Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Davidson Furtado Dias

Avaliação do papel do óxido nítrico no comprometimento da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos estimulados com sílica

Rio de Janeiro

2012

Davidson Furtado Dias

Avaliação do papel do óxido nítrico no comprometimento da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos estimulados com sílica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

D541 Dias, Davidson Furtado.
Avaliação do papel do óxido nítrico no comprometimento da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos estimulados com sílica / Davidson Furtado Dias. – 2012.
90 f.

Orientadora: Prof.ª Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Pulmões - Fisiologia -Teses. 2. Óxido nítrico - Teses. 3. Pneumoconiose. 4. Pneumonia. 5. Fibrose pulmonar. 6. Pulmão - Fisiologia. 7. Silicose. I. Martins, Patrícia Machado Rodrigues e Silva. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III Título.

CDU 612.89-008.454

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

_____ _____

Assinatura Data

Davidson Furtado Dias

Avaliação do papel do óxido nítrico no comprometimento da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos estimulados com sílica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 20 de julho de 2012.

Banca Examinadora:

_____
Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins (Orientadora)
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

_____
Profª. Dra. Andréa Monte Alto Costa
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____
Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença
Instituto de Ciências Biomédicas – UFRJ

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

A minha família, por ser a base
de tudo o que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

À Deus, o criador de todas as coisas, pela dádiva da vida, sem a qual a respiração pulmonar não seria possível, sendo inviável a realização deste trabalho;

Ao apoio incondicional dos meus pais, Ronaldo Dias e Isabel Dias, além de seus sábios conselhos, incentivos, nas horas pertinentes, e puxões de orelha, que foram fundamentais para mim. Por estes ensinamentos, não existe nenhuma palavra, em todo o léxico português, que consiga sintetizar o meu agradecimento por tudo o que fizeram por mim. Além disto, agradeço à Vanessa Dias, minha irmã, por compreender-me nos meus momentos mais tempestuosos. Obrigado pela sua alegria e seu companheirismo durante esta minha etapa de aprendizado;

Aos amigos, pelo apoio e compreensão, além dos momentos de descontração e confraternização que me proporcionaram. Agradeço, inclusive, os que estão distantes fisicamente, mas que continuam torcendo pelo meu sucesso;

A minha orientadora, Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva. Obrigado pelo seu tempo, paciência e persistência dedicados comigo ao longo destes anos. Através de sua orientação pude reconhecer que sempre podemos ir além. Agradeço a credibilidade e a oportunidade que me foram concedidas para desenvolver este trabalho sob sua orientação, enriquecendo-me tanto em conhecimento quanto profissionalmente;

Ao Dr. Marco Aurélio Martins e ao Dr. Renato Sérgio Balão Cordeiro, por me possibilitarem o desenvolvimento deste trabalho no Laboratório de Inflamação;

À Bianca Torres pelo auxílio no desenvolvimento inicial do meu projeto. Obrigado pela sua amizade e sua dedicação;

À Tatiana Paula Teixeira Ferreira por toda sua colaboração. Com certeza você tornou mais descontraídos nossos momentos de experimentos e congressos. Além disto, obrigado pelas dicas no início da escrita da dissertação. Pode ter certeza que houve estimulação das minhas áreas hipocampais, com auxílio do NO, claro;

A todos os membros do Laboratório de Inflamação, obrigado por me ajudarem, de forma direta ou indireta, a executarem este trabalho. Em especial, agradeço a Ana Carolina Santos de Arantes, Patrícia Trentin e ao apoio técnico do Rodrigo Azevedo. Agradeço também aos pesquisadores doutores Vinicius Frias de Carvalho, Magda Fráguas Serra e Edna Alves dos Anjos Valotta, por sempre estarem dispostos a me ajudar;

Aos bioteristas do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, pelos cuidados para com os animais utilizados experimentalmente;

Aos secretários acadêmicos do BHEx, Cristiane Baptista e José Carlos da Conceição Gomes por serem sempre solícitos a me ajudar nos trâmites burocráticos inerentes à pós-graduação;

De antemão, agradeço, aos membros da banca avaliadora pela sua contribuição ao presente trabalho;

Às agências de fomento CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, ao CNPq e à FAPERJ pelo apoio financeiro.

Algo só é impossível até que alguém duvida
e acaba provando o contrário.

Albert Einstein

RESUMO

DIAS, Davidson Furtado. *Avaliação do papel do óxido nítrico no comprometimento da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos estimulados com sílica.* 2012. 90f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Silicose é uma doença pulmonar causada pela inalação de partículas de sílica, na qual vários são os mediadores inflamatórios implicados. Neste estudo investigamos o envolvimento do óxido nítrico (NO) nas alterações de função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas, em camundongos estimulados com sílica por via intranasal. Foram analisados parâmetros como i) função pulmonar (resistência e elastância) e hiper-reatividade das vias aéreas ao aerossol com metacolina (3 – 27 mg/mL) através de sistema de pletismografia invasiva, e ii) alterações morfológicas, mediante técnicas clássicas de histologia e imuno-histoquímica. Verificamos que a instilação de partículas de sílica (10 mg) causou aumento nos níveis basais de resistência e elastância pulmonar, bem como de hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina, em tempos que variaram de 2 a 28 dias. Observamos uma correlação temporal com as alterações morfológicas no tecido pulmonar, que refletiram presença de resposta inflamatória e infiltrado celular intenso, seguidos de progressiva fibrose e formação de granulomas. Os tempos de 7 e 28 dias pós-estimulação com sílica foram selecionados para os ensaios subsequentes, por corresponderem às fases aguda e crônica da silicose experimental, respectivamente. Foram detectados níveis elevados de óxido nítrico (NO), bem como de peroxinitrito/expressão da enzima iNOS no lavado broncoalveolar e no tecido pulmonar de camundongos estimulados com sílica, respectivamente. Em outro grupo de experimentos, observamos que camundongos depletados para o gene codificante para a enzima NOS induzida (iNOS) apresentaram abolidas as respostas de aumento nos níveis basais de resistência e elastância pulmonares, bem como da hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina em comparação aos animais selvagens (C57BL/6). A inibição da resposta inflamatória e fibrótica granulomatosa foi também notada no caso dos animais nocautes para iNOS. O tratamento com 1400W, um inibidor da enzima iNOS, diminui de forma marcada as alterações de função pulmonar e fibrose tecidual verificadas nos camundongos silicóticos. Em conclusão, nossos resultados mostram que o comprometimento da função pulmonar, representado pelo aumento na resistência/elastância e hiper-reatividade das vias aéreas, mostraram-se correlacionados à maior geração de NO e de peroxinitrito, assim como da expressão da enzima iNOS. A depleção do gene codificante ou, ainda, o bloqueio da enzima iNOS aboliram a resposta de comprometimento da função pulmonar e fibrose tecidual na silicose experimental. Em conjunto estes achados indicam que o NO parece ser um mediador importante no contexto da silicose, colocando-se como um alvo terapêutico em potencial no tratamento de doenças de caráter fibrótico.

Palavras-chave: Inflamação pulmonar. Silicose. Óxido nítrico. Hiper-reatividade das vias aéreas. Fibrose.

ABSTRACT

Silicosis is a lung disease caused by inhalation of silica particles, which is dependent on several inflammatory mediators. In this study we investigated the role of nitric oxide (NO) in the alteration of lung function and airways hyperreactivity caused by intranasal silica stimulation in mice. The parameters analyzed included: i) lung function (resistance and elastance) and airways hyperreactivity to aerosolized methacholine (3 - 27 mg/mL) by invasive plethysmography, and ii) morphological changes, by classical histological techniques and immunohistochemistry. We found that the instillation of silica particles (10 mg) caused an increase in the baseline levels lung of resistance and elastance and airways hyperreactivity to methacholine, from 2 to 28 days. We noted that there was a temporal correlation with morphological changes in lung tissue, which reflected the presence of an intense inflammatory cell infiltrate, followed by progressive fibrosis and granuloma formation. The time-points of 7 and 28 days post-silica stimulation were chosen for subsequent experiments, because they corrrespond to acute and chronic phases of experimental silicosis, respectively. Higher levels of nitric oxide (NO) and peroxynitrite as well as iNOS expression were detected in the bronchoalveolar lavage and lung tissue of silica-stimulated mice stimulated, respectively. In another group of experiments, we observed that mice depleted for the gene encoding for inducible NOS (iNOS) had the responses of increased basal levels of resistance and elastance lung and airways hyperreactivity abolished as compared to wildtype animals (C57BL/6). Inhibition of the inflammatory and fibrotic granulomatous responses were also inhibited in the case iNOS knockout mice. Treatment with the iNOS inhibitor 1400W markedly suppressed changes in lung function and tissue fibrosis observed in silicotic mice. In conclusion, our results show that suppression of lung function failure, including increased in resistance/elastance as well as airways hyperreactivity were correlated with NO and peroxynitrite generation as well as the iNOS expression. The depletion of the gene encoding to or inhibition of iNOS enzymatic activity abolished the response of lung function and tissue fibrosis in experimental silicosis. Together, these findings indicate that NO is an important mediator in the context of silicosis and suggest that it can be considered a potential therapeutic target for the treatment of fibrotic diseases.

Keywords: Pulmonary inflammation. Silicosis. Nitric oxide. Airways hyperreactivity. Fibrosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da internalização da partícula de sílica, endocitada através de fagossomo..... 22

Figura 2 - Conversão catalisada pela NOS, transformando L-arginina em L-citrulina e liberando uma molécula de NO..... 30

Figura 3 - Esquema de indução de silicose em modelo murino e os tempos em que foram analisados os parâmetros do estudo..... 37

Figura 4 - Sistema para avaliação da função pulmonar composto por: (A) pletismógrafo de corpo inteiro invasivo e (B) sistema de análise em computador..... 38

Figura 5 - Exemplificação do sistema do retículo, contendo 50 barras horizontais e 100 pequenos traços verticais, utilizado na análise morfométrica..... 40

Figura 6 - Cinética da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos instilados com sílica (10 mg)..... 44

Figura 7 - Análise morfológica dos pulmões de camundongos submetidos à instilação de sílica (10 mg/50 µl i.n.)..... 45

Figura 8 - Análise morfométrica dos pulmões de camundongos instilados com sílica (10 mg)..... 46

Figura 9 - Avaliação dos níveis de óxido nítrico no lavado broncoalveolar de camundongos instilados com sílica (10 mg)..... 48

Figura 10 - Avaliação da geração de peroxinitrito no pulmão de camundongos submetidos à instilação de sílica (10 mg/50 µL i.n.)..... 50

Figura 11 - Análise da função pulmonar de camundongos expostos ao composto doador de óxido nítrico DETANonoato (0,61 µmoles/animal)..... 52

Figura 12 - Análise da função pulmonar dos camundongos instilados com sílica (10 mg) e tratados com o inibidor de NOS, o L-NAME (30 mg/kg, v.o.)..... 54

Figura 13 - Avaliação de iNOS nos pulmões de camundongos submetidos à instilação de sílica (10 mg/50 µL i.n.)..... 56

Figura 14 - Análise da função pulmonar dos camundongos $iNOS^{+/+}$ e $iNOS^{-/-}$ estimulados com sílica (10 mg/50 µl i.n.)..... 58

Figura 15 - Análise da função pulmonar dos camundongos $iNOS^{+/+}$ e $iNOS^{-/-}$ estimulados com sílica (10 mg/50 µl i.n.)..... 59

Figura 16 - Análise morfológica dos pulmões de camundongos $iNOS^{+/+}$ e $iNOS^{-/-}$ submetidos à instilação de sílica (10 mg/50 µl i.n.)..... 61

Figura 17 - Análise morfológica dos pulmões de camundongos $iNOS^{+/+}$ e $iNOS^{-/-}$ submetidos à instilação de sílica (10 mg/50 µl i.n.)..... 62

Figura 18 - Análise da função pulmonar dos camundongos estimulados com sílica (10 mg/50 µl i.n.) e submetidos ao contato com inibidor da iNOS, o 1400W (2 mg/kg, i.p.)..... 64

Figura 19 - Análise morfológica dos pulmões de camundongos $iNOS^{+/+}$ e $iNOS^{-/-}$ submetidos à instilação de sílica (10 mg/50 µl i.n.) e ao composto 1400W (2 mg/kg, i.p.)..... 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL –	Microlitro
µm –	Micrômetro
µM –	Micromolar
ATP –	Trifosfato de adenosina
B6.129 P2-NOS2 –	Camundongos $iNOS^{-/-}$
BSA –	Soro fetal Bovino
C57BL/6 –	Camundongos $iNOS^{+/+}$
CECAL –	Centro de Criação de Animais
CEUA –	Comitê de Ética de Uso de Animais
cmH_2O –	Centímetro de água
DPOC –	Doença pulmonar obstrutiva crônica
E.P.M. –	Erro padrão da média
EDTA –	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS –	Óxido nítrico sintase endotelial
ERN –	Espécies reativas de nitrogênio
ERO –	Espécies reativas de oxigênio
FIOCRUZ –	Fundação Oswaldo Cruz
h –	Hora
i.n. –	Intranasal
i.p. –	Intraperitoneal
i.v. –	Intravenoso
iNOS –	Óxido nítrico sintase induzida
LBA –	Lavado broncoalveolar
LPS –	Lipopolissacarídeo

M –	Molar
MAPK –	Proteína quinase ativadora da fase mitótica
mg –	Miligrama
mL –	Mililitro
nm –	Nanômetro
nNOS –	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS –	Óxido nítrico sintase
ºC –	Grau Célsius
OMS –	Organização Mundial de Saúde
PBS –	Salina tamponada com fosfato
PNK –	Nitrotirosina
rpm –	Rotações por minuto
SUS –	Sistema único de saúde
TRIS –	Tampão tris salina
v.o. –	Via oral

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	**REVISÃO DA LITERATURA**	15
1.1	**Sistema respiratório**	15
1.1.1	Pulmão	15
1.1.1.1	Função pulmonar	17
1.1.1.2	Hiper-reatividade pulmonar	18
1.2	**Doenças respiratórias**	19
1.3	**Sílica**	19
1.4	**Silicose**	20
1.4.1	Epidemiologia	23
1.4.2	Formas e manifestações clínicas	24
1.4.3	Diagnóstico	25
1.4.4	Tratamentos	26
1.5	**Silicose e espécies reativas**	27
1.5.1	Espécies reativas de oxigênio	28
1.5.2	Espécies reativas de nitrogênio	29
1.6	**Óxido nítrico**	29
1.6.1	Efeitos biológicos do NO	31
1.6.2	NO e doenças respiratórias	32
2	**OBJETIVOS**	34
2.1	**Objetivo geral**	34
2.2	**Objetivos específicos**	34
3	**MATERIAIS E MÉTODOS**	36
3.1	**Animais**	36
3.2	**Modelos de estimulação intranasal.**	36
3.3	**Tratamento**	37
3.4	**Avaliação da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas**	37
3.5	**Análises histológicas**	39
3.5.1	Morfometria	39
3.5.2	Imuno-histoquímica	40
3.5.3	Análise digital	41

3.6 **Quantificação do óxido nítrico pela técnica de Griess**..... 41
3.7 **Análise estatística**..... 42
4 **RESULTADOS**..... 43
5 **DISCUSSÃO**..... 66
6 **CONCLUSÃO**..... 74
REFERÊNCIAS..... 75
ANEXO – Certificado de aprovação pela Comissão de ética no uso de animais..... 90

INTRODUÇÃO

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Sistema respiratório

O sistema respiratório é dividido em duas porções principais: uma condutora e outra respiratória. A porção condutora é composta pelas cavidades nasais, nasofaringe e orofaringe, laringe, traquéia, brônquios e bronquíolos. Ela possibilita a passagem do ar entre o meio externo e a porção respiratória. Nesta outra classificação, que consiste nos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos, seus componentes desempenham como função a troca gasosa entre o sangue e o ar inalado, ou seja, a hematose. Na respiração, além destas porções, existe o mecanismo de ventilação, comandado pelos movimentos de inspiração e expiração da caixa torácica, que são realizados com a ajuda de quatro elementos: a cavidade torácica, músculos intercostais associados, músculo diafragma e tecido conjuntivo elástico do pulmão (Kierszenbaum e Tres, 2012). No sistema respiratório, as superfícies epiteliais são constantemente expostas a inúmeros tipos de contaminantes em suspensão no ar atmosférico, como partículas inorgânicas, vírus e bactérias. Além disto, a flora nasofaríngea é regularmente aspirada durante o sono, mesmo nos indivíduos saudáveis (Kumar *et al.*, 2007). Estas ocorrências propiciam o surgimento de doenças respiratórias que desencadeiam um processo inflamatório e fibrótico, culminando na progressiva alteração das estruturas das vias aéreas e, consequente, na diminuição de suas trocas gasosas (Campos *et al.*, 2003).

