg/mL) durante 2 horas . As amostras foram centrifugadas a 504 x g, à 4°C durante 10 min e o “pellet” ressuspenso e plaqueado em garrafa médias contendo meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (1x10<sup>6</sup> U/mL) e estreptomicina (0,2 g/mL). Após a terceira passagem, as células foram submetidas ao processo de tripsinização (Tripsina 1,25 g/L + EDTA 0,2 g/L), contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 12,5 x10<sup>3</sup> células/poço. Para a análise da proliferação celular foi utilizada a técnica de incorporação de timidina<sup>+3</sup>H. Vinte e quatro horas após o plaqueamento,

as células foram incubadas com talidomida ( $10^{-9}$  à  $10^{-3}$  M; FUNED), infliximabe (1 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Janssen) e XPro 1595 (1 - 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Xencor) e, em seguida, estimuladas com IL-13 (40  $\text{ng}/\text{mL}$ ). Após 20 horas foram adicionados 0,5  $\mu\text{Ci}$  de timidina  $^3\text{H}$  (Metil- $^3\text{H}$ -Timidina; Amersham) e, feita incubação por 4 horas. O DNA marcado foi transferido para um filtro que posteriormente, foi imerso em líquido de cintilação. A detecção da radioatividade foi realizada em contador beta (Beckman, Série LS-6500).

#### **3.9.4 – Viabilidade celular**

Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado o ensaio colorimétrico com base na utilização do reagente 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-yl) - 2,5 - difeniltetrazolium brometo (MTT). Para tanto as células foram tripsinizadas, e em seguida adicionadas a placas de 96 poços, na densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço. Uma hora após, os compostos foram adicionados e incubação por 21 horas. Em seguida, foi adicionado a solução de MTT (0,5  $\text{mg}/\text{mL}$ ) e as células foram incubadas durante 3 horas. Após esse período a placa foi centrifugada à  $2.800 \times \text{g}$  por 3 minutos à  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e os cristais residuais dissolvidos com DMSO 100%. A análise da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro a 540nm.

#### **3.10 – Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados através de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de “Student -Newman-Keuls”. Para comparação entre dois grupos experimentais, foi utilizado o teste “t” de Student para amostras não-pareadas. No caso da análise da área de granuloma os parâmetros apresentados em forma percentual foram submetidos à transformação arcoseno, a fim de tornar sua distribuição próxima ao normal, permitindo, assim, a realização dos testes de variância descritos acima (194). Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## **4 – Resultados**

### **4.1 – Efeito da talidomida sobre a silicose experimental em camundongos**

#### **4.1.1 – Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas**

Inicialmente avaliamos o efeito da talidomida (25 e 50 mg/kg) sobre a função pulmonar de camundongos silicóticos, com ênfase na resistência das vias aéreas (Figura 4.1A) e elastância pulmonar (Figura 4.1B). Verificamos que os animais silicóticos apresentaram níveis aumentados de resistência e elastância em comparação aos controles (Figura 4.1A e 4.1B, respectivamente). Apenas o aumento no nível de elastância basal foi sensível à maior dose de talidomida. Na condição de estimulação com o agente broncoconstritor metacolina (3, 9 e 27mg/ml), observamos a ocorrência de uma exacerbação na resposta de resistência e elastância nos animais silicóticos quando comparados aos animais do grupo controle, indicando um quadro de hiper-reatividade. O tratamento com talidomida se mostrou eficaz em inibir ambos os parâmetros (Figuras 4.1A e 4.1B).

#### **4.1.2 – Morfologia e morfometria do tecido pulmonar**

Em seguida, realizamos avaliação morfológica dos pulmões, utilizando a coloração por H&E. Observamos que os animais do grupo controle, instilados com salina, apresentaram parênquima com estrutura íntegra e preservada (Figura 4.2A), enquanto que aqueles do grupo estimulado com sílica apresentaram resposta inflamatória caracterizada por marcado infiltrado leucocitário e extensa fibrose com formação de granulomas dispersos no tecido (Figura 4.2B). O tratamento terapêutico com talidomida, nas doses de 25 mg/kg (Figura 4.2C) e 50 mg/kg (Figura 4.2 D), foram eficazes em reduzir tanto o infiltrado inflamatório quanto a formação de granulomas. A análise morfométrica confirmou nossa análise prévia, revelando supressão da resposta fibrótica granulomatosa (Figura 4.2E).



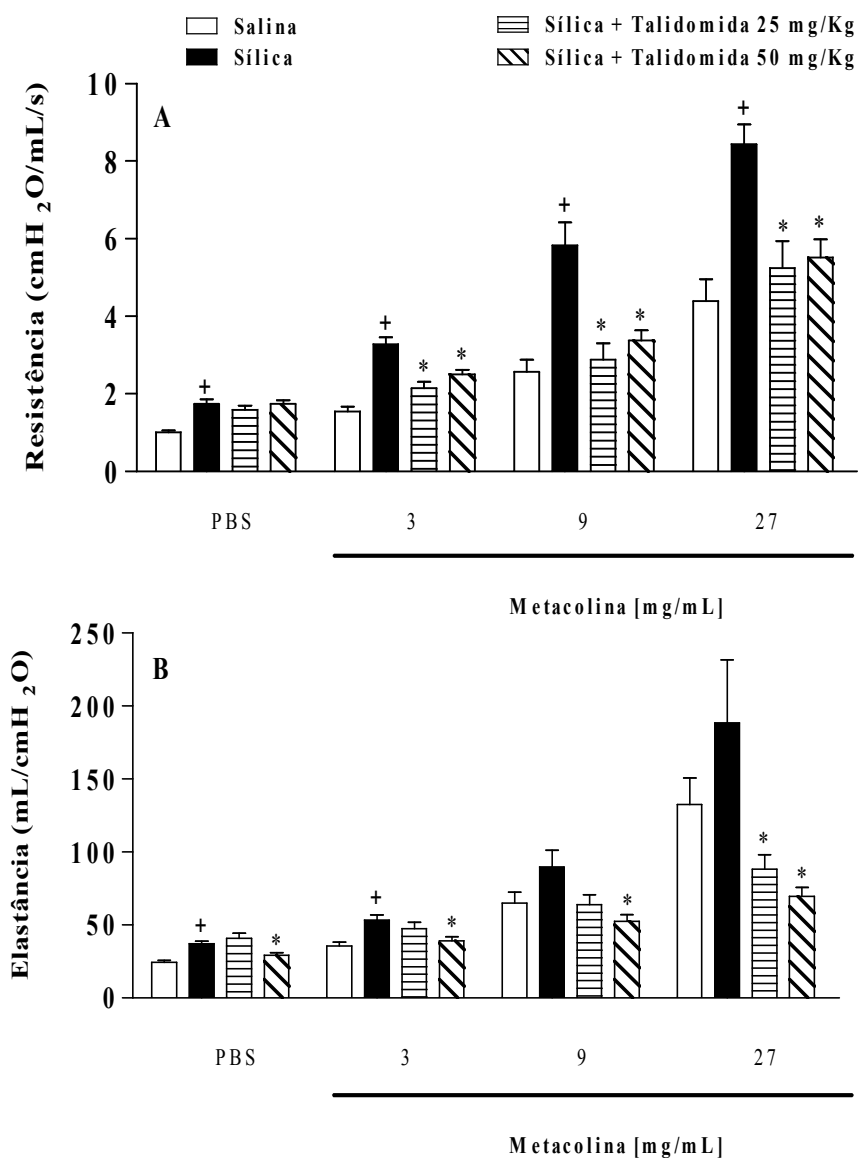


Figura 4.1: Efeito da talidomida sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos instilados com sílica (10mg/50µl). Foram avaliados os parâmetros de (A) resistência das vias aéreas e (B) elastância pulmonar na condição de aerolização de PBS e metacolina (3 - 27 mg/ml). Os camundongos foram tratados a partir do 21º dia após a instilação de sílica durante 7 dias consecutivos. A análise foi realizada 24 horas após a última administração do composto. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de um *n* experimental de 6 a 8 animais por grupo. +  $P < 0,05$  em comparação ao grupo controle; \*  $P < 0.05$  em comparação ao grupo sílica.

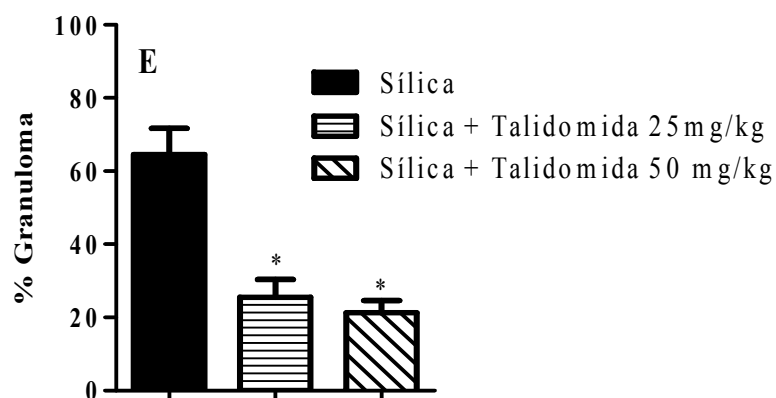
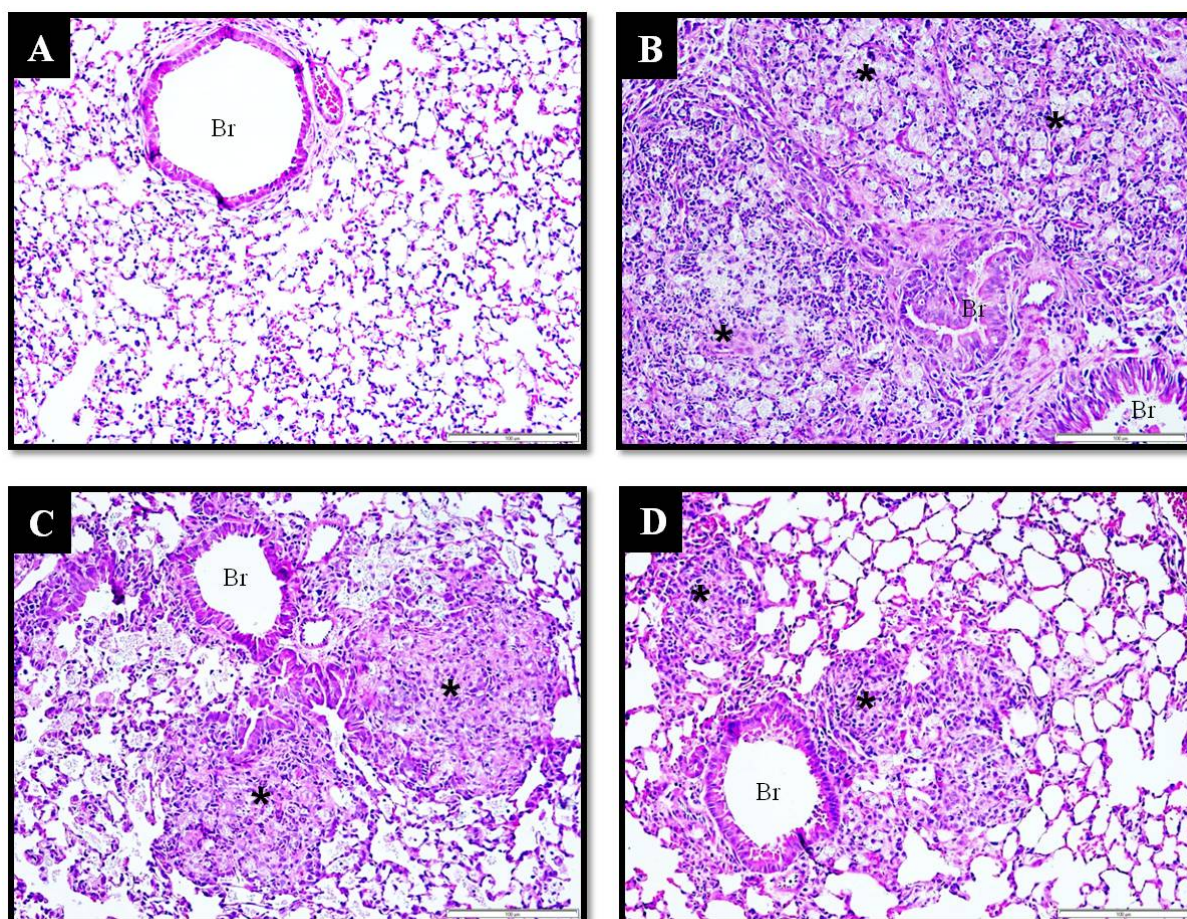


Figura 4.2: Efeito da talidomida sobre alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A); sílica (10 mg/50 $\mu$ L) (B); sílica e tratados com talidomida (25 mg/kg) (C); sílica e tratados com de talidomida (50 mg/kg) (D). Análise morfométrica do parênquima pulmonar (E). As imagens são representativas de 6 a 8 animais por grupo. Barra = 100  $\mu$ m; Br = bronquíolos; \*= granuloma. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 6 animais por grupo. \* $P$ <0,05 comparado ao grupo sílica.

Na sequência, avaliamos o efeito do tratamento com a talidomida sobre a deposição de componentes da matriz extracelular, com especial ênfase sobre o colágeno. Através da coloração de Picrosirius vimos que os pulmões dos camundongos do grupo controle apresentaram discreta marcação rósea, correspondente ao tecido conjuntivo constituinte do parênquima e à membrana basal das vias aéreas e vasos sanguíneos (Figura 4.3A). Os animais silicóticos mostraram intensa marcação preferencialmente na região correspondente à presença dos granulomas (Figura 4.3B). Após o tratamento com talidomida, verificamos que a maior dose se mostrou eficaz em inibir a deposição de colágeno no pulmão dos camundongos silicóticos (Figura 4.3C e 4.3D), enquanto que a dose menor não exerceu efeito significativo (Figura 4.3C). A análise quantitativa do conteúdo de colágeno pulmonar confirmou os achados obtidos quando da análise histológica (Figura 4.3E).

#### **4.1.3 – Geração de mediadores inflamatórios/fibróticos no tecido pulmonar**

Buscando compreender o mecanismo de ação, analisamos o efeito da talidomida sobre a geração de mediadores inflamatórios e fibróticos produzidos ao nível do tecido pulmonar. Verificamos primeiramente que os animais silicóticos apresentaram aumento nos níveis das citocinas TNF- $\alpha$  (Figura 4.4A), IFN- $\gamma$  (Figura 4.4B) e IL-6 (Figura 4.4C) e das quimiocinas MCP-1 (Figura 4.4D) e MIP-2 (Figura 4.4E) ao nível do tecido pulmonar. O tratamento dos animais silicóticos com talidomida inibiu a produção de MCP-1 (Figura 4.4D) e IFN- $\gamma$  (Figura 4.4B), em ambas as doses testadas, enquanto que TNF- $\alpha$  (Figura 4.4A), MIP-2 (Figura 4.4E) e IL-6 (Figura 4.4C) foram reduzidos somente na maior dose de talidomida (50 mg/kg).

#### **4.1.4 - Células alvos presentes no tecido pulmonar**

Nesta etapa partimos para avaliar o efeito da talidomida sobre células alvos importantes no contexto da silicose, incluindo macrófagos e fibroblastos. Tivemos como base a técnica de imunohistoquímica quando foram identificadas células positivas para os antígenos F4/80 e  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) marcadores de macrófagos e fibroblastos ativados (miofibroblastos), respectivamente.

Analisando a expressão de F4/80, vimos que os animais do grupo controle apresentaram ausência de marcação no parênquima pulmonar (Figura 4.5A), enquanto que os animais silicóticos apresentaram marcado aumento na população de células marcadas localizadas predominantemente na região de granulomas (Figura 4.5B). O tratamento dos animais silicóticos com talidomida, em ambas as doses, levou a uma redução na expressão de

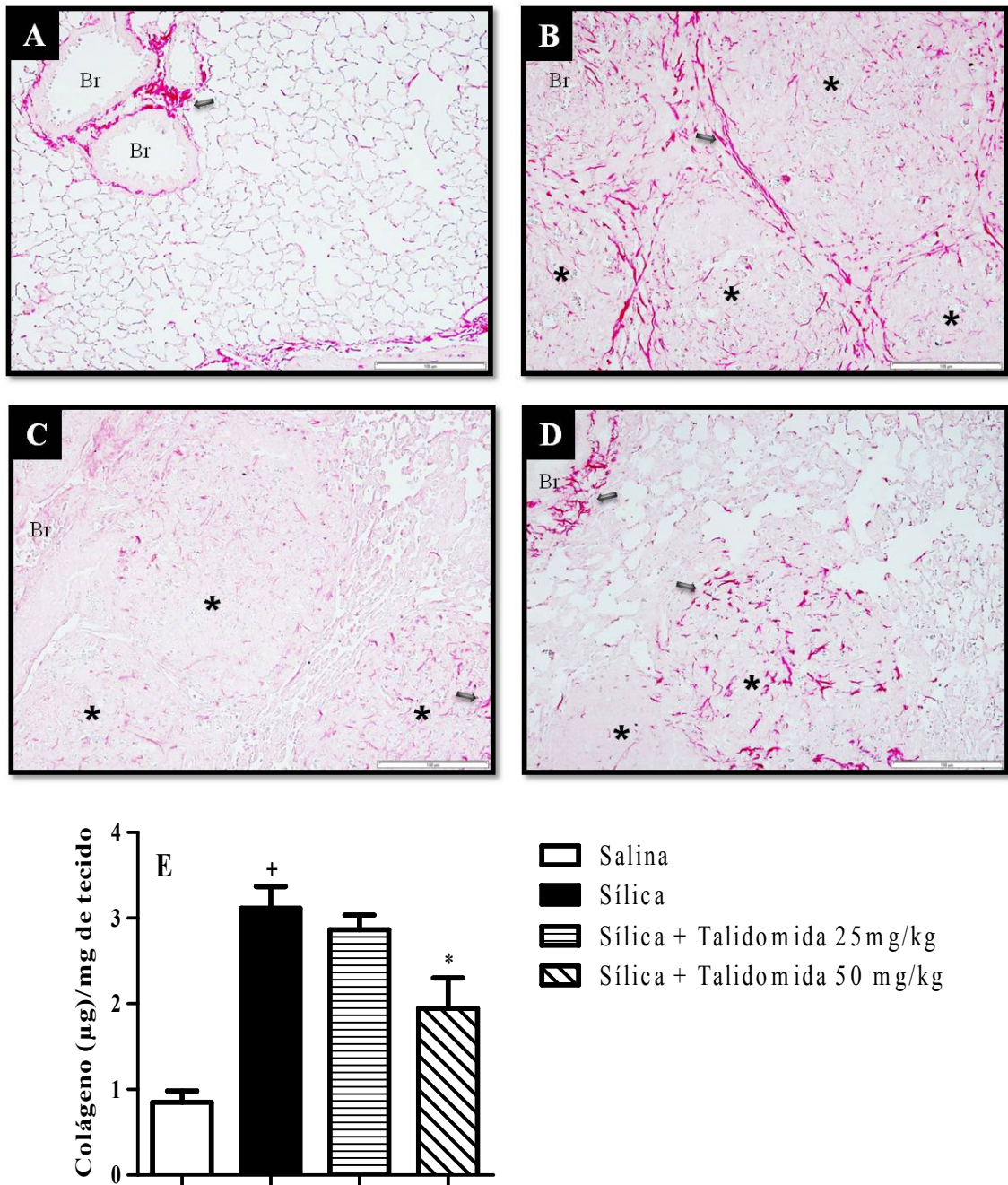


Figura 4.3: Efeito da talidomida sobre a deposição de colágeno no pulmão de camundongos silicóticos. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A); sílica (10 mg/50µL) (B); sílica e tratados com talidomida (25 mg/kg) (C); sílica e tratados com de talidomida (50 mg/kg) (D). Análise quantitativa do conteúdo de colágeno tecidual (E). As imagens são representativas de 6 a 8 animais por grupo. **Br** = bronquíolos; \*= granuloma. Seta= fibras colágenas. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de no mínimo 6 animais por grupo. Barra = 100µm; +  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; \* $P < 0,05$  comparado ao grupo sílica.

