



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thamiris Andrade Lima de Oliveira

**Estudo do envolvimento da adenosina na resposta inflamatória
pulmonar crônica induzida por partículas de sílica em
camundongos**

Rio de Janeiro
2019

Thamiris Andrade Lima de Oliveira

**Estudo do envolvimento da adenosina na resposta inflamatória pulmonar
crônica induzida por partículas de sílica em camundongos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

O48	<p>Oliveira, Thamiris Andrade Lima de. Estudo do envolvimento da adenosina na resposta inflamatória pulmonar crônica induzida por partículas de sílica em camundongos / Thamiris Andrade Lima de Oliveira – 2019. 65 f.</p> <p>Orientadora: Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-graduação em Biociências.</p> <p>1. Silicose – Teses. 2. Pulmões – Inflamação – Teses. 3. Fibrose pulmonar – Teses. 4. Adenosina. 5. Receptor A2A de Adenosina. 6. Sílica – Teses. I. Martins, Patrícia Machado Rodrigues e Silva. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.</p> <p>CDU 616.24-003.662</p>
-----	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Thamiris Andrade Lima de Oliveira

**Estudo do envolvimento da adenosina na resposta inflamatória pulmonar
crônica induzida por partículas de sílica em camundongos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 06 de dezembro de 2019.

Orientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins
Fundação Oswaldo Cruz

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Simone Vargas da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Àguila
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Pedro Leme
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Agradeço primeiramente a Deus, que me manteve forte, me deu força e paciência para mover barreiras. Agradeço à minha família, por todo apoio, por serem meu porto seguro e por estarem sempre ao meu lado. Aos amigos que também estiveram ao meu lado, muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço pela minha vida. Por me dar sabedoria, paciência e por estar sempre presente em todos os momentos;

Aos meus pais, Celso e Elizabeth, por estarem sempre presentes em minha vida. Por sempre me proporcionarem o melhor e compartilharem comigo toda sua sabedoria, amor e carinho. Agradeço pelo seus ensinamentos e por me mostrarem o quão importante é a família, e por todo esforço e dedicação que fizeram para me ajudar a realizar meus sonhos e por acreditarem em meu potencial;

Aos meus avós, Humberto, Maria Luíza e Cacilda, agradeço por seus ensinamentos, por sua paciência e por suas histórias. Obrigada por me darem carinho e por estarem ao meu lado sempre, agradeço por todos os momentos de descontração, agradeço pelo amor que vocês tem por mim;

Ao meu irmão, Daniel, obrigado pelo apoio e pelos momentos de impicância para me poder fazer rir, pelos momentos de descontração e por estar ao meu lado, sei que posso contar com você sempre que eu precisar;

Aos demais familiares, agradeço o apoio, por estarem sempre me dando força e torcendo por mim;

Ao Mauro Vinícius e seus familiares, por todo apoio, carinho, amor e paciência comigo sempre. Por estarem ao meu lado e por acreditarem em mim. Agradeço pelos ensinamentos e pelos momentos de descontração, pelos passeios com sorvetes para “distrair as idéias” e pelas palavras de apoio e incentivo;

Aos amigos, em especial Alessandra, Caroline Valdevino, Leilane, Joyce Chistina, Emily, Bruna, agradeço pela sua amizade e por acreditarem em meu potencial, por sempre me darem apoio e pelos momentos de descontração;

Às amigas, Aryella e Joyce Caroline, que sempre estiveram ao meu lado e que estavam sempre dispostas a me fazer rir para melhorar meu humor. Obrigada por estarem ao meu lado e por acreditarem em mim. Aprendi muito com vocês, e vou guardar todos os ensinamentos comigo. Agradeço a ajuda tanto nos experimentos quanto fora deles;

A todos os membros do Laboratório de Inflamação, que fizeram parte de algum modo de tudo isto, sendo ajudando em experimentos ou nos momentos de

descontração. Agradeço em especial, à Fernanda Verdini por me ajudar nos experimentos e pelo apoio e pelos momentos de descontração, ao apoio técnico da Ana Carolina Arantes, Camila Dantas, Ana Lúcia Pires, obrigada pelo apoio e pelos momentos de descontração em meio a alguns dias sérios. Agradeço a Amanda Chaves por seus conselhos e pelo convívio. Agradeço aos pesquisadores Vinicius Farias de Carvalho e Andressa Bernardi, por estarem sempre à disposição de ajuda;

Aos usuários da sala de cultura, um agradecimento especial ao Yago Amigo, que sempre esteve disposto a me ajudar, a ensinar e sempre esteve presente nos momentos de descontração, à Natália Ribeiro, Érica e Carolina Azevedo, por estarem sempre dispostas a ajudar e nos momentos de convívio diário;

À aluna do PROVOG, Anna Beatriz, agradeço por todo seu apoio e pelos momentos de descontração e risadas. Amei ser sua co-orientadora;

A todos os profissionais relacionados ao biotério do Pavilhão Osório de Almeida, pelo cuidado com os animais que foram usados nos experimentos

Ao Dr. Marco Aurélio Martins e Dr. Renato Cordeiro, pela dedicação para com o laboratório e pela dedicação e profissionalismo. Agradeço a oportunidade de convivência e desenvolvimento do trabalho no Laboratório de Inflamação;

À Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins por toda paciência, orientação e presença. Obrigada por acreditar em meu potencial e por sempre dar apoio e incentivo. Agradeço pelas conversas e por momentos de descontração e pela torcida pelo meu sucesso;

À Secretaria de Pós-graduação do Programa de Pós-Graduação em Biociências (PPGB), por sempre estar à disposição para esclarecimento de dúvidas e para auxílio sobre algo importante;

Agradeço a todos os membros da banca pela disponibilidade e interesse em contribuir academicamente para o trabalho;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Às agências de fomento: CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado e Capes e Faperj pelo apoio financeiro.

Tu és o meu abrigo e o meu escudo; e na Tua palavra
deposito toda a minha esperança!

Salmo 119:114

RESUMO

OLIVEIRA, Thamiris Andrade Lima de. *Estudo do envolvimento da adenosina na resposta inflamatória pulmonar crônica induzida por partículas de sílica em camundongos*. 2019. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A silicose é a pneumoconiose de maior prevalência no Brasil e no mundo, resultado da exposição prolongada a partículas de sílica cristalina. É caracterizada por componente inflamatório e fibrogênico, associado a um marcado comprometimento da função pulmonar. Apesar do arsenal terapêutico disponível, não há tratamento eficaz até o momento. A adenosina é um mediador gerado a partir de nucleotídeos de adenina, cuja ação está associada a receptores metabotrópicos transmembranares clássicos e também tem sido demonstrado o envolvimento em processos fibróticos. Neste estudo investigamos o envolvimento da adenosina na silicose experimental. Camundongos foram instilados com suspensão de sílica cristalina (10 mg/50 µL/animal), (n = 6 a 8 animais por grupo), e as análises realizadas em 7 (fase inicial) e 28 dias (fase tardia) após o estímulo com sílica. Foram avaliados os parâmetros de: i) histologia (morfologia e morfometria; deposição de colágeno) utilizando os corantes de hematoxilina e eosina e Picrus sirius; ii) função pulmonar e reatividade das vias aéreas ao agonista colinérgico metacolina; iii) quantificação de mediadores inflamatórios por ELISA e iv) expressão de receptores A_{2A} por *western blot*. Verificamos que a instilação das partículas de sílica levou ao aumento na expressão dos receptores A_{2A}, de forma tempo dependente, com resposta mais intensa sendo notada na fase tardia. Na sequência, foram utilizados camundongos geneticamente depletados do receptor A_{2A} (A_{2A}^{-/-}) (*background* Balb/c) ou, ainda, camundongos Swiss-Webster que receberam a administração, terapêuticamente, do antagonista do receptor A_{2A} SCH 58261, na dose de 0,1 mg/kg (i.p.). Verificamos que os animais A_{2A}^{-/-} bem como aqueles tratados com o composto SCH 58261 mostraram nítida redução do conteúdo de granulomas e da fibrose (deposição de fibras de colágeno) no parênquima pulmonar, em paralelo à melhora da função pulmonar evidenciada pela diminuição da hiperreatividade das vias aéreas. A redução no conteúdo de células positivas para α -actina de músculo liso (α -SMA) – um marcador para os miofibroblastos - foi também evidenciada. Em conclusão, nossos resultados mostram que a adenosina parece desempenhar um papel importante na fibrose granulomatosa verificada na condição de estimulação com as partículas de sílica no pulmão de camundongos, e sugerem ser este mediador um alvo terapêutico relevante neste processo. Estes dados são relevantes para o processo de desenvolvimento futuro de uma terapêutica eficaz para ser aplicada em doenças fibróticas como a silicose.

Palavras-chave: Silicose. Inflamação. Fibrose. Adenosina. Receptor A_{2A}.
Terapêutica

ABSTRACT

OLIVEIRA, Thamiris Andrade Lima de. *Study of adenosine involvement in chronic pulmonary inflammatory response induced by silica particles in mice*. 2019. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Silicosis is the most prevalent pneumoconiosis in Brazil and worldwide, resulting from prolonged exposure to retention of crystalline silica. It is characterized by the inflammatory and fibrogenic component, associated with a marked impairment of pulmonary function. Despite the available therapeutic arsenal, there is no effective treatment so far. Adenosine is a mediator generated from adenine nucleotides, whose action is associated with classical transmembrane metabotropic receptors and involvement in fibrotic processes has also been demonstrated. In this study, we investigated the involvement of adenosine in experimental silicosis. Mice were instilled with suspension of crystalline silica (10 mg / 50 μ L / animal), (n= 6 - 8 animals per group), and were monitored at 7 (early) and 28 days (late) after silica stimulation. The following parameters were taxed: i) histology (morphology and morphometry; collagen deposition) using hematoxylin and eosin and Picrus sirius dyes; ii) pulmonary function and airway reactivity to cholinergic agonist methacholine; iii) quantification of inflammatory mediators by ELISA and iv) A2A receptor expression by western blot. It verified that the instillation of the silicas led to the increase in the expression of A2A receptors, in a time dependent manner, with more intense response being noticed in the late phase. Following, genetically depleted A2A receptor (A2A^{-/-}) mice (Balb / c background) or Swiss-Webster mice receiving therapeutically A2A SCH 58261 antagonist administration were used, at the dose of 0.1 mg / kg (i.p.). A2A^{-/-} as well as those composed of compound SCH 58261 did not reduce the granulomas and fibrosis (collagen fiber deposition) content without pulmonary parenchyma, in parallel to the improvement in pulmonary function evidenced by airway hyperreactivity. The reduction in the content of smooth muscle action positive cells (α -SMA) - a marker for myofibroblasts - was also evidenced. In conclusion, our results show that adenine appears to play an important role in granulomatous fibrosis found in the estimation condition with non-lung mouse silica estimates, and to suggest this mediator as a currently concerned therapeutic agent. These data are relevant to the future development process of an effective therapy to be applied in fibrotic diseases such as silicosis.

Keywords: Silicosis. Inflammation. Fibrosis. Adenosine. A2A receptor. Therapeutics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Local de deposição das partículas de poeira no sistema respiratório humano.....	19
Figura 2 – Representação da fisiopatologia da silicose.....	23
Figura 3 – Metabolismo da adenosina.....	24
Figura 4 – Esquema do processo de instilação intranasal de sílica (10 mg), tratamentos e tempos de análise.....	30
Figura 5 – Expressão do receptor de adenosina A2A no pulmão de camundongos Swiss-Webster.....	38
Figura 6 – Avaliação morfológica do pulmão de camundongos A2A ^{+/+} e A2A ^{-/-}	39
Figura 7 – Avaliação da deposição de colágeno no pulmão de camundongos A2A ^{+/+} e A2A ^{-/-}	40
Figura 8 – Avaliação morfológica do pulmão de camundongos A2A ^{+/+} e A2A ^{-/-}	41
Figura 9 – Avaliação da deposição de colágeno no pulmão de camundongos A2A ^{+/+} e A2A ^{-/-}	42
Figura 10– Avaliação da produção de quimiocinas e citocinas no pulmão de camundongos A2A ^{+/+} e A2A ^{-/-} estimulados com sílica (10 mg/50 µL) (28 dias).....	44
Figura 11– Avaliação da mecânica respiratória (parâmetro de elastância) em camundongos A2A ^{+/+} e A2A ^{-/-}	45
Figura 12– Avaliação de partículas de sílica cristalina no pulmão de camundongos A2A ^{+/+} e A2A ^{-/-}	47
Figura 13– Expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) no pulmão de camundongos A2A ^{+/+} e A2A ^{-/-}	48
Figura 14– Efeito do tratamento com o antagonista de receptor de adenosina A2A SCH-58261 nas alterações morfológicas do pulmão de camundongos Swiss-Webster instilados com sílica (10 mg/50 µl) (0,1 mg/kg).....	50
Figura 15– Efeito do tratamento com o antagonista de receptor de adenosina A2A SCH-58261 sobre o depósito de colágeno no	

	pulmão no pulmão camundongos Swiss-Webster instilados com sílica (10 mg/50 µl).....	51
Figura 16–	Efeito do tratamento com o antagonista de receptor de adenosina A2A SCH-58261 sobre a produção de quimiocinas e citocinas no pulmão de camundongos Swiss-Webster estimulados com sílica (10 mg/50 µL) (28 dias).....	52
Figura 17–	Efeito do tratamento com o antagonista de receptor de adenosina A2A SCH-58261 sobre a mecânica respiratória (parâmetro de elastância) em camundongos A2A ^{+/+} e A2A ^{-/-}	53
Figura 18–	Expressão do receptor A2A em fibroblastos pulmonares de camundongos Swiss-Webster instilados com salina e sílica (10 mg/50 µL).....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Adenosina Deaminase
ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Trifosfato de Adenosina
AK	Adenosina Quinase
α -SMA	“ α -Smooth-Muscle Actin”
A2AR	“A2A Receptor”
BSA	Bovine Serum Albumin
CD39	Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfo-Hidrolase
CD73	Ecto-5'-Nucleotidase
CNT	Transportadores de Nucleosídeos Concentrados Ligados a Cátions
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EMT	Transição Eptelial para Mesenquimal
ENT	Transportadores de Nucleosídeos
EPM	Erro Padrão da Média
GPCR	Receptor Acoplado a Proteína G
HE	Hematoxilina - Eosina
IL - (n)	“Interleukin – (n)” ou Interleucina (n)
IL-13 - PE	“Interleukin 13 Pseudomonas Exotoxin”
INF - Y	Interferon - gama
LBA	Lavado Broncoalveolar
M1	“Type 1 Macrophage Polarization ”
M2	“Type 2 Macrophage Polarization ”
MCP-1	“Monocyte Chemoattractant Protein-1”
MIP-1	“Macrophage Inflammatory Protein -1”
MMP	“Matrix Metalloproteinases”
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
PS	Picrus-Sirius
ROS	Espécie Reativas de Oxigênio
SAH	S-Adenosil-Homocisteína

SFB	Soro Fetal Bovino
Tg	Trangênicos
TGF- β	“Transforming Growth Factor beta”
TIMP	“Tissue Inhibitors of Metalloproteinases”
TNF- α	“Tumor necrosis Factor – alpha”
Th2	T Helper 2
KC	“Keratinocyte Derived Chemokine”

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
α	Alfa
β	Beta
°C	Graus Celsius
H ₂ O	Molécula da água
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
cm	Centímetro
I.P.	Intraperitoneal
L	Litro
mM	Milimolar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico
NaOH	Hidróxido de Sódio
nM	Nanômetro
rpm	Rotações por minute
μL	Microlitro
μM	Micrômetro
Kg	Kilograma
KDa	Quilodalton
qsp	Quantidade Suficiente Para

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	27
1.1	Geral	27
1.2	Específicos	27
2	MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1	Animais	29
2.2	Indução da silicose e tratamento	29
2.3	Análise da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas	30
2.4	Histologia	31
2.4.1	<u>Análise morfométrica</u>	31
2.4.2	<u>Imunohistoquímica</u>	32
2.5	Quantificação das partículas de sílica no tecido pulmonar	33
2.6	Quantificação de mediadores inflamatórios por ELISA	33
2.7	<i>Western Blotting</i>	34
2.8	Análise estatística	34
3	RESULTADOS	36
3.1	Análise da expressão do receptor de adenosina A2A no pulmão de camundongos Swiss-Webster estimulados com partículas de sílica	36
3.2	Análise morfológica e morfométrica do pulmão de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} estimulados com partículas de sílica	36
3.3	Avaliação da produção de quimiocinas e citocinas no pulmão de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} estimulados com sílica	43
3.4	Avaliação da mecânica respiratória em camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} estimulados com sílica	43
3.5	Avaliação do conteúdo de partículas de sílica nos pulmões de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} estimulados com sílica	46

3.6	Avaliação da presença de α-SMA em pulmões de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} estimulados com sílica	46
3.7	Avaliação do tratamento com o antagonista de receptor A2A sobre a resposta fibrótica no pulmão de camundongos estimulados com sílica	49
3.8	Análise da expressão do receptor A2A em fibroblastos pulmonares de camundongos Swiss-Webster	54
4	DISCUSSÃO	56
	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62

INTRODUÇÃO

O pulmão atua efetivamente no processo de trocas gasosas entre o sangue e o ar inspirado, sendo assim um órgão que está em contato íntimo com o ambiente externo e exposto à ação de vários agentes agressivos, incluindo patógenos, poluentes, antígenos e substâncias xenobióticas. Para manter a integridade necessária do fenômeno de trocas gasosas que ocorre nos alvéolos e capilares, os pulmões, durante todo o processo de evolução, desenvolveram um sistema de adaptação particular e eficaz de desintoxicação e defesa. No entanto, as estruturas alveolares são extremamente finas e, conseqüentemente, muito suscetíveis a respostas de natureza inflamatória. O resultado é a existência de uma ampla gama de doenças em grande parte associadas à inflamação aguda e seguida do desenvolvimento de um processo fisiológico de reparo associado à fibrose, acúmulo excessivo de matriz extracelular e células mesenquimatosas, ou remodelamento tecidual. Todos estes eventos juntos levam a uma alteração progressiva da arquitetura das vias aéreas, uma redução do processo de trocas gasosas, e uma subsequente queda da funcionalidade do órgão (LOPES; NORONHA; MAFORT, 2010; PUCHELLE et al., 2006).