1.1.1 Pulmão

O pulmão é um órgão vital. Sua principal função é possibilitar um contato íntimo do ar inspirado com os capilares pulmonares, ricos em sangue venoso, viabilizando a hematose e, consequentemente, a oxigenação sanguínea. No ser humano existem dois pulmões, tendo em média 25 centímetros de altura e pesando 700 gramas. Eles estão localizados sobre o músculo

diafragma, dentro da cavidade torácica. Anatomicamente, existe o pulmão esquerdo e o direito, que dividem-se em 2 e 3 lobos, respectivamente. Neste contexto, há uma membrana denominada pleura, que é classificada em duas camadas: a visceral, intimamente ligada ao revestimento externo dos pulmões, sendo composta do epitélio pavimentoso simples (mesotélio) associado a um tecido conjuntivo frouxo rico em fibras elásticas, e uma camada mais espessa denominada parietal, que reveste a superfície interna da cavidade torácica. Entre elas existe um estreito espaço preenchido pelo líquido visceral, que diminui o atrito causado pelos movimentos de inspiração e expiração entre as duas membranas. Os vasos sanguíneos da pleura visceral derivam dos vasos sanguíneos pulmonares e bronquiais; já os vasos que suprem a pleura parietal derivam dos vasos sanguíneos sistêmicos (Kierszenbaum e Tres, 2012).

Os pulmões são formados por várias subdivisões dos brônquios. Estas estruturas iniciam-se após a bifurcação na porção final da traqueia, que culmina em dois brônquios principais. Cada ramo segue em direção a um pulmão, direito ou esquerdo. Quanto mais distal, menor será o diâmetro dos brônquios, que recebem outras classificações (brônquios lobares e segmentares) de acordo com suas características estruturais. Os ramos menores dos brônquios segmentares são os bronquíolos (cerca de 1 mm de diâmetro), que ramificam-se repetidamente, dando origem aos bronquíolos terminais. Sendo esta a estrutura mais distal da porção condutora, não estão envolvidos na troca gasosa. Finalmente, dividem-se originando os bronquíolos respiratórios, primeiros componentes da porção respiratória, terminando em inúmeras unidades estruturais chamadas de sacos alveolares e alvéolos, que são formados por uma camada única e contínua de epitélio pavimentoso contendo dois tipos celulares: os pneumócitos de tipo I, componentes estruturais da parede alveolar, e os pneumócitos do tipo II, que são células arredondadas produtoras de fatores importantes como a substância tensoativa pulmonar (surfactante). Além destas células, encontram-se macrófagos pulmonares responsáveis pela ação fagocítica aos antígenos não próprios do indivíduo (Kumar *et al.*, 2007).

Apesar dos poucos dados na literatura, a análise comparativa sobre aspectos anatômicos indica haver diferenças consideravelmente importantes entre a arquitetura do pulmão de humanos e roedores (Schlesinger e Mcfadden, 1981). Nesse contexto, camundongos foram melhor caracterizados devido a sua grande utilização em pesquisas acerca de doenças pulmonares (Irvin e Bates, 2003). Foi verificado que a árvore respiratória de camundongos possui menor número de ramificações (menos 4 a 6) e que esses possuem dois pulmões: o direito contendo quatro lobos (inferior, médio, superior e pós-cava) e o

esquerdo com apenas um lobo (Fox *et al.*, 2007). Mais ainda, o parênquima pulmonar murino ocupa uma fração maior comparativamente a humanos, com volume total pulmonar de 18% e 12%, respectivamente. Os camundongos possuem, ainda, alvéolos de menor tamanho do que os humanos, o que implica na necessidade de uma frequência respiratória mais acelerada no sentido de permitir a manutenção da homeostasia. A capacidade pulmonar vital também é diferente, sendo 1 mL em camundongos e 6.000 mL em humanos. Pelo fato do diâmetro das vias aéreas ser maior em camundongos do que em humanos, há uma menor resistência ao fluxo de ar nos primeiros, o que justifica a elevada frequência respiratória (entre 90 e 200 incursões por min) nestes animais (Irvin e Bates, 2003).

1.1.1.1 Função pulmonar

A retração e expansão dos pulmões ocorre de duas formas: i) pelos movimentos de contração e relaxamento do músculo esquelético diafragma, que reduz ou aumenta, respectivamente, a pressão intratorácica, e ii) pela elevação e depressão das costelas realizada pelos músculos intercostais e outros músculos acessórios, que expandem ou diminuem o diâmetro anteroposterior da cavidade torácica. Durante uma respiração normal o músculo diafragma se contrai e desce, aumentando o tamanho da caixa torácica e, consequentemente, tornando a pressão interna menor, permitindo a entrada de ar nos pulmões. No entanto, na expiração o diafragma relaxa e sobe, fazendo com que o aumento da pressão intratorácica comprima os pulmões, expulsando grande parte do ar pulmonar. Na expiração forçada, além dessas estruturas já mencionadas, ocorre a participação dos músculos abdominais, que pressionam o conteúdo abdominal contra o diafragma, auxiliando a saída do ar pulmonar.

Os pulmões são estruturas bastante elásticas que entrariam em colapso, ou seja, colabariam caso não houvesse nenhuma força para mantê-los inflados, fenômeno conhecido como pneumotórax (Luh, 2010). Isto normalmente não acontece, pois existe um equilíbrio entre as forças exercidas entre o pulmão e a cavidade torácica, mantido pela pressão negativa do líquido intrapleural (pressão intrapleural, variando entre -5 a -7,5 cmH_2O). Esta força existe graças ao bombeamento contínuo do excesso do líquido intrapleural para o sistema linfático. No entanto, na porção pulmonar interna existe a pressão alveolar, que é referente à força exercida no pulmão no momento de repouso, ou seja, entre uma inspiração e expiração. Neste intervalo ela é igual a pressão atmosférica, sendo considerada a pressão zero de

referência nas vias aéreas (0 cmH_2O), porém ela é alterada durante os movimentos de inspiração (-1 cmH_2O) e expiração (1 cmH_2O) pulmonares. A diferença entre a pressão alveolar e a intrapleural é denominada pressão transpulmonar. Esta é responsável por controlar o fluxo de entrada e saída de ar nos pulmões (Hall e Guyton, 2011).

A compreensão destes parâmetros é importante, pois na maioria das doenças respiratórias ocorre um rompimento do equilíbrio natural entre as pressões internas e externas do pulmão. Por isso, os testes de função pulmonar por meio de equipamentos com sensibilidade suficiente para identificar, diagnosticar e acompanhar alterações na mecânica respiratória são cada vez mais utilizados na clínica médica e pesquisa científica. Neste contexto, destacam-se os testes de broncoprovocação com algum agente broncocontrictor, como carbacol, histamina, metacolina e serotonina. Estes mediadores são aerossolizados nas vias aéreas através de aparelhos, induzindo uma alteração controlada do fluxo de entrada e saída do ar nos pulmões, que é mensurada pelos transdutores, gerando dados que são interpretados por um computador. Nestes testes, são geralmente avaliados dois parâmetros: iii) resistência e iv) elastância pulmonares. O primeiro caso indica a capacidade das vias aéreas e parênquima pulmonar de resistirem ao fluxo de ar, sendo normalmente expressa em cmH_2Os/mL. Todavia, a elastância, que é o oposto da complacência, avalia a distensibilidade pulmonar através da sua disposição em retornar a conformação original de repouso após cessar a força de deformação, sendo descrita em cmH_2O/mL (Grinnan e Truwit, 2005).

1.1.1.2 Hiper-reatividade pulmonar

Em algumas disfunções respiratórias, como a asma brônquica e doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC), ocorre um fenômeno nas vias aéreas denominado hiper-reatividade pulmonar (Scichilone *et al.*, 2006; Anderson, 2010). Este termo foi utilizado pela primeira vez por Woolcock e Peat (1989) e, desde então, vem sendo empregado para definir a forma intensa com que estes indivíduos doentes respondem a determinados fármacos broncoconstritores nos testes de broncoprovocação. A princípio, esse quadro está associado à inflamação, que altera a contratilidade da musculatura lisa peribrônquica. Em determinado estudo, mostrou-se que na condição patológica ocorre uma alteração da via MAPK, que culmina na ativação de fatores de transcrição, induzindo produção e liberação de ácido araquidônico, assim como os eicosanoides, propiciando, então, aumento da contratilidade das

vias aéreas (An e Fredberg, 2007). No entanto, sabe-se que diversos mediadores estão envolvidos na contração da musculatura lisa, como o óxido nítrico (Gao, 2010). Além disso, a inflamação é composta por fenômenos complexos, o que torna necessário maiores estudos para compreender os mecanismos do fenômeno da hiper-reatividade pulmonar.

1.2 **Doenças respiratórias**

São classificadas como doenças respiratórias todas aquelas que interferem no bom funcionamento das vias aéreas e órgãos que compõem o sistema respiratório. Elas podem ter diversas causas, tais como alergia, predisposição genética, exposição do indivíduo à determinadas partículas, entre outras. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças respiratórias são responsáveis por grande parte das mortes de adultos e crianças em todo o mundo. No último grande estudo realizado pela OMS, os dados indicaram que cerca de 4,3 milhões de pessoas morreram por doenças respiratórias crônicas no ano de 2008, porém com estimativa de alcançar aproximadamente 6,6 milhões de pessoas no ano de 2030, majoritariamente nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (Organização Mundial Da Saúde, 2012). No Brasil as doenças respiratórias são consideradas a segunda maior causa de internações, responsáveis por cerca de 16 % do total de internações realizadas no Sistema Único de Saúde (SUS), consumindo grande parte das verbas destinadas à saúde pública, de acordo com a listagem estatística do departamento de informática do SUS (Datasus, 2012).5

1.3 **Sílica**

A sílica, ou dióxido de silício (SiO_2), é um composto abundante e facilmente encontrado em todo o planeta Terra, na forma amorfa e cristalina. Em ambas, suas moléculas podem combinar-se em diferentes arranjos estruturais (polimorfos). As formas amorfas mais comuns são opala, terra de diatomáceas (tripolita), sílica rica em fibra de vidro, sílica ativa, lã de rocha e vidro (sílica vítrea) (Greenberg *et al.*, 2007). No entanto, o quartzo, a tridimita e a cristobalita são formas cristalinas. Entre elas, o quartzo é o que representa o recurso mineral

mais comum, que está presente em concentrações variáveis no granito e arenito, cujo teor é de aproximadamente 67% e 25-40% de sílica, respectivamente (Greenberg *et al.*, 2007). No entanto, a tridimita e a cristobalita são formadas naturalmente em rochas magmáticas efusivas ácidas sob elevadas temperaturas, que convertem o quartzo e a sílica amorfa nessas estruturas cristalinas. Porém, elas podem ser produzidas artificialmente em condições especiais de temperatura e pressão (Armington, 2000). Além desses elementos, a keatita, a coesita e a stishovita também são formas cristalinas, porém mais raras. Cada um destes polimorfos possui sua estrutura interna e morfologia externa características.

Atualmente, a sílica apresenta uma grande importância comercial pois, além de originar o silício (componente cuja capacidade de semicondução está sendo largamente utilizada na fabricação de circuitos eletrônicos pelas indústrias de informática, microeletrônica e eletrônica), é a matéria prima presente na produção de materiais de construção, como cerâmica e concreto armado, esmaltes, fertilizantes (rocha fosfática), talco, vidro, entre outros, sendo, inclusive, utilizada na fabricação de fornos industriais. Adiciona-se a isto o fato de que essas partículas estão presentes nas atividades de, por exemplo, confecção de prótese dentária; extração e beneficiamento de rochas; jateamento de areia; mineração de ouro, arsênico, estanho e de pedras preciosas; perfuração de poços; retífica e polimento de metais e minerais com abrasivos; entre outras (Terra Filho e Santos, 2006), o que propicia cada vez mais o contato do homem com essas partículas.

1.4 **Silicose**

A silicose é uma doença respiratória com evolução progressiva, causada pela inalação de pequenas partículas de sílica cristalina (0,5 - 10 µm). Por outro lado, apesar de ter sido considerada por muitos anos inerte, a forma amorfa também tem seus efeitos deletérios no homem (Ghiazza *et al.*, 2010; Costantini *et al.*, 2011). No ar atmosférico existem diversas partículas em suspensão. Porém, o aparelho respiratório possui barreiras físicas, mecânicas e celulares que filtram o ar inalado e impedem que essas estruturas estranhas ao organismo cheguem nos pulmões (Waterer, 2012). Por isso, as partículas de sílica com diâmetros maiores que 10 µm são eficientemente filtradas no nariz e na nasofaringe, e as moléculas menores que conseguem ultrapassar esta barreira inicial são retidas nos cílios e muco do epitélio respiratório e, posteriormente, são depuradas. Todavia, algumas (geralmente com

cerca 0,5 - 5 µm de diâmetro) alcançam a porção respiratória mais terminal, os alvéolos pulmonares, sendo fagocitadas pelos macrófagos residentes, induzindo um processo inflamatório, caracterizado, a princípio, como uma alveolite, podendo evoluir para um quadro de fibrose (Begin *et al.*, 1987). Neste contexto, a silicose é considerada uma doença ocupacional por ser geralmente adquirida em meio a um trabalho insalubre, como a exploração de ouro e outros minerais, que expõe o indivíduo às partículas de sílica.

Inicialmente, devido as suas características físico-químicas, as partículas interagem diretamente com os epitélios das vias aéreas, reagindo com a água, lipídios e proteínas dessas células, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) que podem causar lesão celular caso os mecanismos antioxidantes do indivíduo, formados principalmente pelas enzimas superóxido dismutase, glutationa peroxidase, catalase e transferrina, não consigam tornar inócuos tais radicais livres. Neste caso, ocorre perda de integridade dos pneumócitos tipo I e II, além da ativação e proliferação dos macrófagos residentes, acometendo inicialmente as regiões peribronquiolares (Castranova, 2004). A inalação recorrente de sílica causa o surgimento e o progressivo aumento de nódulos fibróticos, ou seja, granulomas, além de fibrose intersticial difusa (Rom e Markowitz, 2007).

Nesse contexto, o disparo inicial e a manutenção da resposta inflamatória da silicose parecem estar associados às células fagocíticas, principalmente os macrófagos (Hamilton *et al.*, 2008). As partículas de sílica interagem com receptores “scavengers” dos macrófagos (Figura 1) e são internalizadas em vesículas (fagossomos) que irão se fundir com lisossomos presentes no citoplasma (Hamilton *et al.*, 2008). Essa junção acaba propiciando o dano e ruptura lisossomal, liberando enzimas proteolíticas, peroxidases e radicais livres no meio intracelular, culminando na formação e ativação de um complexo multiproteico denominado NALP3 inflamassoma (Martinon *et al.*, 2002). Esta estrutura é composta pela proteína NALP3 (também conhecida como criopirina ou NLRP3) ativada e, em seguida, ligada à molécula adaptadora ASC (“apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD”) pelos domínios pirinas, que associa-se a uma caspase-1 pela interação CARD-CARD (“caspase activation and recruitment domain”) (Agostini *et al.*, 2004).

A NALP3 é capaz de ativar a caspase-1 em resposta a diversos estímulos, como o trifosfato de adenosina (ATP), cristais de urato monossódico e endotoxinas de bactérias, como o LPS (Mariathasan *et al.*, 2006; Martinon *et al.*, 2006). Além disso, ela integra a família NLR composta por um total de 20 proteínas. Estas possuem três domínios característicos: a porção variável amino-terminal, uma região central contendo sítios de ligação para nucleotídeos e um domínio carboxi-terminal rico em sequências de leucinas repetidas. A

região amino-terminal pode ser encontrada em duas formas diferentes: pirina (NALP) ou CARD (Lamkanfi e Dixit, 2009).