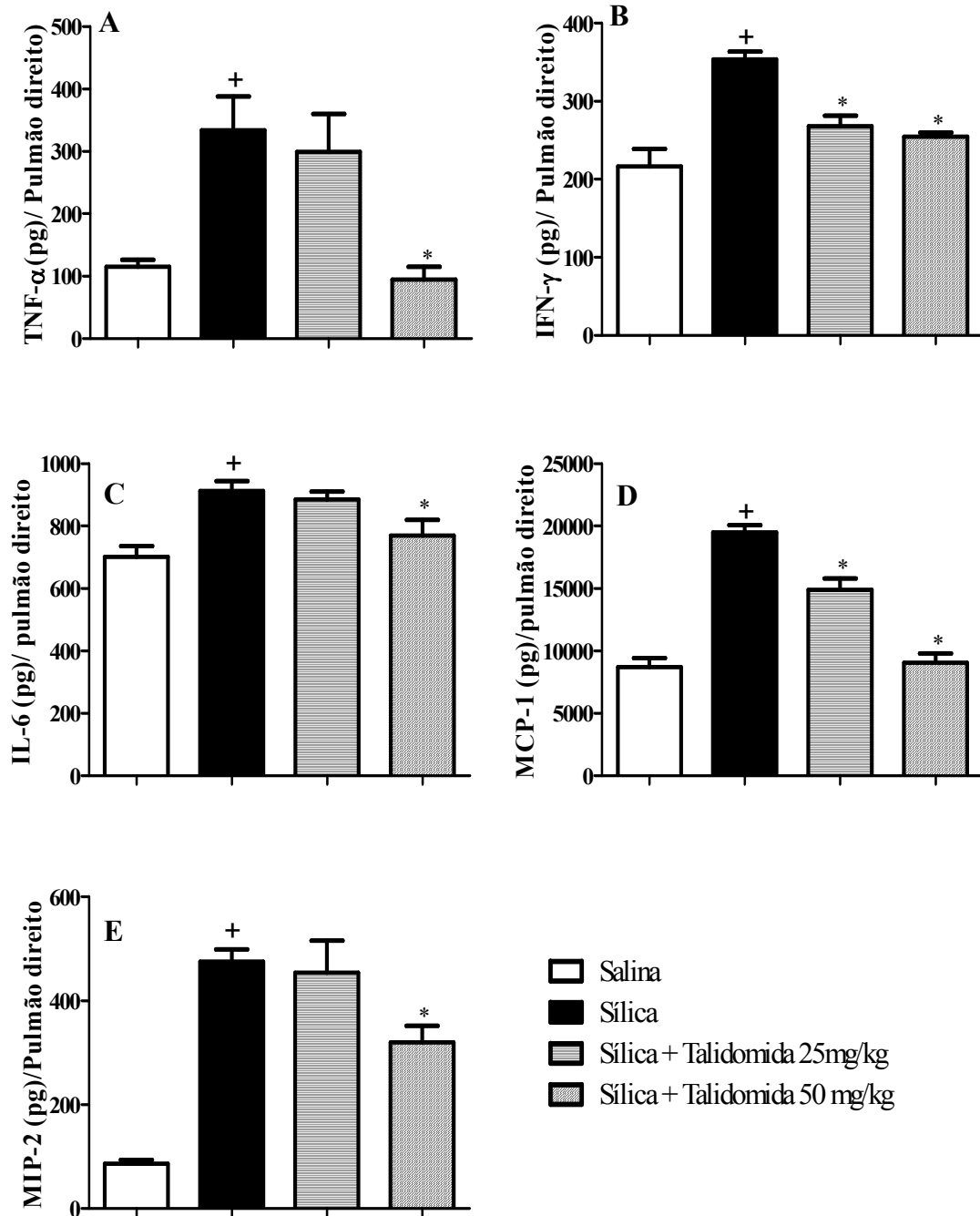


Figura 4.4: Efeito da talidomida sobre a geração de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos silicóticos. (A) TNF- $\alpha$ ; (B) IFN- $\gamma$ ; (C) IL-6; (D) MCP-1 e (E) MIP-2. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 6 animais por grupo. +  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo instilado com sílica.

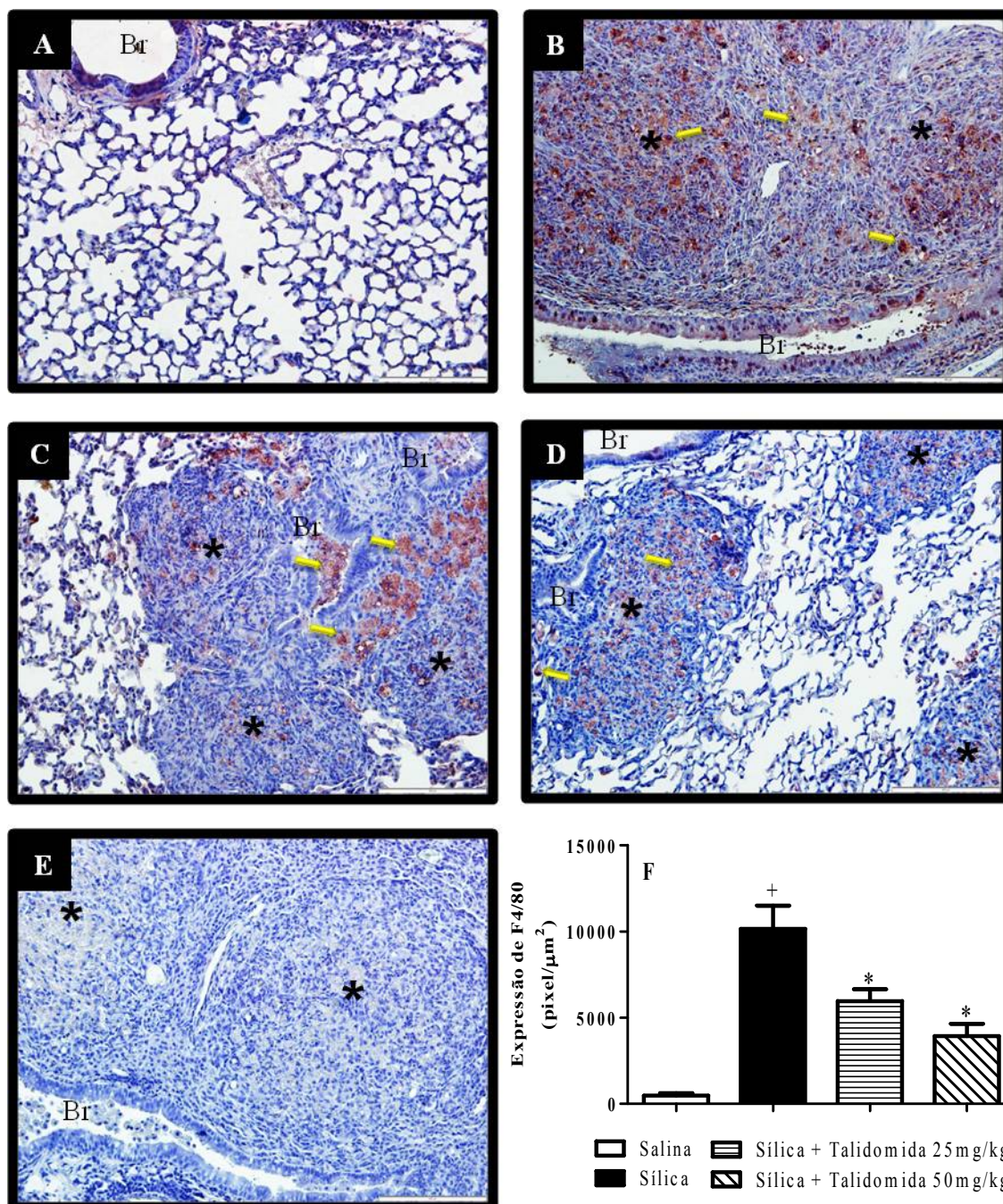


Figura 4.5: Efeito da talidomida sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos silicóticos. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A); sílica (10 mg/50μL) (B); sílica e tratados com talidomida (25 mg/kg) (C); sílica e tratados com talidomida (50 mg/kg) (D); Controle negativo – omissão do anticorpo primário (E); Avaliação quantitativa em pixels (F). Barra = 100 μm; **Br** = bronquíolos; \*= granuloma. Seta = células positivas para F4/80. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de no mínimo 5 animais por grupo. +  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo instilado com sílica.

F4/80 (Figuras 4.5C e 4.5D). A análise quantitativa realizada através da contagem de “pixels”, em sistema de analisador de imagem, confirmou os achados histológicos (Figura 4.5F). É importante mencionar que o controle negativo do ensaio de imunohistoquímica incluiu a omissão do anticorpo primário e não foi evidenciada qualquer marcação, garantindo a especificidade da reação (Figura 4.5E).

Em seguida, avaliamos a expressão de  $\alpha$ -SMA em células presente no parênquima pulmonar. Como ilustrado na figura 4.6, observamos ausência de marcação nos animais do grupo controle (Figura 4.6A), enquanto que no pulmão dos camundongos silicóticos foi verificada presença de células positivas para  $\alpha$ -SMA, predominantemente na região de formação de granulomas (Figura 4.6B). O tratamento com talidomida, em ambas as doses, foi capaz de reduzir a intensidade de marcação (Figuras 4.6C e 4.6D). A análise quantitativa do número de “pixels” confirmou os achados histológicos (Figura 4.6E).

#### **4.1.4.1 - Células alvos *in vitro***

Como passo seguinte, passamos a avaliar o potencial efeito direto da talidomida sobre células relevantes no contexto da silicose incluindo macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. Utilizando linhagem de macrófagos alveolares de camundongos (AMJ2C11), verificamos que a incubação com partículas de sílica (300  $\mu$ g/ml) induziu a produção/secreção de TNF- $\alpha$ , em comparação às células incubadas com meio, e que o pré-tratamento com talidomida ( $10^{-9}$  –  $10^{-3}$  M) foi capaz de inibir esta resposta em todas as concentrações testadas (Figura 4.7A). Ao observarmos a viabilidade das células frente ao tratamento com a talidomida, apenas a maior concentração se mostrou tóxica para as células (Figura 4.7B).

Avaliamos, então, o efeito da talidomida sobre fibroblastos pulmonares provenientes de silicóticos (Figura 4.8), observamos que a talidomida não interferiu com a viabilidade de fibroblastos silicóticos (Figura 4.8A). Quando da estimulação com a citocina pró-fibrótica IL-13 (40 ng/ml) vimos uma clara resposta de proliferação celular quando comparada àquela decorrente da incubação das células apenas com meio. Este fenômeno mostrou-se sensível frente ao tratamento das células com talidomida (Figura 4.8B).

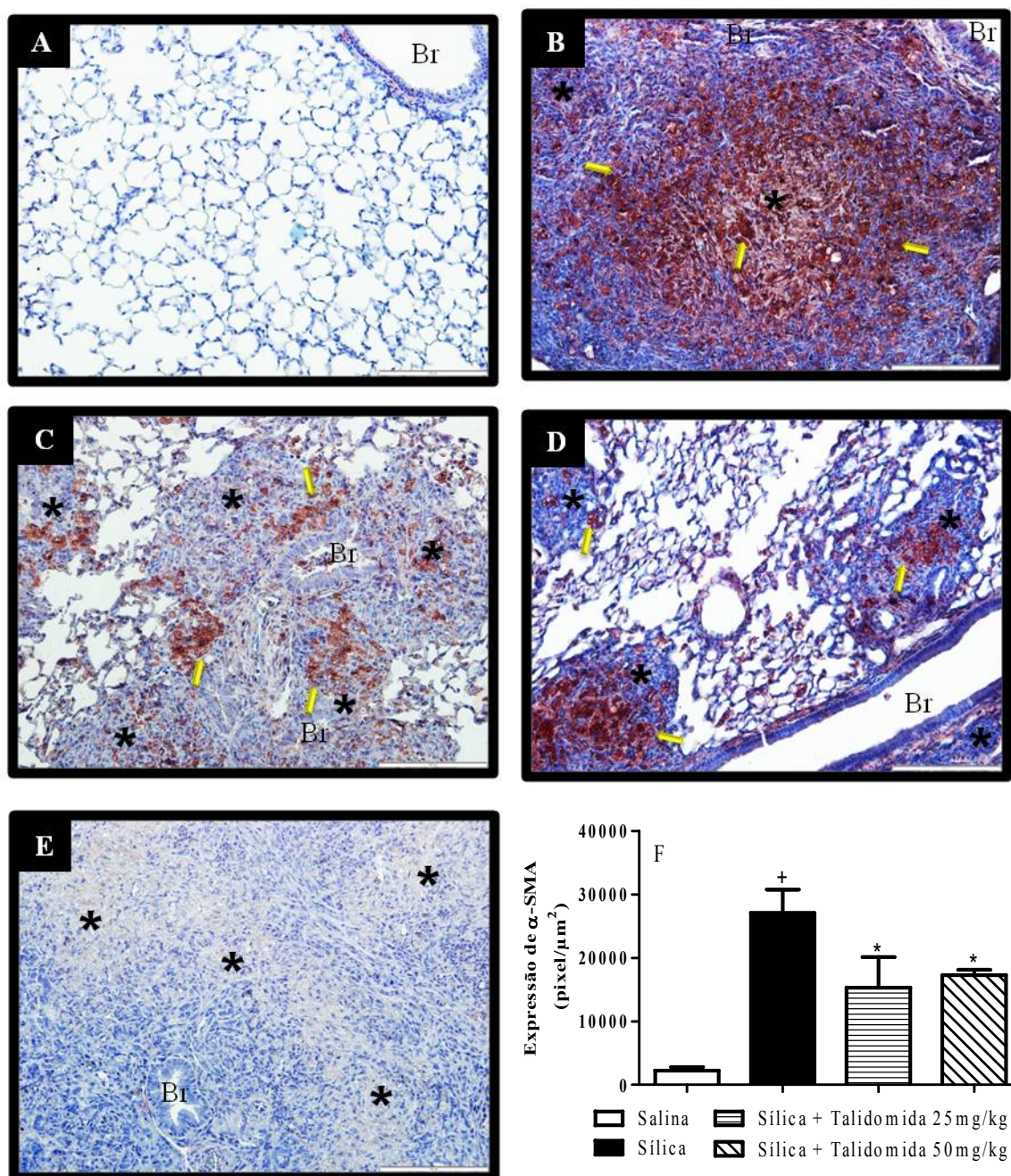


Figura 4.6: Efeito da talidomida sobre a expressão de  $\alpha$ -SMA no pulmão de camundongos silicóticos. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A); sílica (10 mg/50 $\mu\text{L}$ ) (B); sílica e tratados com talidomida (25 mg/kg) (C); sílica e tratados com talidomida (50 mg/kg) (D); Controle negativo – omissão do anticorpo primário (E); Avaliação quantitativa em pixels (F). Barra = 100  $\mu\text{m}$ ; Br = bronquíolos; \*= granuloma.; Seta = células positivas para F4/80. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 5 animais por grupo. +  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; \* $P < 0,05$  comparado ao grupo instilado com sílica.



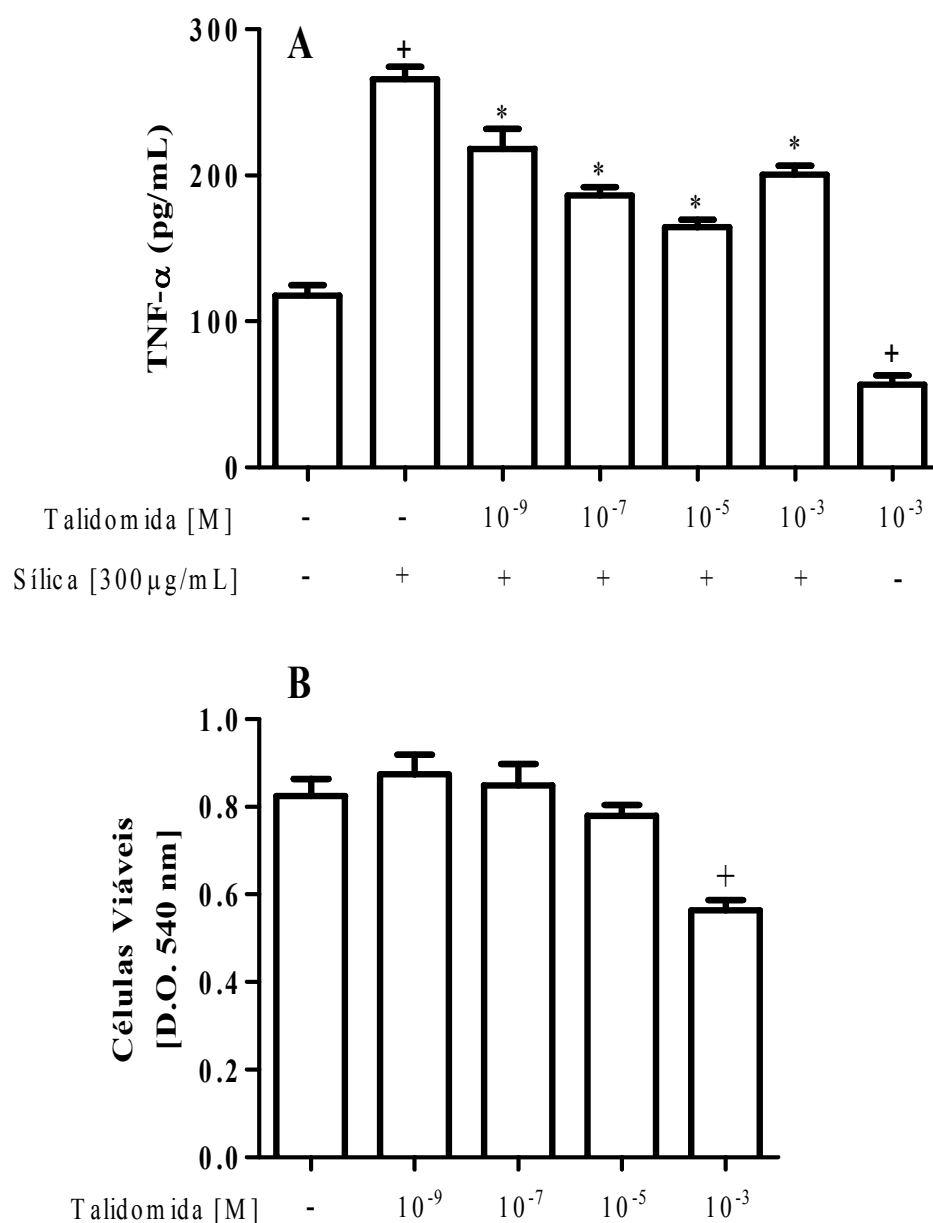


Figura 4.7: Efeito da talidomida sobre a ativação de macrófagos alveolares (AMJ2C11) estimulados com sílica *in vitro*. (A), Quantificação de TNF- $\alpha$  do sobrenadante 6 horas após estímulo com sílica (300  $\mu$ g/mL); (B), Avaliação da viabilidade celular por MTT. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de triplicata por grupo. Este gráfico é representativo de dois experimentos. +  $P < 0,05$  comparado ao grupo não-estimulado; \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo estimulado com Sílica

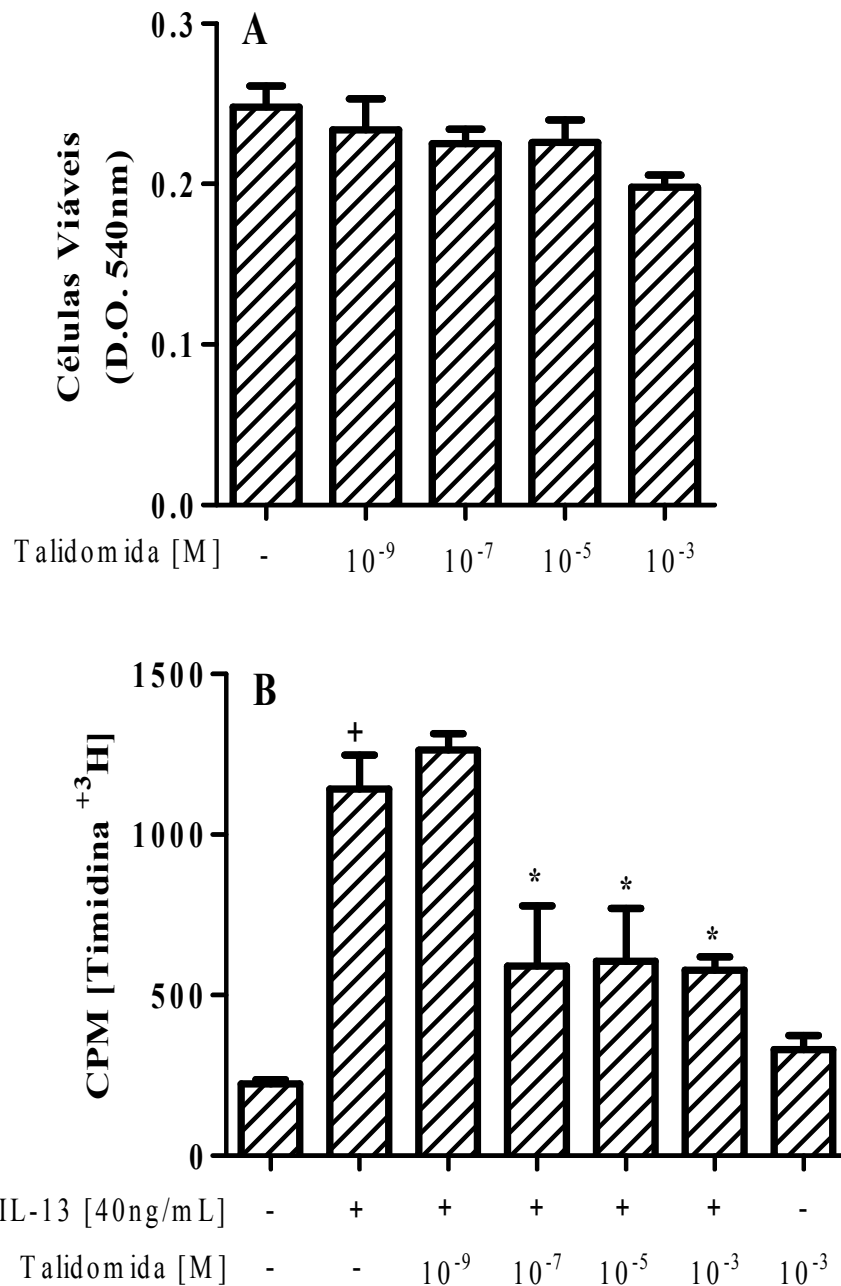


Figura 4.8: Efeito da talidomida sobre a viabilidade e proliferação de fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos silicóticos estimulados com IL-13 *in vitro*. (A), Avaliação da viabilidade celular por MTT; (B), Proliferação de fibroblastos provenientes de camundongos silicóticos. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo triplicata por grupo. Este gráfico é representativo de dois experimentos. <sup>+</sup>  $P < 0,05$  comparado ao grupo não estimulado; \* $P < 0,05$  comparado ao grupo estimulado com IL-13.

a sequência analisamos as células epiteliais e para tanto utilizamos a linhagem de alveolares humanas (linhagem A549). Observamos que a estimulação com partículas de sílica (300 µg/ml) levou à produção e secreção de IL-8 quando comparada à incubação com meio (Figura 4.9A). A avaliação da viabilidade celular através do ensaio de MTT mostrou que a concentração de  $10^{-3}$ M reduziu de forma discreta a viabilidade desta população de células (Figura 4.9B).

## **4.2 – Efeito do infliximabe e XPro-1595 sobre a silicose experimental em camundongos**

Nesta etapa do trabalho fizemos uso de compostos inibidores do TNF- $\alpha$ , com especial destaque para o infliximabe, um anticorpo monoclonal quimérico (humano/murino) neutralizante das formas solúvel e transmembranar do TNF- $\alpha$ . O composto XPro1595, um inibidor dominante negativo seletivo para a forma solúvel de TNF- $\alpha$ , foi utilizado para fins de comparação.