As doenças pulmonares de caráter ocupacional e ambiental são um aspecto importante da clínica médica e compõem um grupo de disfunções denominadas como restritivas, que se caracteriza pela diminuição da expansão dos pulmões, conseqüência de um comprometimento amplo do parênquima pulmonar, refletindo assim na perda de área de trocas gasosas. Os custos econômicos associados a estas doenças são muito expressivos, quando bilhões de dólares são gastos a cada ano como compensação a trabalhadores que sofrem de doenças e lesões relacionadas ao trabalho. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a silicose é a doença ocupacional que faz o maior número de vítimas e ainda mata milhares de pessoas todo ano em todo o mundo, o que indica que em algumas áreas se está repetindo uma história muito antiga. A silicose faz parte do grupo das doenças pulmonares causadas por exposição a poeiras – as pneumoconioses. Visconti, em 1870, foi quem usou o termo *silicose* pela primeira vez, muito embora já houvesse descrição em múmias do antigo Egito e Grécia. Também Hipócrates a descreveu ao observar dificuldade respiratória nos escavadores de metal e foi

descrita no século XVI nos mineiros da Boémia e nos cortadores de pedra no século XVIII (GREENBERG; WAKSMAN; CURTIS, 2007).

Embora muitas medidas de controle de situações de risco inalatório na geração e disseminação de aerossóis nos ambiente de trabalho tenham sido implementadas, a incidência de silicose em muitos países desenvolvidos ainda é séria. Mais de um milhão de trabalhadores americanos estão expostos a poeira causadora de silicose neste século, e estima-se que mais de cinquenta mil desenvolverão a doença a cada ano. Em outros países a situação é ainda mais crítica. As estatísticas mostram que na China e na Índia existem respectivamente 100 milhões e 1,7 milhão de pessoas expostas a partículas de sílica, com uma prevalência de 30-55%. Mais recentemente, alguns relatórios indicam que 387 mil pessoas morrem todos os anos na China e que a faixa etária dessas pessoas é de 35 anos. Uma situação semelhante está presente na América Latina, onde 1,8 milhões de trabalhadores na Colômbia correm o risco de inalar pó de sílica. No Brasil existem cerca de 6,6 milhões de pessoas expostas a partículas de sílica, particularmente na região sudeste, onde a indústria de mineração (9%), pedreiras (16%), de construção (67%) e de processamento de minerais (34%) são as atividades econômicas predominantemente desenvolvidas. Nas regiões do nordeste do país, afetadas pela seca, a escavação manual de poços que atravessam camadas de rochas com alto conteúdo de quartzo, uma atividade que gera grandes quantidades de poeira em espaços reduzidos, resulta em uma prevalência de 26% de silicose, com muitos casos na condição da forma acelerada. O contraste entre as taxas de prevalência reflete diferentes condições de exposição à sílica, dependendo do grupo de trabalhadores analisados. O total de dados estatísticos e epidemiológicos sobre a silicose é muito baixo, especialmente nas microempresas e na indústria da construção, onde muitos trabalhadores não são registrados (CARNEIRO et al., 2017; LUZ et al., 2011; MARON-GUTIERREZ et al., 2008). São atividades gerais de risco a extração e o trabalho em rochas; jateamento de areia; alvenaria; fabricação de cimento; cerâmica; construção; demolição; eletrônica; fundições; trabalho com vidro; fabricação de abrasivos e tintas; mineração; construção de ferrovias; estaleiros e siderurgia (GERBER et al., 2014).

Um fato relevante a ser considerado é que apesar do arsenal terapêutico disponível atualmente, não existe um tratamento específico para a silicose, e a

remoção da fonte de exposição à sílica é uma alternativa para prevenir que a doença se agrave. O tratamento de suporte inclui medicamentos de supressão da tosse, broncodilatadores e oxigênio, se necessário.

A doença é consequência de uma repetida exposição às partículas de sílica na sua forma livre e cristalina, havendo três elementos principais para o diagnóstico de silicose. Primeiro, a história do paciente deve revelar a exposição ao pó de sílica suficiente para causar esta doença. Segundo, imagens de tórax (geralmente radiografia simples de tórax) que revelam achados consistentes com silicose, onde pode ser observada a presença de pequenos nódulos, principalmente na parte superior dos pulmões. Terceiro, não haver doenças subjacentes com maior probabilidade de causar as anormalidades. O exame físico geralmente não é o mais relevante, a menos que haja doença complicada. Além disso, os resultados do exame não são específicos para a silicose. O teste da função pulmonar pode revelar limitação do fluxo aéreo, defeitos restritivos, capacidade reduzida de difusão, defeitos mistos ou pode ser normal (especialmente quando a doença não é complicada). A maioria dos casos de silicose não requer biópsia de tecido para o diagnóstico, mas isso pode ser necessário em alguns casos, principalmente para excluir outras condições (LUZ et al., 2011).

A insuficiência respiratória resultante é uma consequência de alterações na ventilação pulmonar e nas trocas gasosas, e esta queda da função respiratória é um fator limitante para as atividades do paciente. A forma e a gravidade com a qual a silicose se manifesta dependem da concentração e tempo de exposição à sílica, sendo três as formas de silicose conhecidas: i) aguda, que se desenvolve em semanas havendo detecção com conteúdo de proteína extravasada elevado; ii) acelerada, se desenvolve em alguns anos e tem exposição a altas concentrações de sílica e iii) crônica (clássica), ocorre exposição prolongada (10 – 20 anos) e baixas concentrações de sílica. Os sintomas associados à silicose incluem tosse seca, falta de ar, perda de peso e grave dificuldade em respirar (POLLARD, 2016; TERRA FILHO; SANTOS, 2006).

O ar inalado passa através das vias aéreas superiores, da traquéia, dos brônquios e dos ramos menores, eventualmente chegando aos bronquíolos (ou vias aéreas menores). As partículas inaladas de pó são em sua maioria exaladas ou depositadas nas vias aéreas superiores, e removidas através da camada mucociliar.

Além dos bronquíolos terminais (ou respiratórios) existem aglomerados de alvéolos onde ocorrem as trocas de oxigênio e dióxido de carbono. Pequenas partículas inaladas (<10 µm diâmetro aerodinâmico) podem se depositar na área dos bronquíolos respiratórios e nos alvéolos. Nesta região as partículas de poeira são removidas pelos macrófagos, que constituem o único mecanismo de limpeza alveolar contra material particulado que tiver escapado dos filtros traqueobronquiais (**FIGURA 1**) (LOPES-PACHECO; BANDEIRA; MORALES, 2016).

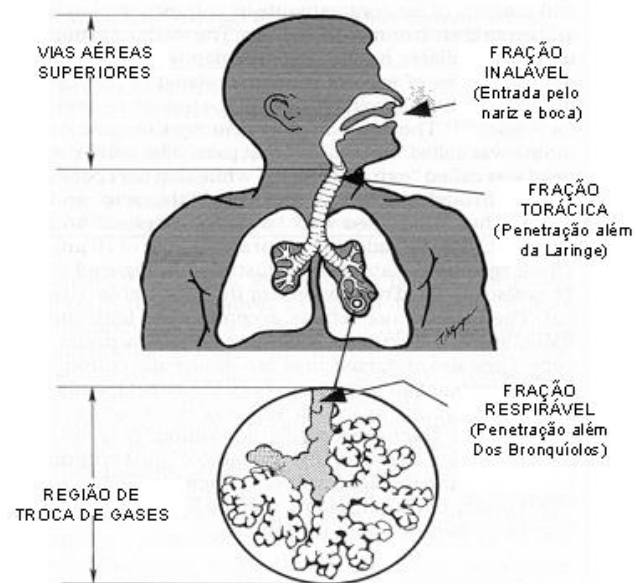


Figura 1 – Local de deposição das partículas de poeira no sistema respiratório humano.

Adaptado de Fundacentro – web site: <http://www.fundacentro.gov.br/silica-e-silicose/silica>

Os macrófagos alveolares normalmente são encontrados dentro dos alvéolos, e são as primeiras células pulmonares residentes a entrar em contato com o agente agressivo. Apresentam-se em número elevado nas vias aéreas, no interstício pulmonar e dentro dos alvéolos, constituindo assim importantes células efetoras da resposta de imunidade inata. Podem se mostrar fenotipicamente distintos, com influência direta do microambiente, com perfil clássico M1, que é citotóxico, e o alternativo M2, neste caso atuante na fase de reparo tecidual, atuando através da produção de citocinas profibróticas para induzir a proliferação e ativação de miofibroblastos secretores de colágeno. TGF-β e IL-13 são citocinas cruciais no

quadro de fibrose, promovendo a proliferação de fibroblastos, produção de componentes da matriz extracelular (colágeno I) bem como a transição epitelial para mesenquimal (EMT) (NIE et al., 2017). Os macrófagos possuem papel fundamental para a eliminação de partículas inaladas, pois atuam juntamente com as células epiteliais, através de processo químico, a partícula inalada é lipofílica ou é solúvel no fluido de revestimento epitelial; e do processo físico que compreende o fenômeno de fagocitose e posterior drenagem para os linfonodo. A participação dos macrófagos no processo de reparo tecidual é importante, já que eles têm a capacidade de secretar citocinas e fatores quimiotáticos que podem regular o acúmulo local de células mesenquimatosas (fibroblastos), além de matriz extracelular. Estas células são membros importantes da família das células macrofágicas, que existem com fenótipos heterogêneos, dependendo i) do processo de diferenciação celular, diretamente relacionado ao tipo de citocina com a qual entrou em contato e à sua interação com o estroma nos órgãos hematopoiéticos, e ii) da sua ampla distribuição nos tecidos do organismo e das suas variadas respostas a estímulos endógenos e exógenos. Os diferentes tipos de estímulos são reconhecidos através da interação com uma ampla gama de receptores conectados à membrana plasmática, o que resulta em fagocitose ou endocitose, sinalização intracelular e alterações complexas de ativação e repressão de genes (GEISSMANN et al., 2010; GORDON, 2003; LOHMANN-MATTHES; STEINMULLER; FRANKE-ULLMANN, 1994).

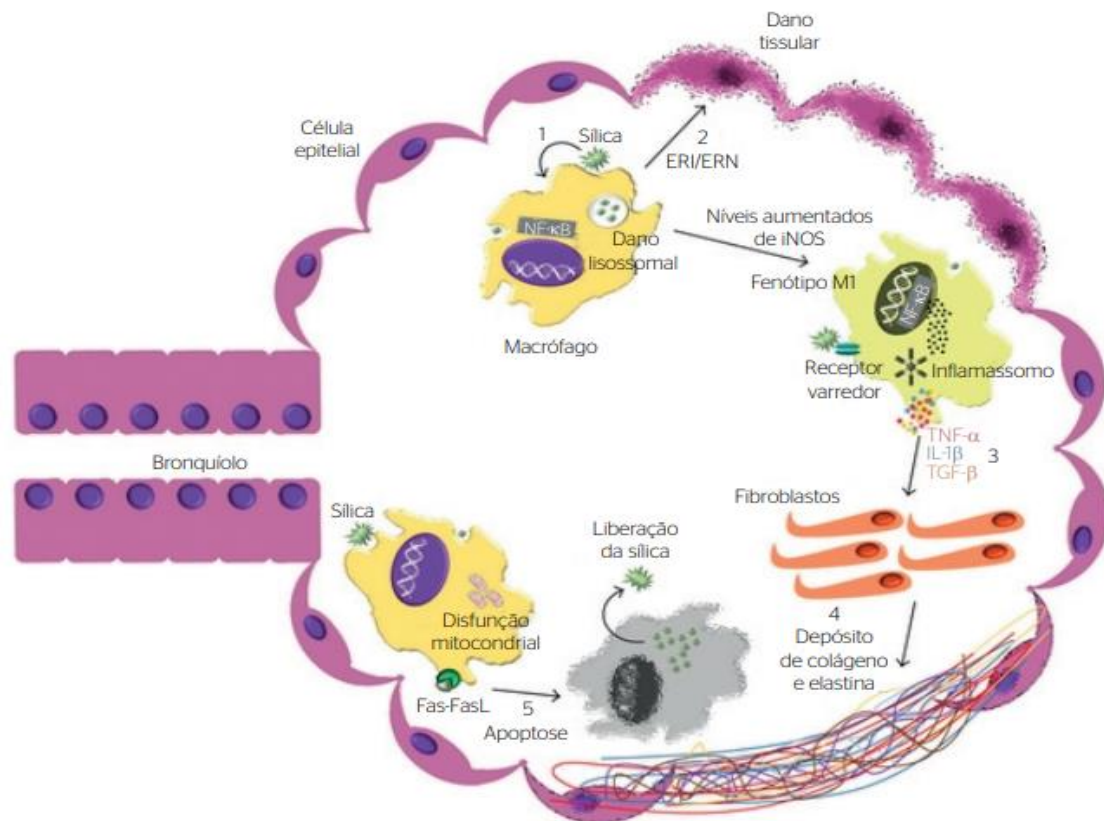
No caso da silicose, as partículas podem destruir ou alterar o metabolismo dos macrófagos pulmonares, reduzindo assim sua capacidade de defesa antibacteriana e tornando-os suscetíveis ao desenvolvimento da tuberculose pulmonar. A destruição das paredes dos alvéolos também pode exacerbar os danos causados pelo fumo, aumentando a suscetibilidade ao enfisema. Associados aos macrófagos, encontramos neutrófilos polimorfonucleares, que formam o primeiro estágio da fase aguda da resposta inflamatória, e podem ter um papel igualmente importante no processo de fibrose. A resposta de fibrose pulmonar é tradicionalmente vista como um fenômeno que ocorre após uma resposta inflamatória aguda, embora até o momento não existam evidências clínicas que provem a real existência de uma relação direta entre parâmetros inflamatórios e a evolução da doença. No entanto, a literatura especializada já descreveu que a fibrose tecidual inicia sua amplificação a partir de uma lesão inicial e age modulando

o fenômeno de reparo tecidual, tanto no sentido do acúmulo de células mesenquimatosas quanto da síntese de componentes da matriz extracelular (THANNICKAL et al., 2004). Isto levou alguns grupos de pesquisadores a concentrar seus estudos na expressão de alguns componentes da matriz extracelular e em moléculas normalmente envolvidas na regulação da homeostase. No caso particular da matriz extracelular, existem evidências de que a sua manutenção é um processo dinâmico, envolvendo a síntese de proteínas como fibrilas de colágeno, fibronectina e proteoglicanas, sempre equilibradas através de uma proporção equivalente de proteólise (HUAUX, 2007; NARDI et al., 2018). No caso dos reguladores, também vem sendo enfatizada uma certa classe de proteases: as metaloproteinases (MMPs), cuja ação enzimática é regulada por uma família de inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs). Alguns estudos demonstram que durante um processo de desregulação do processo homeostático é possível observar a formação de fibrose tecidual, correspondendo ao fenômeno de reparo excessivo, dando origem a importantes alterações funcionais (BAUM; DUFFY, 2011; DARBY et al., 2014; PHAN, 2008). Como elementos cruciais no processo de reparo tecidual têm destaque os fibroblastos, que são as células principais do tecido conjuntivo e cuja função é a produção de componentes da matriz extracelular, com predomínio do colágeno, bem como produção de fatores reguladores da resposta de fibrose.

A exposição ocupacional às partículas de sílica leva à produção de um grupo extenso de mediadores inflamatórios e fibróticos que estão implicados no desenvolvimento de lesão fibrótica. Vários fatores, incluindo radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (RNS), TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IFN, participam especialmente da reação inflamatória, enquanto TNF, TGF e IL-4 parecem estar implicados em processos fibróticos. Entre as citocinas, o TNF desempenha papel importante na inflamação, controlando outras citocinas como IL-1, IL-4, IL-6 e IL-8, enquanto a IL-6 regula a fibrose, modulando a expressão de citocinas Th2 (**FIGURA 2**). Embora a resposta imune do tipo 2 facilite o reparo fisiológico do tecido, quando desregulado, este processo pode contribuir para o desenvolvimento de fibrose, o que pode constituir um dos principais fatores associados a doenças fibroproliferativas (BORTHWICK; WYNN, 2015). Neste contexto, merece destaque a citocina IL-13, que é um produto pleiotrópico de 12 kDa de um gene no cromossomo 5 em q31 que é produzido em grandes quantidades

pelas células Th2. Um grande número de estudos demonstrou que a IL-13 é superproduzida na asma e implicou a IL-13 na patogênese da inflamação Th2 e no remodelamento das vias aéreas, incluindo-se também processos de fibrose hepática e fibrose pulmonar (BLACKBURN et al., 2003).