Na inflamação induzida pela sílica, o NALP3 inflamassoma é um importante modulador desta resposta, pois induz, via caspase-1, a clivagem e, consequentemente, a ativação das formas precursoras pró-IL-1β, pró-IL-18 e pró-IL-33 nas respectivas citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IL-18 e IL-33, além de participar da indução de uma via de morte celular denominada piroptose (Fink e Cookson, 2005). Na piroptose diversas citocinas são liberadas para o meio extracelular com a ruptura da membrana plasmática, corroborando para o processo inflamatório (Bergsbaken *et al.*, 2009). Em outros estudos com modelo animal, o NALP3 inflamassoma desempenhou um papel crucial na produção de ERO, mostrando-se também necessário ao estabelecimento do quadro fibrótico crônico na silicose murina, reiterando sua importância na resposta inicial e crônica da silicose (Cassel *et al.*, 2008).

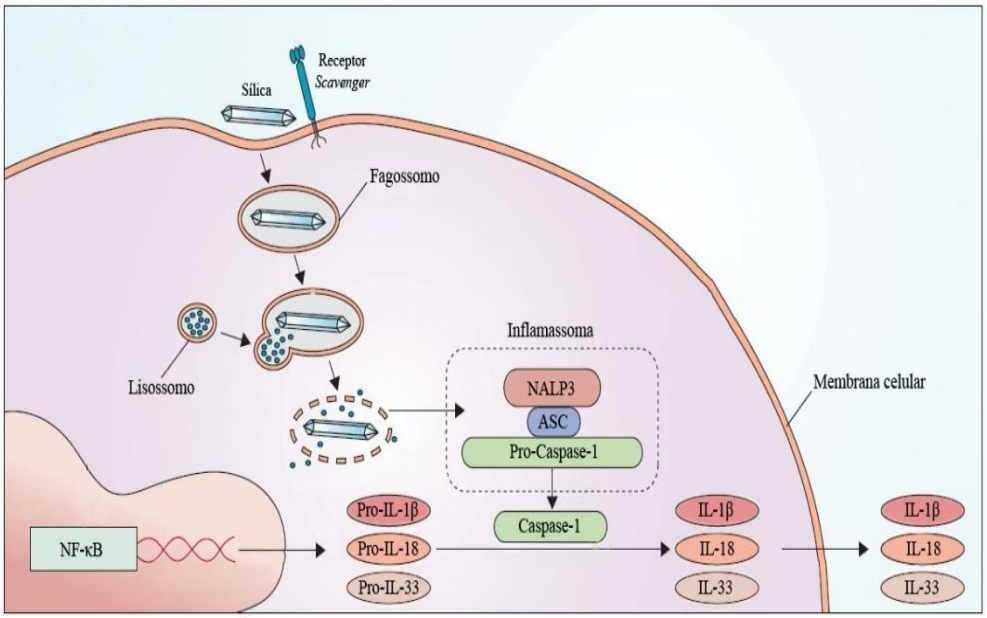


Figura 1: Esquema da internalização da partícula de sílica, endocitada através de fagossomo. A lise do vacúolo digestivo (fagossomo + lisossomo) ativa o complexo inflamassoma induzindo conversão de pró-citocinas em citocinas, corroborando para a inflamação. Figura adaptada de Leung *et al.* (2012).

1.4.1 Epidemiologia

A silicose possui grande incidência no mundo todo, porém em muitos países o número de indivíduos silicóticos pode ser subestimado, principalmente pela carência de dados estatísticos que abordam esse assunto. Geralmente, os países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento apresentam maiores taxas de prevalência dessa doença que os desenvolvidos (Leung *et al.*, 2012). Só no Brasil, atualmente, são mais de 6 milhões de trabalhadores expostos à sílica, principalmente na construção civil e mineração. As estimativas especulam que só no ano de 2007 existiram cerca de 300.000 casos de silicose em território brasileiro (Ribeiro *et al.*, 2010). Na Índia a situação não é diferente. Cerca de 7 milhões de trabalhadores estão expostos a diversos tipos de partículas causadoras de pneumoconioses, dentre as quais a silicose possui maior importância epidemiológica, devido a sua elevada prevalência (12 - 54%) na população indiana (Saiyed e Tiwari, 2004). Todavia, destacando-se de todos os outros países, a China possui o maior número registrado de paciente silicótico, apresentando mais de 500.000 casos entre os anos de 1991 e 1995. Anualmente são contabilizados 6.000 novos casos e 24.000 mortes em decorrência dessa doença (Tse *et al.*, 2007). Em outra situação, a análise de dados da autópsia de quase 20.000 homens, que trabalhavam em minas de ouro na África do Sul, revelou uma alta prevalência de silicose nessa população (8% e 14% para trabalhadores negros e brancos, respectivamente), durante o período de 1975 a 2007 (Nelson *et al.*, 2010).

Nos países desenvolvidos o número de casos de silicose também é alarmante. No período de 1991 e 1993, somente em 15 países da União Européia (composta por 27 Estados-membros) existiam cerca de 32 milhões de trabalhadores que tinham contato com algum poluente atmosférico em seus respectivos locais de trabalho, sendo que desses mais de 3 milhões eram expostos somente às partículas de sílica (Kauppinen *et al.*, 2000). No continente norte americano, o NIOSH ("National Institute for Occupational Safety and Health") estima que, nos Estados Unidos, aproximadamente mais de 3 milhões de trabalhadores foram expostos às partículas de sílica no ano de 1983 (Castranova *et al.*, 1996). Sendo a silicose a responsável por mais de 14.000 mortes entre o período de 1968 a 1994, de acordo com o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (EUA) (1995). Atualmente, através de mecanismos de controle de partículas liberadas, para a atmosfera, pelas indústrias e pela utilização de equipamentos de proteção pelos trabalhadores, adotados por alguns países, há uma lenta e progressiva diminuição do número de mortes por silicose nos países

desenvolvidos (Bang *et al.*, 2008), porém com períodos esporádicos de maior incidência de novos casos (Seaton *et al.*, 1991), revelando que medidas mais eficientes são necessárias para a erradicação dessa pneumoconiose.

1.4.2 Formas e manifestações clínicas

Em humanos, a silicose pode desenvolver-se de maneiras distintas, sendo classificadas em três formas. Na aguda, também denominada proteinose silicótica, observa-se um grande infiltrado inflamatório, que está presente em áreas peribrônquicas, induzido pelas partículas de sílica neste local. Esse infiltrado contém exsudado e células da resposta imunológica, como macrófagos, neutrófilos e em menor número os linfócitos. Apesar da inflamação no interstício e fibrose pulmonar, a presença de granulomas é facultativa (Hnizdo *et al.*, 1994). Geralmente ocorre após a inalação de grande quantidade de sílica num curto período de tempo, que varia de algumas semanas até 5 anos. Devido a essa característica, a forma aguda acomete principalmente os profissionais de atividades como jateamento de areia, perfuração de túneis, moagem de quartzo, entre outras que expõem mais intensamente seus trabalhadores às finas partículas de sílica recém-fraturadas (Marchiori *et al.*, 2007). Nessa forma os sintomas surgem em até alguns anos pós-exposição, manifestando-se através de fadiga, febre, perda de peso e tosse intensa, evoluindo rapidamente para a insuficiência respiratória aguda e culminando na morte do indivíduo (Terra Filho e Santos, 2006).

Outra forma da silicose é a acelerada. Esta pode ser considerada intermediária, pois ocorre de 5 a 10 anos após o início da exposição à sílica, sendo morfologicamente muito parecida com a silicose aguda (Ding *et al.*, 2002). A última forma de manifestação clínica da silicose, chamada de fase crônica, possui presença de fibrose e de granulomas em áreas com deposição de sílica no parênquima pulmonar (Ding *et al.*, 2002). Essa é a mais comum apresentação da silicose, que geralmente o paciente desenvolve após longos períodos (a partir de 10 anos) de inalação contínua de sílica, em pequenas quantidades (Greenberg *et al.*, 2007). Inicialmente, os pacientes não apresentam sintomas, porém, com a evolução da doença, é comum a presença de tosse, além de uma progressiva dificuldade respiratória. Neste estágio, o processo fibrótico no pulmão é bastante acentuado, havendo presença massiva de granulomas, muitos destes coalescidos, localizados principalmente na porções superiores deste órgão. Além disso, também podem ser observadas bolhas enfisematosas e um espessamento do

interstício pulmonar axial, juntamente com a hipertrofia dos linfonodos adjacentes ao pulmão (hiliares e mediastiniais), que por vezes apresentam calcificações, conferindo-lhes o formato de “casca de ovo” (Meirelles *et al.*, 2006). Os indivíduos silicóticos possuem uma maior propensão ao desenvolvimento de determinadas patologias, como a tuberculose pulmonar, além de constar na literatura uma grande correlação entre a sílica cristalina e o câncer pulmonar (Guha *et al.*, 2011; Milovanovic *et al.*, 2011).

1.4.3 Diagnóstico

Em geral o diagnóstico da silicose em seres humanos ocorre após análise do histórico de exposição às partículas de sílica pelo paciente, associada a exame de imagem, como a radiografia póstero-anterior do tórax. Neste caso, os nódulos fibróticos da silicose são revelados como áreas mais claras, geralmente predominantes nas porções posteriores dos terços superiores pulmonares (Marchiori *et al.*, 2001). Todavia, alguns pacientes, ao invés de apresentarem os nódulos silicóticos característicos, possuem uma fibrose difusa no interstício pulmonar (Kefeli *et al.*, 2012). Atualmente, com o surgimento de técnicas de diagnóstico mais precisas, como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, é cada vez mais fácil detectar a silicose em seu estágio inicial, possibilitando uma correlação mais precisa entre a fibrose e a perda da função pulmonar (Marchiori et al., 2001). Adicionalmente, outra medida importante foi desenvolvida pela Organização Internacional do Trabalho (2011), que criou diretrizes para auxiliar no diagnóstico de várias pneumoconioses, inclusive a silicose, através de um sistema de símbolos e pontos, de acordo com o tamanho e a forma das áreas opacas presentes na radiografia. Em linhas gerais, os métodos de imagens também podem ser utilizados na avaliação de complicações da silicose, como as infecções (por bactérias e fungos) e neoplasias pulmonares (Meirelles et al., 2006).

As medidas invasivas, como a biópsia, normalmente são consideradas métodos secundários, utilizados em casos nos quais o diagnóstico por imagem não corresponde ao histórico do paciente, sendo então necessária para a exclusão de outras doenças ou em casos clínicos avançados, funcionando como um indicador para o transplante pulmonar. Geralmente, um fragmento de tecido pulmonar é retirado através do procedimento de broncoscopia, evitando-se a biópsia a céu aberto do pulmão. Em seguida, o material histológico obtido é cortado, corado e analisado em microscopia de luz. O uso de um

polarizador pode auxiliar na localização de sílica, que possui birrefringência clara e irregular, mas sua presença só pode ser confirmada através de técnicas mais precisas, como a difração de raios X, pois pode ser confundida com o colágeno, também birrefringente à luz polarizada (Axer *et al.*, 1999).

Os testes de função pulmonar, como a espirometria, não são recomendados para o diagnóstico da silicose, pois pode não haver alteração na mecânica respiratória dos pacientes nos estágios iniciais da doença (Rosenman *et al.*, 2010). Apesar de não ser adequada para determinar a silicose, a espirometria pode ser utilizada para avaliar a presença de alteração funcional ou monitorar a evolução da doença no paciente. Outros critérios também podem ser avaliados através do teste de exercício, que podem revelar a dispnéia de esforço, um indicativo de insuficiência respiratória (Wang *et al.*, 1995).

1.4.4 Tratamentos

Atualmente não existe nenhuma cura para a silicose. Todos os tratamentos disponíveis procuram apenas aliviar os sintomas da doença. Entretanto, quanto mais rápida for a interrupção da inalação de sílica e seu diagnóstico, maiores são as chances de que as terapias existentes consigam estabilizar a doença, melhorando a qualidade de vida do indivíduo e aumentando as suas chances de sobrevivência.

Devido a sua potente ação anti-inflamatória, os corticosteróides têm sido bastante utilizados no tratamento da silicose, diminuindo o processo inflamatório restaurando, em parte, a função pulmonar. Porém, seu efeito benéfico é controverso, além de implicar, a longo prazo, na ocorrência de diversos efeitos colaterais. Estes podem surgir como calvície, erupções cutâneas (equimoses e púrpuras), espinhas, glaucoma, osteoporose, alterações cardiovasculares e metabólicas, entre outros, variando de acordo com a dose e o tempo de utilização do corticosteróide. Além disso, devido a sua imunossupressão, tal tratamento pode aumentar o risco de infecções no indivíduo (Greenberg *et al.*, 2007). Por isso, hoje existem diversos estudos científicos, em animais, que tentam encontrar alternativas para esta problemática, através da diminuição dos efeitos deletérios dos corticosteróides por meio de mudanças em sua estrutura química ou buscando novas terapias farmacológicas (Da Costa *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008).

Em alguns casos clínicos, o uso de fármacos broncodilatadores pode proporcionar alguma melhora na capacidade respiratória de pacientes silicóticos sintomáticos, que varia de acordo com o grau de fibrosamento pulmonar. Além disso, o uso de substâncias mucolíticas também auxilia na desobstrução das vias aéreas do indivíduo. Uma outra alternativa seria a lavagem broncoalveolar para retirar as partículas de sílica do pulmão. Este método é mais eficaz quando a silicose está na forma de silicoproteinose, pois, nos outros estágios, existe uma maior intersticialização da partícula, impossibilitando sua remoção (Banks e Parker, 1998).

Por fim, o transplante de pulmão também pode ser considerado uma opção no tratamento da silicose em pacientes terminais, já que estes não respondem satisfatoriamente às outras terapias existentes (esse tratamento, geralmente, é o último recurso para permitir uma sobrevida do indivíduo). As maiores causas do insucesso nessa cirurgia são a falência do enxerto e as infecções pulmonares, respondendo por mais da metade das mortes no primeiro ano pós-transplante. Outras complicações também podem resultar na morte dos indivíduos transplantados, e as mais frequentes são a bronquiolite obliterante (rejeição crônica), as alterações cardiovasculares, a doença linfoproliferativa, entre outras. Dados na literatura revelam que a sobrevida global dos transplantados foi de 79% em 1 ano, 64% em 3 anos, 52% em 5 anos e 29% em 10 anos, no período de 1994 a 2007 (Jatene *et al.*, 2009).

1.5 **Silicose e espécies reativas**

Na silicose, grande parte da patogenicidade ocorre devido à superfície da partícula de sílica, que interage com a matriz extracelular e ativa os macrófagos alveolares, desencadeando uma resposta inflamatória local. Nessas células, os fatores de transcrição induzem a produção e a liberação de citocinas, quimiocinas, enzimas líticas e espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) (Hamilton *et al.*, 2008). O acúmulo destas substâncias no macrófago resulta em dano e eventual morte celular por necrose ou apoptose, liberando a sílica para o meio extracelular, onde será novamente fagocitada, reiniciando o ciclo pró-inflamatório. Este processo induz o recrutamento de células inflamatórias para o sítio da inflamação, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos, que são responsáveis pela manutenção da inflamação crônica induzida pela sílica. Outras células adjacentes, como o fibroblasto, o endotélio e o epitélio respiratório, também podem expressar e secretar vários mediadores inflamatórios em

resposta aos produtos liberados pelos macrófagos ou às partículas de sílica (Vanhee *et al.*, 1995).

No geral, os danos celulares são causados pelas ERO e ERN, que são formadas por átomos ou moléculas que possuem um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, tornando sua estrutura instável e, consequentemente, reativa a outras moléculas, na busca de sua estabilidade. Mas nem todas as espécies reativas são radicais livres, pois algumas não apresentam elétrons desemparelhados (Halliwell e Gutteridge, 1990). As espécies reativas ocorrem naturalmente em grande parte das células eucariontes, através do processo de respiração celular aeróbica, ou seja, a partir da produção de ATP, através da redução completa do oxigênio à água na mitocôndria. Elas estão envolvidas em vários processos fisiológicos, como a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de mediadores biológicos. Todavia, essas espécies, reativas em excesso, podem causar diversos efeitos nocivos ao organismo, como as lesões celulares pela peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e membranas, danos no DNA, entre outros (Halliwell e Gutteridge, 1990).