### **4.2.1 - Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas**

De forma a identificar a dose mais eficaz de infliximabe a ser utilizada no decorrer do estudo, foram testadas as concentrações de 1,25, 2,5 e 5,0 mg/kg, seguindo esquema terapêutico de tratamento (ver item 3.2, Figura 3.1). Tomando por base a função pulmonar e análise morfométrica, foi escolhida a dose de 1,25 mg/kg para utilização nos experimentos subsequentes, em função de sua maior eficiência em inibir os parâmetros avaliados (dados não mostrados). Conforme ilustrado na Figura 4.10, e de forma coerente aos achados anteriores, verificamos que os animais silicóticos apresentaram níveis basais aumentados de resistência das vias aéreas e elastância pulmonar, assim como, um quadro de hiper-reatividade quando da estimulação com aerossol de metacolina (Figuras 4.10A e 4.10B). O tratamento terapêutico com infliximabe (1,25 mg/kg) foi capaz de reduzir o aumento no basal de resistência e elastância pulmonares, assim como a exacerbação quando do estímulo com metacolina, em sua maior dose (Figuras 4.10A e 4.10B, respectivamente). No caso particular do composto dominante negativo XPro1595, foram testados dois tipos de protocolo distintos que incluíram administração profilática e terapêutica (ver item 3.2, Figura 3.1C e Figura 3.1D). Resultados similares foram observados no caso do tratamento profilático e terapêutico com XPro1595 (10 mg/kg) (ver item 3.2, Figura 3.1C e Figura 3.1D), quando foi evidenciada supressão do quadro de hiper-reatividade nos animais silicóticos (Figuras 4.10).

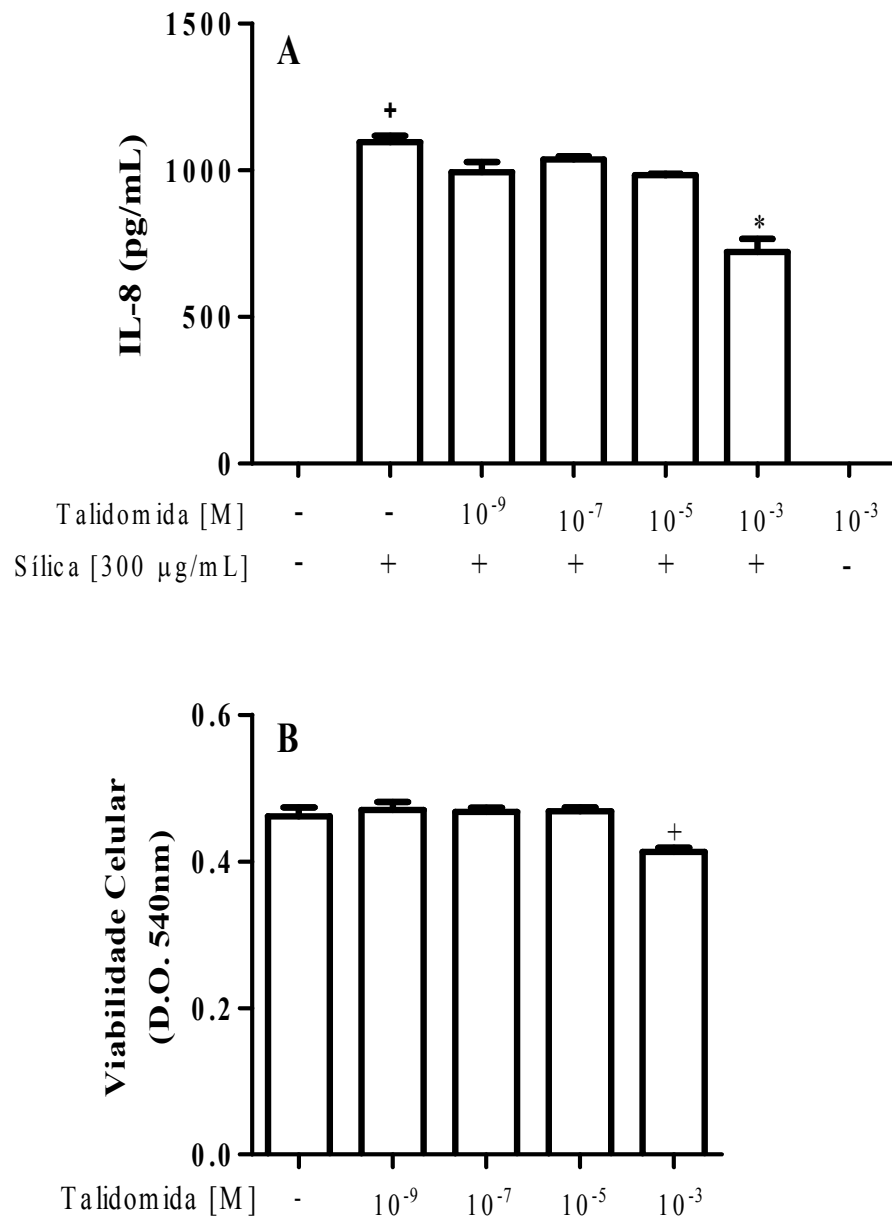


Figura 4.9: Efeito da talidomida sobre a ativação de células epiteliais humana (A549) estimulados com sílica *in vitro*. (A), Quantificação de IL-8 no sobrenadante 24 horas após estímulo com sílica (300 µg/mL); (B), Avaliação da viabilidade celular por MTT. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de triplicata por grupo. Este gráfico é representativo de 2 experimentos. +  $P < 0,05$  comparado ao grupo Não-estimulado; \* $P < 0,05$  comparado ao grupo estimulado com sílica

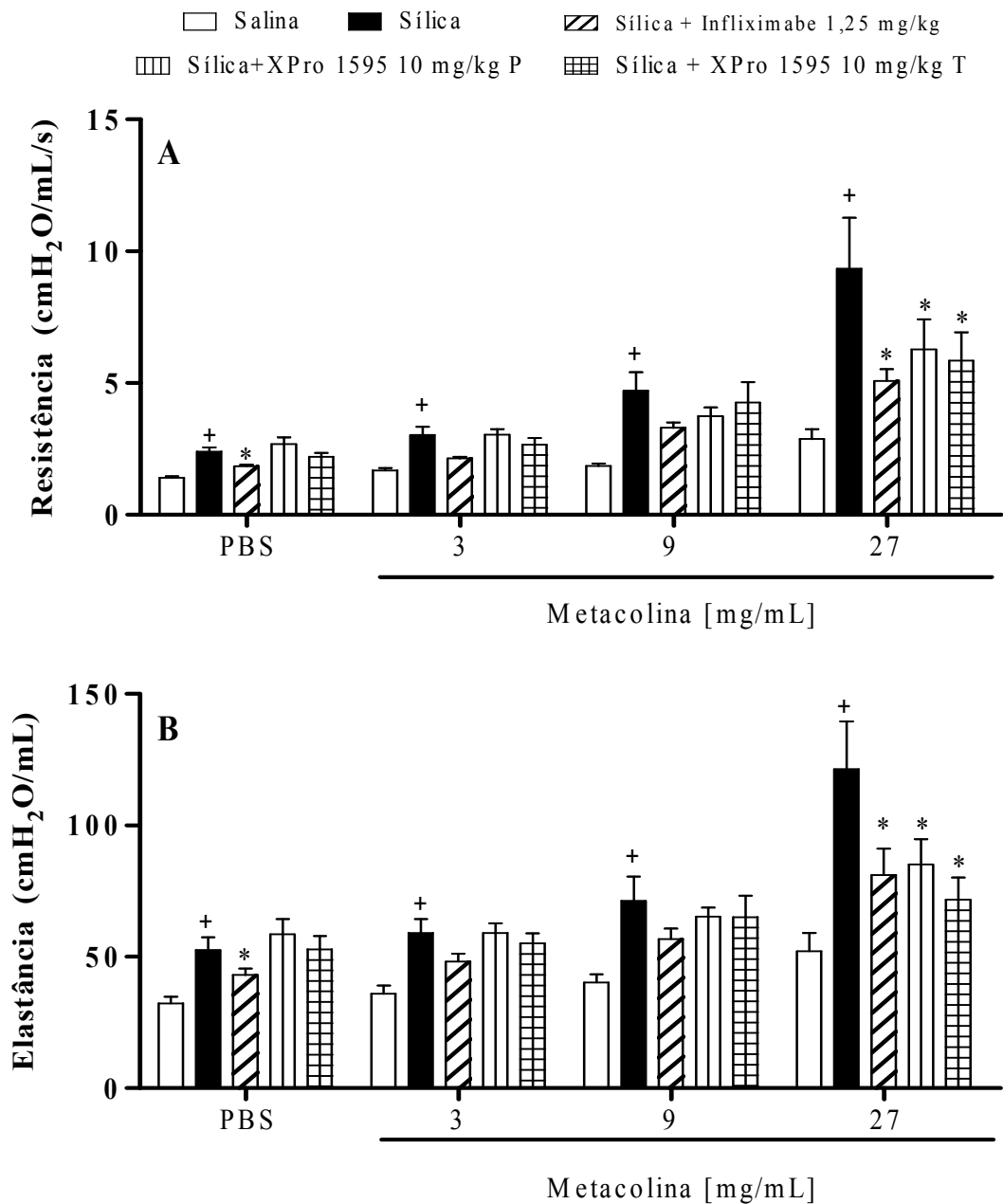


Figura 4.10: Efeito do infliximabe e do XPro-1595 sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos instilados com sílica (10mg/50µl). Foram avaliados os parâmetros de (A) resistência das vias aéreas e (B) elastância pulmonar na condição de aerolização de PBS e metacolina (3 - 27 mg/ml). P, indica profilático; T, indica terapêutico. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de um n experimental de 6 a 8 animais por grupo. +  $P < 0,05$  em comparação ao grupo controle; \*  $P < 0.05$  em comparação ao grupo sílica.

#### 4.2.1.2 – Morfologia e morfometria do tecido pulmonar

A avaliação do tecido pulmonar revelou que os animais instilados com salina mostraram aspecto morfológico normal, sendo observados espaços alveolares livres de infiltrado inflamatório e septos alveolares normais (Figura 4.11A). Os animais silicóticos apresentaram extensa área de formação de granulomas localizados de forma dispersa no tecido pulmonar (Figura 4.11B). O tratamento com infliximabe (1,25 mg/kg) (Figura 4.11C), assim como com o XPro1595 (10 mg/kg), reduziu significativamente os componentes inflamatório e fibrótico do quadro silicótico murino (Figuras 4.11D e 4.11E, respectivamente). A análise morfométrica ratificou os achados morfológicos (Figura 4.11F).

A análise de fibras colágenas, utilizando corante de Picrosirius, mostrou que nos camundongos silicóticos foi detectado marcado aumento no depósito de fibras colágenas correspondente à região dos granulomas (Figura 4.12B), enquanto que os animais controles apresentaram pequena quantidade basal de fibras colágenas ao redor de vasos e vias aéreas (Figura 4.12A). O tratamento com infliximabe mostrou-se efetivo em atenuar a deposição de colágeno tecidual nos animais silicóticos (Figura 4.12C), fenômeno também observado no caso da administração profilática e terapêutica do composto XPro1595 (Figuras 4.12D e 4.12E, respectivamente). A quantificação do conteúdo de colágeno confirmou os achados morfológicos (Figura 4.12F).

#### 4.2.1.3 – Geração de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar

Avaliando o perfil de mediadores produzidos no pulmão de camundongos expostos à sílica, verificamos aumento nos níveis das citocinas TNF- $\alpha$  (Figura 4.13A), IL1- $\beta$  (Figura 4.13B) e TGF- $\beta$  (Figura 4.13C), assim como das quimiocinas MIP-1 $\alpha$  (Figura 4.13D) e da MIP-2 (Figura 4.13E) em comparação aos animais controles. Quando da administração de infliximabe observamos redução nos níveis dos mediadores analisados, incluindo TNF- $\alpha$  (Figura 4.13A), IL1- $\beta$  (Figura 4.13B) e TGF- $\beta$  (Figura 4.13C), MIP-1 $\alpha$  (Figura 4.13D) e de MIP-2 (Figura 4.13E). No caso específico do tratamento com XPro1595, foi observado que apenas TGF- $\beta$  (Figura 4.13C), MIP-1 $\alpha$  (Figura 4.13D) e de MIP-2 (Figura 4.13E) mostraram-se sensíveis ao efeito inibitório do composto.

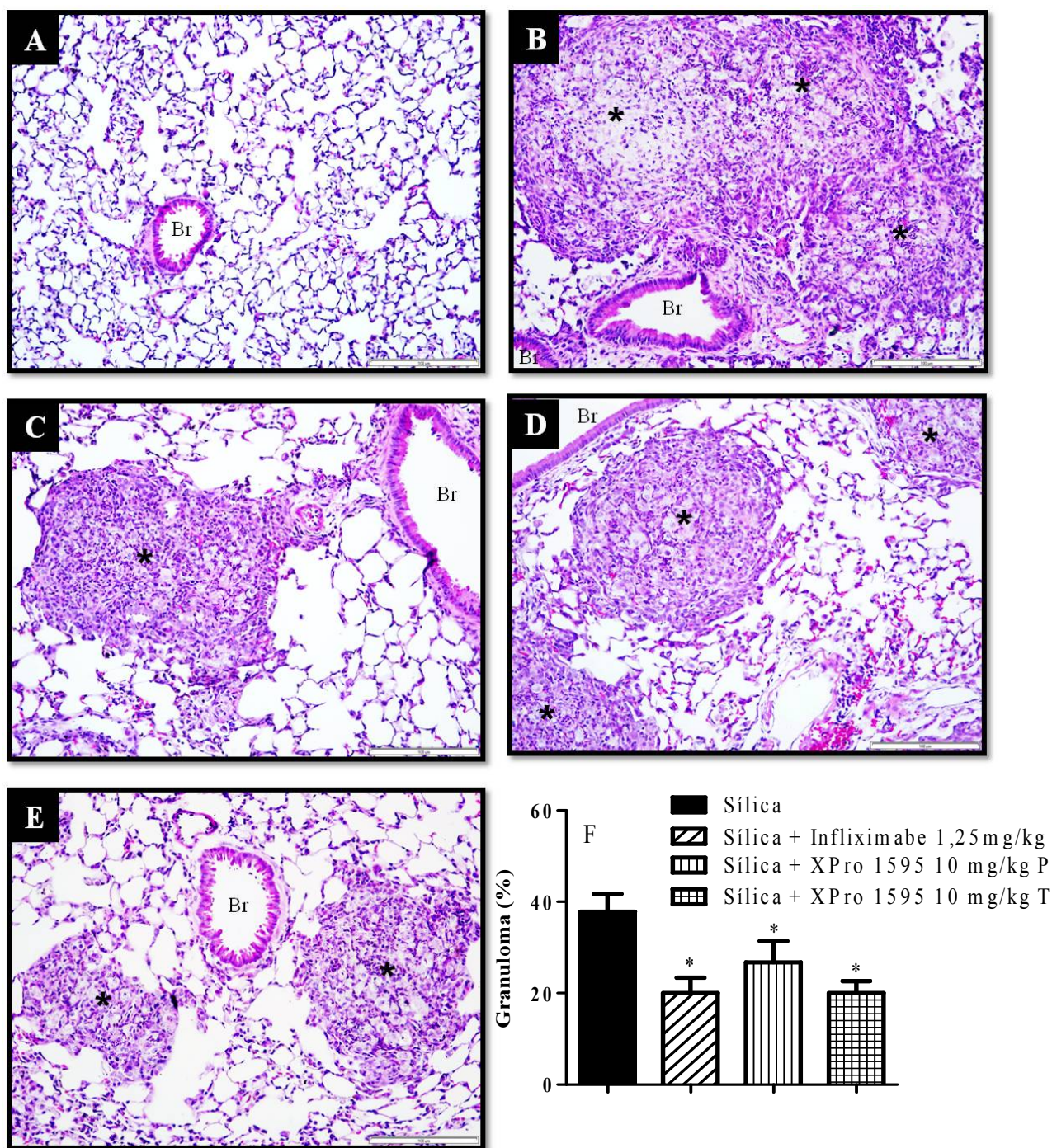


Figura 4.11: Efeito do infliximabe e do XPro-1595 sobre alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A); sílica (10 mg/50 $\mu$ L) (B); sílica e tratados com infliximabe (1,25 mg/kg) (C); sílica e tratados com XPro 1595 (10 mg/kg) – Profilático (D); sílica e tratados com XPro 1595 (10 mg/kg) – Terapêutico (E). Análise morfométrica de parênquima pulmonar (F). As imagens são representativas de 6 a 8 animais por grupo. Barra = 100  $\mu$ m; Br = bronquíolos; \* = granuloma.. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 6 animais por grupo. \* $P$ <0,05 comparado ao grupo sílica.

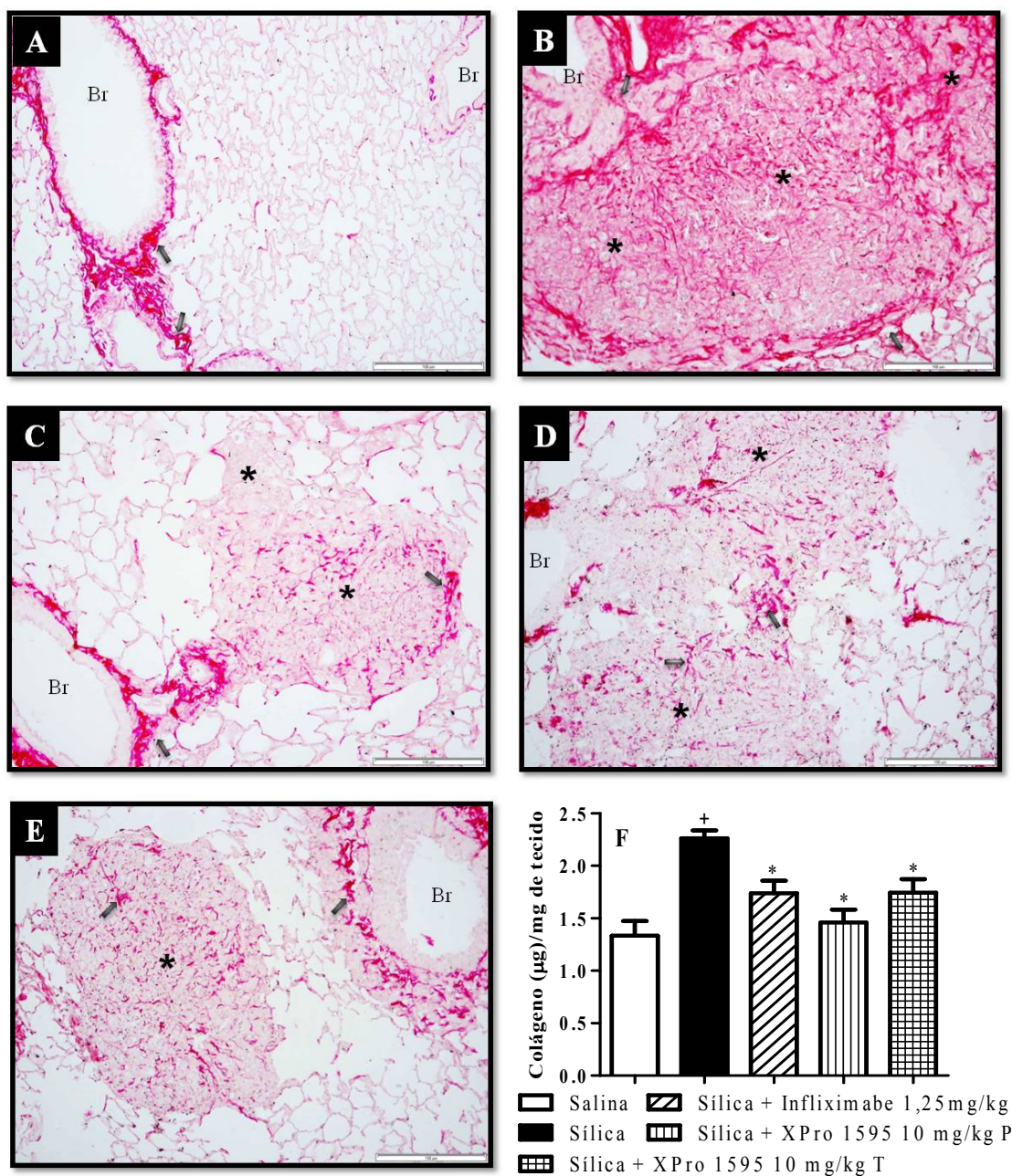


Figura 4.12: Efeito do infliximabe e do XPro1595 sobre a deposição de colágeno no pulmão de camundongos silicóticos. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A); sílica (10 mg/50µL) (B); sílica e tratados com infliximabe (1,25 mg/kg) (C); sílica e tratados com XPro 1595 (10 mg/kg) – Profilático (D); sílica e tratados com XPro 1595 (10 mg/kg) – Terapêutico (E). Análise quantitativa do conteúdo de colágeno tecidual (F). As imagens são representativas de 6 a 8 animais por grupo. Br = bronquíolos; \*= granuloma. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de no mínimo 6 animais por grupo. Barra = 100 µm; +  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo sílica.