De forma interessante, em estudos de nosso laboratório demonstramos que a IL-13 encontra-se em níveis elevados no tecido pulmonar de camundongos silicóticos, demonstrando clara associação com a progressão da doença (FERREIRA, 2012). Através da utilização de uma ferramenta biológica original – IL13-PE – uma molécula quimérica (imunotoxina) derivada da fusão da proteína humana IL-13 e uma forma mutada da exotoxina de *Pseudomonas*, verificamos que tratamento terapêutico com IL13-PE reverteu o comprometimento da função pulmonar assim como a resposta fibrótica granulomatosa, o que nos foi indicativo de ser a IL-13 um alvo importante no contexto da silicose experimental. Além disso, evidências da literatura apontaram que o importante efeito da IL-13 na patogênese de algumas doenças poderia estar associada à adenosina, propondo uma regulação mútua em situações fisiopatológicas, incluindo aquelas que afetam o trato respiratório. Camundongos que super expressam IL-13 mostraram níveis aumentados de adenosina nos pulmões em associação com redução nos níveis da enzima responsável por sua degradação (BLACKBURN et al., 2003).



Fonte: Lopes-Pacheco et al.⁹.

Figura 2: Representação da fisiopatologia da silicose. Adaptado de LOPES-PACHECO; BANDEIRA; MORALES, (2016).

A adenosina é uma molécula endógena (nucleosídeo) gerado pelo catabolismo de ATP tanto em condições fisiológicas como em locais de estresse e lesão, incluindo inflamação e remodelamento tecidual. A adenosina medeia seus efeitos principalmente por meio da interação com quatro receptores acoplados à proteína G (GPCR), assim denominados de A1, A2A, A2B e A3, que são expressos em várias células e tecidos em todo o organismo. Em condições fisiológicas normais, os níveis extracelulares de adenosina estão entre 20 e 300 nM, podendo aumentar de forma expressiva (30 μ M) em condições patológicas. O principal mecanismo responsável pela geração extracelular de adenosina é a desfosforilação de seus precursores: ATP, ADP e AMP. Estes são liberados por vários tipos de células sob condições de estresse celular, através de enzimas hidrolizantes específicas denominadas ectonucleosídeo trifosfato difosfo-hidrolase (CD39) e ecto-5'-nucleotidase (CD73) (LIU et al., 2019). No entanto, em condições fisiológicas, a

adenosina é originada principalmente intracelularmente a partir da hidrólise de AMP e S-adenosil-homocisteína (SAH) através da endo-5'-nucleotidase e SAH hidrolase, respectivamente (FLINN; GENNERY, 2018). Uma vez gerada, a adenosina extracelular é capturada intracelularmente através da família de transportadores de nucleosídeos concentrados ligados a cátions (CNTs) e da família de transportadores de nucleosídeos (ENTs), que permitem a passagem livre de adenosina através da membrana. A direção da captação ou liberação de adenosina pelas células é determinada pela diferença de concentração através da membrana (AHERNE et al., 2018; LE et al., 2019). Após a captação intracelular, a adenosina sofre desaminação da inosina pela adenosina desaminase (ADA) ou fosforilação do AMP através da adenosina quinase (AK), dando à adenosina uma meia-vida fisiológica <1 s (ANTONIOLI et al., 2007; DELLA LATTA et al., 2013).

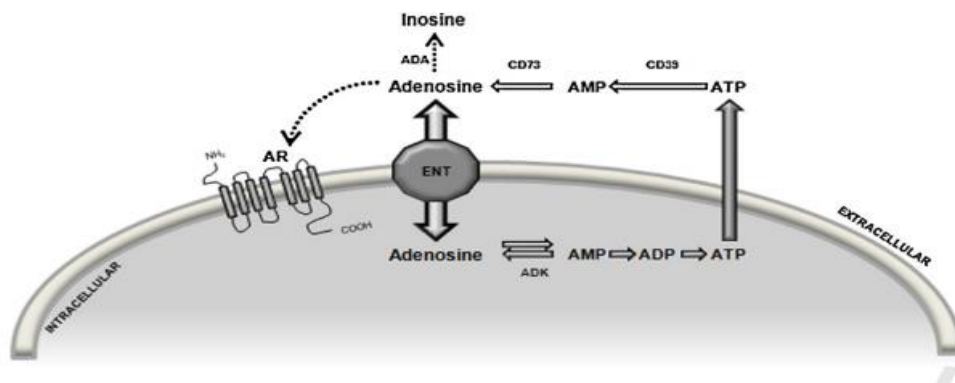


Figura 3: Metabolismo da adenosina. Adaptado de DELLA LATTA et al. (2013).

Níveis elevados de adenosina são encontrados no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com asma e a adenosina regula a função de vários tipos de células centrais para esse distúrbio, incluindo mastócitos, eosinófilos, macrófagos, células epiteliais e células musculares lisas. A exposição à aerossol adenosina induz broncoespasmo em pacientes com asma e DPOC, mas não em controles normais. Além disso, estudos recentes demonstraram que camundongos com uma mutação nula da adenosina desaminase (ADA) (a enzima que degrada a adenosina) apresentam níveis elevados de adenosina tecidual que gera um fenótipo semelhante de maneira importante às respostas da asma, DPOC e os distúrbios intersticiais. Quando vistos em conjunto, esses estudos sugerem fortemente que a adenosina

desempenha um papel importante na patogênese desses distúrbios (MOHSENIN et al., 2007).

Camundongos deficientes em ADA acumulam adenosina em vários tecidos, incluindo o pulmão, onde a adenosina contribui para o desenvolvimento de inflamação e fibrose (FARAHMAND et al., 2016; LE et al., 2019). A adenosina extracelular tem sido associada à progressão de várias doenças crônicas, incluindo aquelas nas quais a fibrose é um componente importante. Alguns estudos relatam que camundongos deficientes em ADA exibem elevações progressivas e crônicas nos níveis de adenosina devido à ausência da enzima envolvida em sua degradação. Os animais geneticamente deficientes da ADA desenvolvem espontaneamente fibrose em muitos órgãos, incluindo o pulmão (KARMOUTY-QUINTANA et al., 2018).

Blackburn e colaboradores relataram que a inflamação progressiva, remodelamento e fibrose pulmonar induzidas em animais transgênicos para a IL-13 são associados a aumento progressivo e proporcional nos níveis de adenosina tecidual e no aumento da expressão dos receptores da adenosina. A administração exógena de ADA reduziu os níveis de adenosina tecidual, inibindo a inflamação, o remodelamento alveolar, fibrose pulmonar e secreção de muco, tendo como consequência índices mais elevados de sobrevivência. Foi, também, demonstrado que níveis elevados de adenosina estimulam a produção da IL-13, destacando a capacidade da IL-13 e adenosina para regularem-se mutuamente, indicando que a sinalização da adenosina pode contribuir e influenciar a natureza e gravidade das doenças pulmonares induzidas por IL-13 (BLACKBURN et al., 2003).

Muitos dos efeitos anti-inflamatórios da adenosina foram atribuídos ao receptor A2A, que se apresenta como um dos primeiros sensores de concentrações elevadas de adenosina (LAFLAMME; MAILHOT; POULIOT, 2017). O receptor A2A é do tipo metabotrópico clássico, acoplado à proteína G ativadora da enzima adenilato ciclase, resultando no acúmulo de AMPc quando ativada. Há evidências de que a ativação deste receptor resulta em supressão da inflamação e promove a proteção tecidual (MOHSENIN et al., 2007). Evidências demonstram que o bloqueio do receptor A2A pode inibir fenômenos como fagocitose, adesão de neutrófilos às células endoteliais e geração de ERO (LAFLAMME; MAILHOT; POULIOT, 2017).

Estudos realizados *in vitro* em nosso laboratório demonstraram que ocorreu um aumento da taxa de proliferação e produção de MCP-1 por fibroblastos que foram estimuladas com adenosina, sendo estes sensíveis ao tratamento com antagonista seletivo do receptor A2A (ZM 241385). Observou-se também que houve um aumento de proliferação de fibroblastos que foram estimulados com IL-13 (sendo este sensível ao antagonista do receptor A2A). Estes dados demonstram que existe uma ação prófibrótica da adenosina em relação à IL-13 quando ligado ao receptor A2A.

Existem achados que demonstram que a sinalização de adenosina pode contribuir e influenciar a natureza e gravidade das patologias pulmonares induzidas por IL-13. Foi descrito também a possível amplificação de adenosina - IL-13 que pode contribuir para a severidade, progressão, conseqüências e cronicidade da mediação de IL-13 e Th2 em doenças e diferentes distúrbios (BLACKBURN et al., 2003).

1 OBJETIVOS

1.1. Geral

Considerando evidências de literatura acerca do envolvimento da adenosina em processos inflamatórios e de fibrose tecidual, neste estudo objetivamos investigar o papel da adenosina na resposta pulmonar causada por instilação de partículas de sílica em camundongos, com foco no receptor A2A. Foram utilizadas, para tanto, a ferramenta farmacológica mediante tratamento com o antagonista seletivo de receptor A2A (SCH58261) e biológica através de animais deficientes para o receptor A2A.

1.2. Específicos

- a) Avaliar a expressão do receptor A2A no pulmão de camundongos 7 e 28 dias após estimulação com partículas de sílica;
- b) Avaliar a morfologia e morfometria do tecido pulmonar de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} 28 dias após a estimulação com partículas de sílica;
- c) Avaliar o conteúdo de colágeno depositado no tecido pulmonar de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} 28 dias após a estimulação com partículas de sílica;
- d) Avaliar os níveis de IL-13 no tecido pulmonar de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} 28 dias após a estimulação com partículas de sílica;
- e) Avaliar o conteúdo de células positivas para a alfa-actina de músculo liso (alfa-SMA) no tecido pulmonar de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} 28 dias após a estimulação com partículas de sílica;

- f) Avaliar a função pulmonar e a hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} 28 dias após a estimulação com as partículas de sílica;
- g) Avaliar o conteúdo de partículas de sílica presentes no tecido pulmonar de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} 28 dias após a estimulação com partículas de sílica;
- h) Avaliar a expressão do receptor A2A e produção de colágeno em fibroblastos pulmonares *in vitro*;
- i) Avaliar o efeito do tratamento com o antagonista de receptor A2A SCH58261 sobre a morfologia e morfometria do tecido pulmonar de camundongos 28 dias após a estimulação com partículas de sílica;
- j) Avaliar o efeito do tratamento com o antagonista de receptor A2A SCH58261 sobre a função pulmonar de camundongos 28 dias após a estimulação com partículas de sílica;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss-Webster machos, de 3 a 4 semanas, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP, São Paulo. Os animais Balb/c ($A2A^{+/+}$) e nocautes para o gene codificante para o receptor A2A ($A2A^{-/-}$) foram provenientes do Centro de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto (FMUSP-RP), São Paulo. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA), licença LW 57/14 e L001/19. Os animais foram mantidos sob a temperatura 22 – 25°C tendo como ciclo de 12 horas de claro/ 12 horas de escuro e livre acesso à água e ração.

2.2. Indução da silicose e tratamento

Os animais foram anestesiados com isoflurano 0,4% (Cristália, Itapira, SP), sob um fluxo de O₂ a 0,5 L/min e foram submetidos à instilação intranasal com 50 µL de uma suspensão contendo as partículas de sílica (10 mg) (0,5 - 10 µm, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) dissolvidas em salina (0,9 % de NaCl) estéril. Os animais controles receberam igual volume de salina. As análises foram realizadas 7 e 28 dias após a instilação com sílica.

Os animais foram tratados de forma terapêutica com o antagonista de receptor A2A, SCH 58261 (Sigma), na dose de 0,1 mg/kg (i.p.), durante 7 dias consecutivos, iniciados 21 dias após a instilação da sílica. As análises foram realizadas 1 dia após a administração da última dose.

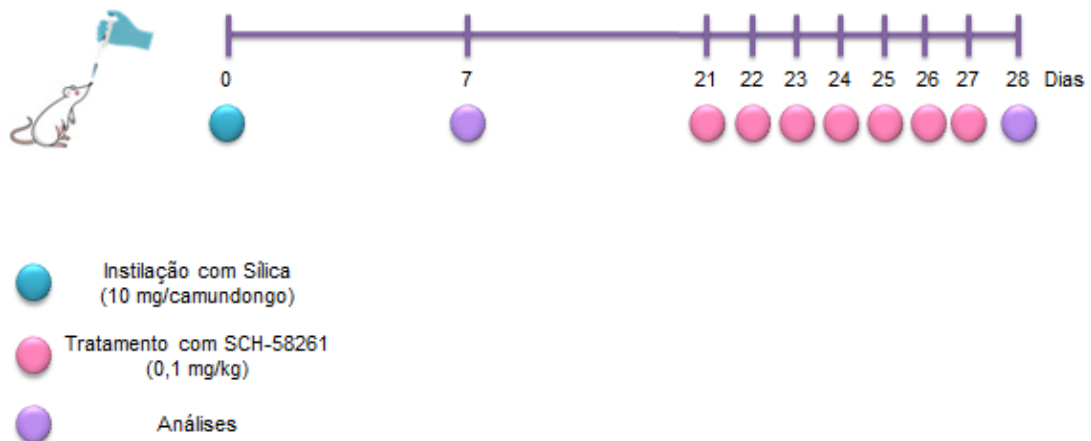


Figura 4: Esquema do processo de instilação intranasal de sílica (10mg), tratamentos e tempos de análise.

2.3. Análise da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas

O parâmetro de elastância (mL/cm H₂O) referentes à avaliação da função pulmonar foram mensurados em pletismógrafo barométrico de corpo inteiro invasivo (Buxco Fine Pointe Mouse RC Site, DSI, EUA). Para tanto os camundongos foram anestesiados com Nembutal (Pentobarbital) (60 mg/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 esofágiana. 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 broncoconstritor colinérgico metacolina (3 - 27 mg/mL), sendo em seguida feita a medida da função pulmonar por um período de 5 minutos. Os valores de elastância foram registrados e avaliados no Software Buxco Biosystem XA.

2.4. Histologia

Após a avaliação da função pulmonar, os animais foram mortos mediante injeção de pentobarbital (250 mg/kg), exsangüinados através de um corte na veia cava abdominal e o pulmão perfundido com solução de salina (NaCl 0,9%) através da inserção de um escalpe no coração (ventrículo direito). Para a análise histológica, o pulmão esquerdo foi infundido com 1 mL de solução Milloning (155 mM NaH₂PO₄; 105mM NaOH; Formol 10%, q.s.p. H₂O destilada 1 L) sendo mantido imerso em igual solução por no mínimo 48 horas antes do processamento. 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 etapa de 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 Picro-sirius para posteriores análise de deposição de colágeno e imunohistoquímica. O pulmão direito foi retirado, congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C para posteriores análises.

2.4.1. Análise morfométrica

A análise morfométrica foi realizada mediante o uso do escâner de lâminas histológicas 3DHISTECH – Panoramic MIDI e com auxílio do software Panoramic Viewer, no qual de fato foram realizadas as análises.

‘No software Panoramic Viewer, o procedimento foi iniciado através da ferramenta de anotação a mão livre que possibilitou que toda a área do pulmão fosse delimitada, tendo a finalização da demarcação salvando/identificando cada pulmão. Além da delimitação da área total dos pulmões, foi feita também delimitação da área de granuloma, vias aéreas e vasos de grande tamanho foram excluídos da análise se no momento da delimitação as mesmas excedem a área visualizada no aumento de 20x. Após todas as delimitações os valores do perímetro (µ) e área (µ²) referentes as áreas demarcadas foram exportadas para planilha do Excel. O cálculo utilizado teve como base uma regra simples percentual, partindo do princípio que a

área total do pulmão total equivale a cem por cento (100%) e a área ocupada por granuloma a incógnita ser descoberta em porcentagem:

$$\begin{array}{l} \text{Área total do pulmão} \text{ _____ } 100\% \\ \text{Área ocupada por granuloma} \text{ _____ } X\% \end{array}$$

Obtivemos assim a relação da área ocupada por granuloma em relação à área a área total do pulmão.