1.5.1 Espécies reativas de oxigênio

Atualmente, as ERO estão divididas em dois grupos: radicalares e não radicalares. No primeiro são consideradas as moléculas cujo átomo de oxigênio possui um elétron desemparelhado, ou seja, são radicais livres. Neste grupo as espécies mais importantes são: a hidroxila ($HO^{\bullet}$), o superóxido ($O_2^{-\bullet}$), a peroxila ($ROO^{\bullet}$) e a alcoxila ($RO^{\bullet}$). Todavia, os não radicalares também interagem com as moléculas biológicas, sendo esses representados pelo oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl) (Krotz *et al.*, 2004).

Dentre as ERO o radical $HO^{\bullet}$ possui a maior reatividade, apresentando efeitos devastadores no organismo. Esta molécula possui meia-vida muito curta. Frequentemente, ela interage com outras estruturas por meio de sua adição às ligações insaturadas e/ou do sequestro de hidrogênio. A $HO^{\bullet}$ pode ser formada pela reação do H_2O_2 com metais de transição ou através da homólise da água por radiação ionizante, como os raios X, ultra-violeta (UV) e gama (γ) (Halliwell e Gutteridge, 1990). Dessa forma, a incidência de raios solares sobre a pele produz o radical $HO^{\bullet}$, em grande parte pela ação do UV nas moléculas de

água das células da epiderme e derme, sendo o responsável pelo surgimento de danos no DNA e, a longo prazo, por mutações e câncer no epitélio (Afaq, 2011).

1.5.2 Espécies reativas de nitrogênio

Em contrapartida, existem outros tipos de moléculas reativas denominadas ERN, sendo essas constituídas de átomo(s) de nitrogênio(s). Neste grupo incluem-se o óxido nítrico (NO), o óxido nitroso (N_2O_3), o ácido nitroso (HNO_2), o nitrito (NO_2^-), o nitrato (NO_3^-) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Halliwell e Gutteridge, 1990). Estas ERN estão envolvidas em diversos processos metabólicos, tais como modulação da pressão arterial, sistema imune, agregação plaquetária, neurotransmissão, entre outros. Algumas destas espécies podem ser altamente reativas, reagindo com diversas moléculas do organismo. Porém, existem outras mais seletivas que interagem com estruturas específicas, como os lipídios. Dentre as espécies reativas, o NO pode reagir com o $O_2^{-\bullet}$ produzindo o $ONOO^-$. Esta é uma molécula altamente oxidante que consegue promover o desequilíbrio redox da glutationa (via depleção de grupamentos –SH), além de induzir a fosforilação do inibidor κ-B (IκB) via complexo IκB quinase (IKK), permitindo, assim, a liberação e translocação do fator de transcrição nuclear κ-B (NF-κB) para o núcleo, levando a transcrição de diversos mediadores inflamatórios. Além disso, o $ONOO^-$ pode liberar do citocromo C no citosol e induzir morte celular por apoptose, via caspase. Esses mecanismos são fundamentais para o desenvolvimento de muitos processos patológicos (Pacher *et al.*, 2007).

1.6 **Óxido nítrico**

O óxido nítrico (NO) é um gás incolor em temperatura ambiente, sendo relativamente instável, com uma meia-vida curta (menos de 10 segundos). Apesar de ser pouco solúvel em água, consegue atravessar facilmente a membrana plasmática das células através de difusão (Denicola *et al.*, 1996). Ele também pode ser encontrado em duas formas iônicas: íon nitroxil (NO^-) e íon nitrônio (NO^+) (Gow e Ischiropoulos, 2001). No meio ambiente, o NO é formado naturalmente na troposfera, através das descargas elétricas dos relâmpagos (Derakhshan *et al.*,

2007). Porém, também pode ser liberado na atmosfera, juntamente com outras formas de óxidos de nitrogênio, por bactérias presentes no solo (nitrobactérias), sendo um intermediário das reações de desnitrificação (Conrad, 1996). Todavia, o NO é considerado um poluente atmosférico, pois pode ser produzido, através da combustão, pela reação do nitrogênio do ar com o oxigênio, principalmente por motores à explosão e pela indústria (Bell *et al.*, 2011; Knuckles *et al.*, 2011). Entretanto, na década 80 os pesquisadores Furchgott e Zawadzki (1980) provaram que o NO apresentava também efeitos biológicos e, desde então, aumenta progressivamente o número de pesquisas científicas tendo essas moléculas como alvo de estudo. Hoje o NO destaca-se entre as espécies reativas como um importante modulador de diversos processos biológicos (Dusse *et al.*, 2003).

Nesse contexto, a partir dos achados de Palmer *et al.* (1988), descobriu-se que no ser humano o NO é sintetizado a partir da L-arginina, um aminoácido presente em altas concentrações no sangue, fluido extra e intracelular. Sendo assim, sua síntese é realizada em duas etapas (Figura 2). Na primeira ocorre a oxidação de dois elétrons do nitrogênio guanidino na L-arginina, formando a Nω-hidroxi-L-arginina (NHA), numa reação de hidroxilação, na presença dos cofatores tetraidrobiopterina (BH4), Ca^{2+}-calmodulina, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), Flavin mononucleótido (FMN) e grupamento heme (HEME), além dos cosubstratos oxigênio (O_2) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Na segunda reação a NHA é convertida em L-citrulina, liberando uma molécula de NO (Marletta, 1993).

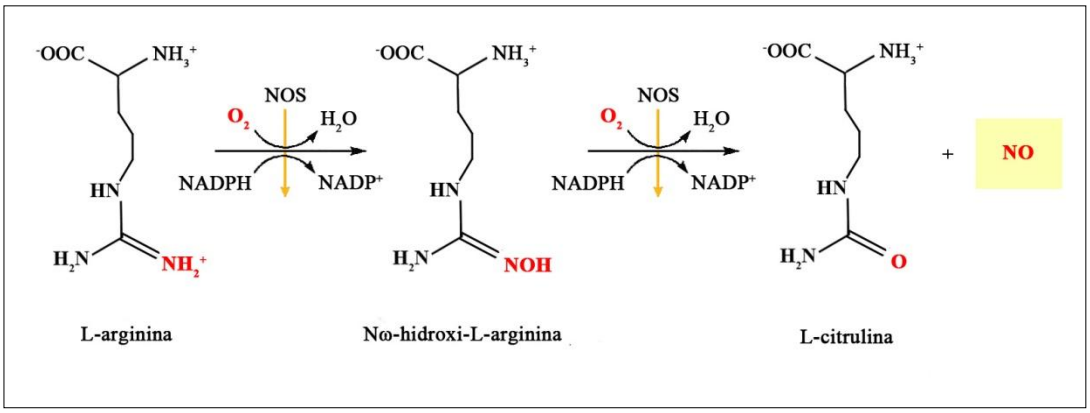


Figura 2: Conversão catalisada pela NOS, transformando L-arginina em L-citrulina e liberando uma molécula de NO.

Essas reações químicas de conversão da arginina são catalisadas pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), associada aos cofatores supracitados, em locais específicos dessa

enzima. Atualmente existem três isoformas clássicas da NOS caracterizadas pelo local de síntese, pelo padrão de expressão e pela dependência de Ca^{2+}, embora sejam encontradas em menores quantidades nos mais diversos lugares do organismo. São elas: eNOS (endotelial) , iNOS (induzível) e nNOS (neuronal).

As isoformas nNOS e eNOS são enzimas constitutivas bastante similares, porém a eNOS está associada à membrana plasmática de células endoteliais, através de suas ligações covalentes com fosfolipídeos da superfície celular. Já a nNOS é localizada majoritariamente em neurônios. Todavia, a iNOS tem sido vinculada aos processos inflamatórios, onde ocorre um aumento na sua expressão. Ela é encontrada, principalmente, em endotélios, macrófagos, fibras musculares lisas, neutrófilos e plaquetas. Essas enzimas NOS possuem dois domínios com atividades catalíticas independentes. São eles: i) oxigenase N-terminal e ii) redutase C-terminal. Em i) existe sítio de ligação para os cofatores HEME e BH4, e está ligado através do complexo Ca^{2+}-calmodulina ao ii), que contém FAD, FMN e NADPH (Tennyson e Lippard, 2011). A alteração da concentração de Ca^{2+} intracelular interfere na quantidade de íons de Ca^{2+} ligados à calmodulina, influenciando diretamente na ativação enzimática das NOS, principalmente nas isoformas constitutivas (nNOS e eNOS), sendo por isso, consideradas Ca^{2+}-dependentes (Tennyson e Lippard, 2011). Entretanto, dados na literatura apontam para a existência de outra isoforma expressa constitutivamente: a mNOS (mitocondrial). Ela está localizada na membrana mitocondrial interna, sendo capaz de regular os processos da respiração mitocondrial e o potencial transmembranar mitocondrial, através de sua atividade Ca^{2+} dependente (Ghafourifar e Richter, 1997).

1.6.1 Efeitos biológicos do NO

No ser humano o NO atua como um mediador químico, exercendo as mais variadas funções biológicas, tais como: a agregação plaquetária, a alteração metabólica, a atividade neuronal, a contração muscular e a resposta imunológica. Estas múltiplas funções são decorrentes da grande plasticidade do NO, que é capaz de interagir com diversos tipos de biomoléculas, como metais, tióis, além de outras espécies reativas (Derakhshan *et al.*, 2007). Grande parte dos efeitos do NO ocorre através da ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC), enzima heterodimérica formada por uma subunidade alfa (α1 ou α2) e beta, resultando na transformação de guanosina 3',5'-monofosfato (GMP) em sua forma cíclica (cGMP), que atua

como segundo mensageiro em vários tipos celulares (macrófagos, miócitos, neurônios, plaquetas, entre outros), nos processos de vasodilatação, agregação plaquetária, sinapse e contração de musculatura lisa (Friebe e Koesling, 2009). A afinidade do NO por centros metálicos, como grupamentos heme e outros grupos com ligações de ferro-enxofre, é importante tanto para a ativação da sGC (contém uma molécula de heme) quanto para sua inativação pela hemoglobina (Évora *et al.*, 2002).

Na mitocôndria o NO também consegue ligar-se ao grupamento heme da citocromo C oxidase (CcO) (proteína da cadeia transportadora de elétrons), através da competição com o oxigênio. Este processo resulta na diminuição da produção de ATP da respiração mitocondrial, sendo considerado uma resposta adaptativa da mitocôndria à situações adversas (Carreras e Poderoso, 2007). Em outra situação, o NO pode reagir com os grupamentos tióis (-SH) em um processo denominado S-nitrosilação. Nesse caso, o NO forma uma ligação reversível, altamente específica, com proteínas, que podem ser a albumina, a hemoglobina, os fatores de transcrição, entre outras. A reação de S-nitrosilação ocorre, inclusive, em concentrações fisiológicas do NO (Stamler, 1994). Nesse sentido, a S-nitrosilação tem se mostrado um importante mecanismo de ação do NO dentro de um organismo biológico. Entretanto, de modo geral, o papel do NO ainda é paradoxal, pois seus efeitos anti-inflamatórios e pró-inflamatórios variam de acordo com a concentração desse mediador no local de ação. Se, por um lado, o NO através da S-nitrosilação suprime a função do fator nuclear-κB (NF-κB) e diminui a inflamação (Gaston *et al.*, 2006), por outro, o NO pode se combinar com espécies reativas, como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), originando o peroxinitrito ($ONOO^-$), gerando lesão tecidual e liberação de mecanismos celulares pró-infamatórios (Pacher *et al.*, 2007).

1.6.2 NO e doenças respiratórias

No início da década de 90, Alving e colaboradores (Alving *et al.*, 1993) evidenciaram a existência de NO presente no ar exalado por pacientes humanos asmáticos, o que foi sugestivo do envolvimento desse mediador no processo inflamatório associado à asma. Desde então, o NO tem sido implicado em diversas disfunções respiratórias, tais como a DPOC, a hipertensão pulmonar e a fibrose cística, que também apresentam um marcado componente inflamatório. Atualmente, sabe-se que o NO possui um papel modulador importante nas

respostas inflamatórias e imunológicas, em grande parte pelo seu envolvimento nas atividades microbicidas das células do sistema imune, como os macrófagos, e pela sua modulação na síntese de citocinas pró-inflamatórias (Bogdan, 2001).

Na silicose, a estimulação pelas partículas de sílica propicia a ocorrência de estresse oxidativo nos pulmões, principalmente pela indução/exacerbação da produção de NO, envolvendo majoritariamente a enzima iNOS tanto nas células endoteliais como em macrófagos (Vallyathan *et al.*, 1997). Após ativação destas células, o aumento dos níveis de NO irá favorecer a produção de alguns metabólitos tais como as ERO e ERN, que de forma conjunta atuam induzindo dano tecidual (Castranova, 2004). Além disto, existem evidências *in vitro* de que os processos de reparo tecidual e fibrose pulmonar estão atrelados ao aumento de NO, pela iNOS, tanto nas células epiteliais da vias aéreas (Xu *et al.*, 2006), quanto nos macrófagos alveolares (Misson *et al.*, 2004). Adicionalmente, experimentos *in vivo*, utilizando camundongos nocautes para iNOS versus os selvagens C57BL/6, também sugeriram que o NO derivado da forma induzível da NOS contribui para a fibrose e patogenia da sílica conforme verificado no modelo experimental de silicose murino (Zeidler *et al.*, 2004).

Dessa forma, o aumento da produção do NO tem sido utilizado pela clínica médica e pelos estudos experimentais, como um monitor da severidade e da evolução de tais doenças respiratórias (Taylor, 2012), o que o coloca como uma molécula-alvo importante para entender o disparo do processo inflamatório e consequente remodelamento tecidual pulmonar (Barnes *et al.*, 2010; Chow *et al.*, 2012; Salonen *et al.*, 2012). Porém, o papel do NO nestes fenômenos biológicos ainda não é totalmente conhecido, necessitando, portanto, de maiores estudos acerca a ação dessa molécula em diferentes sistemas (Fubini e Hubbard, 2003).

2 **OBJETIVOS**

2.1 **Objetivo geral**

Com base no que foi exposto, tivemos como objetivo deste projeto investigar a participação do NO nas alterações de função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas na condição do modelo experimental de silicose murina, desenvolvido em nosso laboratório. Uma possível correlação entre o NO e as alterações morfológicas da silicose foi igualmente analisada. Para tanto foram utilizados camundongos geneticamente modificados, submetidos ao processo de deleção do gene codificante para a enzima iNOS, bem como ferramentas farmacológicas que permitiram a interferência no processo de geração do NO.

2.2 **Objetivos específicos**

- Avaliar a cinética da função pulmonar (resistência e elastância) e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos normais e instilados com partículas de sílica, em tempos que variaram de 2 a 28 dias pós-sílica;
- Avaliar a cinética de alterações morfológicas no pulmão de camundongos normais e instilados com partículas de sílica, em tempos que variaram de 2 a 28 dias pós-sílica;
- Avaliar a produção de NO nas vias aéreas de camundongos normais e silicóticos, 7 e 28 dias pós-sílica;
- Avaliar o efeito da instilação com o doador de NO - DETANonoato - sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos normais, 7 dias após início do estímulo;
- Avaliar a produção de peroxinitrito no pulmão de camundongos normais e silicóticos, 7 e 28 dias pós-sílica;
- Avaliar o efeito do tratamento com o inibidor das enzimas NOS - L-NAME - sobre função pulmonar/hiper-reatividade das vias aéreas e alterações morfológicas em camundongos normais e silicóticos, 7 dias pós-sílica;

- Avaliar comparativamente função pulmonar/hiper-reatividade das vias aéreas e alterações morfológicas em camundongos selvagens ($iNOS^{+/+}$) e nocautes para iNOS ($iNOS^{-/-}$), normais e silicóticos, 7 e 28 dias pós-sílica;
- Avaliar o efeito do tratamento com o inibidor seletivo de iNOS - 1400W - sobre função pulmonar/hiper-reatividade das vias aéreas e alterações morfológicas em camundongos silicóticos, 7 e 28 dias pós-sílica.

3 **MATERIAIS E MÉTODOS**

3.1 **Animais**

Foram utilizados camundongos machos, das cepas Swiss-Webster, C57BL/6 ($iNOS^{+/+}$) e B6.129 P2-NOS2 ($iNOS^{-/-}$), de 6 a 8 semanas de idade, com pesos entre 18 a 20 g, oriundos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) (Licença 034/09), conforme o documento em anexo. Em todas as etapas experimentais, os animais foram mantidos em ambiente com temperatura 25 ± 2ºC, com ciclos de luminosidade controlados (12 h claro/12 h escuro), umidade a 55± 10%, além de serem fornecidos água e ração comercial *ad libitum*.