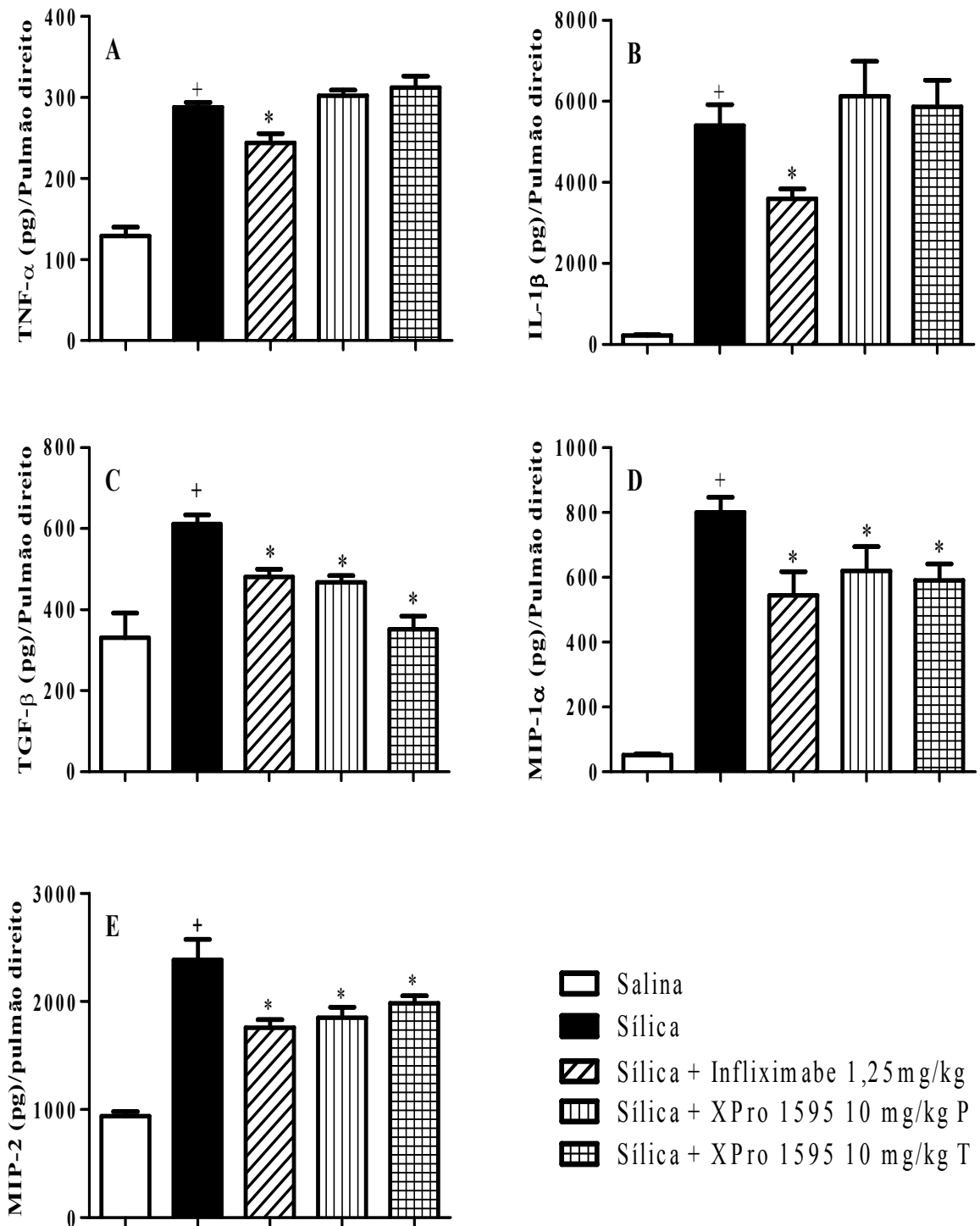


Figura 4.13: Efeito do infliximabe e do XPro-1595 sobre a geração de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos silicóticos. (A) TNF- $\alpha$ ; (B) IL- $\beta$ ; (C) TGF- $\beta$ ; (D) MIP-1 $\alpha$  e (E) MIP-2. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 6 animais por grupo. +  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo instilado com sílica.

#### 4.2.1.4 – Células alvos presentes no tecido pulmonar

De forma a compreender os potenciais alvos para infliximabe e XPro1595, foi realizada análise de macrófagos e fibroblastos através de técnica de imunohistoquímica. Notamos que as células positivas para o antígeno F4/80 se mostraram em número aumentado no pulmão dos animais silicóticos (Figuras 4.14B), em comparação aos animais controles (Figuras 4.14A). O tratamento com infliximabe reduziu significativamente a marcação para F4/80 (Figuras 4.14C), assim como verificado com o composto XPro1595 – tanto no esquema profilático como terapêutico (Figura 4.14E). No caso de fibroblastos, detectamos marcação aumentada para  $\alpha$ -SMA no pulmão de camundongos silicóticos (Figura 4.15B), em relação aos controles (Figura 4.15A). O tratamento com o infliximabe (Figuras 4.15C) e com o XPro1595, significativamente reduziu a marcação tanto para F4/80 como para  $\alpha$ -SMA (Figuras 4.15D e 4.15E). A análise quantitativa realizada através da contagem de “pixels”, em sistema de analisador de imagem, confirmou os achados qualitativos tanto para F4/80 (Figura 4.14F) como para  $\alpha$ -SMA (Figura 4.15F). O controle negativo do ensaio incluiu a omissão do anticorpo primário e não foi evidenciada qualquer marcação, garantindo a especificidade da reação (Figura 4.14E e 4.15E).

##### 4.2.1.4.1 - Células alvos *in vitro*

Seguindo a estratégia utilizada previamente, partimos para analisar o potencial efeito do infliximabe e XPro1595 sobre tipos celulares importantes no contexto da silicose. Verificamos que macrófagos alveolares murinos (linhagem AMJ2C11) foram responsivos à estimulação com sílica, conforme evidenciado pelo aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  liberado no sobrenadante (Figura 4.16A). O pré-tratamento das células com infliximabe (1 e 100 ng/mL) reduziu de forma discreta os níveis de TNF- $\alpha$  produzido (Figura 4.16A). Nas mesmas condições, o composto XPro1595, apenas em sua maior concentração, apresentou discreto efeito inibitório (Figura 4.16A). Entretanto, esta concentração reduziu a viabilidade destas células (Figura 4.16B). Ambos os compostos não foram capazes de modificar os níveis basais de TNF- $\alpha$  (células controles incubadas com meio).

No caso de fibroblastos pulmonares, provenientes de camundongos silicóticos, evidenciamos um padrão esperado de proliferação celular frente à ativação com IL-13 e que o tratamento com infliximabe (1 e 100 ng/mL) inibiu de forma parcial, porém significativa este fenômeno (Figura 4.17A), de forma complementar o infliximabe também foi capaz de aumentar a viabilidade celular (Figura 4.17B). Em outro grupo de experimentos, optamos por

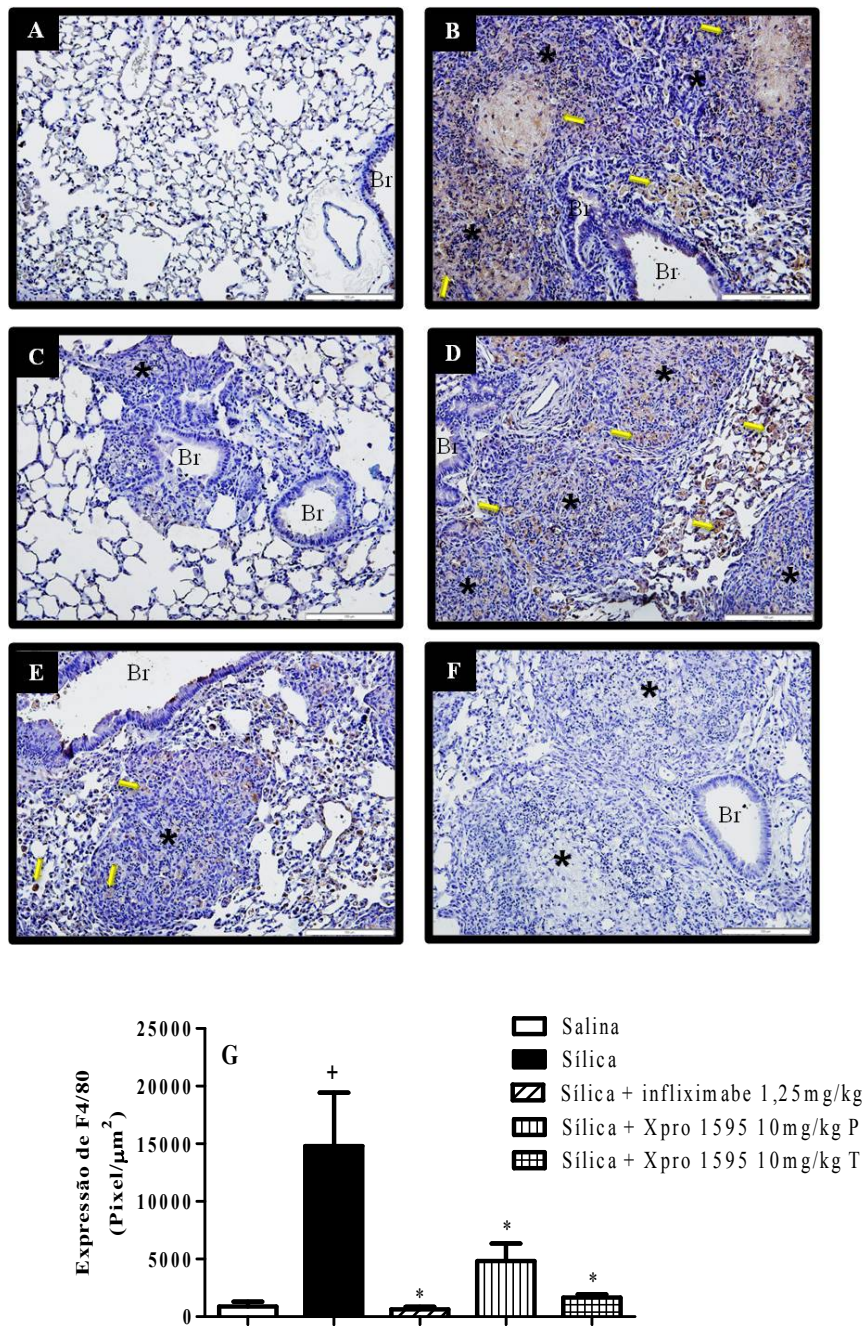


Figura 4.14: Efeito do infliximabe e do XPro1595 sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos silicóticos. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A); sílica (10 mg/50μL) (B); sílica e tratados com infliximabe (1,25 mg/kg) (C); sílica e tratados com XPro 1595 (10 mg/kg) – Profilático (D); sílica e tratados com XPro 1595 (10 mg/kg) – Terapêutico (E).. Controle negativo – omissão do anticorpo primário (F); Avaliação quantitativa em pixels (G). Barra = 100 μm. Br = bronquíolos; \*= granuloma. Seta = células positivas para F4/80. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de no mínimo 5 animais por grupo. +  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; \* $P < 0,05$  comparado ao grupo instilado com sílica.

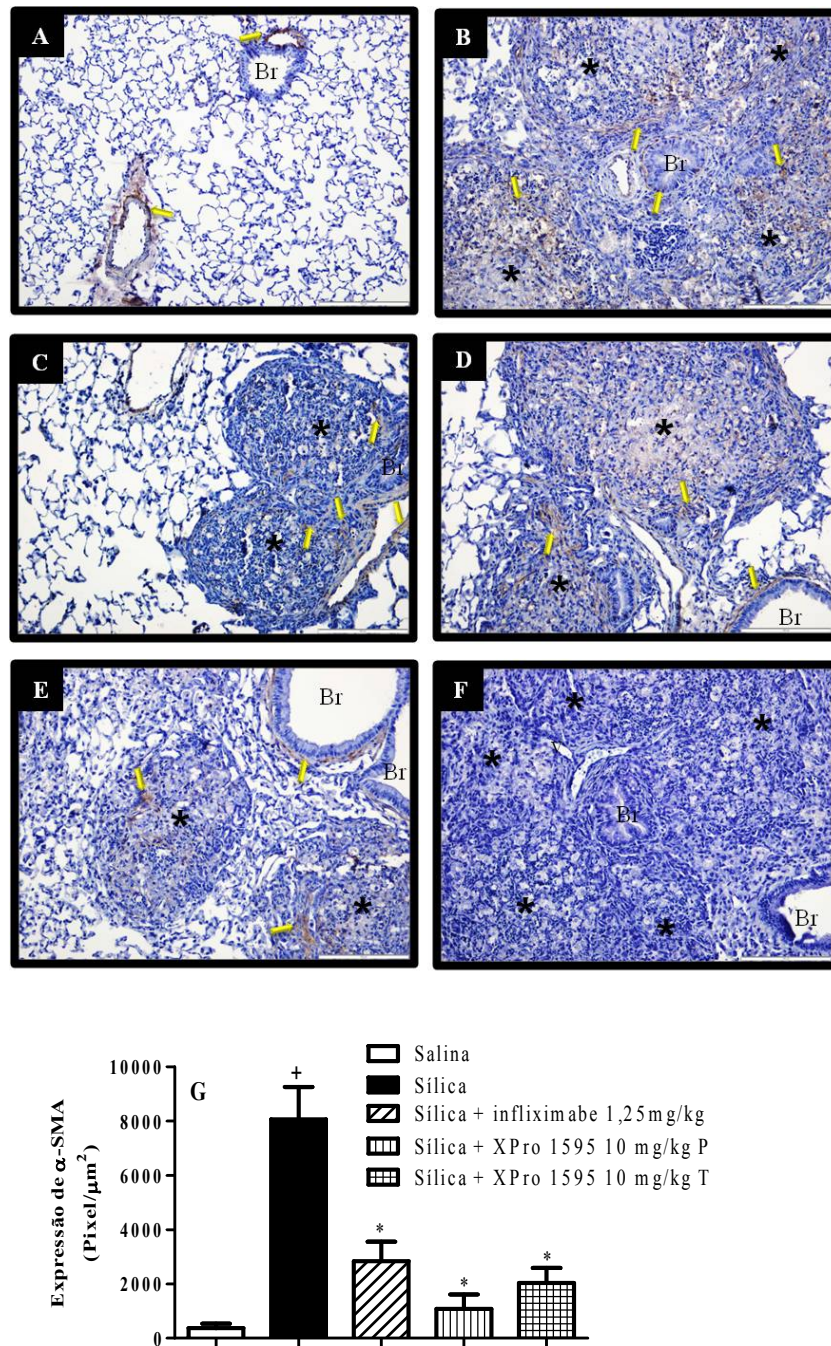


Figura 4.15: Efeito do infliximabe sobre a expressão de  $\alpha$ -SMA no pulmão de camundongos silicóticos. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A); sílica (10 mg/50 $\mu\text{L}$ ) (B); sílica e tratados com infliximabe (1,25mg/kg) (C); sílica e tratados com infliximabe (1,25 mg/kg) (C); sílica e tratados com XPro 1595 (10 mg/kg) – Profilático (D); sílica e tratados com XPro 1595 (10 mg/kg) – Terapêutico (E) ; Controle negativo – omissão do anticorpo primário (F); Avaliação quantitativa em pixels (G). Barra = 100  $\mu\text{m}$ ; Br = bronquíolos; \*= granuloma. Seta = marcação positiva para  $\alpha$ -SMA. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 5 animais por grupo. +  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; \* $P < 0,05$  comparado ao grupo instilado com sílica.

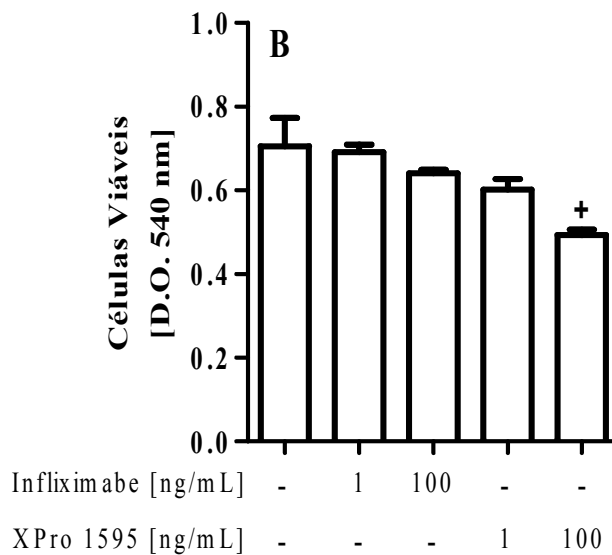
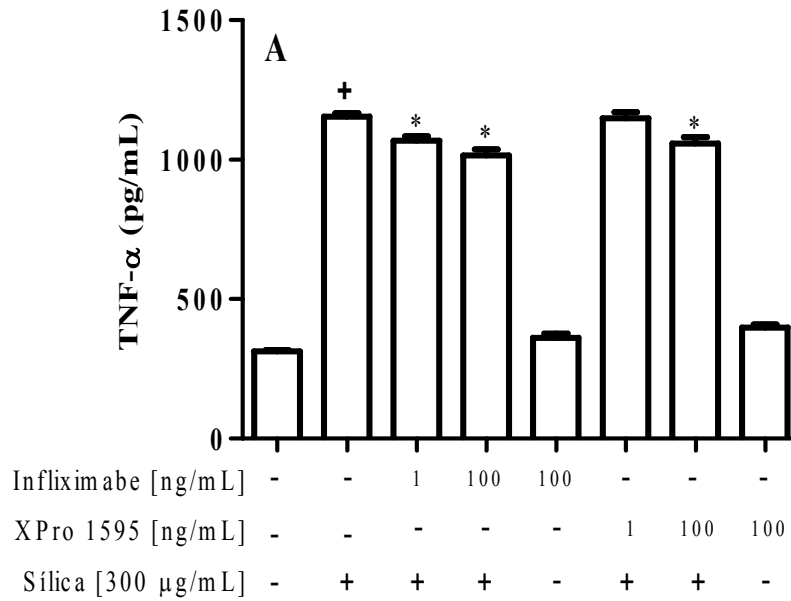


Figura 4.16: Efeito do infliximabe e XPro 1595 sobre a ativação de macrófagos alveolares (AMJ2C11) estimulados com sílica *in vitro*. (A) Representa a produção de TNF- $\alpha$  no sobrenadante dessas células 6 horas após o estímulo. (B) Representa a viabilidade celular. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de triplicata por grupo. Este gráfico é representativo de dois experimentos. +  $P < 0,05$  comparado ao grupo não-estimulado; \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo estimulado com sílica.

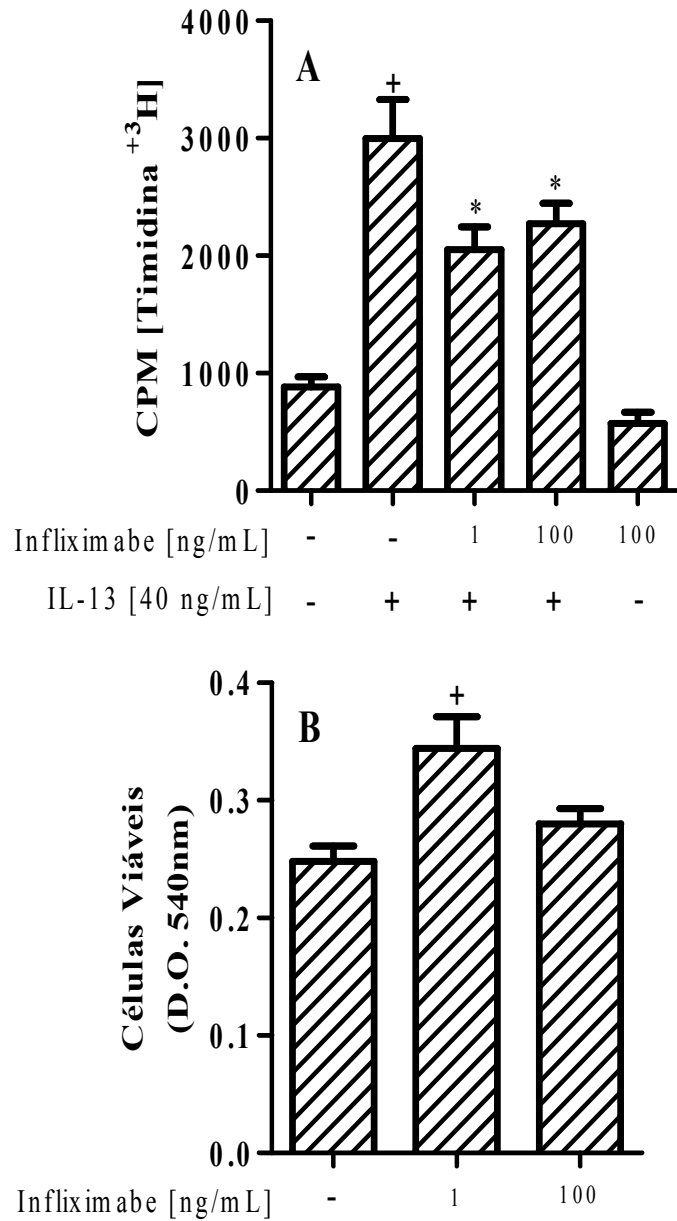


Figura 4.17: **Efeito do infliximabe sobre a viabilidade e proliferação de fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos silicóticos estimulados com IL-13 *in vitro*.** (A) Representa a proliferação celular. (B) Representa a viabilidade celular. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo triplicata por grupo. Este gráfico é representativo de dois experimentos. <sup>+</sup> $P < 0,05$  comparado ao grupo não estimulado; \* $P < 0,05$  comparado ao grupo estimulado com IL-13.

utilizar um sistema de proliferação induzida diretamente pelo TNF- $\alpha$ , uma vez que o composto XPro1595 neutraliza apenas o TNF- $\alpha$  solúvel (1 e 100 ng/mL). Mais ainda, considerando que evidências da literatura apontam para um efeito aditivo entre TNF- $\alpha$  e IL-13, no contexto da fibrose (196), foi usado o sistema de cultura de fibroblastos pulmonares submetidos à estimulação concomitante com ambas as citocinas. Como pode ser visto na figura 4.18A, a estimulação dos fibroblastos com as citocinas isoladamente levou a uma resposta de proliferação celular, onde IL-13 mostrou-se mais potente do que o TNF- $\alpha$ . A estimulação concomitante com IL-13 e TNF- $\alpha$ , em concentrações nas quais ambas produziram discreto efeito proliferativo, determinou a ocorrência de uma resposta exacerbada indicando fenômeno de sinergismo (Figura 4.18 A). O tratamento com XPro1595 foi capaz de reduzir parcialmente, porém de forma significativa, a resposta proliferativa causada por estimulação concomitante de TNF- $\alpha$  e IL-13 (Figura 4.18C), apesar de ser capaz de aumentar a viabilidade dessas células quando usado sozinho (Figura 4.18B). A análise das células epiteliais alveolares da linhagem A 549 mostraram que a produção da quimiocinas IL-8 induzida pelas partículas de sílica não foi modificada pelo tratamento com infliximabe e com XPro 1595 nas concentrações testadas (1 e 100 ng/mL) (Figura 4.19).