2.4.2. Imunohistoquímica

Os cortes de tecido pulmonar foram fixados sobre lâminas histológicas, previamente filmadas com poli-L-lisina, sendo posteriormente submetidos à desparafinização em xilol e à hidratação em sucessivos banhos em concentrações decrescentes de etanol (100% a 70%). Em seguida, foi realizada a reconstituição antigênica através de incubação das amostras em tampão citrato por 15 minutos previamente aquecido entre 95° à 99° C. Seguiram-se, então, sucessivas lavagens com PBS 1x (pH 7,4) e bloqueio da peroxidase endógena, através da incubação com H₂O₂ a 3% em metanol por 15 - 20 minutos. Posteriormente, foi adicionada uma solução de PBS + BSA 2% + 2% NGS, por 2 horas, para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, os cortes foram incubados “overnight” com o anticorpo primário (Anti-A2A - (cat: ab3461) – ABCAM; Anti-alphaSMA - (cat: A2547) – SIGMA) à 4°C. Posteriormente os cortes foram submetidos a sucessivas lavagens com PBS 1x e, em seguida, incubados à temperatura ambiente por 2 horas com os respectivos anticorpos secundário (Anti-rabbit - (cat: HAF008) - R&D; Anti-mouse - (cat:HAF007) - R&D). As amostras foram novamente lavadas e a revelação feita com 3- amino-9-etilcarbazol (AEC) entre 10 a 20 minutos, seguindo-se a contra-coloração com hematoxilina de Mayer por 1 minuto. As lâminas foram montadas utilizando meio aquoso contendo gelatina. As imagens foram capturadas com o auxílio do “software” de análise (Q Capture) (versão 3.1) e as análises realizadas pela quantificação do número de “pixel”, com a cor desejada sendo definida no sistema

pelo software Image-Pro plus (Media Cybernetics) e o resultado expresso por pixel/ μm^2 .

2.5. Quantificação das partículas de sílica no tecido pulmonar

Para realização da análise da presença de colágeno e de partículas de sílica, os cortes que foram submetidos à coloração de picrus-sirius foram observados no microscópio de polarização. O mesmo disponibiliza de dois objetos para análise que são chamados de polarizador e analisador. O filtro polarizador está localizado entre a fonte de luz e o condensador e é responsável por promover um plano de direção de ondas luminosas, ou seja, um plano de luz polarizada que é responsável por promover uma dupla refração promovendo um brilho colorido. Enquanto que o filtro analisador se encontra entre a objetiva e a ocular.

2.6. Quantificação de mediadores inflamatórios por ELISA

As amostras foram homoganeizadas em uma solução de lise (PBS 1x, Triton 100-X 0,1%; Complete®) 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_3BO_4 0,5M e NaOH 1N; pH 7,4) pelo período de incubação de 12 horas à 4°C. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes (200 μL /poço) com tampão 1 (timerosal, KPO_4 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 à 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 biotilado (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sendo mantida a incubação por 1 hora à 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 (200 μL /poço), foi feita a adição do substrato (K-Blue®) (100

$\mu\text{L/poço}$) para o desenvolvimento da reação colorimétrica (aproximadamente 5 a 30 minutos), que foi interrompida após acréscimo de 100 $\mu\text{L/poço}$ de H_2SO_4 (0,19 M). A análise espectrofotométrica foi realizada em leitora de placa no comprimento de onda de 450 nm.

2.7. Western Blotting

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 bincincronico, na proporção 1:50 às amostras. A incubação foi feita por 30 minutos à 37°C (ou 60° por 15 minutos, mantendo-se ao abrigo de luz) e realizada a leitura em espectrofotômetro à 540 nm. Para a técnica de eletroforese foi utilizado o gel de poliacrilamida (12%) ao qual foram adicionadas as amostras, posteriormente submetidas a uma diferença de potencial de 80 V. Em seguida, as proteínas foram separadas através do peso molecular e foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que foi bloqueada com BSA 5% por 1 hora e incubada com o anticorpo primário (Anti-A2A - (cat: ab3461) – ABCAM) “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 (Anti-rabbit - (cat: HAF008) - R&D) 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 (1.43 v). O valor de densidade da banda foi dividido pelo valor da respectiva banda, sendo o resultado expresso em unidades arbitrárias.

2.8. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de Newman-Keuls-Student. Para

comparação entre dois grupos experimentais foi utilizado o teste t de Student para amostras não pareadas. Para ambos os testes os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

3.1 Análise da expressão do receptor de adenosina A2A no pulmão de camundongos Swiss-Webster estimulados com partículas de sílica

Analizamos a expressão do receptor A2A na condição de exposição à sílica (10 mg) por 7 ou 28 dias. Podemos observar que os pulmões controles negativos (instilados com salina) mantiveram sua integridade. Através da técnica de imunohistoquímica e visualização do tecido em microscópio de luz (aumento 10 vezes nos painéis superiores e de 20 vezes nos inferiores), verificamos a ausência de marcação positiva para o receptor A2A no pulmão dos animais controles (Figuras 5A e 5B, respectivamente). No caso dos animais instilados com sílica, podemos observar marcação positiva para o receptor A2A, de forma tênue em 7 dias (Figuras 5C e 5D) e intensa em 28 dias após a estimulação com sílica (Figuras 5E e 5F).

3.2 Análise morfológica e morfométrica do pulmão de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} estimulados com partículas de sílica

Como próximo passo, realizamos a análise morfológica do tecido dos pulmões utilizando a coloração de HE. Esta análise foi feita nos pulmões de camundongos que foram instilados com partículas de sílica, 7 dias ou 28 dias após a estimulação. Foi possível visualizar a parênquima pulmonar em condição preservada e sem indício de inflamação nos animais A2A^{+/+} e A2A^{-/-} (Figuras 6A e 6C, respectivamente). No entanto, analisando a fase inicial (7 dias), verificamos que os camundongos instilados com sílica apresentaram área fibrótica extensa com presença de granulomas (Figura 6B), entretanto os camundongos A2A^{-/-} apresentaram ter uma diminuição da área de granulomas e fibrose (Figura 6D). A análise morfométrica confirmou as observações prévias (Figura 6E). Através de cortes histológicos e coloração de Picrus-Sirius, que identifica fibras colágenas no tecido, identificamos presença basal, dentro da normalidade, no tecido pulmonar em ambos os grupo controles negativos (Figuras 7A e 7C), enquanto que na condição de estimulação com a sílica, os animais A2A^{+/+} apresentaram expressiva deposição de colágeno no parênquima pulmonar (Figura 7B), enquanto que os camundongos

A2A^{-/-} apresentaram menor deposição de colágeno (Figura 7D). A análise quantitativa confirmou as observações prévias (Figura 7E).

Em seguida, analisamos a fase mais tardia (28 dias) e observamos que os pulmões de ambos os grupos controles se mostraram inalterados em sua condição basal (Figuras 8A e 8C), porém o grupo de camundongos A2A^{+/+} estimulado com sílica apresentou área extensa de fibrose granulomatosa (Figura 8B). Os camundongos A2A^{-/-} apresentaram significativa diminuição da área de granuloma (Figura 8D). A análise morfométrica confirmou as observações prévias (Figura 8E). A identificação das fibras colágenas através da utilização de Picrus sirius revelou condição de normalidade nos grupos controles negativos (Figuras 9A e 9C), enquanto que os animais A2A^{+/+} mostraram extensa área com deposição de colágeno (Figura 9B), entretanto nos camundongos A2A^{-/-} vimos uma menor área de deposição de colágeno (Figura 9D). A análise quantitativa confirmou as observações prévias (Figura 9E).

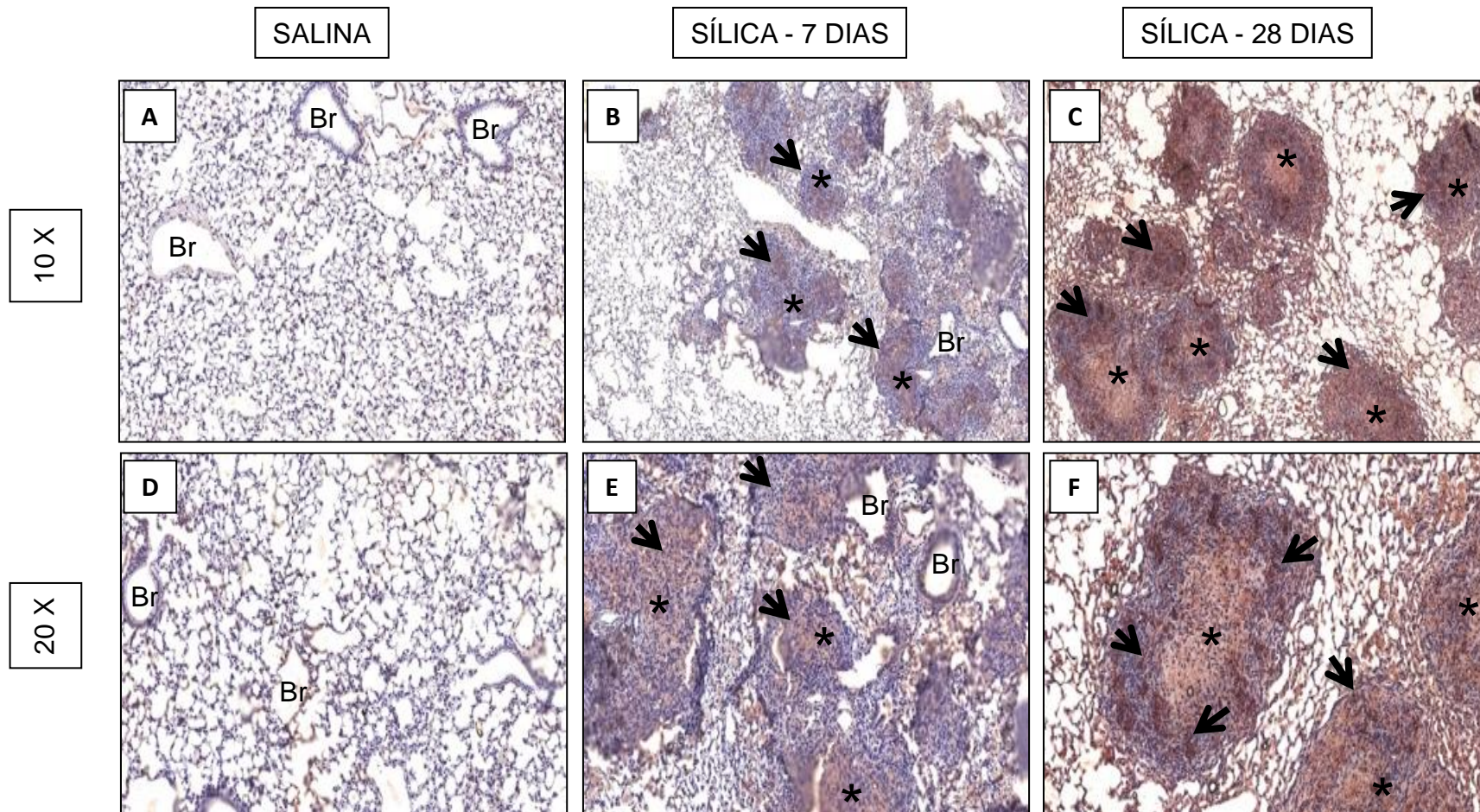


Figura 5 - Expressão do receptor de adenosina A2A no pulmão de camundongos Swiss-Webster. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A, D) e sílica (10 mg/50 μ L) (7 dias) (B, E) e (28 dias) (C F). Foi utilizada técnica de imunohistoquímica e coloração com HE. Imagens representativas de 6 animais. Aumento 100 x (painéis superiores) e 200 x (painéis inferiores); Br = bronquíolos; * = granuloma; Setas = marcação positiva para receptor A2A .

Fonte: Andrade, Thamiris; 2019

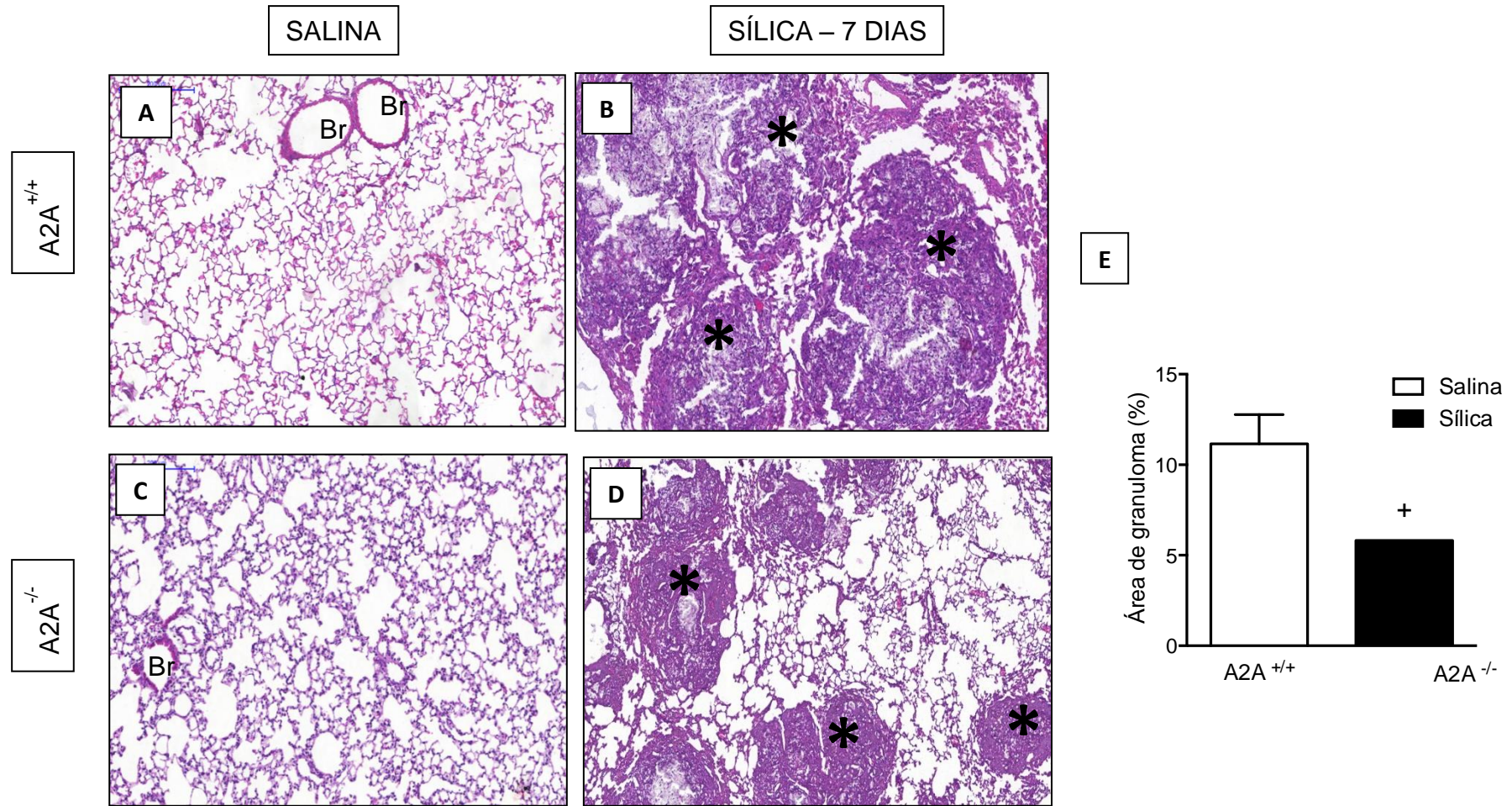


Figura 6– Avaliação morfológica do pulmão de camundongos $A2A^{+/+}$ e $A2A^{-/-}$. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A, C) e sílica (10 mg/50 μ L) (B, D). Quantitativo da área de parênquima pulmonar ocupada por granulomas (E). As análises foram realizadas 7 dias pós estimulação com a sílica. Coloração por HE. Aumento = 100 x; Br = bronquíolos; * = granuloma. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado ao grupo $A2A^{+/+}$ estimulado com sílica. Fonte: Andrade, Thamiris; 2019

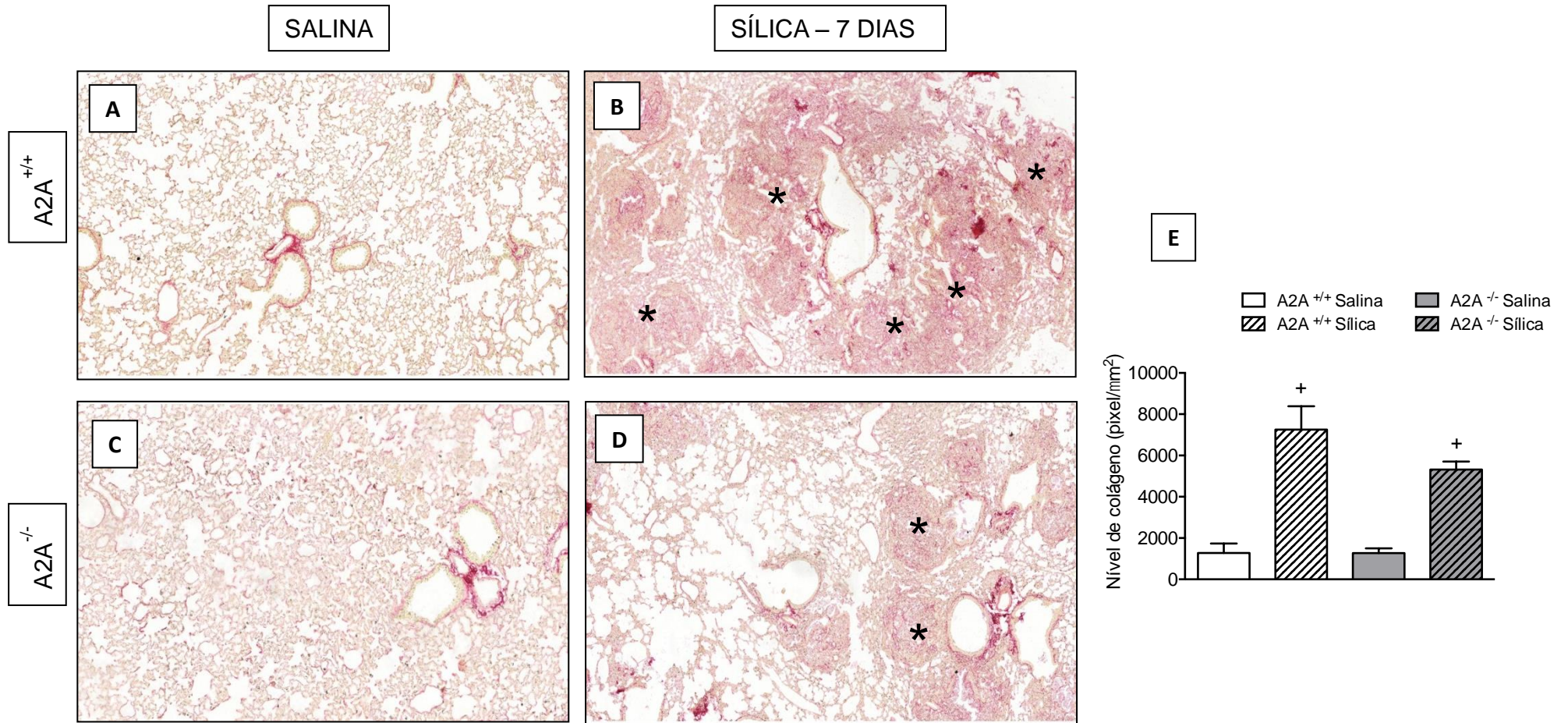


Figura 7 – Avaliação da deposição de colágeno no pulmão de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-}. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A, C) e sílica (10 mg/50 µL) (B, D). Quantitativo da deposição de fibras colágenas (E). As análises foram realizadas 7 dias pós estimulação com a sílica. Coloração por Picrus sirius. Aumento = 100 x; Br = bronquíolos; * = granuloma; Aumento 100 x. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo. + p<0,05 comparado grupo A2A^{+/+} estimulado com sílica.