3.2 **Modelos de estimulação intranasal**

Para indução da silicose, os camundongos foram anestesiados com halotano (Tanohalo, Cristália, Itapira, SP) e, instilados com 50 µL de uma suspensão contendo 10 mg de partículas de sílica (0,5 - 10 µm, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) solubilizadas em salina (0,9 % de NaCl) estéril com o auxílio do sonicador ultrassônico (T14, Thornton), durante 15 min. Os animais do grupo controle receberam igual volume apenas com salina estéril. As análises foram realizadas em diferentes tempos após a estimulação com sílica (Figura 3). Em um outro grupo de experimentos, os animais receberam instilação intranasal do doador de óxido nítrico DETANonoato (0,61 µmoles/animal), diariamente durante 5 dias consecutivos, com análises realizadas 24 h após a última dose.

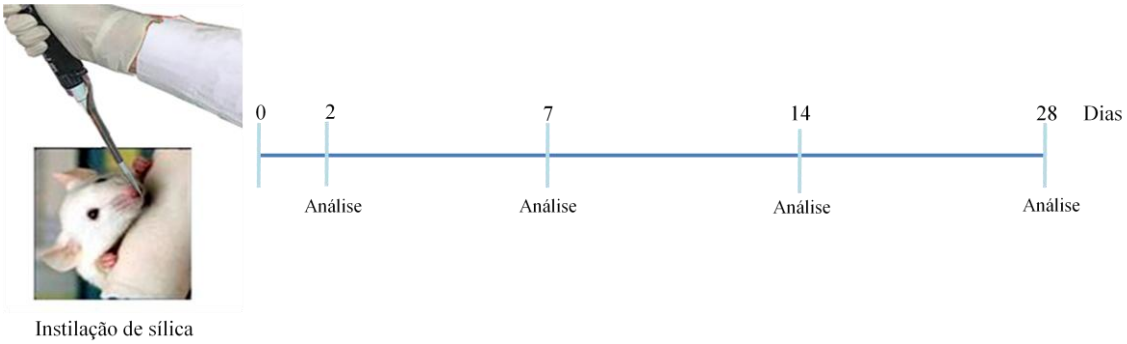


Figura 3: Esquema de indução de silicose em modelo murino e os tempos em que foram analisados os parâmetros do estudo.

3.3 **Tratamento**

Os animais foram tratados com o inibidor não seletivo de óxido nítrico sintase (NOS), L-NAME (30 mg/kg, v.o.), administrado diariamente por 5 dias consecutivos, iniciando-se 1 dia pós-sílica. No caso do inibidor seletivo de NOS induzida, 1400W, o tratamento foi também diário (2 mg/kg, i.p.), por 5 dias consecutivos, iniciando-se 23 dias pós sílica. Em ambos os casos, as análises foram realizadas 24 h após a última dose.

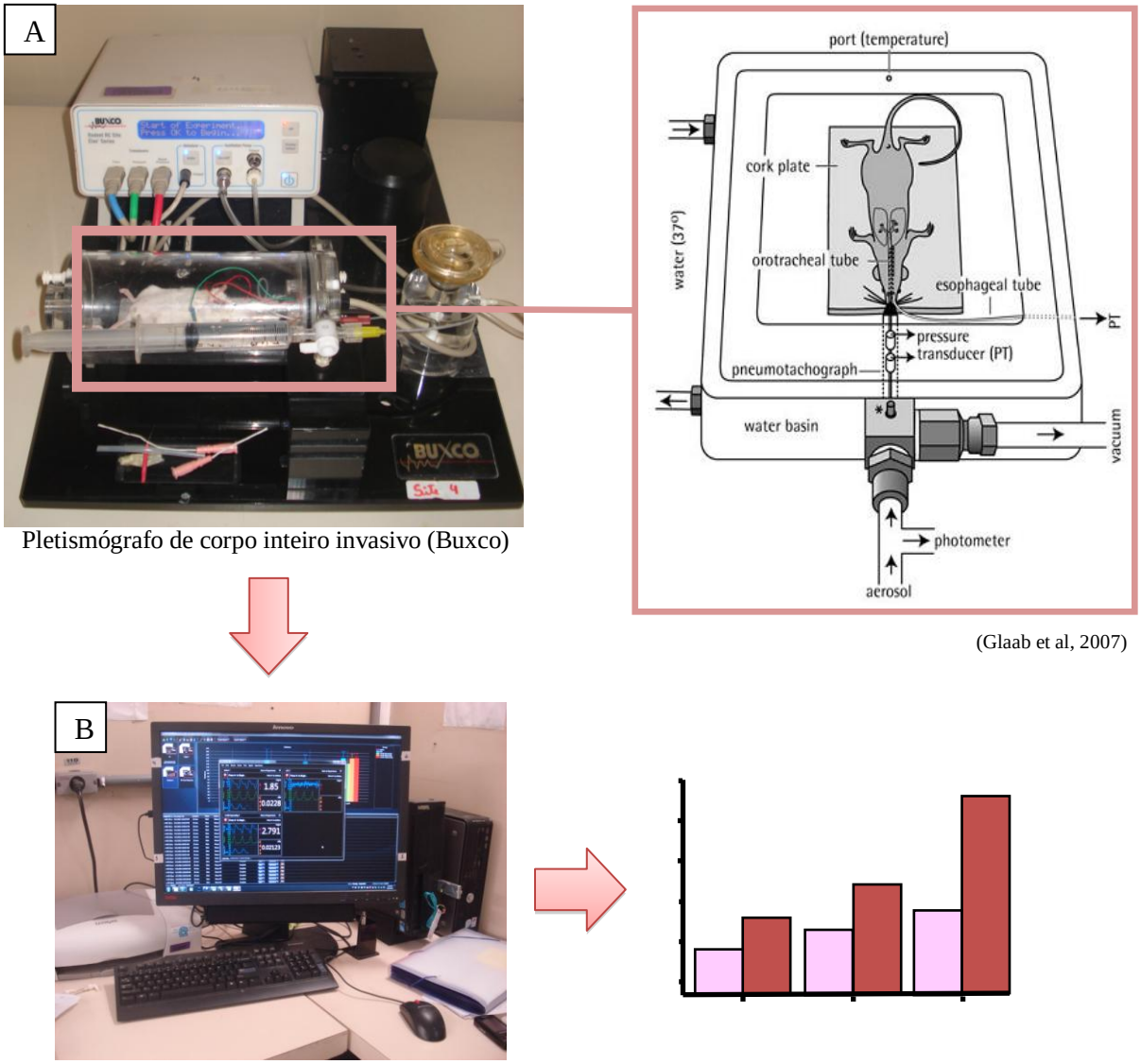
3.4 **Avaliação da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas**

A função pulmonar foi mensurada através de um pletismógrafo de corpo inteiro invasivo (Figura 4) (Buxco Research System, Winchester, Reino Unido). Este aparelho é dotado de transdutores capazes de detectar pequenas variações das pressões esofagiana e transpulmonar, que são registradas em um computador através do programa específico (FinePointe, versão 2.1). Após o processamento, os dados são traduzidos em parâmetros de resistência ($cmH_2O.s/mL$) e elastância (cmH_2O/mL) pulmonares.

Para tanto, os camundongos foram submetidos à anestesia com Nembutal (60 mg/kg, i.p.) e posterior curarização com brometo de pancurônio (1 mg/kg, i.v.). Na sequência foi realizada uma traqueostomia onde foi inserida uma cânula que estava acoplada a um ventilador mecânico, permitindo assim uma ventilação pulmonar artificial através de um fluxo

de ar controlado, monitorado pelo computador, respeitando o número normal de incursões respiratórias do animal.

Após um período de estabilização, foi realizada aerossolização de PBS seguido de concentrações crescentes do agente broncoconstritor metacolina (3, 9 e 27 mg/mL), com um intervalo de 5 min entre as doses. Ao final do processo o animal foi sacrificado com tiopental sódico (500 mg/kg, i.p.) (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP) e o pulmão retirado e processado para futuras análises.



Pletismógrafo de corpo inteiro invasivo (Buxco)

(Glaab et al, 2007)

Programa FinePointe 2.1

Figura 4: Sistema para avaliação da função pulmonar composto por: (A) pletismógrafo de corpo inteiro invasivo e (B) sistema de análise em computador.

3.5 **Análises histológicas**

Os animais tiveram seus pulmões perfundidos por uma solução de salina a 0,9% + EDTA (20 mM) através de uma incisão no ventrículo direito. O pulmão esquerdo foi retirado e fixado em solução de Milloning por no mínimo 48 h. Na sequência, ele foi submetido aos processos de desidratação em soluções com concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%) e depois de xilol, sendo posteriormente incluído em solução contendo uma mistura com proporções iguais de parafina e Paraplast Plus® (P3683, Sigma-Aldrich). Após realização de cortes com 4 µm de espessura, o material foi colocado sobre lâminas de vidro e passou à etapa de coloração. Para tanto, foi realizada gradual desparafinização em xilol e reidratação em banhos de etanol (100, 90, 80 e 70%), sendo então, as lâminas submetidas à coloração com hematoxilina/eosina (H&E). O material foi analisado em microscópio de luz (BX50F-3, Olympus) e fotografado através de uma câmera digital acoplada (UC30, Olympus).

3.5.1 Morfometria

A estimativa do total da área pulmonar ocupada pelos granulomas foi realizada através de um retículo morfométrico (WHN10X-H, Olympus) com um sistema de contagem de pontos (Figura 5). Em um aumento de 200x foram contabilizados os traços que incidiram sobre a área granulomatosa de um total de 20 campos por pulmão. Ao final da contagem foi realizada uma correlação entre o número total de pontos analisados e a quantidade de pontos sobre os granulomas, resultando na porcentagem de pulmão ocupada pelos granulomas.

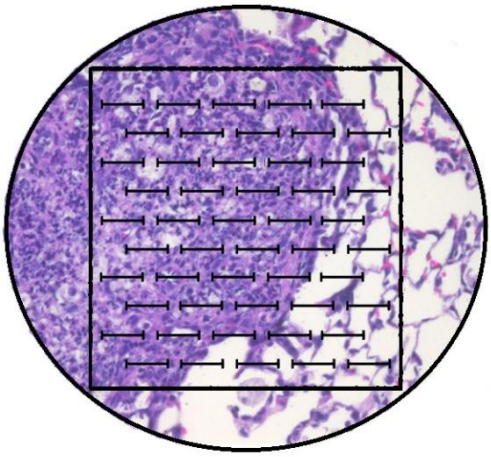


Figura 5: Exemplificação do sistema do retículo, contendo 50 barras horizontais e 100 pequenos traços verticais, utilizado na análise morfométrica.

3.5.2 Imuno-histoquímica

A presença de determinadas proteínas no tecido pulmonar foi avaliada mediante a técnica de imuno-histoquímica. Os cortes histológicos foram aderidos à lâmina de vidro previamente recobertas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). O material foi clarificado com xilol, reidratado com banhos de etanol (100, 90, 80 e 70%) e submetido à recuperação antigênica através da adição de ureia (3M). Na sequência foi realizada a etapa de inativação de peroxidase endógena através da utilização de solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (3%), por 10 min, seguida de bloqueio antigênico e permeabilização celular com solução de BSA 5% + 0,1% de Triton X-100 e 0,05% de Tween 80 por 2 h.

Após essas etapas, foi adicionado o anticorpo primário, diluído em Tris-HCl 0,05M pH 7,6, e o material mantido em geladeira por 12 h. As lâminas foram lavadas com PBS e então adicionado o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, por 2 h. Para revelação da reação foi utilizada incubação com o substrato 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) por aproximadamente 15 min. Ao final desse processo, as lâminas foram submetidas a um fluxo controlado de água corrente, durante 5 min, feita contracoloração com hematoxilina de Mayer e a montagem em meio aquoso contendo gelatina-glicerina. Na tabela a seguir encontram-se listados os anticorpos utilizados.

Anticorpo Primário	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
Anti-NOS2 (SC-651, Santa Cruz Biotechnology, EUA)	1:50	Anti-IgG de coelho (HAF008, R&D, EUA)	1:1000
Anti-PNK (SC-55256, Santa Cruz Biotechnology, EUA)	1:100	Anti-IgG de coelho (HAF008, R&D, EUA)	1:1000

3.5.3 Análise digital

Esta análise foi realizada após a captura de 20 diferentes campos, utilizando-se um sistema de microscópio de luz (BX50F-3, Olympus) acoplado a uma vídeo-câmera (UC30, Olympus) e o programa de captura AnalySIS getIT 5.1 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Alemanha). Com o auxílio do programa ImagePro Plus 6.2 (Media Cybernetics, EUA), foram identificadas as áreas pulmonares marcadas por imuno-histoquímica, que foram delimitadas e contabilizadas, sendo os resultados expressos em pixels/µm².

3.6 **Quantificação de óxido nítrico (NO) pela técnica de Griess**

A determinação de NO foi realizada no conteúdo do lavado broncoalveolar (LBA). Após o sacrifício dos animais e inserção de uma cânula na traquéia, houve a injeção de 1 mL de PBS, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (100 mM), nos pulmões. Em seguida, foi feita a recuperação do LBA, que foi centrifugado a 1500 rpm, por 15 min a 4 ºC. O sobrenadante foi recolhido e armazenado (-20°C) para posterior análise. A produção de NO foi quantificada de forma indireta, através do metabólito estável nitrito (NO^{2-}), usando o método de Griess, que tem como base uma reação colorimétrica. De cada amostra, foi utilizado um volume de 100 µl do sobrenadante do LBA, seguido da adição de igual volume do reagente de Griess (sulfanilamida 1 % p/v, em H_3PO_4 5% + alfa-naftil-etilenodiamina 0,1% v/v, em água), colocados em placa de 96 poços de fundo chato. A absorbância desta reação foi medida em

espectrofotômetro a 540 nm. A quantidade de nitrito no sobrenadante foi calculada a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de NO^{2-} e expressa em µM.

3.7 **Análise estatística**

Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da media (E.P.M) e analisados através de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de Newman-Keuls-Student, no programa GraphPad Prism versão 5.0. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os parâmetros apresentados em forma percentual foram submetidos à transformação arcoseno, permitindo, assim, a realização dos testes de variância (Zar, 2009).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos silicóticos

Inicialmente, avaliamos a cinética de alteração da função pulmonar de camundongos instilados com sílica, em tempos que variaram de 2 a 28 dias pós-estimulação. Como pode ser observado na figura 6, em todos os tempos analisados (2, 7, 14 e 28 dias), os animais silicóticos apresentaram um aumento na resposta basal no que tange os parâmetros de resistência (Figura 6A, 6C, 6E e 6G) e elastância pulmonares (Figura 6B, 6D, 6F e 6H) quando comparados ao grupo controle. Após aerossolização de concentrações crescentes do agonista colinérgico metacolina (3, 9 e 27 mg/mL), os animais silicóticos apresentaram uma resposta exacerbada tanto para resistência como elastância em comparação aos controles, caracterizando assim um quadro de hiper-reatividade pulmonar.

4.2 Avaliação morfológica dos pulmões de camundongos silicóticos

Para a análise morfológica foi utilizada técnica de histologia clássica e coloração com hematoxilina e eosina. Observamos que o tecido pulmonar dos animais controles, instilados com salina, apresentaram parênquima preservado e vias aéreas intactas, incluindo ductos, sacos alveolares e os alvéolos (Figuras 7A, 7C, 7E, 7G). Na condição dos animais silicóticos foi observado no tempo de 2 dias, a presença de uma resposta inflamatória caracterizada por infiltrado celular difuso, espessamento de septos alveolares e formação inicial de granulomas, porém ainda sem delineamento nítido de bordo (Figura 7B). Clara presença de partículas de sílica pode ser notada no interior dos alvéolos. Nos tempos de 7 e 14 dias, verificamos uma progressão do quadro com uma maior área do tecido pulmonar sendo ocupada por granulomas que se mostraram mais densos e com maiores definições de bordo (Figuras 7D e 7F). Na fase mais tardia do processo, em 28 dias, vimos a manutenção da resposta inflamatória acompanhada por uma marcada resposta fibrogênica e formação extensa de granulomas dispersos em todo o parênquima pulmonar (Figura 7H). A avaliação morfométrica permitiu a análise quantitativa da resposta fibrótica e revelou a existência de aumento progressivo da área de parênquima pulmonar ocupada por granulomas, tempo dependente, reforçando nossas observações anteriores quando da análise morfológica (Figura 8).