#### **4.3.7 – Avaliação da resposta intracelular desencadeada pela inibição do TNF- $\alpha$ na silicose**

Como última etapa do trabalho, avaliamos os níveis do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no tecido pulmonar, elemento considerado crucial nos efeitos associados ao TNF- $\alpha$  (Chun, 2013). Para tanto, foram utilizados camundongos silicóticos, submetidos ou não ao tratamento com infliximabe e XPro1595, e técnica de western blotting. Como mostrado na figura 4.20, detectamos aumento da razão entre a forma fosforilada e não fosforilada do NF- $\kappa$ B, tanto ao nível citoplasmático (Figura 4.20A) quanto nuclear (Figura 4.20B), em comparação aos animais controles. O tratamento dos camundongos silicóticos com infliximabe (1,25mg/kg) e com XPro1595 (10mg/kg), tanto profilática como terapêuticamente, diminuiu significativamente nos níveis NF- $\kappa$ B em ambos os compartimentos celulares.

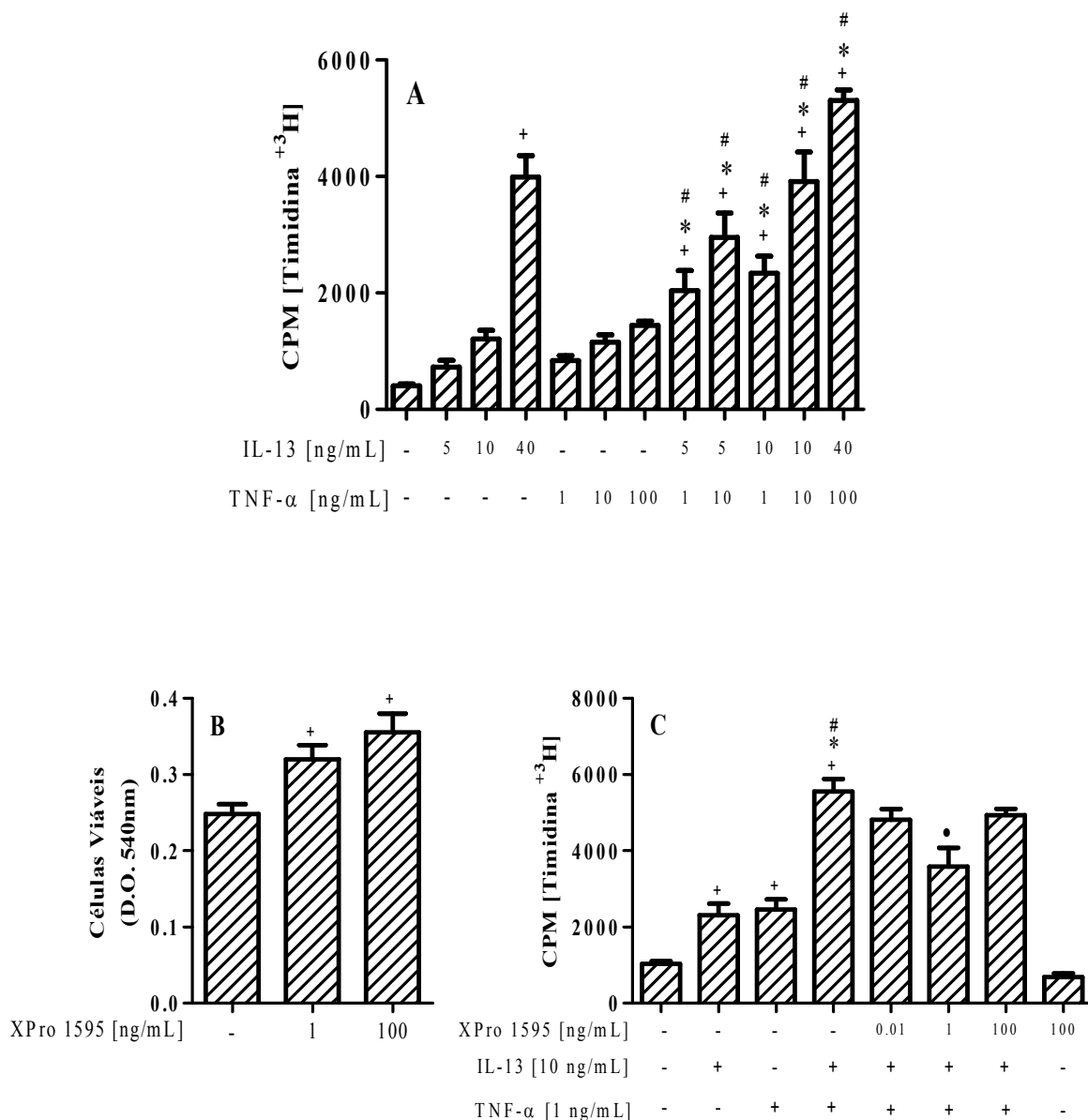


Figura 4.18: Avaliação da resposta proliferativa de fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos instilados com sílica e estimulados com IL-13 ou TNF- $\alpha$  *in vitro*. (A) Indica a proliferação de fibroblastos estimulados com IL-13 e/ou TNF- $\alpha$ ; (B) Indica a viabilidade celular após o tratamento com XPro 1595; (C) Indica a proliferação de fibroblastos tratados com XPro 1595 e estimulados com IL-13 e TNF- $\alpha$ . Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo triplicata por grupo. Este gráfico é representativo de dois experimentos. +  $P < 0,05$  comparado ao grupo não estimulado; \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo estimulado com IL-13; #  $P < 0,05$  comparado ao grupo estimulado com TNF- $\alpha$ ; •  $P < 0,05$  comparado ao grupo estimulado com IL-13 e TNF- $\alpha$ .



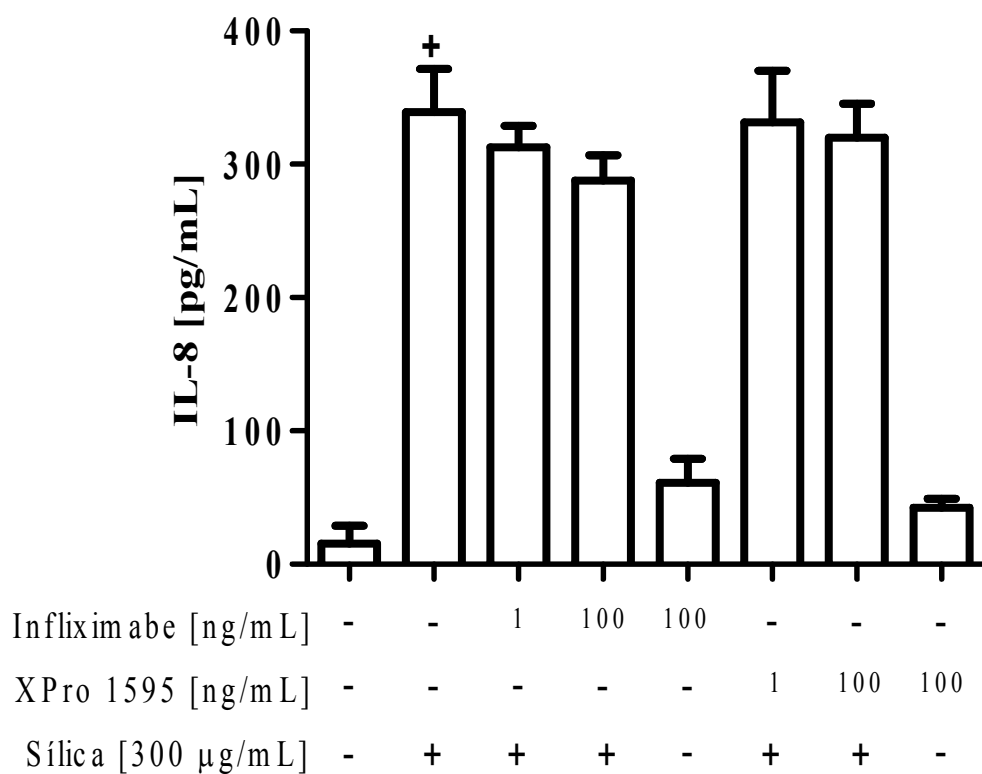


Figura 4.19: Efeito do infliximabe e XPro 1595 sobre a ativação de células epiteliais humanas (A549) estimuladas com sílica *in vitro*. Quantificação de IL-8 foi realizada no sobrenadante das células, 24 horas após o estímulo com sílica. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de triplicata por grupo. Este gráfico é representativo de 2 experimentos. +  $P < 0,05$  comparado ao grupo não-estimulado.

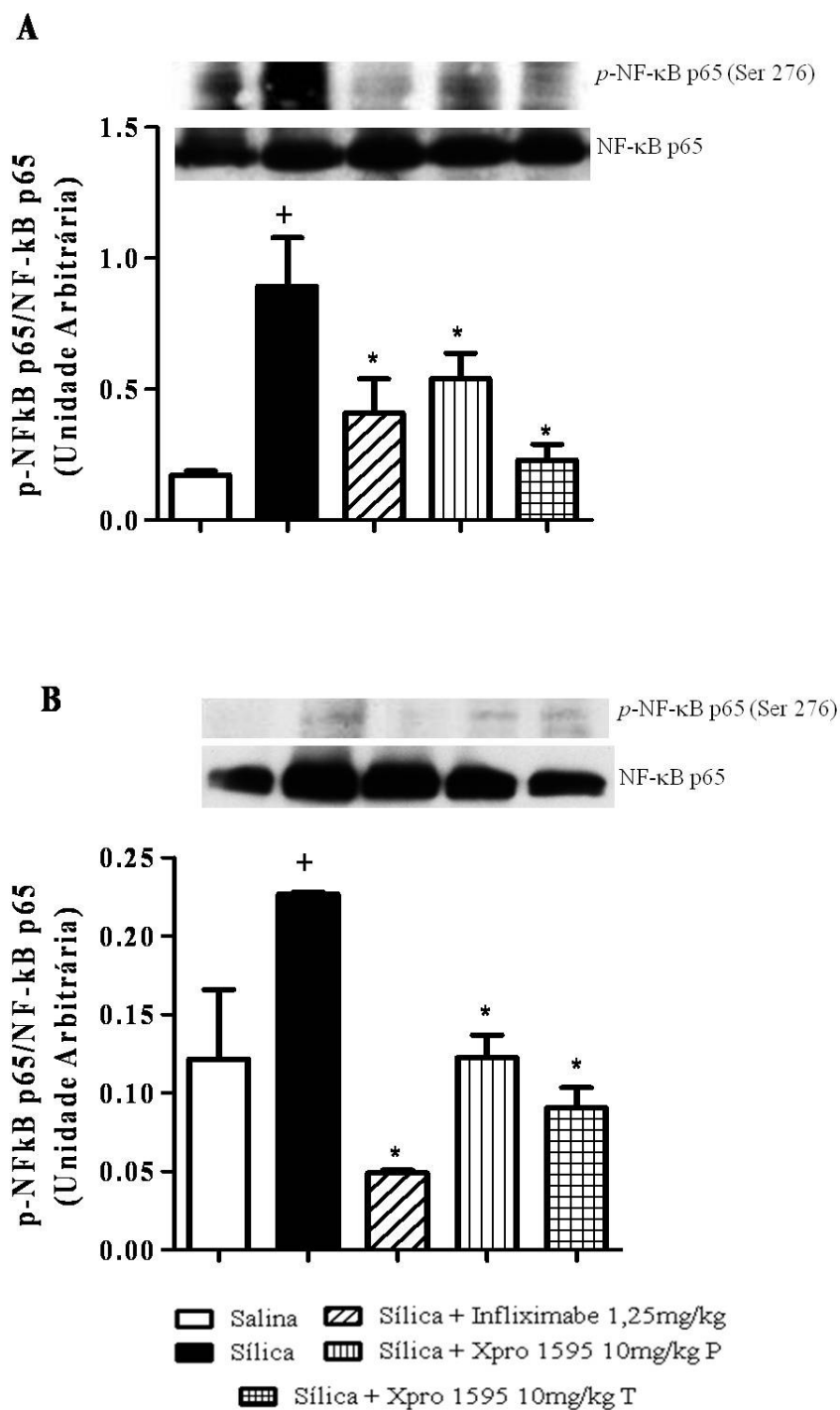


Figura 4.20: Efeito do infliximabe e XPro1595 sobre a ativação do fator de transcrição NF-κB no pulmão de camundongos silicóticos. (A) NF-κB citoplasmático; (B) NF-κB nuclear. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de no mínimo 3 animais por grupo. +  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; \* $P < 0,05$  comparado ao grupo instilado com sílica.

## 5 – Discussão

A silicose é doença de caráter ocupacional causada pela inalação de poeira contendo partículas de sílica cristalina, cujo desenvolvimento e a gravidade são dependentes da quantidade e do tempo de exposição à sílica (74). Caracteriza-se pela presença de nódulos fibróticos decorrentes de um processo inflamatório persistente e de uma marcada proliferação de fibroblastos, com excessivo acúmulo de colágeno e outros componentes da matriz extracelular, que em conjunto resultam em um marcado comprometimento da função pulmonar (76,195). É uma doença com grau de complexidade elevado, envolvendo uma vasta gama de mediadores inflamatórios e prófibróticos, com destaque para o TNF- $\alpha$ . Inúmeros relatos existem na literatura indicando que TNF- $\alpha$ , em função da sua variedade de efeitos biológicos como indução da resposta contrátil de células musculares lisas das vias aéreas e diminuição da resposta a alguns agentes indutores de relaxamento, assim como ativação/recrutamento leucocitário, coloca-se como um mediador chave em processos inflamatórios incluindo aqueles ao nível pulmonar incluindo disfunções de caráter obstrutivo como a asma brônquica (110,184,185,196-198). No que tange a doenças pulmonares de caráter restritivo, observações prévias apontam para a existência de polimorfismo do gene que codifica o TNF- $\alpha$  e a suscetibilidade à silicose humana (187,199). Dados divergentes foram relatados por Wu e colaboradores (2008) indicando haver ausência de tal correlação (200). De forma a melhor entender o envolvimento do TNF- $\alpha$  no contexto da silicose, utilizando o modelo experimental de silicose murina desenvolvida em camundongos Swiss-Webster, demonstramos previamente que a instilação intranasal de partículas de sílica determinaram o aparecimento de níveis elevados de TNF- $\alpha$ , tanto em uma fase inicial (7 dias) como tardia (28 dias), resposta esta que mostrou correlação com a ocorrência de um quadro de comprometimento da função pulmonar e de hiper-reatividade das vias aéreas juntamente como inflamação e fibrose (28). Mais ainda, evidenciamos que animais depletados para o gene codificante para o receptor 1 do TNF- $\alpha$  (TNFR1<sup>-/-</sup>) mostraram supressão do quadro de comprometimento da função pulmonar e hiper-reatividade, além de clara diminuição da área de fibrose e formação de granulomas (28). Estes dados reforçaram a hipótese de ser o TNF- $\alpha$  um potencial alvo terapêutico na silicose. Desta forma, nos sentimos motivados a estender nossa análise a fim de investigar o efeito de terapias anti-TNF- $\alpha$  sobre a silicose experimental murina. Para tanto, foram utilizadas duas estratégias farmacológicas que incluíram a utilização de compostos com atividade inibidora sobre a produção do TNF- $\alpha$  (talidomida) e sobre a ação do TNF- $\alpha$  (infliximabe – Remicade<sup>®</sup>). Foi utilizado, também, o composto

Dominante Negativo (DN) do TNF- $\alpha$ , XPro 1595, que seletivamente neutraliza a forma solúvel do TNF- $\alpha$ .

Como primeira abordagem testamos, em nosso modelo experimental de silicose, a talidomida que é um composto reconhecidamente eficaz em inibir a produção do TNF- $\alpha$  por induzir maior instabilidade do mRNA devido à redução do seu tempo de meia vida (158). A talidomida foi administrada de forma terapêutica, nas doses de 25 e 50 mg/kg, por via oral durante 7 dias consecutivos, iniciando-se 21 dias pós-sílica. Vimos que os animais silicóticos tratados com talidomida apresentaram redução do comprometimento da função pulmonar e da hiper-reatividade das vias aéreas, verificada na condição de aerolização com metacolina, quando comparados aos controles. Estes achados são coerentes com dados anteriores onde demonstramos que os animais TNFR1<sup>-/-</sup> apresentaram inibição das alterações na função pulmonar e, também, da hiper-reatividade das vias aéreas. Além disso, a instilação intranasal de TNF- $\alpha$  em camundongos foi capaz de promover resposta de hiper-reatividade das vias aéreas, o que veio a reforçar a importância deste mediador no contexto de doenças pulmonares (28). Dados outros da literatura demonstram o efeito inibitório da talidomida sobre a resposta de hiper-reatividade das vias aéreas em modelo de asma alérgica murina (201). Este fato pode estar associada à propriedade do TNF- $\alpha$  de induzir resposta em células musculares lisas através da ativação da enzima RhoA e da liberação de Ca<sup>+</sup> intracelular, aumentando, dessa forma, a contratilidade destas células (178,202).

Além dos efeitos anti-inflamatórios ao nível pulmonar, existem relatos que mostram a capacidade da talidomida em inibir a formação de granulomas na condição de modelos experimentais de doenças fibrogênicas ou na clínica incluindo a doença renal crônica (203); a neurosarcoideose (204,205) e a hanseníase (154).

Na sequência, então, partimos para avaliar o efeito da talidomida sobre as alterações teciduais verificadas no pulmão dos camundongos silicóticos. Vimos que os animais silicóticos tratados com talidomida apresentaram redução significativa da área de fibrose e de granuloma. Corroborando nossos achados, dados da literatura mostram que a talidomida foi capaz de inibir o processo fibrótico no pulmão de camundongos estimulados com a bleomicina, um medicamento anti-neoplásico que quando instilado leva a um quadro de fibrose que é similar àquele verificado no caso de fibrose pulmonar intersticial (146,160).

De forma complementar, através de técnicas histológicas e coloração por Picrosirius (191), evidenciamos que os camundongos silicóticos apresentaram aumento na deposição de colágeno, principalmente na região da formação de granulomas e o tratamento com talidomida foi capaz de reverter o depósito destas fibras no parênquima pulmonar. Estes

achados foram confirmados pela análise quantitativa utilizando a técnica espectrofotométrica de Sircol (206), que mostram clara redução do conteúdo total de colágeno na condição do tratamento com talidomida. Achados de Tabata e colaboradores (2007) e Choe e colaboradores (2010), demonstraram no modelo de inflamação pulmonar por bleomicina, que os efeitos inibitórios da talidomida era responsável pela redução da expressão de citocinas importantes, principalmente do fator pró-fibrótico TGF- $\beta$ 1, reconhecido por sua atividade sobre a ativação de miofibroblastos a produzir colágeno (146,160,207-209).

Dessa forma, com a finalidade avaliar a ação da talidomida sobre a produção de citocinas e quimiocinas, foram feitas análise de diversos mediadores ao nível pulmonar. Observamos que os camundongos silicóticos apresentaram aumento na produção de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6, MCP-1 e MIP-2 e que o tratamento com a maior dose de talidomida foi capaz de reduzir a produção de todas as citocinas analisadas. Reforçando nossos achados, trabalhos mostram que a talidomida se mostrou eficiente em reduzir a produção de citocinas em diferentes modelos experimentais murinos de inflamação pulmonar (146,160,201,210). Achados interessantes, onde foram utilizadas células provenientes do lavado broncoalveolar de pacientes portadores de doenças pulmonares crônicas como sarcoidose e fibrose pulmonar idiopática, também identificaram o efeito inibitório da talidomida sobre a geração de citocinas (211).

De forma a investigar potenciais células alvos no caso da talidomida, focamos nossa análise em macrófagos e fibroblastos que foram estudados mediante técnica de imunohistoquímica e identificação dos marcadores F4/80 e  $\alpha$ -SMA, respectivamente. Animais silicóticos apresentaram aumento da quantidade de células positivas para ambos os marcadores, e o tratamento com a talidomida inibiu este fenômeno. Tomando por base estes achados, fomos investigar o potencial efeito direto da talidomida sobre estes tipos celulares. Para a avaliação da deste composto sobre ativação de macrófagos, foi utilizada uma linhagem de macrófagos alveolares murinho (AMJ2C11), quando verificamos nítida ativação na condição de estimulação com partículas de sílica, através da elevação nos níveis de TNF- $\alpha$  liberado. No caso de fibroblastos, foram utilizadas células provenientes do pulmão de camundongos silicóticos submetidas à estimulação com a citocina prófibrótica IL-13, e analisada resposta proliferativa. O tratamento com talidomida reduziu tanto a ativação de macrófagos quanto fibroblastos. Suportando nossos dados, foi mostrado por alguns autores que a talidomida apresenta atividade supressora sobre ativação de macrófagos peritoneais (linhagem RAW 264.7) conforme observado pela redução da produção de óxido nítrico e TNF- $\alpha$  frente à estimulação com LPS (212,213).

Quanto aos fibroblastos, nossos achados estão concordantes com os de Tseng e colaboradores (2013) que mostraram que a talidomida foi capaz de inibir a proliferação de fibroblastos pulmonares humanos induzida pelo TGF- $\beta$ 1, assim como a produção de colágeno (214). Liang e colaboradores (2013) relataram também atividade semelhante da talidomida sobre a proliferação de fibroblastos normais e de fibroblastos provenientes de quelóides, e ainda, sobre a produção de fibronectina por essas células (215). Optamos também por incluir células epiteliais já que por serem fundamentais no revestimento das vias aéreas, são responsáveis pelo primeiro contato com substâncias inaladas. Neste caso, foram utilizadas células epiteliais oriundas de adenocarcinoma humano (linhagem A549). Vimos que a talidomida não foi capaz de alterar nem a produção de IL-8 frente à estimulação com partículas de sílica (300  $\mu$ g/mL), nem a taxa de viabilidade celular. Entretanto, dados da literatura apontam que a talidomida é capaz de reduzir a expressão do Fator básico de crescimento de fibroblasto (bFGF), de forma dose dependente, quando incubada com células epiteliais A549 (216). Em queratinócitos estimulados com raios UV, a talidomida também foi capaz de inibir a ativação de caspase 1 e conseqüentemente reduzir a ativação de pró-IL-1 $\beta$  em IL-1 $\beta$  (217). Fatores como dose e tipos de citocinas avaliadas poderiam contribuir para explicar as diferenças encontradas.