Fonte: Andrade, Thamiris; 2019

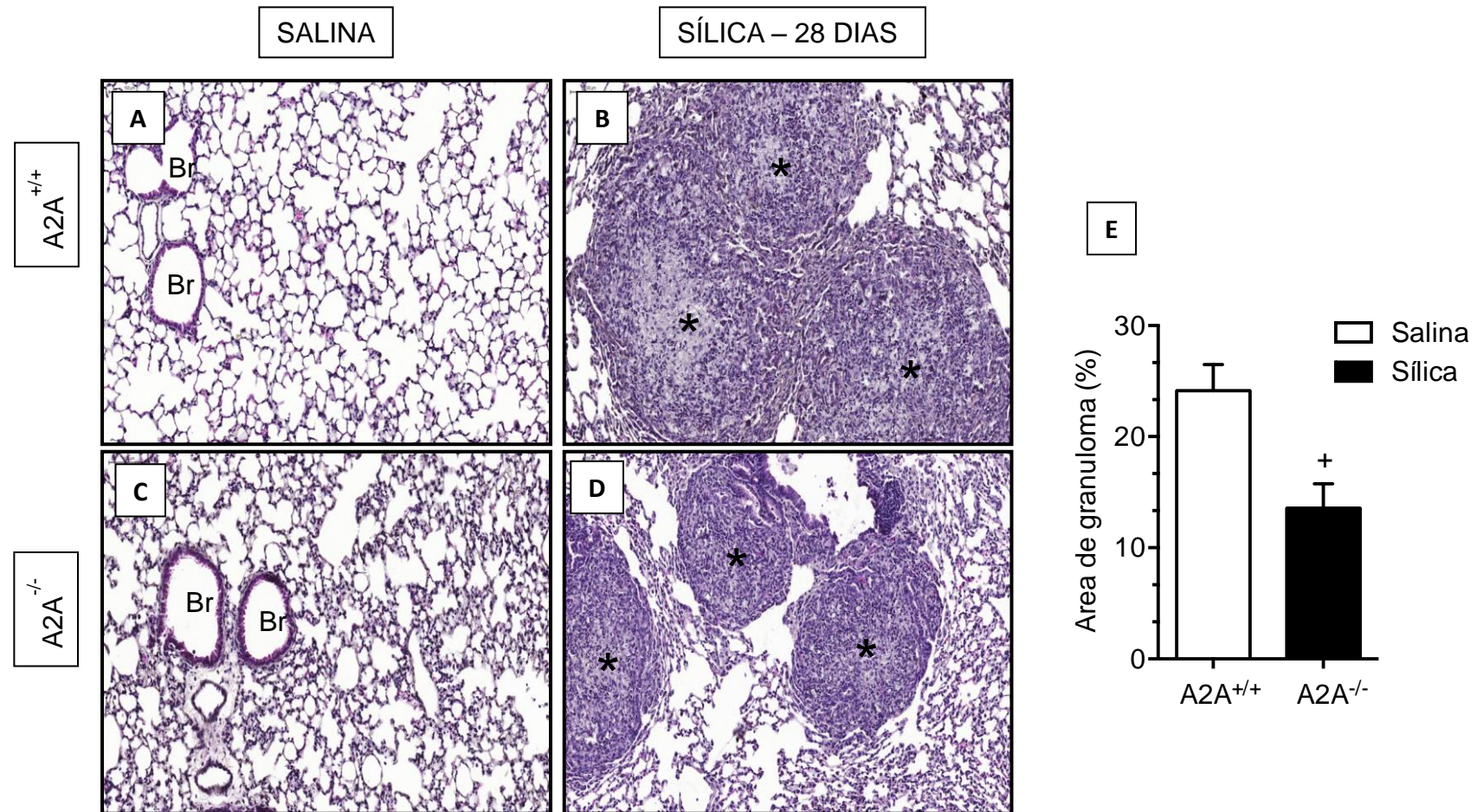


Figura 8 – Avaliação morfológica do pulmão de camundongos $A2A^{+/+}$ e $A2A^{-/-}$. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A, C) e sílica (10 mg/50 μ L) (B, D). Quantitativo da área de parênquima pulmonar ocupada por granulomas (E). As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com sílica. Coloração por HE. Aumento = 100 x; Br = bronquíolos; * = granuloma. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado ao grupo $A2A^{+/+}$ estimulado com sílica.

Fonte: Andrade, Thamiris; 2019

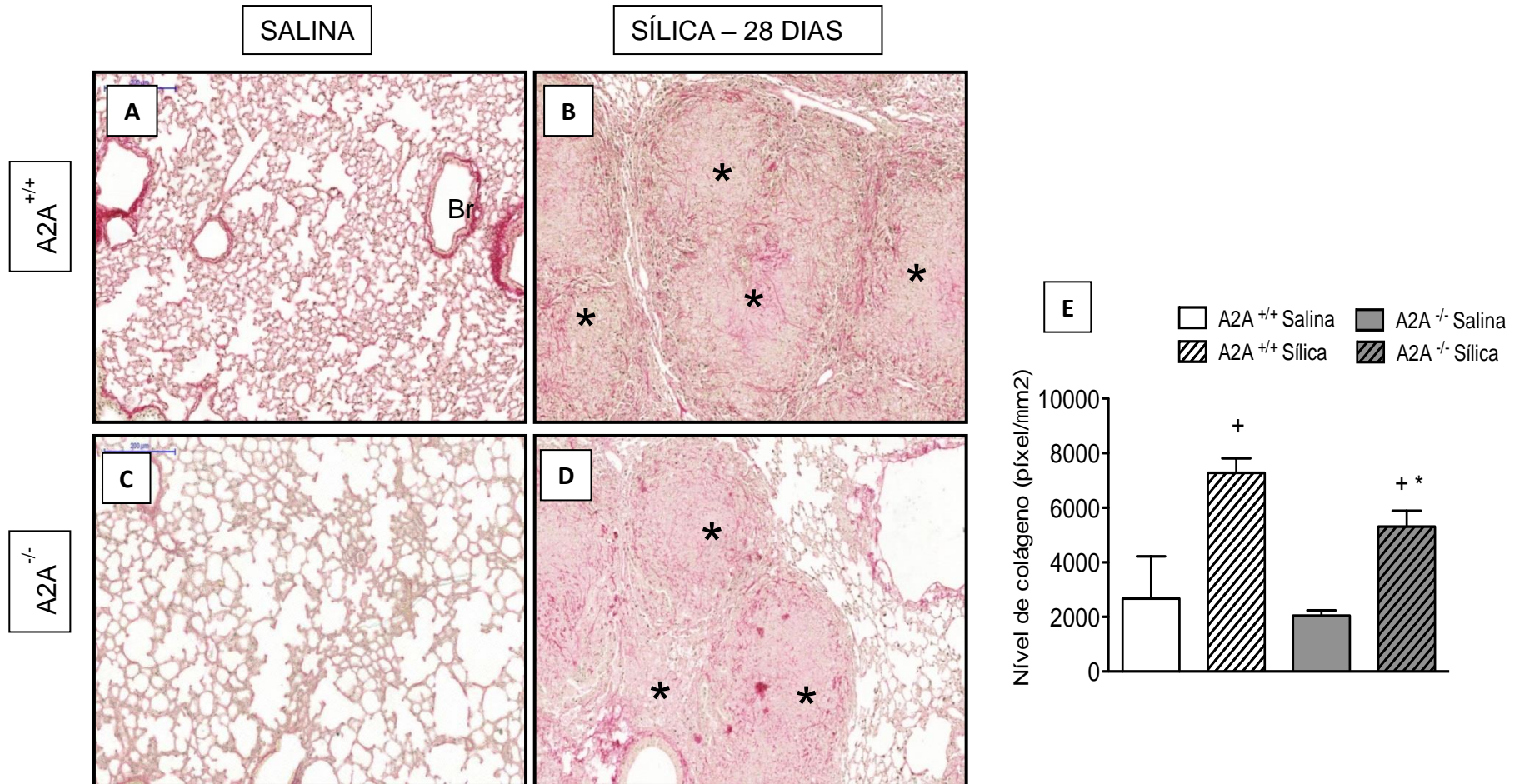


Figura 9 – Avaliação da deposição de colágeno no pulmão de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-}. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A, C) e sílica (10 mg/50 µL) (B, D). Quantitativo da deposição de fibras colágenas no parênquima pulmonar (E). As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com a sílica. Coloração por Picrus sirius. Aumento = 100 x; Br = bronquíolos; * = granuloma. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo. + p<0,05 comparado ao respectivo grupo controle estimulado com salina; *p<0,05 comparado ao grupo A2A^{+/+} estimulado com sílica.

Fonte: Andrade, Thamiris; 2019

3.3 Avaliação da produção de quimiocinas e citocinas no pulmão de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} estimulados com sílica

Em uma próxima etapa passamos para analisar a produção de quimiocinas importantes no recrutamento leucocitário no contexto da silicose. Constatamos que houve um aumento na produção das quimiocinas KC, MIP-1 α e MCP-1 (Figuras 10A, 10B e 10C, respectivamente), quando comparado aos seus respectivos controles. Notamos uma redução significativa nos níveis de MIP-1 α no grupo A2A^{-/-} sílica em comparação aos animais A2A^{+/+} estimulados com sílica. A produção de citocinas relevantes no processo silicótico, IL-6, TNF- α e IL-13, apresentou-se elevada em ambos os grupos de animais silicóticos quando comparados aos seus respectivos controles (Figuras 10D, 10E e 10F, respectivamente). O grupo silicótico nocaute do receptor A2A não apresentou diferença na produção de IL-6 (Figura 10D) e TNF- α (Figura 10E), enquanto níveis menores de IL-13 foram detectados no pulmão de camundongos A2A^{-/-} silicóticos (Figura 10F).

3.4 Avaliação da mecânica respiratória em camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} estimulados com sílica

Através do sistema de pletismografia invasiva de corpo inteiro, avaliamos a mecânica respiratória com foco na elastância – fenômeno inverso à complacência, que mede a capacidade de distensibilidade do pulmão. Como ilustrado na Figura 11, verificamos presença de aumento nos nível basal de elastância nos animais A2A^{+/+} estimulados com sílica. O mesmo não foi verificado no caso dos animais A2A^{-/-}, uma vez que os controles negativos apresentaram níveis basais de elastância aumentados em comparação àqueles verificados no grupo A2A^{+/+} controle. Na condição de aerolização com concentrações crescentes do agente broncoconstritor colinérgico metacolina (3 - 81 mg/mL) notamos uma exacerbação da resposta de elastância pulmonar nos animais A2A^{+/+} silicóticos em comparação àquela detectada nos animais aerolizados com mesmo volume de PBS (Figura 11). Os camundongos A2A^{-/-} silicóticos mostraram significativa redução do aumento nos níveis de elastância pulmonar (Figura 11).

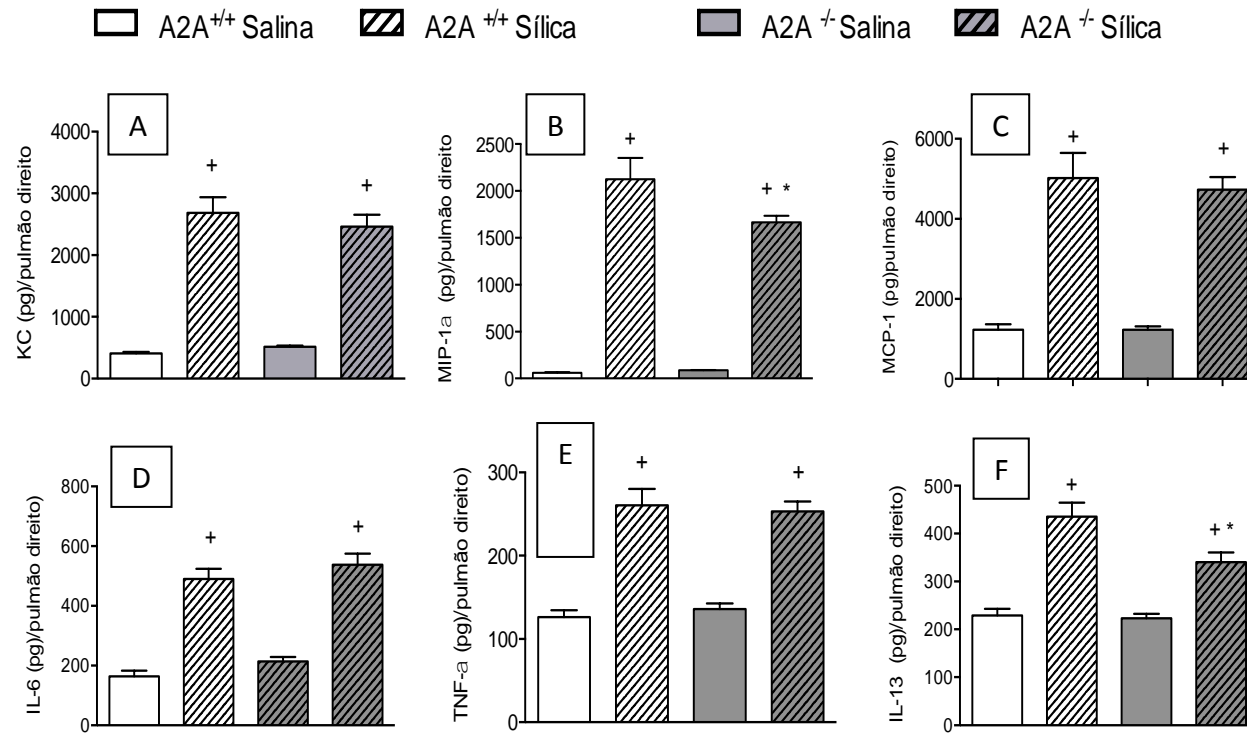


Figura 10 - Avaliação da produção de quimiocinas e citocinas no pulmão de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} estimulados com sílica (10 mg/50μL) (28 dias). Quimiocinas: KC (A), MIP-1α (B), MCP-1 (C); Citocinas: IL-6 (D), TNF-α (E) e IL-13 (F). As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com sílica. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo. + p<0,05 comparado ao respectivo grupo controle estimulado com salina; *p<0,05 comparado ao grupo A2A^{+/+} estimulado com sílica.
Fonte: Andrade, Thamiris; 2019