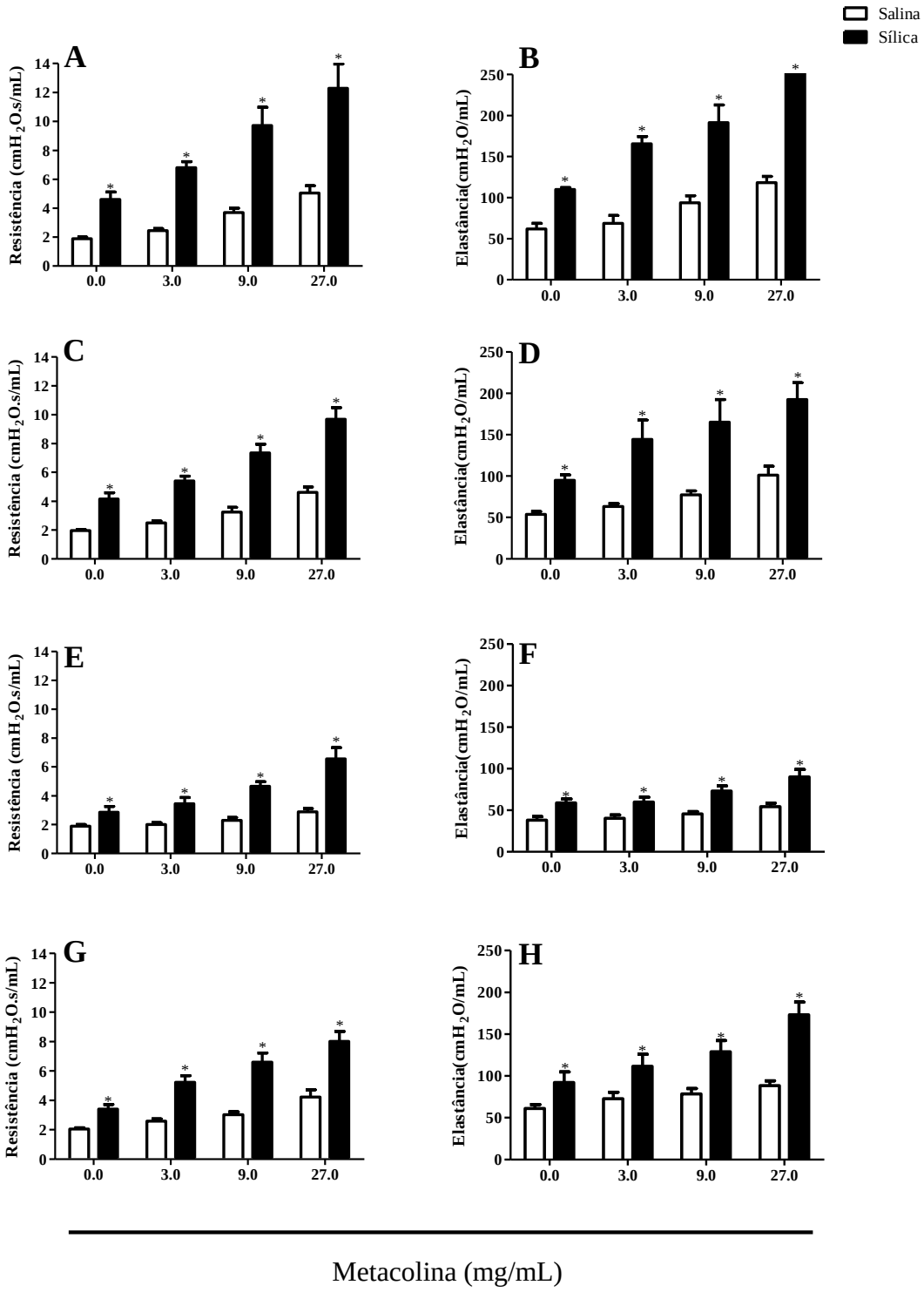


Figura 6: Cinética da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos instilados com sílica (10 mg). Animais controles foram instilados com salina. Os parâmetros de resistência (painéis à esquerda) e elastância (painéis à direita) foram avaliados no tempos de 2 (A, B), 7 (C, D), 14 (E, F) e 28 (G, H) dias pós-sílica. Os valores representam a média ± E.P.M de no mínimo 6 animais). *p<0,05 em comparação ao grupo controle instilado com salina.

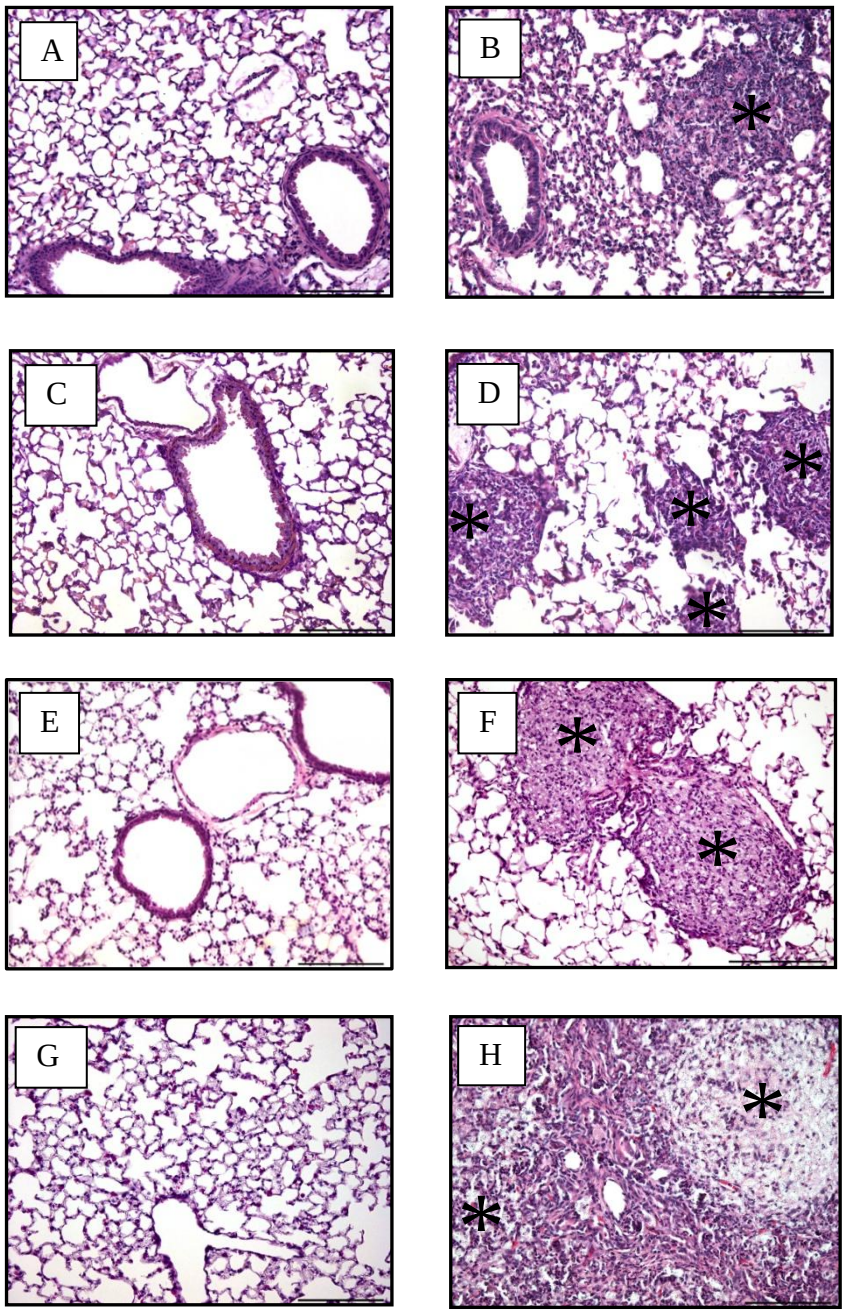


Figura 7: Análise morfológica dos pulmões de camundongos submetidos à instilação de sílica (10 mg/50 µl i.n.). Fotomicrografias do tecido pulmonar do grupo controle (A, C, E e G) e silicótico (B, D, F e H), nos tempos de 2 (A, B), 7 (C, D), 14 (E, G) e 28 (G, H) dias pós-sílica. Coloração com H&E. (*) Área de granuloma; as barras de calibração correspondem a 50 µm.

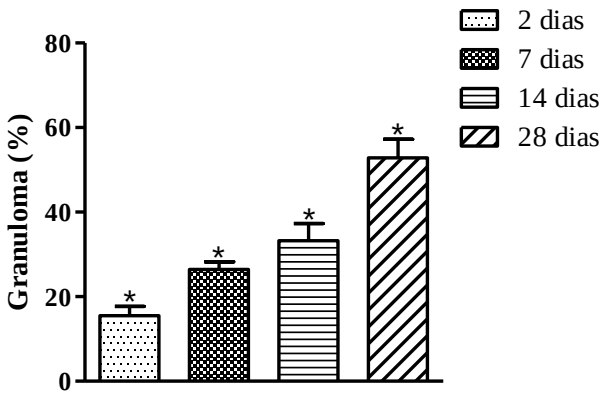


Figura 8: Análise morfométrica dos pulmões de camundongos instilados com sílica (10 mg). As análises foram feitas 2, 7, 14 e 28 dias pós-sílica. Os valores de granuloma (%) representam a média ± E.P.M de no mínimo 6 animais. *p<0,05 em comparação ao grupo controle.

4.3 **Avaliação do conteúdo de óxido nítrico (NO) no lavado broncoalveolar de camundongos silicóticos**

Com base nos achados acima mencionados, os tempos de 7 e de 28 dias foram escolhidos para análises futuras, considerando que estes correspondem às fases aguda e crônica do quadro silicótico murino, respectivamente. Confirmando alguns dados de literatura (Shaw *et al.*, 2007), verificamos que nas nossas condições experimentais os níveis de NO mostram-se significativamente aumentados, em relação àqueles dos animais controles em ambos os tempos de 7 (Figura 9A) e 28 dias pós-sílica (Figura 9B).

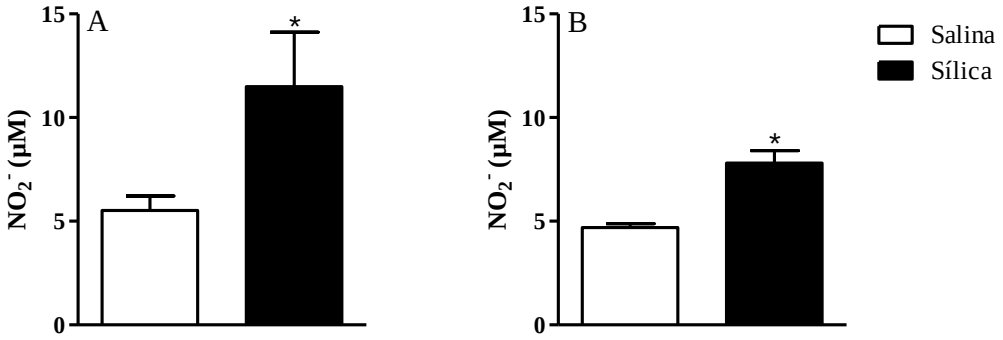


Figura 9: Avaliação dos níveis de óxido nítrico no lavado broncoalveolar de camundongos instilados com sílica (10 mg). Animais controles foram instilados com salina. As análises foram realizadas em 7 (A) e 28 dias (B) pós-sílica. Os valores representam a média ± E.P.M de no mínimo 6 animais. *p<0,05 em comparação ao grupo controle instilado com salina.

4.4 **Avaliação da presença de peroxinitrito nos pulmões de camundongos silicóticos**

Foi demonstrado que o NO pode reagir com ânion superóxido gerando quantidades expressivas de peroxinitrito ($ONOO^-$), derivado extremamente lesivo aos tecidos. Nesta etapa analisamos a produção de $ONOO^-$ no tecido pulmonar dos animais silicóticos. Utilizando ensaio de imuno-histoquímica, verificamos a presença de marcação expressiva, majoritariamente na região de granulomas nos tempos e 7 e 28 dias pós-sílica (Figuras 10B e 10C, respectivamente). Nenhuma marcação foi verificada no caso dos animais controles instilados com salina (Figura 10A). A análise quantitativa realizada através da contagem de "pixels", em sistema de analisador de imagem, confirmou os achados histológicos (Figura 10D). Vale mencionar que o controle negativo do ensaio de imuno-histoquímica incluiu a omissão do anticorpo primário e não foi evidenciada qualquer marcação, garantindo a especificidade da reação ("insets" Figura 10).

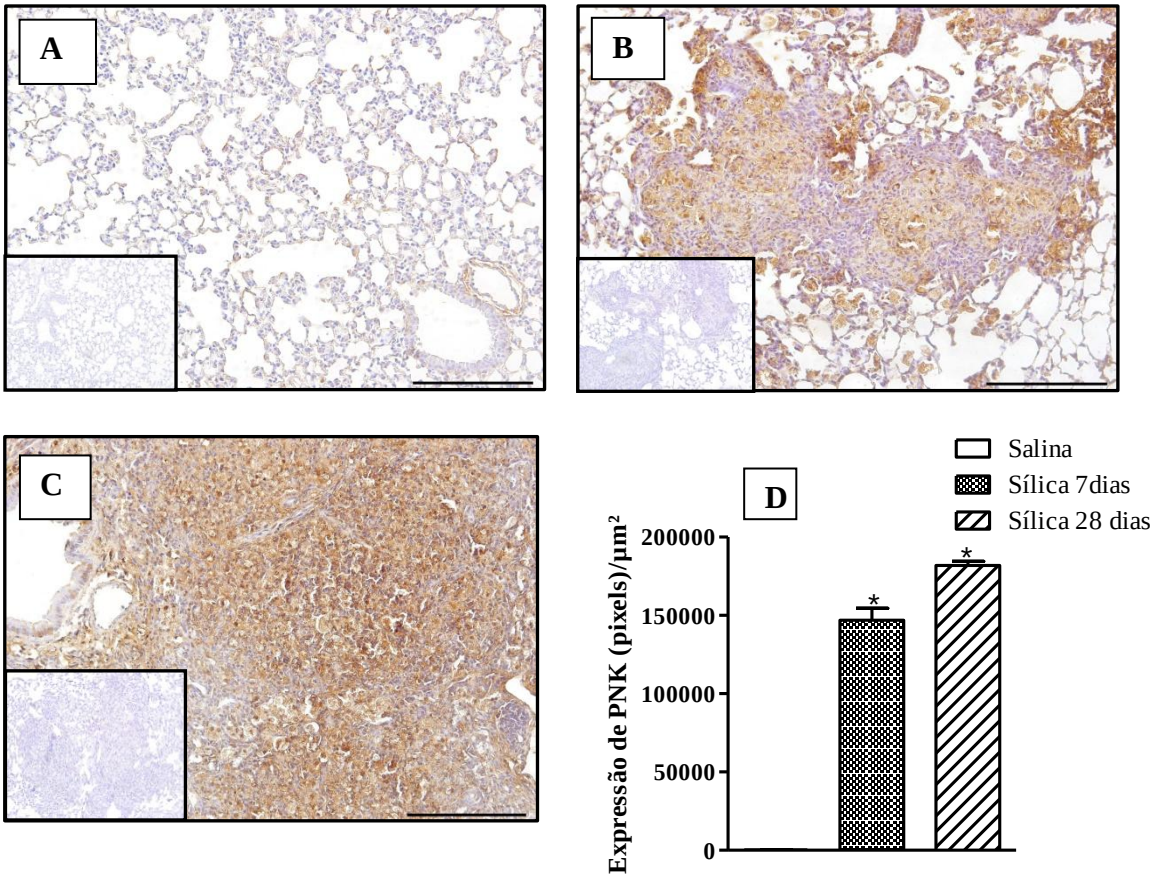


Figura 10: Avaliação da geração de peroxinitrito no pulmão de camundongos submetidos à instilação de sílica (10 mg/50 µL i.n.). Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A) ou sílica, nos tempos de 7 (B) e 28 (C) dias pós-sílica. Avaliação quantitativa de pixels (D). Os valores representam a média ± E.P.M de no mínimo 6 animais. *p<0,05 em comparação ao grupo controle instilado com salina. Os cortes histológicos foram corados com H&E e as barras de calibração correspondem a 50 µm.