Passando, então, para a segunda abordagem proposta neste trabalho, fomos avaliar o efeito de compostos que atuam bloqueando a ação do TNF- $\alpha$ . Inicialmente utilizamos o infliximabe, um anticorpo monoclonal quimérico humano/murino já utilizado na clínica para tratamento de artrite reumatoide (142,164). Trabalhando de forma a identificar a melhor dose a ser utilizada, foram feitos testes com diferentes doses 1,25; 2,5 e 5 mg/kg e análise fixada no dia 28 pós-sílica. Baseado no trabalho de Deveci e colaboradores (2008) o protocolo seguido foi o de administração apenas uma vez por semana, durante três semanas consecutivas, iniciando-se 7 dias pós sílica (218). Constaram de nossa avaliação parâmetros já mencionados anteriormente. O tratamento dos camundongos silicóticos com o infliximabe produziu um efeito supressor sobre a resposta fibrogênica de forma inversamente proporcional às doses utilizadas (dados não mostrados). Estes achados poderiam estar associados a algum efeito indesejado do infliximabe como a indução de processos granulomatosos associados às doses (219-222). Um eventual acúmulo de composto associado a uma menor metabolização, no caso de camundongos, poderia contribuir para o menor efeito do infliximabe verificado na condição do tratamento com as maiores doses. Desta feita, a menor dose de 1,25 mg/kg foi, então, escolhida para utilização nos ensaios subsequentes. Utilizando o protocolo de administração terapêutica, vimos que o infliximabe inibiu o decréscimo da função pulmonar

dos camundongos silicóticos, tanto no que se refere à condição basal como, também, a hiperreatividade revelado quando da aerolização com metacolina. Dados prévios da literatura suportam nossos achados que mostram o efeito inibitório do infliximabe sobre a disfunção pulmonar no caso de modelos experimentais (camundongos e ratos) de doenças (218, 223), quanto em pacientes asmáticos refratários ao tratamento com glicocorticóides (224). Efeito similar foi também notado no caso de artrite reumatóide (225). De forma contrária, pacientes portadores de DPOC foram refratários ao tratamento com infliximabe (226), indicando que nem todas as doenças pulmonares que estão associadas ao TNF- $\alpha$  são sensíveis ao composto e/ou que o TNF- $\alpha$  pode não constituir um alvo terapêutico para todas as doenças pulmonares. Além disso, o tratamento com infliximabe mostrou-se eficaz em reduzir os componentes inflamatório e fibrogênico da silicose murina. Estes achados são suportados por estudos anteriores que demonstraram a eficiência clínica do infliximabe em diminuir respostas inflamatórias de característica granulomatosa (227-230). A utilização de terapia com anticorpo anti-TNF- $\alpha$  sintetizado por esse grupo mostrou-se eficiente na redução da deposição de colágeno em camundongos silicóticos (186). Corroborando nossos achados, Antoniou e colaboradores (2007) relataram a atividade estabilizadora do infliximabe sobre a progressão da doença fibrótica pulmonar em pacientes (231).

Na busca da identificação do mecanismo de ação do infliximabe, avaliamos seu efeito sobre a produção de citocinas e vimos que o composto reduziu os níveis aumentados de todos os mediadores quantificados ao nível do tecido pulmonar dos animais silicóticos. De forma coerente, infliximabe inibiu a geração de citocinas associadas ao quadro de asma alérgica em modelos murinos da doença (216,223).

Buscando identificar o efeito direto do infliximabe sobre macrófagos e fibroblastos pulmonares, partimos para a utilização de sistema de análise da funcionalidade de células *in vitro*. Verificamos que a incubação de macrófagos e fibroblastos com infliximabe foi capaz de suprimir a resposta de ativação celular, sugerindo que o composto tenha atividade direta sobre ambos os tipos celulares. Indo ao encontro de nosso achados, dados da literatura mostram que o infliximabe foi capaz de abolir a resposta de macrófagos alveolares quando da estimulação por *Histoplasma capsulatum* (232). Mais ainda, o tratamento de pacientes portadores de sarcoidose com infliximabe mostrou-se eficaz em inibir a presença de macrófagos no tecido através da avaliação da expressão da proteína marcadora CD68 (233). Quanto aos fibroblastos, Mattyasovszky e colaboradores (2010) mostraram que a estimulação com TNF- $\alpha$  foi capaz de reduzir a taxa de viabilidade e proliferação deste tipo celular, assim como reduzir a expressão de colágeno tipo 1 (234). A produção de IL-8 por células epiteliais pulmonares

estimuladas com sílica foi refratária à ação do infliximabe, indicando que células epiteliais não são alvo direto do composto. Entretanto, dados da literatura apontam para a capacidade do TNF- $\alpha$  estimular a produção de IL-8 por células epiteliais de bovinos, e que o infliximabe foi capaz de suprimir este efeito (235). A espécie animal utilizada assim como o tipo de estímulo poderiam ser fatores que justificassem a diferença de resultados observada.

Efeitos colaterais indesejáveis têm sido atribuídos ao infliximabe incluindo alterações na função pulmonar (236), ocorrência de lupus, falência cardíaca congestiva (237) e ainda desenvolvimento de doenças granulomatosas (214-217). Hipóteses têm sido propostas para explicar este efeito dual do infliximabe e uma das possibilidades inclui a sua capacidade de inibição de ambas as formas de TNF- $\alpha$ , membranar e solúvel (238). Dados da literatura mostram que os efeitos biológicos do TNF- $\alpha$  estão associados a estas duas formas, sendo a resposta justácrina associada ao mTNF- $\alpha$ , possuindo um papel importante na resolução da inflamação e, também na modulação da resposta imunológica contra patógenos (170,173,239-242). Por sua vez, o TNF- $\alpha$  solúvel, sTNF- $\alpha$ , possui importante papel em processos inflamatórios crônicos, sendo produzida de forma rápida por macrófagos ativados na condição de resposta a patógenos atuando no favorecimento do aumento da taxa de fagocitose e a secreção de citocinas por macrófagos (173,242-244) e da cascata de apoptose em linfócitos T (245). Sendo assim, a inibição apenas da porção solúvel do TNF- $\alpha$  parece ser uma estratégia interessante de forma a garantir processos benéficos como a inibição do processo inflamatório sem que haja comprometimento da resposta imune. Com o objetivo de discriminar a relevância das formas de TNF- $\alpha$  no contexto da silicose experimental, utilizamos de forma totalmente original uma ferramenta biológica que nos permite bloquear seletivamente a forma solúvel da citocina – o DN TNF- $\alpha$ , XPro 1595. Este composto compete com a molécula de TNF- $\alpha$  para a formação do heterotrímero, que assim tem sua ligação bloqueada ao receptor (172).

Seguindo racional similar ao até então utilizado neste trabalho, por razões de eficiência previamente demonstrada em estudo anteriores do grupo do Dr. David Szymkowski (176), foi escolhida a dose de 10 mg/kg de XPro 1595 sendo adotados dois protocolos experimentais - profilático e terapêutico. Verificamos que o comprometimento da função pulmonar, assim como a hiper-reatividade das vias aéreas, nos camundongos silicóticos mostraram-se sensíveis ao tratamento com XPro 1595. De forma similar aos nossos achados, Maillet e colaboradores (2011) mostraram que XPro 1595 foi capaz de reduzir a resposta de hiper-reatividade das vias aéreas em um modelo de asma alérgica murina (176). Em 2012,



Sama e colaboradores mostraram que o XPro 1595 foi capaz de reduzir a sensibilidade dos canais de cálcio e com isso reduzir o influxo de cálcio intracelular (246).

O tratamento com XPro 1595, em ambos os protocolos, foram capazes de diminuir a resposta e formação de granulomas, assim como a deposição de colágeno no tecido pulmonar dos camundongos silicóticos. Somado a isso, vimos que o XPro 1595 reduziu a produção de citocinas e quimiocinas (TGF- $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  e MIP-2) nos animais silicóticos, porém em menor proporção do que aquela verificada no caso do infliximabe. A fibrose e a formação de granulomas foram igualmente sensíveis ao XPro 1595. Este composto reduziu a formação de granuloma no tecido pulmonar e hepático de camundongos infectados com o bacilo *Mycobacterium bovis* (BCG) ou estimulados com LPS (171,174). Além disso, foi verificada a redução do quantitativo de citocinas e enzimas liberadas no pulmão de camundongos alérgicos e fígado de camundongos portadores de disfunção hepática (174,176).

O tratamento com XPro 1595 foi capaz de reduzir o número de células positivas para F4/80 e  $\alpha$ -SMA no pulmão de camundongos silicóticos. De forma complementar, a análise *in vitro* revelou que a maior concentração de XPro 1595 inibiu a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos estimulados com sílica. Na análise da cultura primária de fibroblastos, utilizamos o sistema de proliferação induzida diretamente pelo TNF- $\alpha$ , uma vez que o composto XPro1595 neutraliza apenas o TNF- $\alpha$  solúvel. Mais ainda, considerando que evidências da literatura apontam para um efeito aditivo entre TNF- $\alpha$  e IL-13, no contexto da fibrose (235), foi usado o sistema de cultura de fibroblastos pulmonares submetidos à estimulação concomitante com ambas as citocinas. A incubação de fibroblastos com XPro 1595 inibiu a resposta de proliferação. Até o momento, existem poucos estudos relacionados aos efeitos do composto XPro 1595 em sistemas biológicos. Dados de Zalevsky e colaboradores (2007) demonstraram o efeito inibitório do XPro 1595 em macrófagos peritoniais (RAW264.7) estimulados por LPS (173). De forma inédita, nossos dados referentes a avaliação do composto XPro 1595 sobre fibroblastos, ratificam o potencial do composto sobre a resposta de proliferação celular. Mais estudos são necessários de forma a melhor caracterizar o mecanismo de ação deste composto em sistemas biológicos.

Neste sentido, tentamos como última análise, comparar o efeito do infliximabe e do XPro 1595 sobre a translocação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no tecido pulmonar de camundongos silicóticos. Dados prévios de Gambelli e colaboradores (2004) e Di Giuseppe e colegas (2009) mostraram que o tratamento de camundongos silicóticos com o composto Bay 11-7085, um inibidor do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, suprimiu a resposta inflamatória e a deposição de colágeno no tecido pulmonar, o que indica a relevância deste fator para o quadro

silicótico. Desta forma, através de técnica de western blotting, verificamos o aumento nos níveis de NF- $\kappa$ B fosforilado, tanto na porção citoplasmática quanto na nuclear, e que o tratamento com ambos os compostos foi capaz de inibir este fenômeno (129,247). Estes dados sugerem que a via de NF- $\kappa$ B é um alvo importante para o efeito inibitório do infliximabe e do XPro 1595.

Em conjunto, nossos dados mostram que a inibição do TNF- $\alpha$  gerado pelo processo inflamatório desencadeado pela partícula de sílica no pulmão é responsável pela redução da translocação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e consquentemente a síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo o próprio TNF- $\alpha$ . A redução desses mediadores permitiu uma amenização da resposta inflamatória com diminuição da expressão e da atividade de células do sistema imunológico, como o macrófago, e de células estruturais, como o fibroblastos, reduzindo, assim, a síntese de mediadores pró-inflamatórios e colágeno. Conseqüentemente, a área ocupada pelo granuloma, levando a uma melhora na função pulmonar desses animais. Mostramos ainda, que a inibição apenas da porção solúvel do TNF- $\alpha$  é responsável por reduzir seletivamente quimiocinas (MIP-1 $\alpha$  e MIP-2) e citocinas (TGF- $\beta$ ) importantes para o recrutamento celular e para o desenvolvimento do perfil fibrótico da silicose sem alterar os níveis de TNF- $\alpha$  gerado no pulmão desses animais. Apesar do TNF- $\alpha$  ser uma citocina pró-inflamatória, ele também possui um papel importante no controle da resposta inflamatória. A ausência desta citocina em diversos modelos experimentais desencadeou uma resposta inflamatória exacerbada com desorganização da estrutura do granuloma, levando o animal a morte (249, 250, 252). No caso da utilização do infliximabe, pacientes com artrite reumatóide apresentaram aumento na incidência de tuberculose (251). Fator preocupante no caso da silicose, pois na maioria dos casos, pacientes silicóticos também apresentam infecção por *Mycobacterium* sp. (doença denominada silicotuberculose).

Dessa forma, nossos dados mostram que o tratamento com inibidor seletivo da forma solúvel do TNF- $\alpha$  parece constituir uma ferramenta extremamente importante para aplicação no caso de doenças inflamatórias crônicas de natureza fibrótica, como silicose, uma vez que atua bloqueando os efeitos deletérios do TNF- $\alpha$ , porém preservando seu efeito benéfico de modulação do sistema imune associado à forma transmembranar deste mediador.

## 6. Conclusão

Tomados em conjunto, nossos resultados mostram que o tratamento terapêutico de camundongos silicóticos (28 dias pós-sílica) com compostos que inibam a geração do TNF- $\alpha$ , como a talidomida, e a ação do TNF- $\alpha$ , como o anticorpo monoclonal quimérico infliximabe ou o dominante negativo XPro 1595, foi capaz de inibir o comprometimento da função pulmonar e a hiper-reatividade das vias aéreas, observada quando da aerolização com o agonista colinérgico metacolina. Além disso, os componentes inflamatório e fibrogênico também foram inibidos pelos três compostos testados, verificando-se uma redução da área de granuloma e da deposição de fibras colágenas. O aumento da produção de citocinas/quimiocinas e da presença de células alvos como macrófagos e fibroblastos mostrou-se diminuída no pulmão de camundongos silicóticos tratados com talidomida, infliximabe e XPro 1595. O aumento nos níveis do fator de transcrição NF- $\kappa$ B translocado para o núcleo foi também suprimido pelos infliximabe e XPro 1595. Em sistema de ativação celular *in vitro*, verificamos que macrófagos alveolares e fibroblastos pulmonares mostraram-se afetados diretamente pelos compostos testados, quando foi verificada supressão da resposta de secreção e proliferação, respectivamente. Entretanto, células epiteliais pulmonares foram refratárias aos tratamentos utilizados. Desta forma, elegemos o TNF- $\alpha$  como um alvo terapêutico importante no contexto da silicose e, que em sua forma solúvel se coloca como de potencial relevância no que tange a aplicação na terapia de doenças inflamatórias fibróticas pulmonares como a silicose.

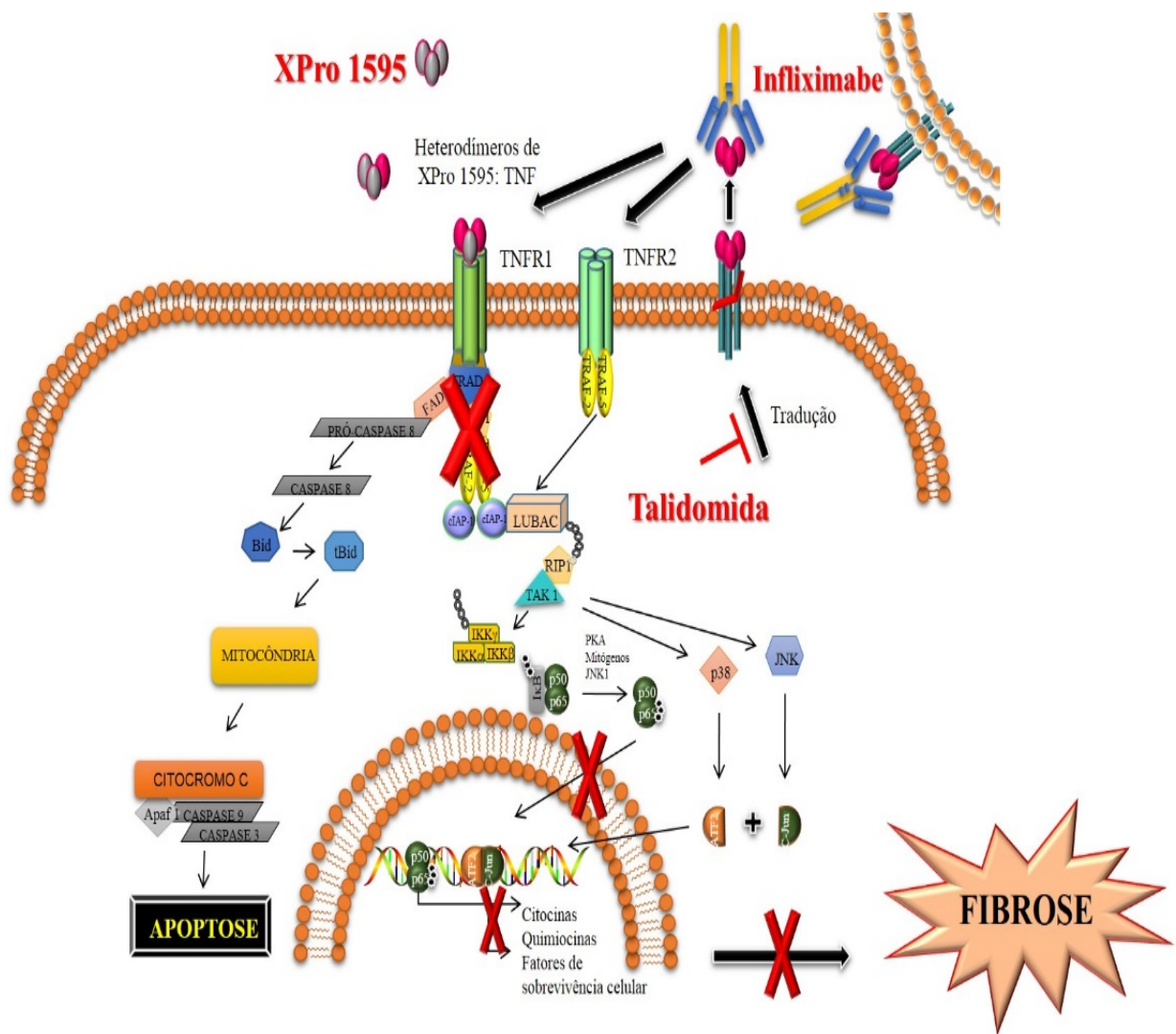


Figura 6.1 – Esquema do efeito de compostos anti-TNF-a sobre o processo inflamatório na silicose.

## 7 – Referências Bibliográficas

1. Bedrikow R, Golin V. A história da descoberta da circulação pulmonar. *J. Pneumologia* [Periódicos na Internet]. 2000 Feb [acesso em 11 de Nov 2012];26(1). Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010235862000000100012&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010235862000000100012&lng=en).
2. Ward JPT, Ward J, Leach RM. *Fisiologia básica do sistema respiratório*. Barueri, SP: Manole; 2012.
3. Silva MB, Duvidier DH, Votion D, Art T, Lekeux P. Aerossolterapia nas doenças respiratórias em eqüinos. *Braz J vet Res anim Sci*. 2001;38(2):88 – 96.
4. West JB. *Fisiologia respiratória*. 6. ed. Barueri (SP): Manole; 2002.
5. Kobzik L, Cotran RS, Kumar V, Collins T. The lung. In: *Pathological basis of disease*. 1999.
6. Hoymann HG. Lung function measurements in rodents in safety pharmacology studies. *Frontiers in Pharmacology: Pharmaceutical Medicine and Outcomes Research*. 2012;3(156):1-11.
7. Irvin CG, Bates JHT. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respir Res*. 2003;4(1):4.
8. Valarius K-P. Size-dependent morphology of the conductive bronchial tree in four species of myomorph rodents. *J Morphol*. 1996;230:291 – 297.
9. Stookey JL, Moe JB. The respiratory system. In: Benirschke K, Garner FM, Jones TC. *Pathology of Laboratory Animals*. 2ª ed. New York: Springer-Verlag; 1978.71 – 113.
10. Jacob ST, Francone CA, Lossow JW. Sistema respiratório. In: *Anatomia e fisiologia humana*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1990.377 – 404.
11. Cotes JE, Chinn DJ, Miller MR. *Lung function: Physiology, measurement and application in medicine*. 6. ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2006.
12. Wagers S, Lundblad L, Moriya HT, Bates JHT, Irvin CG. Nonlinearity of respiratory mechanics during bronchoconstriction in mice with airway inflammation. *J Appl Physiol*. 2002;92:1802 – 1807.

13. Soares S, Lourenço A, Moreira AL. Fisiologia Pulmonar. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Porto. 2002. [Acesso em 2009 mar 16]. Disponível em: <http://www.scribd.com/doc/2361167/FISIOLOGIA-PULMONAR>.
14. An SS, Fredberg JJ. Biophysical basis for airway hyperresponsiveness. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007;85:700 – 714.
15. Zin WA. Mecânica respiratória. In: Fisiologia. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. 471 – 474.
16. Billington CK e Penn RB. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res*. 2003;4(1).
17. Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:551 – 559.
18. Berend N, Salome CM, King GG. Mechanisms of airway hyperresponsiveness in asthma. *Respirology*. 2008;13(5):624-31.
19. Brown JH, Taylor P. Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11. ed. EUA: McGRAW-HILL; 2006. 183 – 200.
20. Gil FR, Lauzon AM. Smooth muscle molecular mechanics in airway hyperresponsiveness and asthma. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007;85(1):133-40.
21. Chiba Y, Misawa M. The role of RhoA-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization of bronchial smooth muscle contraction in airway hyperresponsiveness. *J Smooth Muscle Res*. 2004;40(4-5):155-67.
22. West JB. Fisiopatologia pulmonar moderna. 4. ed. Barueri (SP): Manole; 1996.
23. Laohaburanakit P, Chan A. Obstructive Sarcoidosis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2003;25:115 – 129.
24. Hnizdo E, Murray J, Davison A. Correlation between autopsy findings for chronic obstructive airways disease and in-life disability in South African gold miners. *Int Arch Occup Environ Health*. 2000;73: 235 – 244.
25. Tiwari RR, Sharmab YK, Saiyedc HN. Peak Expiratory Flow and Respiratory Morbidity: A Study among Silica-Exposed Workers in India. *Arch Med Res*. 2005;36:171 –174.
26. Terra Filho M, Santos UP. Silicose. *J Bras Pneumol* 2006; 32 (Supl 1): S41-S47.