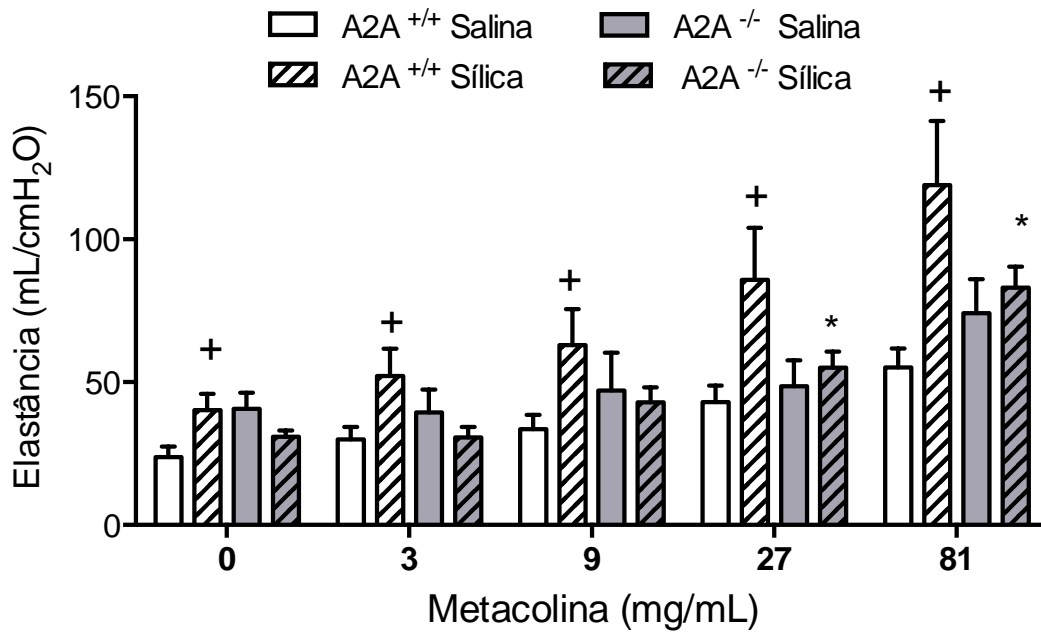


Figura 11 - Avaliação da mecânica respiratória (parâmetro de elastância) em camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-}. Os animais foram instilados com salina e sílica (10 mg/50 μ L). As análises foram feitas 28 dias após a estimulação com sílica, na condição de aerosol de PBS ou metacolina (3 – 81 mg/mL). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de 6 animais. + p < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle estimulado com salina; *p < 0,05 comparado ao grupo A2A^{+/+} estimulado com sílica.
Fonte: Andrade, Thamiris; 2019

3.5 Avaliação do conteúdo de partículas de sílica nos pulmões de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} estimulados com sílica

Visando avaliar a quantidade de partículas no pulmão, por ser um importante fator determinante do efeito residual associado à manutenção do componente fibrogênico na silicose, tomamos por base a capacidade de birrefringência das partículas de sílica cristalina (Ferreira, 2012). Foram utilizados corte de tecido corados por Picrus sirius e analisados em microscópio de luz acoplado a um polarizador. Podemos observar que no pulmão de animais controles foram identificadas áreas marcadas pela coloração avermelhada que correspondem ao conteúdo de colágeno presente na membrana basal de vasos e vias aéreas de animais A2A^{+/+} e A2A^{-/-} controles (Figuras 12A e 12C respectivamente). Na condição da silicose foram observadas áreas com coloração verde e amarela correspondentes à deposição de colágeno e a presença de marcação azul brilhantes correspondente às partículas de sílica no pulmão dos camundongos A2A^{+/+} silicóticos (Figura 12B). O grupo dos animais A2A^{-/-} apresentou diminuição da marcação para colágeno, em associação aparente a um menor número de partículas (Figura 12D). A análise quantitativa da contagem de “pixels” revelou uma tendência na redução das partículas, porém não significativa (Figura 12E).

3.6 Avaliação da presença de α -SMA em pulmões de camundongos A2A^{+/+} e A2A^{-/-} estimulados com sílica

Sabendo que os miofibroblastos possuem participação crucial no processo de fibrose (Phan, 2002), nesta etapa partimos para identificar este tipo celular através da identificação antígeno α -SMA, através de técnica de imunohistoquímica. Como ilustrado na figura 9, os pulmões dos animais A2A^{+/+} e A2A^{-/-} controles mostraram ausência de marcação para a α -SMA (Figura 13A e 13C, respectivamente), enquanto que na condição da silicose observamos presença de uma marcação intensa, predominante nas áreas de granuloma nos animais A2A^{+/+} (Figura 13B). Os animais A2A^{-/-} mostraram diminuição na marcação para α -SMA (Figura 13D).

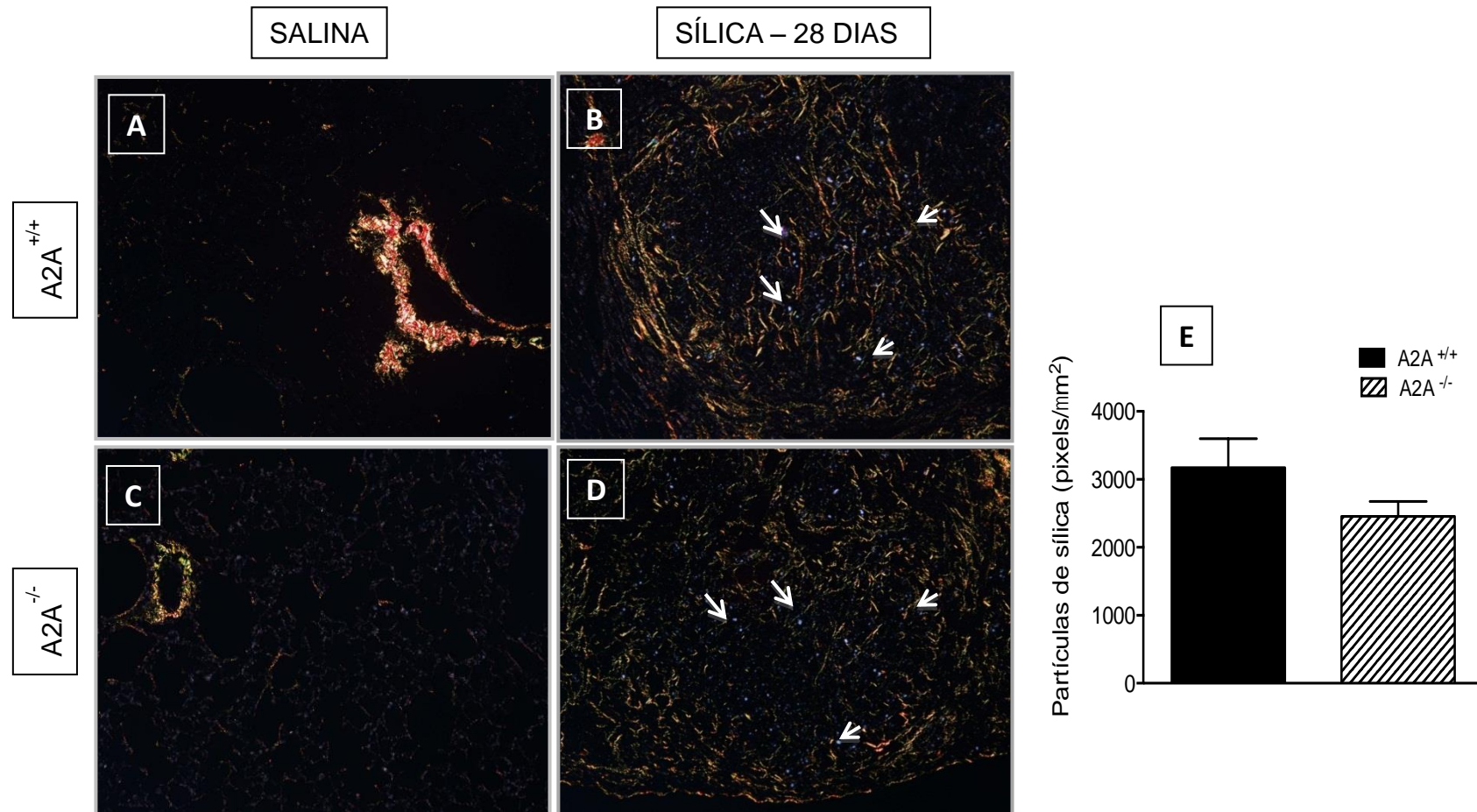


Figura 12 – Avaliação de partículas de sílica cristalina no pulmão de camundongos $A2A^{+/+}$ e $A2A^{-/-}$. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A, C) e sílica (10 mg/50 μ L) (B, D). Quantitativo de partículas (E). As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com a sílica. Coloração por Picrus sirius e análise em microscópio de luz polarizada. Aumento = 200 x. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de no mínimo 8 animais por grupo
 Fonte: Andrade, Thamiris; 2019

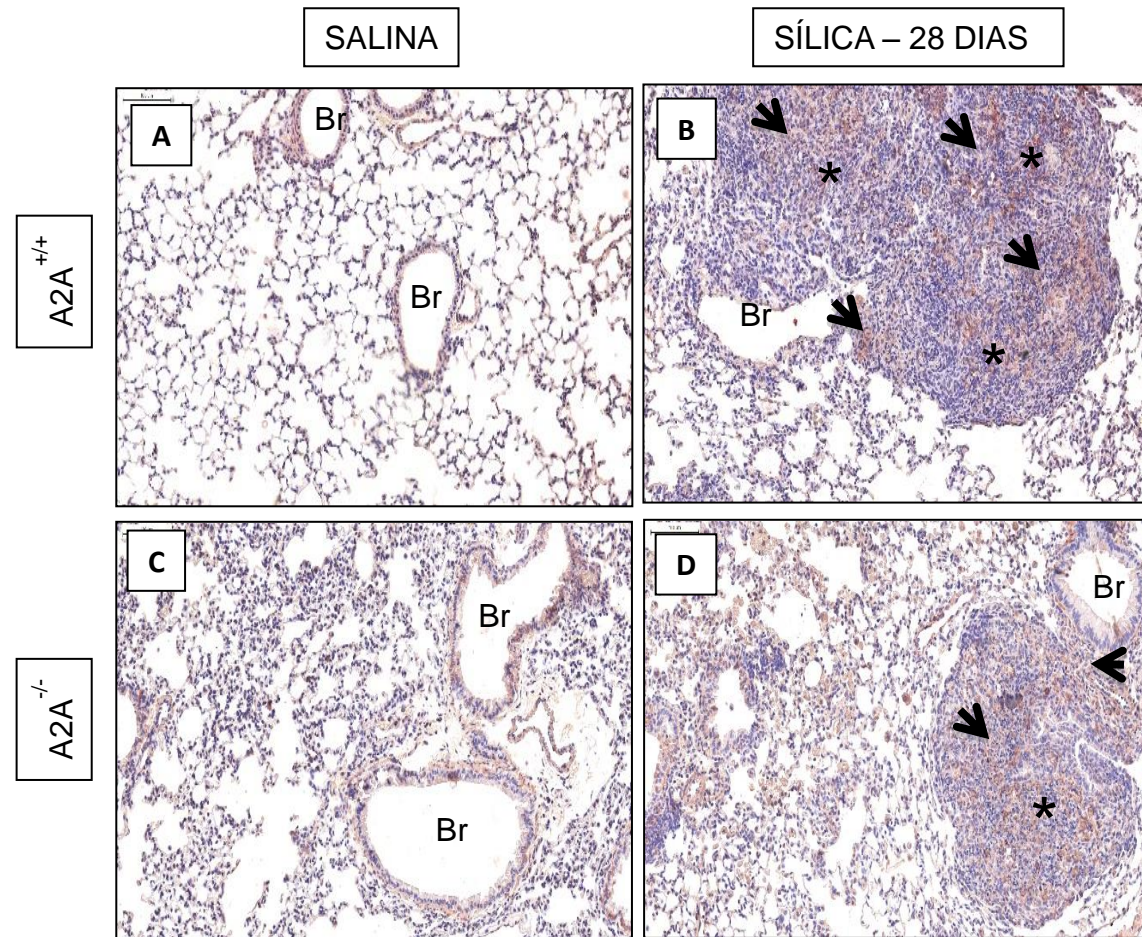


Figura 13 - Expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) no pulmão de camundongos $A2A^{+/+}$ e $A2A^{-/-}$. Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A, C) e sílica (10 mg/50 μ L), 28 dias pós-sílica. Foi utilizada técnica de imunohistoquímica e coloração com HE. Imagens são representativas de 6 animais. Br = bronquíolos; * = granuloma; Setas = marcação positiva para α -SMA. Aumento 100 x.

Fonte: Andrade, Thamiris; 2019

3.7 Avaliação do tratamento com o antagonista de receptor A2A sobre a resposta fibrótica no pulmão de camundongos estimulados com sílica

A fim de validar os dados obtidos a partir da utilização de camundongos nocautes para o receptor A2A da adenosina, no modelo experimental de silicose, nesta próxima etapa avaliamos o efeito da administração terapêutica do antagonista de receptor A2A da adenosina, SCH-58261, sobre a fase tardia da silicose murina. Confirmamos a ocorrência de fibrose e formação de granulomas nos camundongos silicóticos (Figura 14B), em comparação aos controles negativos (Figura 14A), resposta que foi significativamente reduzida pelo tratamento com o antagonista SCH-58261 (Figura 14C), realizado entre os dias 21 – 27 pós estimulação com sílica. Após a análise quantitativa confirmar nossos achados (Figura 14D) nós analisamos a deposição de fibras colágenas como referencial de fibrose. Os animais controles apresentaram parênquima pulmonar preservado (Figura 15A), enquanto que os animais silicóticos tiveram deposição de fibras colágenas, com predomínio na região de granuloma (Figura 15B). O tratamento com o antagonista SCH-58261 reduziu o conteúdo de colágeno no pulmão dos animais silicóticos (Figura 15C), fenômeno confirmado após análise da quantificação de pixels (Figura 15D).

De forma complementar, verificamos aumento nos níveis de quimiocinas KC (Figura 16A), MCP-1 (Figura 16B) e MIP-1 α (Figura 16C), bem como da citocina TNF- α (Figura 16D) no pulmão dos animais silicóticos, quando comparado aos do grupo controle negativo. Vimos que apenas a produção das quimiocinas KC e MCP-1 foi sensível ao tratamento com o antagonista SCH-58261 (Figuras 16A e 16B, respectivamente).

Por último, avaliamos a mecânica respiratória em animais silicóticos, na condição do tratamento com o antagonista de receptor A2A SCH – 58261. Observamos que a exacerbação da resposta de elastância pulmonar, verificada na condição do estabelecimento da silicose, quando da estimulação com metacolina por aerossol, foi sensível ao tratamento com composto SCH 58261 (Figura 17).

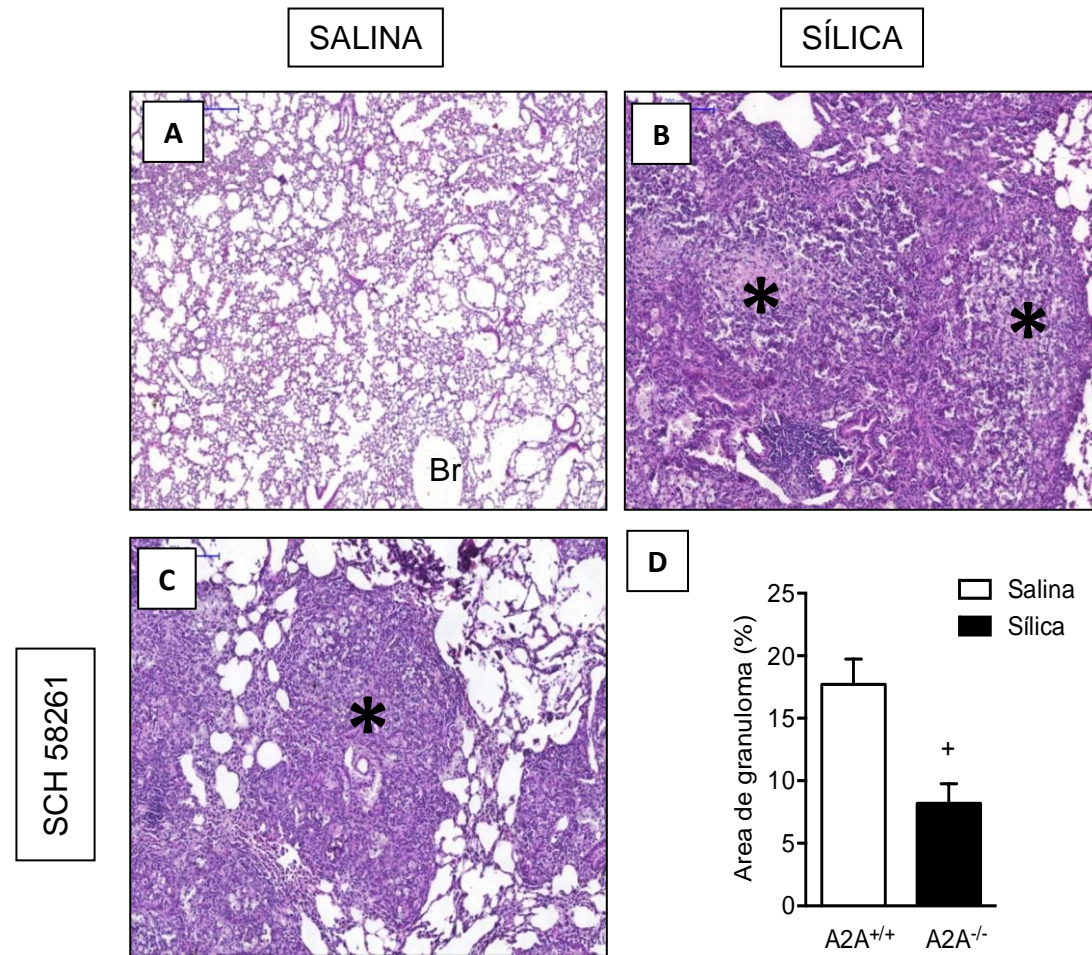


Figura 14 - Efeito do tratamento com o antagonista de receptor de adenosina A2A SCH-58261 nas alterações morfológicas do pulmão de camundongos Swiss-Webster instilados com sílica (10 mg/50 μ l) (0,1 mg/kg). Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A), sílica (B) e sílica tratados com SCH-58261 (0,1 mg/kg) (C). Quantitativo da área de parênquima pulmonar ocupada por granulomas (D). As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com sílica. Coloração com HE e análise em microscópio de luz. . Br = bronquíolos; * = granuloma. Aumento de 100x. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de no mínimo 6 animais por grupo. + $p < 0,05$ comparado ao grupo estimulado com salina; * $p < 0,05$ comparado ao grupo estimulado com sílica.