4.5 **Avaliação da função pulmonar de camundongos submetidos à instilação com DETANonoato**

Uma vez constatada a geração de NO na resposta silicótica, em camundongos, e sabendo que este mediador se encontra envolvido em processos de hiper-reatividade em outras doenças pulmonares, partimos para avaliar a capacidade do NO em induzir aumento na reatividade das vias aéreas em camundongos. Para tanto, foi realizada instilação intranasal de um composto doador de óxido nítrico, o DETANonoato (Dukelow *et al.*, 2002).

Conforme pode ser observado na figura 11, a estimulação local com DETANonoato (0,61 µmoles/animal) foi capaz de promover um aumento dos níveis de resistência (Figura 11A) e elastância pulmonares (Figura 11B) frente à aerossolização com o agente broncoconstrictor metacolina. Esta resposta de exacerbação mostrou ser dose-dependente, sendo a resposta significativamente maior nas duas maiores concentrações testadas, 9 e 27 mg/ml.

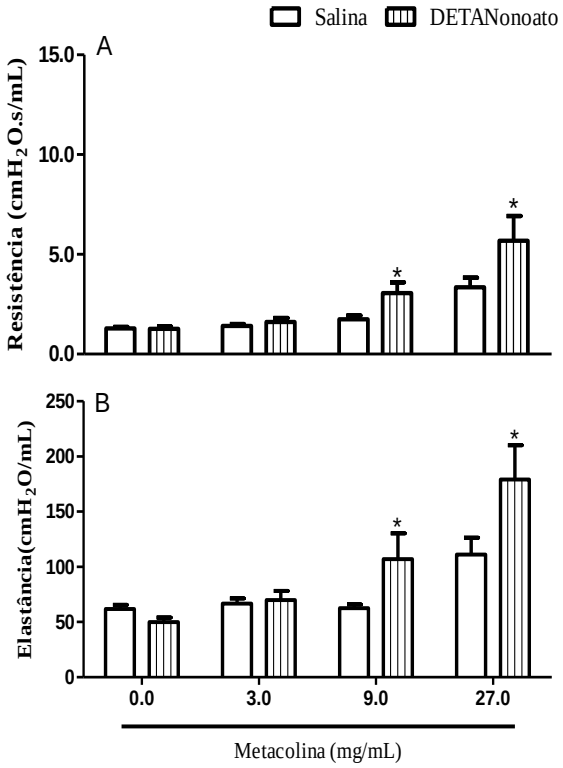


Figura 11: Análise da função pulmonar de camundongos expostos ao composto doador de óxido nítrico DETANonoato (0,61 µmoles/animal). Animais controles foram instilados com salina. O composto foi instilado durante 5 dias consecutivos e os parâmetros de resistência (A) e elastância (B) foram avaliados 24 h após a última administração. Os valores representam a média ± E.P.M de no mínimo 6 animais. *$p<0,05$ em comparação ao grupo controle instilado com salina.

4.6 **Avaliação do efeito do tratamento com o inibidor de NOS, o L-NAME, sobre a função pulmonar de camundongos silicóticos**

Uma vez constatado o aumento nos níveis de NO nos animais silicóticos e o efeito indutor de hiper-reatividade das vias aéreas pelo doador de NO, DETANonoato, como próximo passo foi avaliar o efeito do inibidor não seletivo de NOS sobre a função pulmonar dos camundongos silicóticos. Para tanto foi escolhido o tempo de 7 dias. Verificamos que o tratamento com L-NAME (30 mg/kg, v.o.) foi capaz de inibir o aumento nos níveis basais de resistência pulmonar (Figura 12A) nos animais silicóticos, porém não de elastância. No entanto, quando da aerossolização de metacolina, vimos que o L-NAME foi capaz de inibir a exacerbação da resposta tanto de resistência (Figura 12A) quanto de elastância (Figura 12B) nos animais silicóticos.

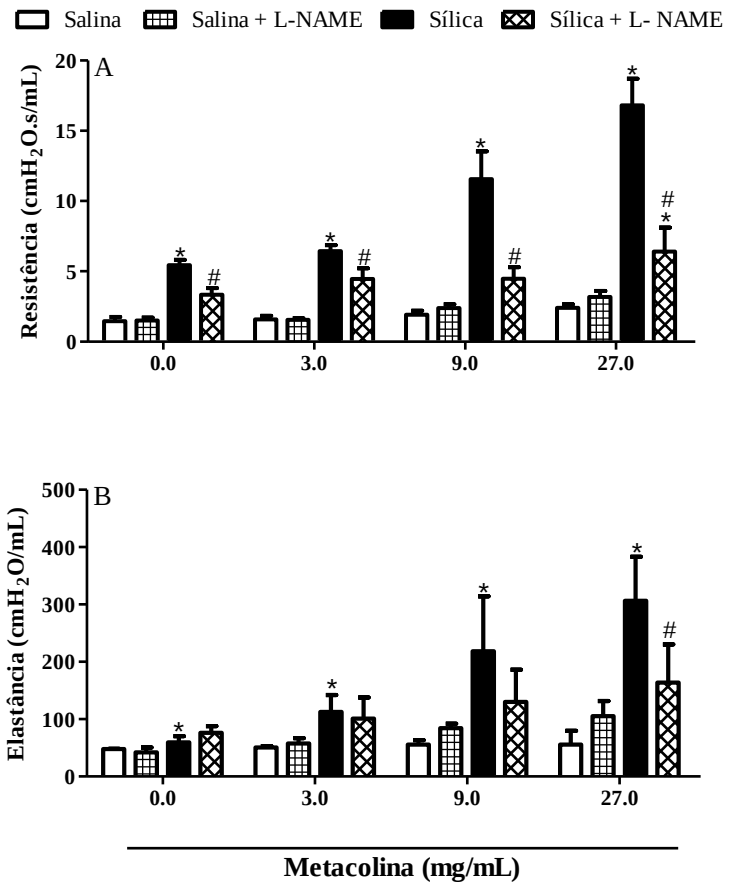


Figura 12: Análise da função pulmonar dos camundongos instilados com sílica (10 mg) e tratados com o inibidor de NOS, o L-NAME (30 mg/kg, v.o.). Animais controles foram instilados com salina. As análise foram realizadas 24 h após a administração da última dose. Os valores representam a média ± E.P.M de no mínimo 6 animais. *p<0,05 em comparação ao grupo controle; #p<0,05 em comparação ao grupo sílica.

4.7 **Avaliação da expressão de iNOS no pulmão de camundongos silicóticos**

Considerando os achados prévios indicativos da produção de NO e de peróxinitrito no pulmão de camundongos estimulados com sílica, resolvemos avaliar os níveis de expressão da NOS induzida – enzima responsável pela produção de NO com participação predominante em processos inflamatórios. Os resultados mostraram marcação positiva no tecido pulmonar de camundongos silicóticos em ambos os tempos analisados, 7 (Figura 13B) e 28 dias (Figura 13C). Não foi verificada marcação no pulmão dos camundongos controles (Figura 13A). A análise quantitativa realizada através da contagem de "pixels", em sistema de analisador de imagem, confirmou os achados histológicos (Figura 13D). Vale mencionar que o controle negativo do ensaio de imuno-histoquímica incluiu a omissão do anticorpo primário e, não foi evidenciada qualquer marcação, garantindo a especificidade da reação ("insets" Figura 13).

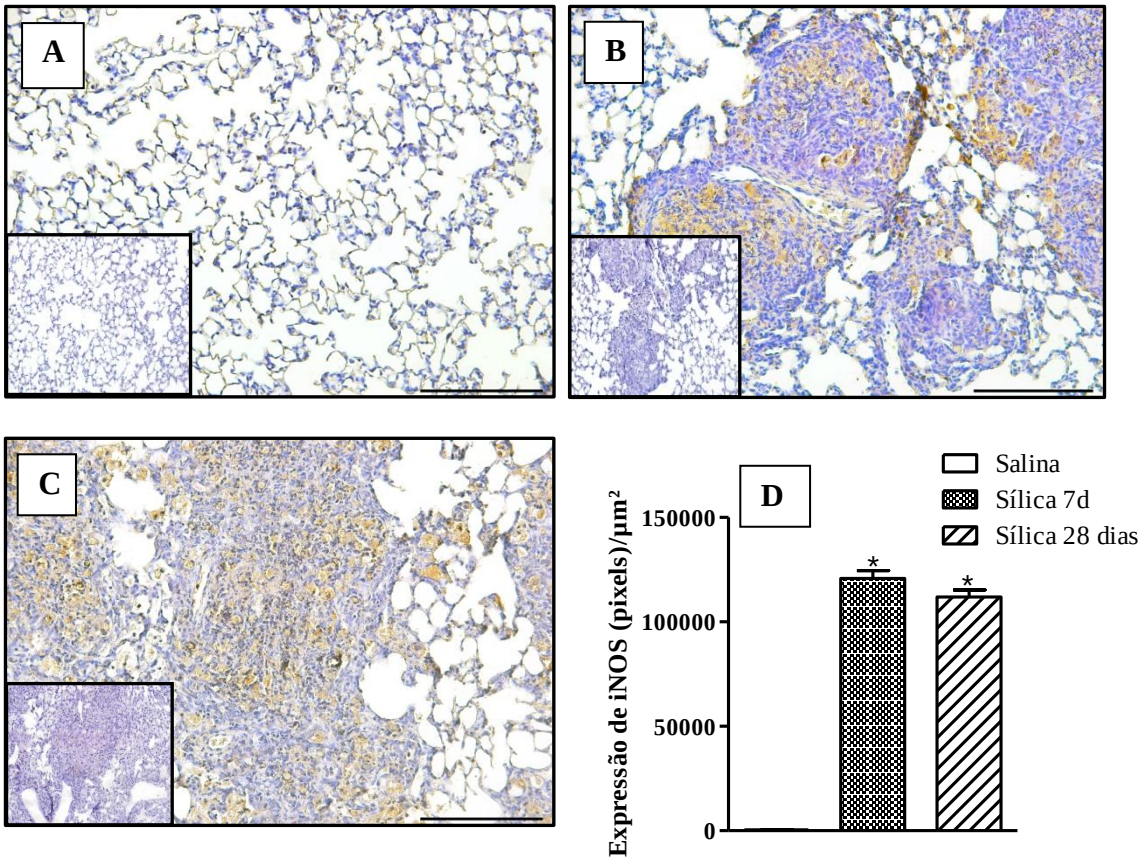


Figura 13: Avaliação de iNOS nos pulmões de camundongos submetidos à instilação de sílica (10 mg/50 µL i.n.). Fotomicrografias do tecido pulmonar de animais instilados com salina (A) ou sílica, nos tempos de 7 (B) e 28 (C) dias pós-sílica. Avaliação quantitativa em pixels (D). Os valores representam a média ± E.P.M de no mínimo 6 animais. *p<0,05 em comparação ao grupo controle instilado com salina. Os cortes histológicos foram corados com H&E e as barras de calibração correspondem a 50 µm.

4.8 **Avaliação da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de animais iNOS^{+}/$^{+}$ e iNOS^{-}/$^{-}$ estimulados com sílica**

Tomando por base os achados que apontam a capacidade da instilação do doador de NO em produzir um quadro de hiper-reatividade, passamos a avaliar se este mediador poderia estar participando das alterações da função pulmonar no modelo de silicose experimental. Para tal análise, foram utilizados camundongos deletados do gene codificante da isoenzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS^{-}/$^{-}$) utilizando-se para comparação animais selvagens C57BL/6 (iNOS^{+}/$^{+}$).

Verificamos que no tempo de 7 dias da instilação com sílica, os animais apresentaram níveis basais de resistência (Figura 14A) e elastância (Figura 14B) aumentados em relação aos animais controles instilados com salina. Além disso, na condição de aerossolização com metacolina, a resposta no caso de ambos os parâmetros mostrou-se aumentada nos animais silicóticos em comparação com aqueles instilados com PBS (Figura 14A e 14B). A análise dos camundongos iNOS$^{-/-}$ revelou que, em condições onde os níveis basais de resistência e elastância não se mostraram diferentes daqueles dos animais selvagens, uma marcada inibição da resposta à aerossolização com metacolina foi evidenciada (Figura 14A e 14B, respectivamente).

Passando para uma fase mais tardia da doença, ou seja, crônica, foram novamente analisados os parâmetros de função pulmonar e alterações morfológicas. Conforme pôde ser evidenciado na figura 15, de forma semelhante ao observado no tempo de 7 dias, fase aguda, um aumento nos níveis basais de resistência (Figura 15A) e elastância (Figura 15B) pulmonares foi verificado no caso dos camundongos iNOS^{+}/$^{+}$ silicóticos quando comparados aos controles instilados com salina. Resposta aumentada à aerossolização de metacolina foi também detectada no caso dos camundongos silicóticos (Figura 15A e 15B). Nos camundongos iNOS$^{-/-}$ silicóticos, a resposta de hiper-reatividade à metacolina mostrou-se abolida (Figura 15A e 15B).

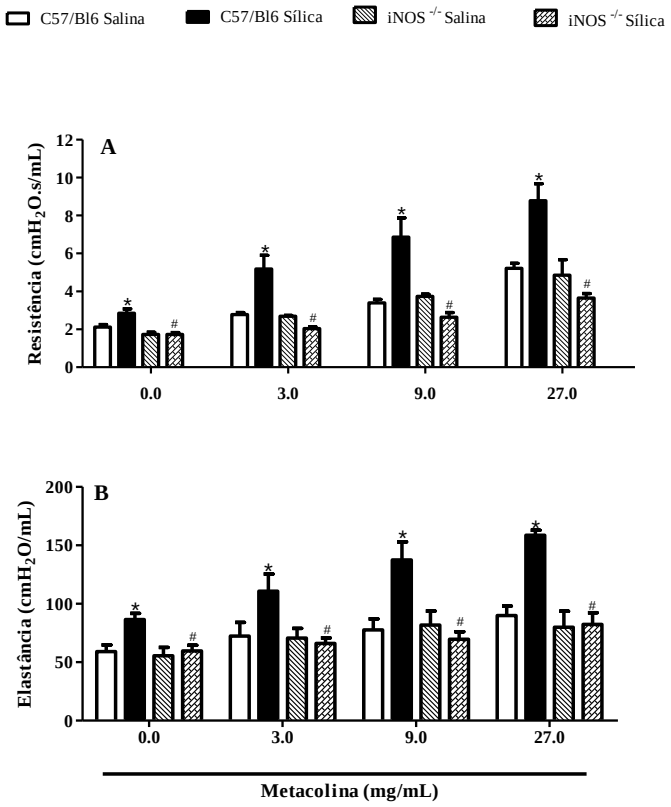


Figura 14: Análise da função pulmonar dos camundongos iNOS$^{+/+}$ e iNOS$^{-/-}$ estimulados com sílica (10 mg/50 µl i.n.). Animais controles foram instilados com salina. As análises de resistência (A) e elastância (B) foram realizadas 7 dias após estimulação com sílica. Os valores representam a média ± E.P.M de no mínimo 6 animais. *p<0,05 em comparação com animais iNOS$^{+/+}$ instilados com salina. #p<0,05 em comparação com animais iNOS$^{+/+}$ instilados com sílica.