27. Şahbaz S, İnönü H, Öcal S, Yilmaz A, Pazarlı C, Yeğinsu A, *et al.* Denim sandblasting and silicosis two new subsequent cases in Turkey. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2007; 55(1): 87 – 91.
28. Ciambarella BT. Papel do TNF- $\alpha$  na resposta inflamatória pulmonar causada por partículas de sílica em camundongos. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz; 2009.
29. World Health Organization. ICD-10 – Diseases of the respiratory system (J00 – J99) [Atualizado em 2006 dez 11; acesso em 19 ago 2008]. Disponível em: <http://www.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>.
30. Santos C, Norte A, Fradinho F, Catarino A, Ferreira AJ, Loureiro M, Baganha *et al.* Silicosis - brief review and experience of a pulmonology ward. *Rev Port Pneumol.* 2010;16(1):99-115.
31. Yonezawa GN. A função de monócitos em indivíduos expostos à sílica Dissertação [Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Federal de Campinas. Instituto de Biologia, 1996.
32. Greenberg MI, Waksman J e Curtis J. Silicosis: A review. *Dis Mon* 2007;53:394 – 416.
33. Bon AMT. Exposição ocupacional à sílica e silicose entre trabalhadores de marmorarias, no município de São Paulo Tese [Doutorado]. São Paulo: FUNDACENTRO - Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, 2006.
34. OSHA (Occupational Safety and Health Administration). Section 6 – VI. Health Effects Discussion and Determination of Final PEL [ Atualizado em 1989 Jul 5; Acesso em 04 fev 2009]. Disponível em: [HTTP://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.show\\_document?p\\_tablePREAMBLES&p\\_id=770](HTTP://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.show_document?p_tablePREAMBLES&p_id=770).
35. Leung CC, Yu IT, Chen W. Silicosis. *Lancet.* 2012;379(9830):2008-18.
36. Fedotov IA, Eijkemans GJM, Goelzer BIF, Rice FL, Baur X, Arana M, *et al.* Elimination of Silicosis. *GOHNET.* 2007; 12:1 – 20.

37. Lin QH, Liu YM, Guo JY. Epidemiological study of occupational diseases in Guangzhou City, China in 2001 - 2010. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 2012;30(10):759-62.
38. Wang D, Zhang M. Statistics on notification of pneumoconiosis in China in 2010. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 2012;30(11):801-10.
39. Lan TN, Son PH, Trung le V, Tu NT, Keifer M, Barnhart S. Distribution of silica-exposed workers by province and industry in Vietnam. *Int J Occup Environ Health*. 2003;9(2):128-33.
40. Athavale A, Iyer A, Sahoo D, Salgia K, Raut A, Kanodra N. Incidence of silicosis in flourmill workers. *Indian J Occup Environ Med*. 2011;15(3):104-8.
41. Jindal SK. Silicosis in India: past and present. *Curr Opin Pulm Med*. 2013;19(2):163-8.
42. Ehrlich R. A Century of Miners' Compensation in South Africa. *Am J Ind Med*. 55:560–569 (2012).
43. OSHA. Acesso em 15 de março de 2013. Disponível em: [http://www.osha.gov/OshDoc/data\\_General\\_Facts/crystalline-factsheet.pdf](http://www.osha.gov/OshDoc/data_General_Facts/crystalline-factsheet.pdf).
44. Weissman D, Schulte P. The Continuing Persistence of Silicosis. Atualizado em outubro de 2011. [Acesso em 13 de março de 2013]. Disponível em: <http://blogs.cdc.gov/niosh-science-blog/2011/10/silicosis/October18th,2011>.
45. Yassin A, Yebesi F, Tingle R. Occupational exposure to crystalline silica dust in the United States, 1988-2003. *Environ Health Perspect*. 2005;113(3):255-60.
46. Makol A, Reilly MJ, Rosenman KD. Prevalence of connective tissue disease in silicosis (1985-2006) a report from the state of Michigan surveillance system for silicosis. *Am J Ind Med*. 2011;54(4):255-62.
47. CDC. Acesso em 13 de mar de 2013. Disponível em: <http://www2a.cdc.gov/drds/worldreportdata/FigureTableDetails.asp?FigureTableID=2605&GroupRefNumber=T03-15a>.
48. Nasrullah M, Mazurek JM, Wood JM, Bang KM, Kreiss K. Silicosis Mortality with Respiratory Tuberculosis in the United States, 1968–2006. *Am J Epidemiol*. 2011;174(7):839-848.



49. Teixeira CM, Curty M, Macedo E, Barbosa O. Higiene das minas de ouro. Silicose. Morro Velho, Minas Gerais. Brasil. Departamento Nacional da Produção Mineral. Rio de Janeiro, 1940. (Divisão de Fomento da Produção Mineral. Boletim, 44).
50. Godim PM, Latgé M. Problemas de Higiene industrial no Estado do Rio de Janeiro. Ver. Serv. Esp. Saúde Públ.1959;10:565-606.
51. Mendes R. Estudo epidemiológico sobre a silicose pulmonar na região sudeste de Brasil, através de inquérito em pacientes internados em Hospitais de Tisiologia. Ver. Saúde públ. 1979;13:7-19.
52. Nogueira DP, Certain D, Brólio R, Garrafa NM, Shiabata H. Ocorrência de Silicose entre trabalhadores da Indústria de cerâmica da cidade de Jundiaí, SP (Brasil). Ver. Saúde Públ., 1981;15:263-271.
53. Carneiro APS, Campos LO, Gomes MFCF, Assunção AA. Perfil de 300 trabalhadores expostos à sílica atendidos ambulatorialmente em Belo Horizonte. J Pneumol. 2002; 28(6):329-334.
54. Ribeiro FSN, Algranti E, Camargo EA, Wunsch Filho V. Exposição Ocupacional à Sílica no Brasil. Anais do VII Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva. Revista Ciência & Saúde Coletiva. 2003;8(Supl. 1 e 2).
55. Carneiro APS, Barreto SM, Siqueira AL, Rocca PF. Índice de exposição à sílica na atividade de mineração de ouro. Rev. Saúde Públ. 2006;40(1):83-91.
56. Ferreira LR, Pinheiro TMM, Siqueira AL, Carneiro APS, A silicose e o perfil dos lapidários de pedras semipreciosas em Joaquim Felício, Minas Gerais, Brasil. Cad. Saúde Pública. 2008;24(7):1517-1526.
57. Castro AH, Gonçalves KS, Vicentin G. Estudos das internações hospitalares por pneumoconioses no Brasil, 1993 – 2003. Rev Bras Epidemiol.2007;10(3):391 – 400.
58. Lido AV, Kitamura S, Oliveira JI, Lucca SR, Azevedo VAZ, Bagatin E. Exposição Ocupacional e ocorrência de pneumoconioses na região de Campinas (SP) Brasil, 1978 – 2003. J Bras Pneumol. 2008;34(6):367 – 372.
59. Luz FF, Srúker VC, Trevisan MB, Cirino SLMB. Silicose em ex-mineiros de extração de cobre. Ciência e Saúde Coletiva.2011;16(8):3421-3426.

60. Barbosa MAS, Carneiro APS, Maciel JGFS, Moronte EA, Rocca PF, Santos ARM. Silicose em trabalhadores de quartzo da região de São Thomé das Letras – Minas Gerais: dados iniciais indicam um grave problema de saúde pública. *Rev. Bras. Saúde ocup.* 2011;36(123):177-184.
61. Wagner GR. Screening and surveillance of workers exposed to mineral dusts. Geneva: World Health Organization; 1996.
62. Ministério da Saúde; Secretaria de Atenção à Saúde; Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Pneumoconioses. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006.
63. 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.
64. Hnizdo E, Murray J. Risk of pulmonary tuberculosis relative to silicosis and exposure to silica dust in South African gold miners. *Occup Environ Med.* 1998;55:496 – 502.
65. Marchiori E, Ferreira A, Souza Jr AS. Comprometimento do espaço aéreo na silicose aguda dos jateadores de areia: aspectos na tomografia computadorizada de alta resolução. *Radiol Brás.* 2002;35(5):273-276.
66. Calvert GM, Rice FL, Boiano JM, Sheehy JW, Sanderson WT. Occupational silica exposure and risk of various diseases: an analysis using death certificates from 27 states of the United States. *Occup Environ Med.* 2003;60:122 – 129.
67. teWaterNaude JM, Ehrlich RI, Churchyard GJ, Pemba L, Dekker K, Vermeis M, *et al.* Tuberculosis and silica exposure in South African gold miners. *Occup Environ Med* 2006;63:187 – 192.
68. Barboza CEG, Winter DH, Seiscento M, Santos UP, Terra Filho M. Tuberculosis and silicosis: epidemiology, diagnosis and chemoprophylaxis. *J Bras Pneumol.* 2008;34(11):961 – 968.
69. Peretz A, Checkoway H, Kaufman JD, Trajber I, Lerman Y. Silica, silicosis and lung cancer. *IMAJ.* 2006;8:114 – 118.
70. Brown JM, Archer AJ, Pfau JC, Holian A. Silica accelerated systemic autoimmune disease in lupus-prone New Zealand mixed mice. *Clin Exp Immunol.* 2003;131:415 – 421.

71. Ferreira AS, Moreira VB, Ricardo HVM, Coutinho R, Gabetto JM, Marchiori E. Fibrose maciça progressiva em trabalhadores expostos à sílica. Achados na tomografia computadorizada de alta resolução. *J. Bras. Pneumol.* 2006;32(6):523-528.
72. Bon AMT, Santos AMA. FUNDACENTRO - Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho; Sílica e Silicose [Acesso em 13 mar 2013]. Disponível em: <http://www.fundacentro.gov.br/index.asp?D=SES>.
73. Costantini LM, Gilberti RM, Knecht DA. The phagocytosis and toxicity of amorphous silica. *PLoS One.* 2011;6(2):e14647.
74. OEH (Occupational and Environmental Health). Department of Protection of the Human Environment. Hazard Prevention and Control in the Work Environment: Airborne Dust. Geneva: World Health Organization; 1999.
75. Kajiwara T, Ogami A, Yamato H, Oyabu T, Morimoto Y e Tanaka I. Effect of silica particle size of intratracheally instilled crystalline silica on pulmonary inflammation. *J Occup Health* 2007;49:88 – 94.
76. Mossman BT e Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Resp Crit Care Med.* 1998;157:1666 – 1680.
77. Hamilton Jr RF, Thakur SA, Holian A. Sílica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(7):1246-1258.
78. Miyada R, van Eeden SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particule matter. *Toxicol Appl pharmacol.* 2011;257:209-226.
79. Kobzik L. Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors. *J Immunol.* 1995;155(1):367 – 376.
80. Palecanda A, Kobzik L. Alveolar macrophage-environmental particle interaction: analysis by flow cytometry. *Methods.* 2000;21(3):241 – 247.
81. Beamer CA, Holian A. Scavenger receptor class A type I/II (CD204) null mice fail to develop fibrosis following silica exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289(2):L186 – L195.
82. Lapp NL, Castranova V. How silicosis and coal workers' pneumoconiosis develop--a cellular assessment. *Occup Med.* 1993;8(1):35 – 56.

83. Vallyathan V, Shi XL, Dalal NS, Irr W, Castranova V. Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. Potential role in acute silica-induced lung injury. *Am Rev Respir Dis.* 1988;138(5):1213 – 1219.
84. Castranova V. Signaling pathway controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radical Biology & Medicine.* 2004;37(7):916-925.
85. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun.* 1992;17(4):221 – 237.
86. Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol.* 2003;109(3):250-265.
87. Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Telphy LA, *et al.* The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *PNAS.* 2008;105(26):9035 – 9040.
88. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* 2008;9(8):847 – 856.
89. Pétrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. 2007;19:615 – 622.
90. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000;80(5):617-653.
91. Scabilloni JF, Wang L, Antonini JM, Roberts JR, Castranova V, Mercer RR. Matrix metalloproteinase induction in fibrosis and fibrotic nodule formation due to silica inhalation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288:L709 – L717.
92. Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13 $\alpha$ 2 receptor is involved in induction of TGF- $\beta$ 1 production and fibrosis. *Nature Medicine.* 2006;12(1):99 – 106.

93. Manoury B, Nénam S, Guénon I, Lagente V, Broichot E. Influence of early neutrophil depletion on MMPs/TIMP-1 balance in bleomycin-induced lung fibrosis. *Int Immunopharmacol.* 2007;7:900 – 911.
94. Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(3):334 – 337.
95. Davis GS, Holmes CE, Pfeiffer LM, Hemenway DR. Lymphocytes, lymphokines and silicosis. *JEPTO.* 2001;20(Supl. 1):53 – 65.
96. Song L, Weng D, Liu F, Chen Y, Li C, Dong L, Tang W, Chen J. Tregs promote the differentiation of Th17 cells in silica-induced lung fibrosis in mice. *PLoS One.* 2012;7(5):e37286. doi: 10.1371/journal.pone.0037286. Epub 2012 May 15.
97. Wu P, Miura Y, Hyodoh F, Nishimura Y, Hatayama T, Hatada S, Sakaguchi H, Kusaka M, Katsuyama H, Tomita M, Otsuki T. Reduced function of CD4+25+ regulatory T cell fraction in silicosis patients. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2006;19(2):357-368.
98. Liu F, Liu J, Weng D, Chen Y, Song L, He Q, Chen J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells depletion may attenuate the development of silica-induced lung fibrosis in mice. *PLoS One.* 2010;3;5(11):e15404. doi: 10.1371/journal.pone.0015404.
99. Hogan CM, Thatcher TH, Sapinoro RE, Gurell MN, Ferguson HE, Pollock SJ, *et al.* Electrophilic PPAR $\gamma$  ligands attenuate IL-1 $\beta$  and silica-induced inflammatory mediator production in human lung fibroblasts via a PPAR $\gamma$ -independent mechanism. *PPAR Reseach.* 2011; 2011: Article ID 318134, 11 pages.
100. Sappino AP, Masouyé I, Saurat JH, Gabbiani G. Smooth muscle differentiation in scleroderma fibroblastic cells. *Am J Pathol.* 1990;137(3):585-591.
101. Eckes B, Zweers MC, Zhang ZG, Hallinger R, Mauch C, Aumailley M, *et al.* Mechanical tension and integrin alpha 2 beta 1 regulate fibroblast functions. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2006;11(1):66-72.
102. Kinnula VL, Adler KB, Ackley NJ, Crapo JD. Release of reactive oxygen species by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro. *Am J Physiol.* 1992;262(6 Pt 1):L708-L712.

103. Wang L, Bowman L, Lu Y, Rojanasakul Y, Mercer RR, Castranova V, *et al.* Essential role of p53 in silica-induced apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288: L488–L496.
104. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K e Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre. 4<sup>a</sup> ed. Artmed, 2004. p.1010 – 1026; 1343 – 1345.
105. Joshi GN, Knecht DA. Silica phagocytosis causes apoptosis and necrosis by different temporal and molecular pathways in alveolar macrophages. *Apoptosis*. 2013;18(3):271-285.
106. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(9):3666 – 3670.
107. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, *et al.* Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*. 1984;312(5996):724-729.
108. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem*. 1991;266(12):7313-7316.
109. Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol*. 1995;5(10):392-399.
110. Brightling C, Berry M, Amrani Y. Targeting TNF- $\alpha$ : A novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:5-10.
111. Chu W-M. Tumor necrosis factor. *Cancer Letters*. 2013; 328:222–225.
112. Moss ML, Jin SL, Becherer JD, Bickett DM, Burkhart W, Chen WJ, *et al.* Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Neuroimmunol*. 1997;72(2):127-129.
113. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000;50(3):184-195.
114. Semenzato G. Tumor necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities. *Br. J. Cancer* 1990;61: 354-361.
115. Johnston DA, Dong B, Hughes CC. TNF induction of jagged-1 in endothelial cells is NFKappaB-dependent. *Gene*. 2009;435(1-2):36-44. Epub 2009 Jan 22.

116. Russo C e Polosa R. TNF- $\alpha$  as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clin Sci*. 2005;109:135-142.
117. Piqueras L, Sanz MJ, Perretti M, Morcillo E, Norling L, Mitchell JA, *et al*. Activation of PPAR $\beta$ / $\delta$  inhibits leukocyte recruitment, cell adhesion molecule expression, and chemokine release. *J Leukoc Biol*. 2009 Apr 23. [Epub ahead of print]
118. Couture P, Paradis-Massie J, Oualha-Morin N, Thibault G. Adhesion and transcellular migration of neutrophils and B lymphocytes on fibroblasts. *Exp Cell Res*. 2009 Apr 23. [Epub ahead of print]
119. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF $\alpha$  in pulmonary pathophysiology. *Respir Res*. 2006;7:125.
120. Qin W, Feng J, Li Y, Lin Z, Shen B De novo design TNF-alpha antagonistic peptide based on the complex structure of TNF-alpha with its neutralizing monoclonal antibody Z12. *J Biotechnol*. 2006;125(1):57-63.
121. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 2002. 31;296(5573):1634-1635.
122. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *NEJM*. 1996;334(26):1717-1725.
123. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signaling: Differences and cellular consequences. *Cell Signal*. 2002;14(6):477-492.
124. Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 2005;115:1-20.
125. Chouaib S, Branellec D, Buurman WA. More insights into the complex physiology of TNF. *Immunology today* 1991;12(5):141-142.
126. Batra S, Balamayooram G, Sahoo MK. Nuclear Factor- $\kappa$ B: a Key Regulator in Health and Disease of Lung. *Arch Immunol. Ther. Exp*. 2011;59: 335-351.
127. Lin Y, Bai L, Chen W, Xu S. The NF- $\kappa$ B activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14(1):45-55.
128. Sun SC. The noncanonical NF- $\kappa$ B pathway. *Immunological Reviews*. 2012;246:125-140.

129. Di Giuseppe M, Gambelli F, Hoyle GW, Lungarella G, Studer SM, Richards T, *et al.* Systemic inhibition of NF-kappaB activation protects from silicosis. *PLoS One*. 2009;4(5):e5689. doi: 10.1371/journal.pone.0005689.
130. Lahiri S, Levenstein C, Nelson DI, Rosemberg BJ. The cost effectiveness of occupational Health Intervention: Prevention of silicosis. *American Journal of Industrial Medicine*. 2005;1-14.
131. Carneiro APS, Algrantti E. Formas de Apresentação. Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho - FUNDACENTRO. [Acesso em 08 fev 2009]. Disponível em: <http://www.fundacentro.gov.br/conteudo.asp?D=SES&C=786&menuAberto=785>.
132. Wang X, Ying C, Lina L, Chen J. Silencing CD36 gene expression results in the inhibition of latent-TGF- $\beta$ 1 activation and suppression of silica-induced lung fibrosis in the rat. *Respir Res*. 2009;10:36. doi: 10.1186/1465-9921-10-36.
133. Ji WJ, Zhou X, Zeng S, Wang SX. Attenuation of silica-induced pulmonary fibroblasts proliferation by taurine and niacin in vitro. *Exp Lung Res*. 2009;35(3):198-209.
134. Lassance RM, Prota LFM, Maron-Gutierrez T, Garcia CSNB, Abreu SC, Pássaro CP, *et al.* Intratracheal instillation of bone marrow-derived cell in an experimental model of silicosis. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2009;169:227–233.
135. Wang X, Lina Lv, Ying Chen and Jie Chen. A CD36 synthetic peptide inhibits silica-induced lung fibrosis in the mice *Toxicol Ind Health*. 2010;26:47-53.
136. Maron-Gutierrez T, Castiglione RC, Xisto DG, Oliveira MG, Cruz FF, Peçanha R, *et al.* Bone marrow-derived mononuclear cell therapy attenuates silica-induced lung fibrosis. *Eur Respir J* 2011;37:1217–1225.
137. Takato H, Yasui M, Ichikawa Y, Waseda Y, Inuzuka K, Nishizawa Y, *et al.* The specific chymase inhibitor TY-51469 suppresses the accumulation of neutrophils in the lung and reduces silica-induced pulmonary fibrosis in mice. *Exp Lung Res*. 2011;37(2):101-108.
138. Singer JP, Chen H, Phelan T, Kukreja J, Golden JA and Blanc PD. Survival following lung transplantation for silicosis and other occupational lung diseases. *Occupational Medicine* 2012;62:134-137.
139. Melo RSS e Zago MMF. The meanings of silicosis held by ill quarry workers. *Texto contexto - enferm*. [online]. 2012, vol.21, n.4, pp. 845-853. ISSN 0104-0707.



140. Xie QM, Tang HF, Chen JQ, Bian RL. Pharmacological actions of tetrandrine in inflammatory pulmonary diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2002;23(12):1107-1113.
141. Lai JH. Immunomodulatory effects and mechanisms of plant alkaloid tetrandrine in autoimmune diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2002;23(12):1093-1101.
142. Reimold AM. New Indications for Treatment of Chronic Inflammation by TNF- $\alpha$  Blockade. *Am J Med Sci* 2003;325(2):75–92.
143. Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(9):736-46.
144. Ito T, Ando H, Handa H. Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011;68:1569-1579
145. Wu JJ, Huang DB, Pang KR, Hsu S, Tying SK. Thalidomide: dermatological indications, mechanisms of action and side-effects. *Br J Dermatol.* 2005;153(2):254-73.
146. Tabata C, Tabata R, Kadokawa Y, Hisamori S, Takahashi M, Mishima M, Nakano T, Kubo H. Thalidomide Prevents Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *The Journal of Immunology.* 2007;179:708–714.
147. Knobloch J, Jungck D, Koch A. Apoptosis induction by thalidomide: critical for limb teratogenicity but therapeutic potential in idiopathic pulmonary fibrosis? *Curr Mol Pharmacol.* 2011;4(1):26-61.
148. Parman T, Wiley MJ, Wells PG. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med.* 1999;5(5):582-5
149. Wells PG, Bhuller Y, Chen CS, Jeng W, Kasapinovic S, Kennedy JC, *et al.* Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2005;207(2):354–366.
150. Knobloch J, Reimann K, Klotz LO, R  ther U. Thalidomide resistance is based on the capacity of the glutathione-dependent antioxidant defense. *Mol Pharm.* 2008;5(6):1138-1144.
151. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(9):4082-4085.

152. Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. Identification of *IKK $\beta$*  as a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*. 2010;327(5971):1345-1350.
153. Koch HP. Thalidomide and congeners as anti-inflammatory agents. *Prog Med Chem*. 1985;22:165-242.
154. Sampaio EP, Hernandez MO, Carvalho DS, Sarno EN. Management of erythema nodosum leprosum by thalidomide: thalidomide analogues inhibit M. leprae-induced TNF $\alpha$  production in vitro. *Biomed Pharmacother* 2002;56: 13-19.
155. Menzel H, Hinmüller K, Kolb HJ, Schuster T, Hoellein A, Peschel C, *et al.* Efficacy of repeat myeloablative chemotherapy with autologous stem- cell support in multiple myeloma. *Ther Adv Hematol*. 2012;3(2):81–88.
156. Yang G, Chen W, Wu Y. Bortezomib, dexamethasone plus thalidomide for treatment of newly diagnosed multiple myeloma patients with or without renal impairment. *Chin J Cancer Res*. 2013;25(2):155-160.
157. Calabrese L, Fleischer, AB. Thalidomide: current and potential clinical applications. *Am. J. Med*. 2000;108:487–495.
158. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med*. 1993;177(6):1675-1680.
159. Lin YC, Shun CT, Wu MS, Chen CC. A novel anticancer effect of thalidomide: inhibition of intercellular adhesion molecule-1-mediated cell invasion and metastasis through suppression of nuclear factor-kappaB. *Clin Cancer Res*. 2006;12(23):7165-7173.
160. Choe JY, Jung HJ, Park KY, Kum YS, Song GG, Hyun DS, *et al.* Anti-fibrotic effect of thalidomide through inhibiting TGF- $\beta$ -induced ERK1/2 pathways in bleomycin-induced lung fibrosis in mice *Inflamm. Res*. 2010;59:177–188.
161. Taylor PC. Anti-TNFalpha therapy for rheumatoid arthritis: an update. *Intern Med*. 2003;42(1):15-20.
162. Lügering A, Schmidt M, Lügering N, Pauels HG, Domschke W, Kucharzik T. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's

- disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology*. 2001;121(5):1145-1157.
163. Callejas-Rubio JL, López-Pérez L, Ortego-Centeno N. Tumor necrosis factor-alpha inhibitor treatment for sarcoidosis. *Ther Clin Risk Manag*. 2008;4(6):1305-1313.
164. Miller AV, Ranatunga SKM. Immunotherapies in Rheumatologic Disorders. *Medical Clinics of North America*. 2012;96(3):475–496.
165. Roberts RL, Barclay ML. Current relevance of pharmacogenetics in immunomodulation treatment for Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27(10):1546-54.
166. Kim IH, West CE, Kwatra SG, Feldman SR, O'Neill JL. Comparative efficacy of biologics in psoriasis: a review. *Am J Clin Dermatol*. 2012;13(6):365-74.
167. Thavarajah K, Wu P, Rhew EJ, Yeldandi AK, Kamp DW. Pulmonary complications of Tumor Necrosis Factor-targeted therapy. *Respir Med*. 2009;103(5): 661-669.
168. Ali T, Kaitha S, Mahmood S, Ftesi A, Stone J, Bronze MS. Clinical use of anti-TNF Therapy and increased risk of infection. *Drug, Healthcare and Patient Safety*. 2013;5:79-99.
169. Van Hauwermeiren F, Vandembroucke RE, Libert C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(5-6):311-319.
170. Alexopoulou L, Pasparakis M, Kollias G. A murine transmembrane tumor necrosis factor (TNF) transgene induces arthritis by cooperative p55/p75 TNF receptor signaling. *Eur J Immunol*. 1997 Oct;27(10):2588-2592.
171. Olleros ML, Vesin D, Lambou AF, Janssens JP, Ryffel B, Rose S, *et al*. Dominant-Negative Tumor Necrosis Factor Protects from *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) and Endotoxin-Induced Liver Injury without Compromising Host Immunity to BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Infectious Diseases* 2009; 199:1053-1063.
172. Steed PM, Tansey MG, Zalevsky J, Zhukovsky EA, Desjarlais JR, Szymkowski DE, *et al*. Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants. *Science*. 2003;301(5641):1895-1898.

173. Zalevsky J, Secher T, Ezhevsky SA, Janot L, Steed PM, O'Brien C, *et al.* Dominant-negative inhibitors of soluble TNF attenuate experimental arthritis without suppressing innate immunity to infection. *J Immunol.* 2007;179(3):1872-1883.
174. Olleros ML, Vesin D, Fotio AL, Santiago-Raber ML, Tauzin S, Szymkowski DE *et al.* Soluble TNF, but not membrane TNF, is critical in LPS-induced hepatitis. *Journal of Hepatology* 2010;53:1059–1068.
175. Harms AS, Barnum CJ, Ruhn KA, Varghese S, Treviño I, Blesch A, *et al.* Delayed dominant-negative TNF gene therapy halts progressive loss of nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Mol Ther.* 2011;19(1):46-52.
176. Maillet I, Schnyder-Candrian S, Couillin I, Quesniaux VF, Erard F, Moser R, *et al.* Allergic lung inflammation is mediated by soluble tumor necrosis factor (TNF) and attenuated by dominant-negative TNF biologics. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(4):731-9.
177. Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Sappino AP, Vassalli P. Requirement of tumor necrosis factor for development of silica induced pulmonary fibrosis. *Nature.* 1990;344:245-247.
178. Amrani Y, Chen H, Panettieri Jr RA. Activation of tumor necrosis factor receptor 1 in airway smooth muscle: a potential pathway that modulates bronchial hyper-responsiveness in asthma? *Respir Res.* 2000;1(1):49-53.
179. Beamer CA, Migliaccio CT, Jessop F, Trapkus M, Yuan D, Holian A. Innate immune processes are sufficient for driving silicosis in mice. *J Leukoc Biol.* 2010;88(3):547-57.
180. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89(20):9784-9788.
181. Wooley PH, Dutcher J, Widmer MB, Gillis S. Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol.* 1993;151(11):6602-6607.
182. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2001;344(12):907-916.

183. Marciniak SJ, Lomas DA. What can naturally occurring mutations tell us about the pathogenesis of COPD? *Thorax*. 2009;64(4):359-364.
184. Nakae S, Lunderius C, Ho LH, Schäfer B, Tsai M, Galli SJ. TNF can contribute to multiple features of ovalbumin-induced allergic inflammation of the airways in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2007-a;119:680-686.
185. Nakae S, Ho LH, Yu M, Monteforte R, Likura M, Suto H, Galli SJ. Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and Th2 cytokine production in an asthma model in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2007-b;120:48-55.
186. Piguet PF, Vesin C. Treatment by human recombinant soluble TNF receptor of pulmonary fibrosis induced by bleomycin or silica in mice. *Eur Respir J*. 1994;7:515-518.
187. Yucesoy B, Vallyathan V, Landsittel DP, Sharp DS, Weston A, Burleson GR, *et al*. Association of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 gene polymorphisms with silicosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001;172(1):75-82.
188. McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation*. 2008;5:45. doi: 10.1186/1742-2094-5-45.
189. Hoymann HG. Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2007;55(1):16-26.
190. Junqueira LCU, Junqueira LMMS. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: Santos, 1983.
191. Montes GS, Junqueira LCU. The use of picosirius' polarizaion method for study of the biopathology of collagen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 1991. 86(111):1-11.
192. Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol*. 1990;258(4 Pt 1):L148-L156.
193. Sakae RS, Leme AS, Dolhnikoff M, Pereira PM, do Patrocínio M, Warth TN, *et al*. Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacholine. *Am J Physiol*. 1994;266(1 Pt 1):L23-L29.
194. Zar JH. *Biostatistical analysis*. 3. ed. New Jersey: Prentice-Hall Inc. 1996.

195. Ortiz LA, Lasky J, Gozal E, Ruiz V, Lungarella G, Cavarra E, *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;163:244-252.
196. Amrani Y, Krymskaya V, Maki C, Panettieri Jr RA. Mechanisms underlying TNF- $\alpha$  effects on agonist-mediated calcium homeostasis in human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1997;273:L1020- L1028.
197. Parris JRM, Cobban HJ, Littlejohn AF, MacEwan DJ, Nixon GF. Tumor necrosis factor- $\alpha$  activates a calcium sensitization pathway in guinea-pig bronchial smooth muscle. *J Physiol.* 1999;518(2):561-569.
198. Williams AS, Eynot PR, Leung S-Y, Nath P, Jupp R, De Sanctis GT, *et al.* Role of cathepsin S in ozone-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Pulm Pharmacol Ther.* 2009;22:27-32.
199. Corbett EL, Mozzato-Chamay N, Butterworth AE, De Cock KM, Williams BG, Churchyard GJ, *et al.* Polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter may predispose to severe silicosis in black South African miners. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(5):690-693
200. Wu F, Qu Y, Tang Y, Cao D, Sun P, Xia Z. Lack of association between cytokine gene polymorphisms and silicosis and pulmonary tuberculosis in Chinese iron miners. *J Occup Health.* 2008;50(6):445-454.
201. Asano T, Kume H, Taki F, Ito S, Hasegawa Y. Thalidomide attenuates airway hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(6):1028-1032.
202. Hunter I, Cobban HJ, Vandenabeele P, MacEwan DJ, Nixon GF. Tumor necrosis factor-alpha-induced activation of RhoA in airway smooth muscle cells: role in the Ca<sup>2+</sup> sensitization of myosin light chain20 phosphorylation. *Mol Pharmacol.* 2003 Mar; 63(3):714-721.
203. Santana AC, Degaspari S, Catanozi S, Dellê H, de Sá Lima L, Silva C, *et al.* Thalidomide suppresses inflammation in adenine-induced CKD with uraemia in mice. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(5):1140-1149.

204. Hammond ER, Kaplin AI, Kerr DA. Thalidomide for acute treatment of neurosarcoidosis. *Spinal Cord* 2007;45:802-803.
205. Hoyle JC, Newton HB, Katz S Prognosis of refractory neurosarcoidosis altered by thalidomide: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2008, 2:27 doi:10.1186/1752-1947-2-27
206. Avasarala,S., Zhang,F., Liu,G., Wang,R., London,S.D. and London,L. Curcumin Modulates the Inflammatory Response and Inhibits Subsequent Fibrosis in a Mouse Model of Viral-induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *PloS one*. 2013;8, e57285.
207. Zhang HY, Gharaee-Kermani M, Zhang K, Karmioli S, Phan SH. Lung fibroblast alpha-smooth muscle actin expression and contractile phenotype in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 1996;148(2):527-537.
208. Zhao L, Xiao K, Wang H, Wang Z, Sun L, Zhang F, *et al*. Thalidomide has a therapeutic effect on interstitial lung fibrosis: evidence from in vitro and in vivo studies. *Clin Exp Immunol*. 2009;157(2):310-315.
209. Usuki J, Matsuda K, Azuma A, Kudoh S, Gemma A. Sequential analysis of myofibroblast differentiation and transforming growthfactor- $\beta$ 1/Smad pathway activation in murine pulmonary fibrosis. *J Nippon Med Sch*. 2012;79(1):46-59.
210. Kumar V, Harjai K, Chhibber S. Thalidomide treatment modulates macrophage pro-inflammatory function and cytokine levels in *Klebsiella pneumoniae* B5055 induced pneumonia in BALB/c mice. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(7):777-783.
211. Ye Q, Chen B, Tong Z, Nakamura S, Sarria R, Costabel U, *et al*. Thalidomide reduces IL-18, IL-8 and TNF-alpha release from alveolar macrophages in interstitial lung disease. *Eur Respir J*. 2006;28(4):824-831.
212. Noman AS, Koide N, Hassan F, I-E-Khuda I, Dagvadorj J, Tumurkhuu G, *et al*. Thalidomide inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production via down-regulation of MyD88 expression. *Innate Immun*. 2009;15(1):33-41.

213. Park E, Levis WR, Greig N, Jung E, Schuller-Levis G. Effect of thalidomide on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *J Drugs Dermatol.* 2010;9(4):330-333.
214. Tseng CM, Hsiao YH, Su VY, Su KC, Wu YC, Chang KT, *et al.* The Suppression Effects of Thalidomide on Human Lung Fibroblasts: Cell Proliferation, Vascular Endothelial Growth Factor Release, and Collagen Production. *Lung.* 2013 May 31. [Epub ahead of print]
215. Liang CJ, Yen YH, Hung LY, Wang SH, Pu CM, Chien HF, *et al.* Thalidomide inhibits fibronectin production in TGF- $\beta$ 1-treated normal and keloid fibroblasts via inhibition of the p38/Smad3 pathway. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(11):1594-1602.
216. Li X, Liu X, Wang J, Wang Z, Jiang W, Reed E, *et al.* Effects of thalidomide on the expression of angiogenesis growth factors in human A549 lung adenocarcinoma cells. *Int J Mol Med.* 2003;11(6):785-790.
217. Keller M, Sollberger G, Beer HD. Thalidomide inhibits activation of caspase-1. *J Immunol.* 2009;183(9):5593-5599.
218. Deveci F, Hamdi MM., Ilhan N, Ki`Rki`L G, Turgut T, Akpolat N. Evaluation of the anti-inflammatory effect of infliximab in a mouse model of acute asthma. *Respirology.* 2008;13:488–497.
219. Almodóvar R, Izquierdo M, Zarco P, Quirós JF, Mazzucchelli R, Steen B. Pulmonary sarcoidosis in a patient with ankylosing spondylitis treated with infliximab. *Clin Exp Rheumatol.* 2007;25(1):99-101.
220. Clementine RR, Lyman J, Zakem J, Mallepalli J, Lindsey S, Quinet R. Tumor Necrosis Factor-Alpha Antagonist-Induced Sarcoidosis. *J Clin Rheumatol* 2010;16: 274-279
221. Dhaille F, Viseux V, Caudron A, Dadban A, Tribout C, Boumier P, *et al.* Cutaneous sarcoidosis occurring during anti-TNF-alpha treatment: report of two cases. *Dermatology.* 2010;220(3):234-7.
222. Ratnarathorn M, Raychaudhuri SP, Naguwa S. Disseminated granuloma annulare: a cutaneous adverse effect of anti-tnf agents. *Indian J Dermatol.* 2011;56(6):752-754.



223. Cai Y, Cao YX, Lu SM, Xu CB e Cardell LO. Infliximab alleviates inflammation and ex vivo airway hyperreactivity in asthmatic E3 rats. *International Immunology*, 2011; 23(7):443–451.
224. Taillé C, Poulet C, Marchand-Adam S, Borie R, Dombret MC, Crestani B *et al.* Monoclonal Anti-TNF- $\alpha$  Antibodies for Severe Steroid-Dependent Asthma: A Case Series. *The Open Respiratory Medicine Journal*. 2013;7:21-25.
225. Stoll ML, Solomon DH, Batra KL, Simard JF, Karlson EW, Dellaripa PF, *et al.* TNF $\alpha$  Inhibitors May Improve Asthma Symptoms: A Case Series of 12 Patients with Rheumatoid Arthritis and Asthma. *J Clin Rheumatol*. 2009;15(4):198-200.
226. Rennard SI, Fogarty C, Kelsen S, Long W, Ramsdell J, Allison J, *et al.* The safety and efficacy of infliximab in moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(9):926-934.
227. Murdaca G, Colombo BM, Barabino G, Caiti M, Cagnati P, Puppo F. Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  treatment with infliximab for disseminated granuloma annulare. *Am J Clin Dermatol*. 2010;11(6):437-439.
228. Mitra A, Gooi J, Darling J, Newton-Bishop JA. Infliximab in the treatment of a child with cutaneous granulomas associated with ataxia telangiectasia. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011;65(3):676-677.
229. Martin GP, González MC, Bueno JS, Calderón MB, Buil MV, Vanaclocha F *et al.* Sarcoidosis simulando una histiocitosis no Langerhans, tratada com antagonistas del factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . *An Pediatr (Barc)*. 2012;77(4):267-271.
230. Yamashita H, Ueda Y, Kawaguchi H, Suzuki A, Takahashi Y, Kaneko H, Kano T e Mimor A. Systemic lupus erythematosus complicated by Crohn's disease: a case report and literature review. *Gastroenterology* 2012, 12:174.
231. Antoniou KM, Mamoulaki M, Malagari K, Kritikos HD, Bouros D, Siafakas NM, Boumpas DT. Infliximab therapy in pulmonary fibrosis associated with collagen vascular disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2007;25(1):23-28.
232. Wood KL, Hage CA, Knox KS, Kleiman MB, Sannuti A, Day RB, *et al.* Histoplasmosis after treatment with anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(9):1279-1282.

233. Milman N, Andersen CB, Baslund B, Loft A, Iversen M. Does tumour necrosis factor-alpha inhibitor infliximab induce histological resolution of pulmonary sarcoid granulomas? *Clin Respir J*. 2007;1(2):106-113.
234. Mattyasovszky SG, Hofmann A, Brochhausen C, Ritz U, Kuhn S, Wollstädter J, *et al*. The effect of the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha on human joint capsule myofibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(1):R4. doi: 10.1186/ar2902. Epub 2010 Jan 8.
235. Fitzgerald DC, Meade KG, McEvoy AN, Lillis L, Murphy EP, MacHugh DE, *et al*. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor kappaB (NFkappaB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammaryepithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;116(1-2):59-68.
236. Guilleminault L, Carré O, Beau-Salinas F, Taillé C, Dieudé P, Crestani B, *et al*. Asthma Unmasked With Tumor Necrosis Factor- a-Blocking Drugs. *CHEST* 2011; 140(4):1068-1071.
237. Scheinfeld, N. A comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor blockers etanercept, infliximab and adalimumab. *J. Dermatolog. Treat*. 2004;15: 280-294.
238. Fernández-Cruz E, Alecsandru D, Rodríguez-Sainz C. Introduction to biological drugs. *Actas Dermosifiliogr*. 2008 Jul;99 Suppl 4:2-6.
239. Aversa G, Punnonen J and de Vries JE: The 26-kD transmembrane form of tumor necrosis factor- on activated CD4+ T cell clones provides a costimulatory signal for human B cell activation. *J Exp Med* 1993;177:1575-1585.
240. Parry SL, Sebbag M, Feldmann M and Brennan FM: Contact with T cells modulates monocyte IL-10 production: role of T cell membrane TNF- $\alpha$ . *J Immunol* 1997;158: 3673-3681.
241. Burger D, Lou J, Dayer JM and Grau GE: Both soluble and membrane-associated TNF activate brain microvascular endothelium: relevance to multiple sclerosis. *Mol Psychiatry* 2:113-116, 1997.
242. Xin L, Wang J, Zhang H, Shi W, Yu M, Li Q, *et al*. Dual regulation of soluble tumor necrosis factor-alpha induced activation of human monocytic cells via

- modulating transmembrane TNF- $\alpha$ -mediated 'reverse signaling'. *Int J Mol Med*. 2006;18(5):885-892.
243. Philip R and Epstein LB: Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin-1. *Nature* 1986;323:86-89.
244. Heller RA and Kronke M: Tumor necrosis factor receptormediated signaling pathways. *J Cell Biol* 1994;126:5-9.
245. Müller S, Rihs S, Schneider JMD, Paredes BE, Seibold I, Brunner T *et al*. Soluble TNF- $\alpha$  but not transmembrane TNF- $\alpha$  sensitizes T cells for enhanced activation-induced cell death. *Eur. J. Immunol*. 2009;39:3171-3180.
246. Sama DM, Abdul HM, Furman JL, Artiushin IA, Szymkowski DE, Scheff SW, *et al*. Inhibition of Soluble Tumor Necrosis Factor Ameliorates Synaptic Alterations and Ca<sup>2+</sup> Dysregulation in Aged Rats. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e38170.
247. Gambelli F, Di P, Niu X, Friedman M, Hammond T, Riches DW, *et al*. Phosphorylation of tumor necrosis factor receptor 1 (p55) protects macrophages from silica-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2004;279(3):2020-2029.
248. Organização Internacional do Trabalho. Disponível em: [http://www.ilo.org/global/about-the-ilo/newsroom/news/WCMS\\_187783/lang--en/index.htm](http://www.ilo.org/global/about-the-ilo/newsroom/news/WCMS_187783/lang--en/index.htm). Acessado em: 23/08/2013.
249. Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A, Wada H, Moore M, Williamson B, Basu S, Old LJ. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jul 22;94(15):8093-8.
250. Chakravarty SD, Zhu G, Tsai MC, Mohan VP, Marino S, Kirschner DE, Huang L, Flynn J, Chan J. Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs. *Infect Immun*. 2008 Mar;76(3):916-26. doi: 10.1128/IAI.01011-07. Epub 2008 Jan 22.
251. Navarra SV, Tang B, Lu L, Lin HY, Mok CC, Asavatanabodee P, Suwannalai P, Hussein H, Rahman MU. Risk of tuberculosis with anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  therapy: substantially higher number of patients at risk in Asia. *Int J Rheum Dis*. 2013 Oct 16. doi: 10.1111/1756-185X.12188. [Epub ahead of print]

252. Bruns H, Meinken C, Schauenberg P, Härter G, Kern P, Modlin RL, Antoni C, Stenger S. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in humans. *J Clin Invest.* 2009 May;119(5):1167-77. doi: 10.1172/JCI38482. Epub 2009 Apr 20.