Fonte: Andrade, Thamiris; 2019

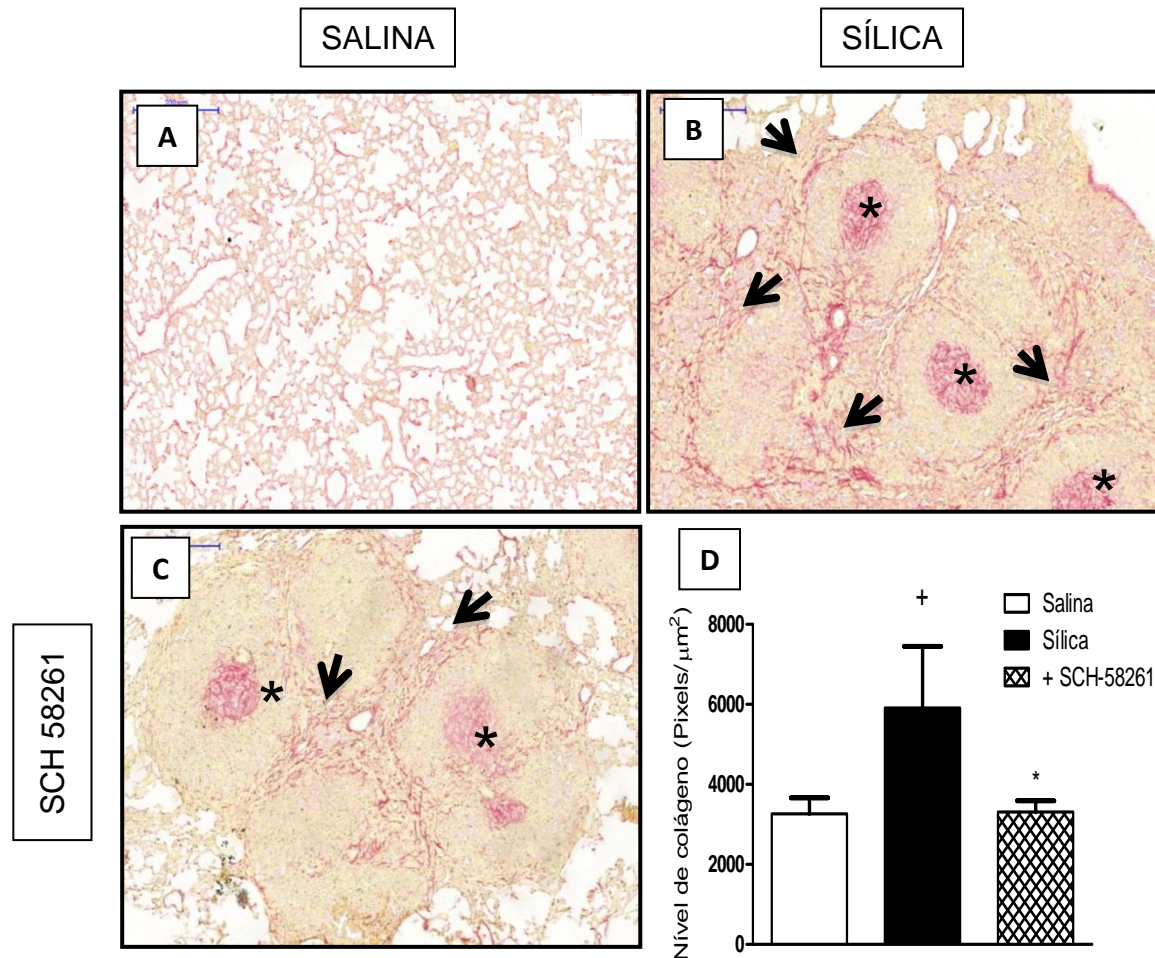


Figura 15 - Efeito do tratamento com o antagonista de receptor de adenosina A_{2A} SCH-58261 sobre o depósito de colágeno no pulmão no pulmão camundongos Swiss-Webster instilados com sílica (10 mg/50 μl). Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A), sílica (B) e sílica tratados com SCH-58261 (0,1 mg/kg, i.p.) (C). Quantitativo da deposição de fibras colágenas no parênquima pulmonar (E). As análises foram realizadas em 28 dias após a estimulação com sílica. Coloração com Picrosirius e análise em microscópio de luz. Aumento de 100x. Br = bronquíolos; * = granuloma. ; Setas = marcação positiva colágeno. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de no mínimo 6 animais por grupo. + p<0,05 comparado ao grupo estimulado com salina; *p<0,05 comparado ao grupo estimulado com sílica.

Fonte: Andrade, Thamiris; 2019

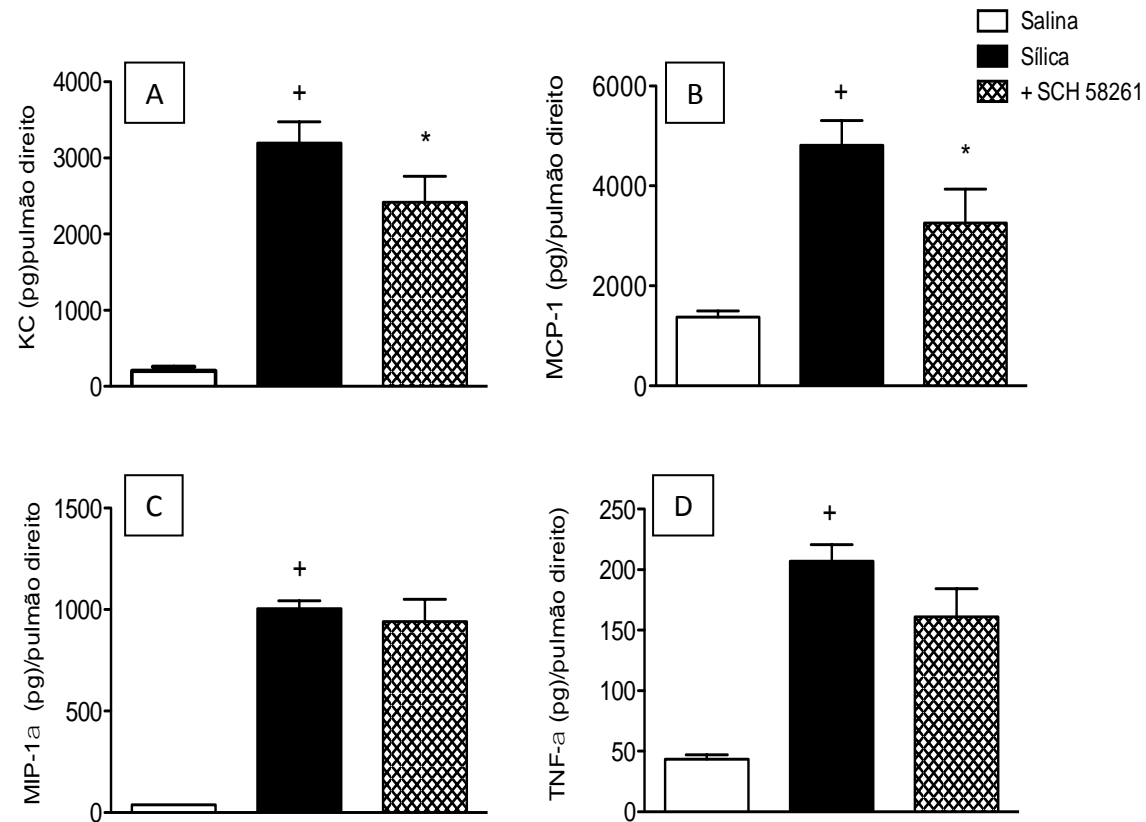


Figura 16 - Efeito do tratamento com o antagonista de receptor de adenosina A_{2A} SCH-58261 sobre a produção de quimiocinas e citocinas no pulmão de camundongos Swiss-Webster estimulados com sílica (10 mg/50μL) (28 dias). Quimiocinas: KC (A), MCP-1 (B); MIP-1α (C), Citocina: TNF-α (D). As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com sílica. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de no mínimo 6 animais por grupo. + p<0,05 comparado ao grupo estimulado com salina; *p<0,05 comparado ao grupo estimulado com sílica.

Fonte: Andrade, Thamiris; 2019

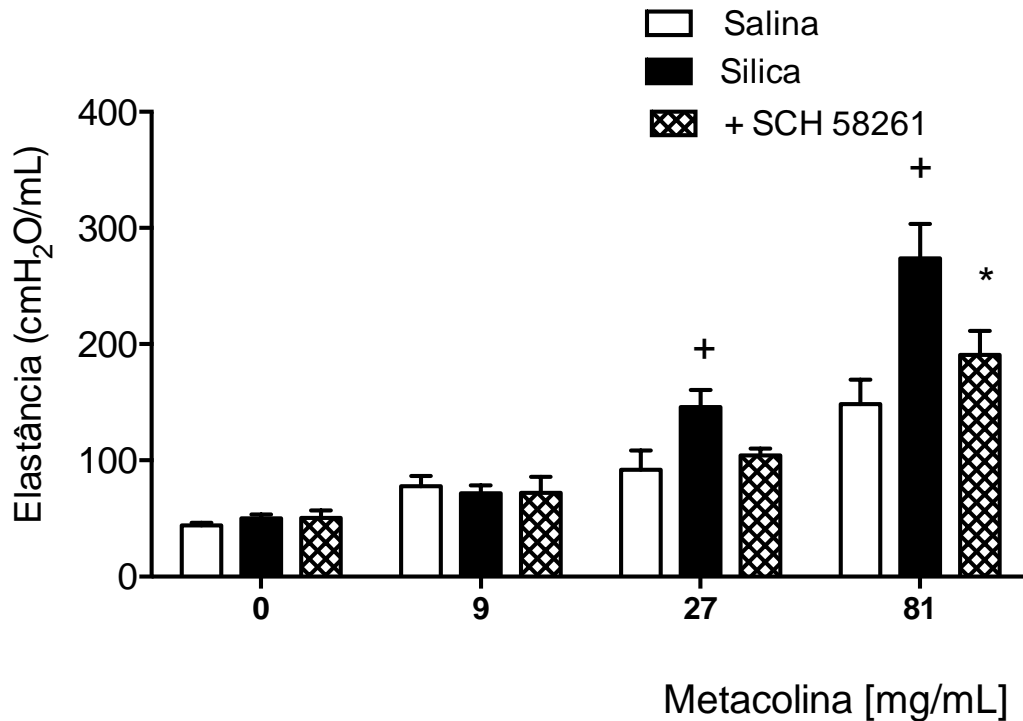


Figura 17 - Efeito do tratamento com o antagonista de receptor de adenosina A_{2A} SCH-58261 sobre a mecânica respiratória (parâmetro de elastância) em camundongos Swiss-Webster. Os animais foram instilados com salina e sílica (10 mg/50µL). As análises foram feitas 28 dias após a estimulação com sílica, na condição de aerosol de PBS ou metacolina (3 – 81 mg/mL). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de 6 animais. + p<0,05 comparado ao respectivo grupo controle estimulado com salina; *p<0,05 comparado ao grupo estimulado com sílica.

Fonte: Andrade, Thamiris; 2019

3.8 Análise da expressão do receptor A2A em fibroblastos pulmonares de camundongos Swiss-Webster

De forma adicional, avaliamos a expressão do receptor A2A em fibroblastos pulmonares na condição de silicose ou não. Através da técnica de *western blotting*, verificamos que fibroblastos pulmonares, submetidos à estimulação com a citocina IL-13 (40 ng/mL), responderam com aumento nos níveis desse receptor de forma equivalente considerando-se aqueles provenientes de animais estimulados com salina ou com partículas de sílica (Figura 18).

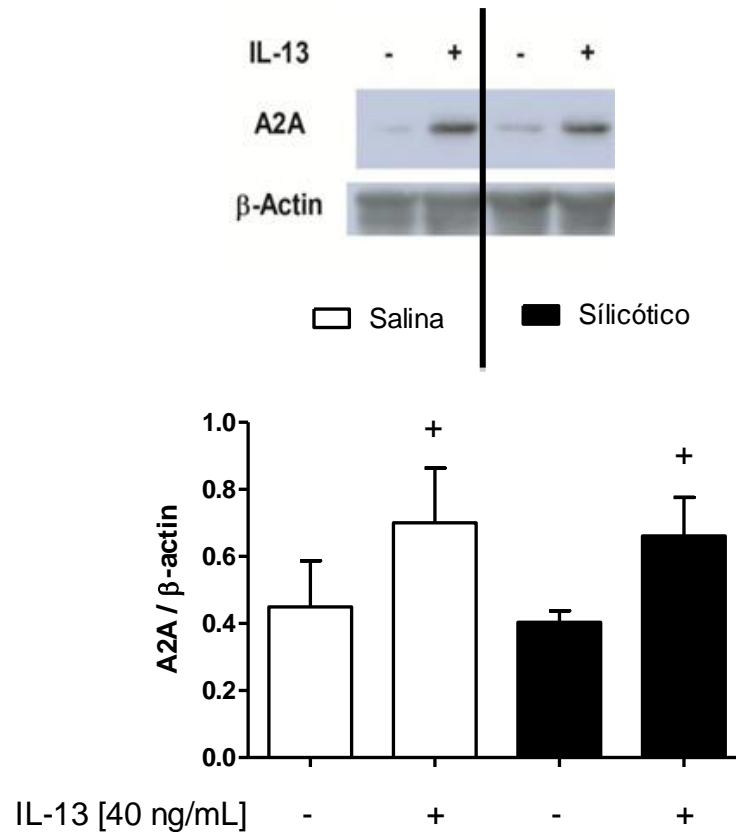


Figura 18 - Expressão do receptor A2A em fibroblastos pulmonares de camundongos Swiss-Webster instilados com salina e sílica (10 mg/50 μ L). As células foram obtidas 7 dias pós-sílica e estimuladas com IL-13 (40 ng/mL) por 24 h. A análise dos receptores foi realizada através da técnica de Western Blot. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 5 animais por grupo. + $P < 0,05$ comparado ao respectivo controle negativo.

Fonte: Andrade, Thamiris; 2019

4. DISCUSSÃO

A inalação de partículas de sílica em sua forma livre e cristalina leva ao desenvolvimento da silicose – a doença de maior prevalência dentre aquelas pertencentes ao grupo das pneumoconioses. A silicose resulta no comprometimento da função pulmonar devido à ocorrência de uma resposta inflamatória, seguida da formação de granulomas que ocupam o parênquima pulmonar. O curso da doença humana é insidioso e sua progressão ocorre mesmo na ausência de exposição contínua à sílica, o que leva à ocorrência de um quadro de insuficiência respiratória e invalidez. A silicose, portanto, representa um grave problema de saúde pública por ser uma doença extremamente incapacitante e que pode levar ao óbito (FISHWICK; BARBER, 2012; POLLARD, 2016). Esta questão torna-se ainda mais preocupante, pelo fato de não haver até o presente momento um tratamento eficaz para esta doença. Neste sentido é fundamental a atenção de diversos grupos de pesquisa, no Brasil e no mundo, visando a identificação de potenciais alvos terapêuticos que possam permitir no futuro o desenvolvimento de uma terapia capaz de ser aplicada nestas doenças.

Diferentes modelos animais têm sido utilizados com o propósito de permitir um melhor entendimento acerca dos eventos que compõem o quadro silicótico. Neste trabalho utilizamos um modelo de silicose experimental, no qual camundongos foram instilados por via intranasal com partículas de sílica cristalina, sendo observada presença de um intenso infiltrado inflamatório e granulomas em formação dispersos no parênquima pulmonar (fase inicial) (TRENTIN et al., 2015), seguida por progressão da fibrose onde se observa a presença de granulomas coalescentes (fase tardia) (FERREIRA, 2012). Também observamos importante comprometimento da função pulmonar, incluindo aumento da resistência das vias aéreas e da elastância pulmonar (FARIA et al., 2019). Estes resultados estão em concordância com a literatura, pois de acordo com LANGLEY et al. (2010) a inflamação persistente acaba originando áreas de fibrose no tecido pulmonar, que iniciam-se como pequenos nódulos e culminam em uma estrutura denominada granuloma. Além disso, TERRA FILHO e SANTOS (2006), afirmaram que esta formação de granulomas é progressiva, com destaque nas fases tardias, onde são

observados, principalmente, nas porções superiores e posteriores dos pulmões, características da fase crônica da doença.

Previamente foi demonstrado por nosso grupo que dentre a gama ampla de mediadores participantes no contexto da silicose experimental, algumas citocinas se destacaram incluindo o TNF- α (CIAMBARELLA, 2013) e a IL-13, ambas reconhecidas por sua participação em processo de remodelamento tecidual associado a doenças pulmonares crônicas como a asma e a DPOC (BETORET et al., 2012). No caso da IL-13, de forma original, demonstramos através do tratamento com a imunotoxina IL-13PE, que esta citocina se coloca como um alvo terapêutico em potencial no contexto de disfunções fibróticas. Mais ainda, relatos prévios da literatura apontaram para uma ação moduladora entre a IL-13 e a adenosina (BLACKBURN et al., 2003). A adenosina é uma molécula pequena gerada extracelularmente a partir de nucleotídeos de adenina, em situações de estimulação celular direta, hipóxia, lesão ou estresse metabólico, que atua por meio de uma família de receptores metabotrópicos acoplados a proteína G (GPCR) (A1, A2A, A2B e A3), expressos de uma maneira específica de células e tecidos (POLOSA; BLACKBURN, 2009). Utilizando sistema de cultura de fibroblastos pulmonares *in vitro*, identificamos a atividade indutora de ativação de fibroblastos pela adenosina de forma isolada ou sinérgica com a IL13. Estes achados reforçaram evidências prévias da existência de atividade moduladora entre IL-13 e adenosina, e mostraram ser este sistema dependente, seletivamente, da ação da adenosina no receptor A2A (BLACKBURN et al., 2003). Através de sistemas *in vivo* evidências preliminares foram obtidas do envolvimento da adenosina na fibrose tecidual na silicose.

No presente trabalho, portanto, tivemos como objetivo aprofundar nossa análise acerca do envolvimento da adenosina na silicose. Inicialmente avaliamos a expressão do receptor A2A no tecido pulmonar dos animais silicóticos, utilizando para tanto a técnica de imunohistoquímica. Verificamos um nítido aumento no quantitativo de células marcadas positivamente para o receptor A2A na fase inicial (7 dias) e também na tardia (28 dias), com a marcação mostrando-se coincidente com a região dos granulomas. Estes dados reforçaram a hipótese da participação da adenosina no quadro da silicose, possivelmente atuando através do receptor A2A. Estes dados deram suporte a achados prévios do grupo, que mostraram aumento na expressão das ecto-enzimas envolvidas na produção de adenosina, CD39 e CD73

no pulmão silicótico. Um limitante importante em nosso estudo é a dificuldade metodológica para realizar a quantificação dos níveis de adenosina tecidual, por ser possível apenas em sistema único por HLPC, o qual não temos disponível porém pretendemos realizar a execução no futuro.

Em seguida, resolvemos estudar o desenvolvimento do quadro da silicose utilizando como primeira estratégia camundongos geneticamente deficientes no gene que codifica para o receptor A2A ($A2A^{-/-}$). Observamos que tanto na fase inicial (7 dias) como na fase tardia (28 dias) da silicose, os animais $A2A^{-/-}$ apresentaram menor formação de granulomas e fibrose, quando comparados aos controles $A2A^{+/+}$. Tanto a avaliação morfológica/morfométrica como a análise da deposição de fibras colágenas no tecido pulmonar revelaram resposta atenuada na condição dos animais nocautes. De forma a centrar nossa atenção no fenômeno da fibrose na silicose, nos ensaios subsequentes fixamos nossas análises no tempo 28 dias após o desafio com a sílica. Avaliando os mediadores gerados no pulmão silicótico, incluímos citocinas (IL-6, TNF- α , IL-13) e quimiocinas (KC, MIP-1 α , MCP-1). Do conjunto analisado, apenas MIP-1 α e IL-13 apresentaram em níveis reduzidos no pulmão dos animais $A2A^{-/-}$ silicóticos, em comparação àqueles $A2A^{+/+}$ silicóticos. Do conjunto analisado, apenas MIP-1 α e IL-13 apresentaram em níveis reduzidos no pulmão dos animais $A2A^{-/-}$ silicóticos, em comparação àqueles $A2A^{+/+}$ silicóticos. A quimiocina MIP-1 α (C-C) é reconhecida por sua atividade indutora de migração para monócitos, portanto, os níveis reduzidos no pulmão dos animais nocautes silicóticos poderiam responder, ao menos em parte, pela menor reatividade destes animais ao desafio com a sílica. O mesmo racional se aplica à IL-13, que por ser uma citocina com reconhecida atividade prófibrótica, os níveis reduzidos poderiam refletir diretamente nos níveis reduzidos de fibrose pulmonar nos animais nocautes. Através da técnica de *western blotting*, detectamos um significativo aumento na expressão do receptor A2A em fibroblastos pulmonares submetidos à estimulação com a IL-13 *in vitro*, o que não apenas reforça atividade da adenosina na ativação de fibroblastos, como também a capacidade de modulação entre a IL-13 e a adenosina.

Procurando investigar a correlação entre o comprometimento tecidual e a função pulmonar/hiper-reatividade das vias aéreas, vimos através da análise da mecânica respiratória que os animais $A2A^{-/-}$ mostraram níveis reduzidos da resposta de elastância pulmonar na condição de estimulação com a agente broncoconstrictor

metacolina. Como citocinas como IL-13 e TNF- α , isoladamente ou em combinação, têm sido fortemente implicadas no mecanismo da AHR (HORIBA et al., 2011; KIBE et al., 2003), parece razoável supor que a diminuição na geração de IL-13 poderia estar contribuindo para a redução AHR induzida por sílica verificada nos animais A2A^{-/-}. Vale ressaltar que outra característica patológica proeminente da silicose foi o acúmulo de fibroblastos α -SMA-positivos na área granulomatosa, resposta que se mostrou reduzida na condição dos animais nocautes. Atenção considerável tem sido direcionada ao miofibroblasto como alvo potencial de medicamentos antifibróticos, devido à sua capacidade única de gerar colágeno e outros componentes da matriz (BAUM; DUFFY, 2011). Também observamos que a presença de partículas de sílica biorrefringentes no tecido pulmonar se mostrou atenuada (não significativamente) no grupo dos animais A2A^{-/-} silicóticos. Em conjunto, os achados descritos acima dão suporte à proposição do envolvimento da adenosina no processo de fibrose pulmonar na silicose, fenômeno este dependente do receptor A2A (CRONSTEIN, 2011).

Nossos achados encontram respaldo em estudos onde foi demonstrado que a estimulação do receptor A2A pela adenosina promove a síntese de colágeno dos tipos I e III na condição experimental de fibrose dérmica induzida pela bleomicina – um composto antineoplásico reconhecido por sua atividade indutora de fibrose. Neste caso, o mecanismo mostrou ser dependente do *crosstalk* entre o receptor A2A e o *wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family* (WNT) e a β -catenina (ZHANG et al., 2017). Por outro lado, nossos dados foram contrários àqueles que mostram exacerbação da resposta inflamatória aguda em animais nocautes para o receptor A2A (XIAO et al., 2013). Este receptor A2A é um GPCR acoplado à proteína Gs (estimulatória da enzima adenilato ciclase), enzima responsável pela síntese de AMPc – um segundo mensageiro reconhecido por suas propriedades anti-inflamatórias (TREVETHICK et al., 2008). Poderíamos especular que a deleção do receptor A2A possa ter indiretamente interferido na regulação negativa de células importantes para o estabelecimento quadro silicótico, o que determinou a redução do processo de fibrose pulmonar. É interessante ressaltar que apesar dos animais nocautes serem uma grande ferramenta no estudo de diversas doenças, o significado dos achados provenientes de estudos utilizando animais geneticamente modificados nem sempre é tão direto quanto o esperado, o que

implica na necessidade de testes complementares utilizando ferramentas experimentais como anticorpos, inibidores de síntese/degradação ou mesmo antagonista seletivos.

Dentro deste racional, na etapa seguinte, foram realizados ensaios de forma a confirmar os achados obtidos na condição dos animais nocautes para o receptor A2A. Para tanto foi utilizado o composto SCH 58261, um antagonista possuidor de seletividade estimada em 50x superior pelo receptor A2A em relação a sua capacidade de bloquear outros receptores da adenosina. Evidências da literatura reportam a utilização deste composto no estudo da participação da adenosina em diversos modelos experimentais (MONOPOLI et al., 1998; ONGINI, 1997).

Tendo como foco a reversão de um quadro de silicose instado, utilizamos o protocolo de administração terapêutica do antagonista SCH 58261. O tratamento foi iniciado 21 dias após a estimulação com a sílica, diariamente, e as análises realizadas no dia 28. Foi observada diminuição da resposta de granulomatosa e de fibrose pulmonar nos animais silicóticos tratados com SCH 58261, em associação com nítida melhora da função pulmonar. Houve também diminuição nos níveis das quimiocinas KC e MCP-1. Estes dados confirmaram aqueles obtidos na condição dos animais nocautes e reforçam de forma original a ideia do envolvimento da adenosina no estabelecimento quadro de fibrose na silicose.

CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados mostram que a deleção genética do receptor A2A da adenosina ou o tratamento com o antagonista seletivo do receptor – SCH-58261- levaram à redução da formação de granuloma e fibrose (menor deposição de colágeno e número de células positivas para α -SMA), no pulmão de camundongos estimulados com partículas de sílica, em associação com uma nítida melhora da função respiratória. Assim, podemos sugerir que a adenosina, através do receptor A2A, como um alvo terapêutico em potencial no quadro da silicose, o que se coloca como subsídio para o desenvolvimento futuro de terapias a serem aplicadas no caso de doenças de natureza fibrótica.

REFERÊNCIAS

- AHERNE, C. M. et al. Coordination of ENT2-dependent adenosine transport and signaling dampens mucosal inflammation. **The Journal of Clinical Investigation - Insight**, v. 3, n. 20, p. 1–18, 2018.
- ANTONIOLI, L. et al. Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, n. 2, p. 435–442, 2007.
- BAUM, J.; DUFFY, H. S. Fibroblasts and Myofibroblasts: What are we talking about? **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 57, n. 4, p. 376–379, 2011.
- BETORET, A. V et al. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 11, p. 3546–3556, 2012.
- BLACKBURN, M. R. et al. Adenosine mediates IL-13–induced. **Assessment**, v. 112, n. 3, 2003.
- BORTHWICK, L. A.; WYNN, T. A. IL-13 and TGF- β 1: Core Mediators of Fibrosis. **Current Pathobiology Reports**, v. 3, n. 4, p. 273–282, 2015.
- CARNEIRO, A. P. S. et al. Silica exposure and disease in semi-precious stone craftsmen, Minas Gerais, Brazil. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 60, n. 3, p. 239–247, 2017.
- CIAMBARELLA, B. T. **Efeito de terapias anti-TNF sobre a resposta inflamatória pulmonar crônica induzida por sílica em camundongos.** [s.l.] INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2013.
- CRONSTEIN, B. N. Adenosine receptors and fibrosis: A translational review. **F1000 Biology Reports**, v. 3, n. 1, p. 1–6, 2011.
- DARBY, I. A. et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 7, p. 301–311, 2014.
- DELLA LATTA, V. et al. The role of the adenosinergic system in lung fibrosis. **Pharmacological Research**, v. 76, p. 182–189, 2013.
- FARAHMAND, F. et al. Evaluation of serum adenosine deaminase in cystic fibrosis patients in an Iranian referral hospital. **Iranian Journal of Pediatrics**, v. 26, n. 3, p. 0–3, 2016.
- FARIA, A. C. D. et al. Association of respiratory integer and fractional-order models with structural abnormalities in silicosis. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 172, p. 53–63, 2019.

FERREIRA, T. P. T. **ESTUDO DO EFEITO ANTIFIBRÓTICO DA IL13-PE NO CONTROLE DA RESPOSTA PULMONAR CRÔNICA CAUSADA POR SÍLICA EM CAMUNDONGOS**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

FISHWICK, D.; BARBER, C. Pneumoconiosis. **Medicine (United Kingdom)**, v. 40, n. 6, p. 310–313, 2012.

FLINN, A. M.; GENNERY, A. R. Adenosine deaminase deficiency: A review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 13, n. 1, p. 5–11, 2018.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656–661, 2010.

GERBER, A. et al. Silicosis: Geographic changes in research: An analysis employing density-equalizing mapping. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2014.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, 2003.

GREENBERG, M. I.; WAKSMAN, J.; CURTIS, J. Silicosis: A Review. **Disease-a-Month**, v. 53, n. 8, p. 394–416, 2007.

HORIBA, M. et al. Effect of IL-1 β and TNF- α s IL-13 on bronchial hyperresponsiveness, β 2-adrenergic responses and cellularity of bronchial alveolar lavage fluid. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 31, n. 3–4, p. 37–49, 2011.

HUAUX, F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 7, n. 2, p. 168–173, 2007.
KARMOUTY-QUINTANA, H. et al. The Antifibrotic Effect of A2B Adenosine Receptor Antagonism in a Mouse Model of Dermal Fibrosis. **Arthritis and Rheumatology**, v. 70, n. 10, p. 1673–1684, 2018.

KIBE, A. et al. Differential regulation by glucocorticoid of interleukin-13-induced eosinophilia, hyperresponsiveness, and goblet cell hyperplasia in mouse airways. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, n. 1, p. 50–56, 2003.

LAFLAMME, C.; MAILHOT, G. B.; POULIOT, M. Age-related decline of the acute local inflammation response: A mitigating role for the adenosine A2A receptor. **Aging**, v. 9, n. 10, p. 2082–2094, 2017.

LANGLEY, R. J. et al. Granuloma formation induced by low-Dose chronic silica inhalation is associated with an anti-apoptotic response in lewis rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 73, n. 10, p. 669–683, 2010.

LE, T. T. T. et al. Purinergic signaling in pulmonary inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JULY, p. 1–14, 2019.

LIU, B. et al. Role of A_{2B} adenosine receptor-dependent adenosine signaling in multi-walled carbon nanotube-triggered lung fibrosis in mice. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2019.

LOHMANN-MATTHES, M. L.; STEINMULLER, C.; FRANKE-ULLMANN, G. Pulmonary macrophages. **European Respiratory Journal**, v. 7, n. 9, p. 1678–1689, 1994.

LOPES-PACHECO, M.; BANDEIRA, E.; MORALES, M. M. Cell-Based Therapy for Silicosis. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.

LOPES, A. J.; NORONHA, A. J.; MAFORT, T. T. Mecanismos de defesa do aparelho respiratório. **Mecanismos de defesa do aparelho respiratório**, v. 9, n. 2, p. 11–16, 2010.

LUZ, F. DE F. et al. Silicose em ex-mineiros de extração de cobre. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 16, n. 8, p. 3421–3426, 2011.

MARON-GUTIERREZ, T. et al. Entendendo a fisiopatologia da silicose. **Pulmão RJ**, v. 17, n. 1, p. 33–37, 2008.

MOHSENIN, A. et al. Genetic removal of the A_{2A} adenosine receptor enhances pulmonary inflammation, mucin production, and angiogenesis in adenosine deaminase-deficient mice. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 293, n. 3, p. 753–761, 2007.

MONOPOLI, A. et al. Blockade of adenosine A_{2A} receptors by SCH 58261 results in neuroprotective effects in cerebral ischaemia in rats. **NeuroReport**, v. 9, n. 17, p. 3955–3959, 1998.

NARDI, J. et al. Inflammatory and oxidative stress parameters as potential early biomarkers for silicosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 484, n. April, p. 305–313, 2018.

NIE, Y. et al. AKT2 Regulates Pulmonary Inflammation and Fibrosis via Modulating Macrophage Activation. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 11, p. 4470–4480, 2017.

ONGINI, E. SCH 58261: A selective A_{2A} adenosine receptor antagonist. **Drug Development Research**, v. 42, n. 2, p. 63–70, 1997.

PHAN, S. H. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 5, n. 3, p. 334–337, 2008.

POLLARD, K. M. Silica, silicosis, and autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. MAR, p. 1–7, 2016.

POLOSA, R.; BLACKBURN, M. R. Adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 10, p. 528–535, 2009.

PUCHELLE, E. et al. Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after

injury in chronic obstructive pulmonary disease. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 3, n. 8, p. 726–733, 2006.

TERRA FILHO, M.; SANTOS, U. D. P. Silicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. SUPPL. 2, p. 41–47, 2006.

THANNICKAL, V. J. et al. Mechanisms of Pulmonary Fibrosis. **Annual Review of Medicine**, v. 55, n. 1, p. 395–417, 2004.

TRENTIN, P. G. et al. Annexin A1 mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 12, p. 3058–3071, 2015.

TREVETHICK, M. A. et al. Treating lung inflammation with agonists of the adenosine A_{2A} receptor: Promises, problems and potential solutions. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 4, p. 463–474, 2008.

XIAO, H. et al. The effects of adenosine A_{2A} receptor knockout on renal interstitial fibrosis in a mouse model of unilateral ureteral obstruction. **Acta Histochemica**, v. 115, n. 4, p. 315–319, 2013.

ZHANG, J. et al. Adenosine A_{2a} Receptor Blockade Diminishes Wnt / b -Catenin Signaling in a Murine Model of. **The American Journal of Pathology**, v. 187, n. 9, p. 1935–1944, 2017.