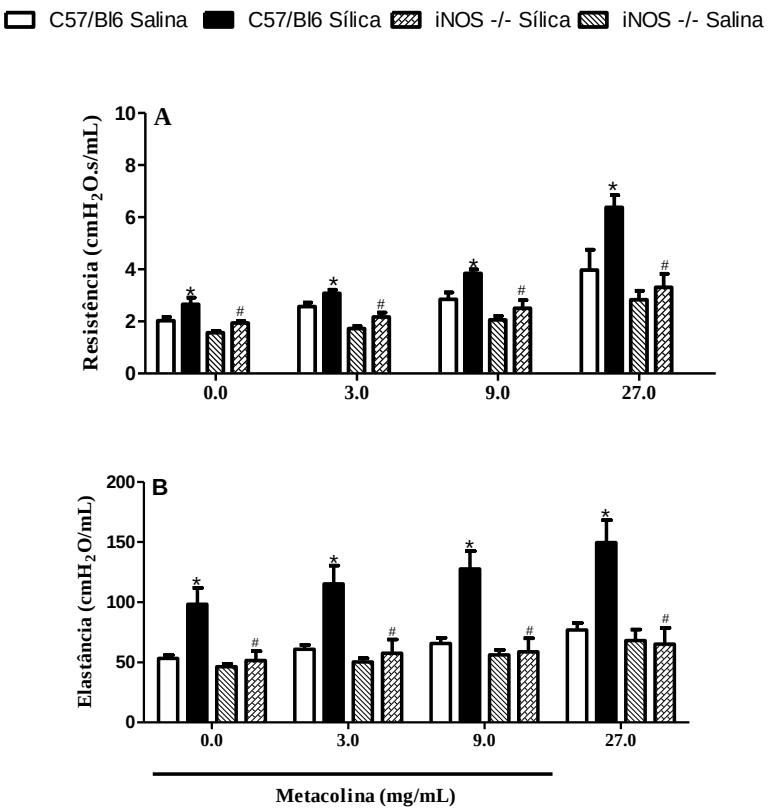


Figura 15: Análise da função pulmonar dos camundongos iNOS$^{+/+}$ e iNOS$^{-/-}$ estimulados com sílica (10 mg/50 µl i.n.). Animais controles foram instilados com salina. As análises de resistência (A) e elastância (B) foram realizadas 28 dias após estimulação com sílica. Os valores representam a média ± E.P.M de no mínimo 6 animais. *p<0,05 em comparação com animais iNOS$^{+/+}$ instilados com salina. #p<0,05 em comparação com animais iNOS$^{+/+}$ instilados com sílica.

4.9 **Avaliação das alterações morfológicas no pulmão de animais iNOS$^{+/+}$ e iNOS$^{-/-}$ estimulados com sílica**

A partir destes achados, passamos para as análises de alterações morfológicas com a intenção de verificar uma possível correlação entre o fenômeno de hiper-reatividade das vias aéreas e os componentes inflamatório e fibrótico do parênquima pulmonar.

A análise morfológica dos pulmões de camundongos iNOS^{+}/$^{+}$, instilados apenas com salina, revelou que estes apresentaram condições de parênquima pulmonar normal, com septos alveolares e alvéolos bem preservados (Figura 16A). No entanto, os animais selvagens quando estimulados com sílica apresentaram um extenso processo inflamatório, com infiltrado celular e áreas de granuloma, que caracterizam a fase aguda da silicose (Figura 16B). Os animais iNOS$^{-/-}$ salina não apresentaram alterações morfológicas significativas (Figura 16C), enquanto que os camundongos iNOS$^{-/-}$ com sílica apresentaram uma marcada redução do processo inflamatório decorrente da silicose (Figura 16D). A análise de morfométria indicou uma redução significativa da área de granuloma nos animais iNOS$^{-/-}$ instilados com sílica quando comparados aos iNOS^{+}/$^{+}$ silicóticos (Figura 16E).

A análise histológica da fase crônica da silicose revelou que os camundongos iNOS^{+}/$^{+}$ instilados com salina (Figura 17A) igualmente mostraram parênquima pulmonar preservado, em condições nas quais os animais selvagens estimulados com sílica apresentaram extensa formação de granuloma e com infiltrado inflamatório (Figura 17B). Nos animais iNOS$^{-/-}$ salina não foram evidenciadas alterações morfológicas no parênquima pulmonar (Figura 17C), sendo que os camundongos iNOS$^{-/-}$ sílica apresentaram uma expressiva inibição do processo granulomatoso quando comparados aos animais selvagens sílica (Figura 17D). A avaliação morfométrica confirmou nossa análise qualitativa (Figura 17E).

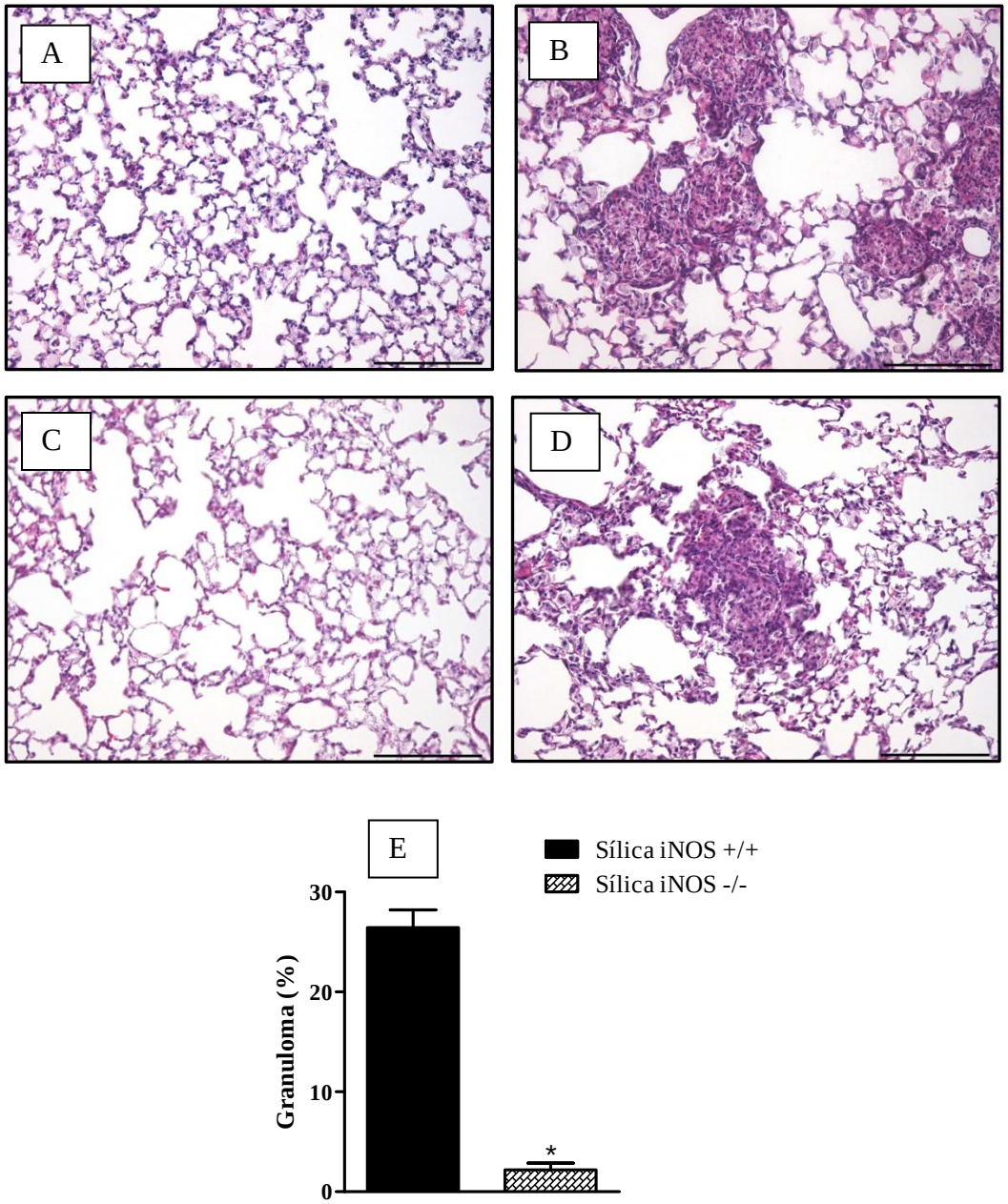


Figura 16: Análise morfológica dos pulmões de camundongos iNOS$^{+/+}$ e iNOS$^{-/-}$ submetidos à instilação de sílica (10 mg/50 µl i.n.). Fotomicrografias do tecido pulmonar de camundongos iNOS$^{+/+}$ (painéis superiores) e iNOS$^{-/-}$ (painéis inferiores) instilados com salina (A e C) ou sílica (B e D). As análises foram realizadas 7 dias pós-sílica. Percentagem da área de tecido pulmonar ocupada por granulomas (E). Os valores representam a média ± E.P.M de no mínimo 5 animais. *$p<0,05$ em comparação ao grupo iNOS$^{+/+}$ instilado com sílica. Os cortes histológicos foram corados com H&E. As barras de calibração correspondem a 50 µm.

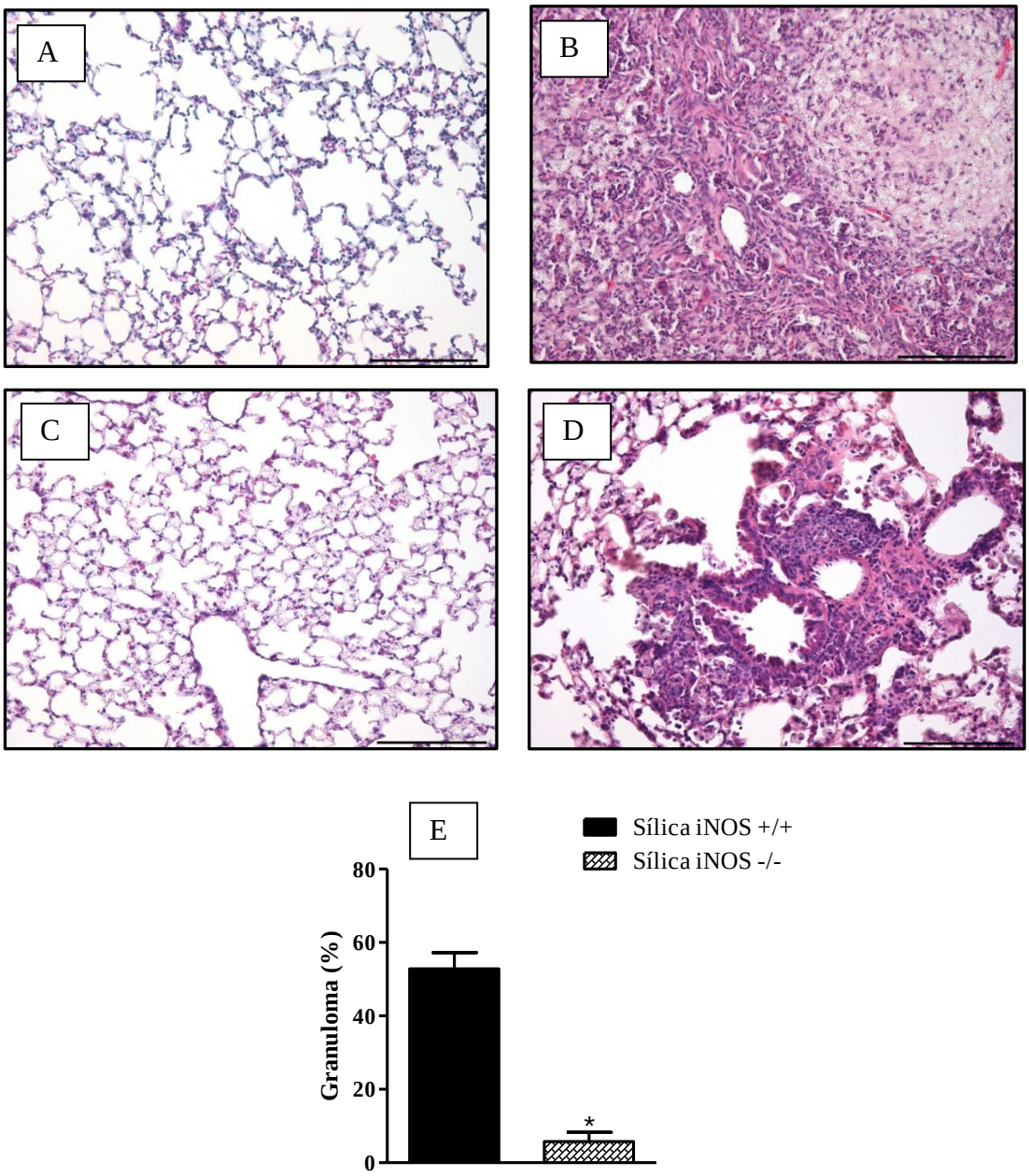


Figura 17: Análise morfológica dos pulmões de camundongos iNOS$^{+/+}$ e iNOS$^{-/-}$ submetidos à instilação de sílica (10 mg/50 µl i.n.). Fotomicrografias do tecido pulmonar de camundongos iNOS$^{+/+}$ (painéis superiores) e iNOS$^{-/-}$ (painéis inferiores) instilados com salina (A e C) ou sílica (B e D). As análises foram realizadas 28 dias pós-sílica. Percentagem da área de tecido pulmonar ocupada por granulomas (E). Os valores representam a média ± E.P.M de no mínimo 5 animais. *$p<0,05$ em comparação ao grupo iNOS$^{+/+}$ instilado com sílica. Os cortes histológicos foram corados com H&E. As barras de calibração correspondem a 50 µm.

4.10 **Avaliação do efeito do tratamento com o inibidor seletivo de NOS induzida (iNOS), o 1400W, sobre a função pulmonar e alterações morfológicas em camundongos silicóticos**

Tomando por base a observação de que a resposta de hiper-reatividade das vias aéreas à estimulação com sílica mostrou-se suprimida na condição de depleção do gene codificante para enzima iNOS, nesta etapa buscamos validar estes achados através da utilização de um inibidor seletivo para enzima iNOS, 1400W (Garvey *et al.*, 1997). Considerando a relevância da fase crônica da silicose no contexto da clínica, foi escolhido o tempo de 28 dias para nossa análise.

Verificamos que o tratamento terapêutico com o composto 1400W (2 mg/kg, i.p.), por 5 dias consecutivos iniciando-se 23 dias após estimulação com sílica, inibiu de forma significativa o aumento nos níveis basais de resistência (Figura 18A) e elastância (Figura 18B), bem como a resposta de hiper-reatividade à metacolina (Figura 18).

A análise morfológica revelou presença de extensa área de fibrose com formação de granulomas nos animais estimulados com sílica (Figura 19B) em comparação aos controles (Figura 19A) e inibição na condição do tratamento com 1400W (Figura 19C). A análise morfométrica reforçou nossas observações prévias indicando clara redução da área de parênquima pulmonar ocupada por granuloma na condição do tratamento de animais silicóticos com o 1400W (Figura 19D).

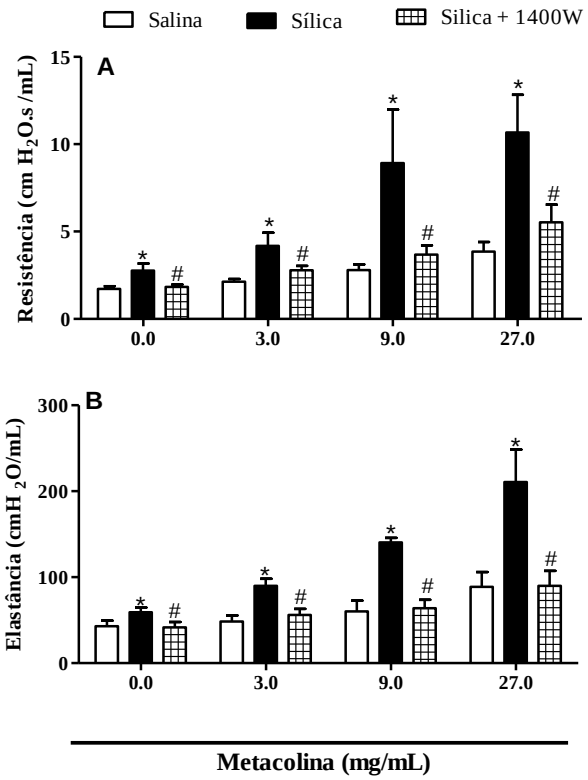


Figura 18: Análise da função pulmonar dos camundongos estimulados com sílica (10 mg/50 µl i.n.) e submetidos ao contato com inibidor da iNOS, o 1400W (2 mg/kg, i.p.). Os parâmetros avaliados foram resistência (A) e elastância (B) das vias aéreas, analisados através de um pletismógrafo de corpo inteiro invasivo, 28 dias pós-sílica. Os valores foram representados em média ± E.P.M (n = 5 animais). *p<0,05 em comparação com animais instilados salina. #p<0,05 comparando entre os grupos instilados com sílica.

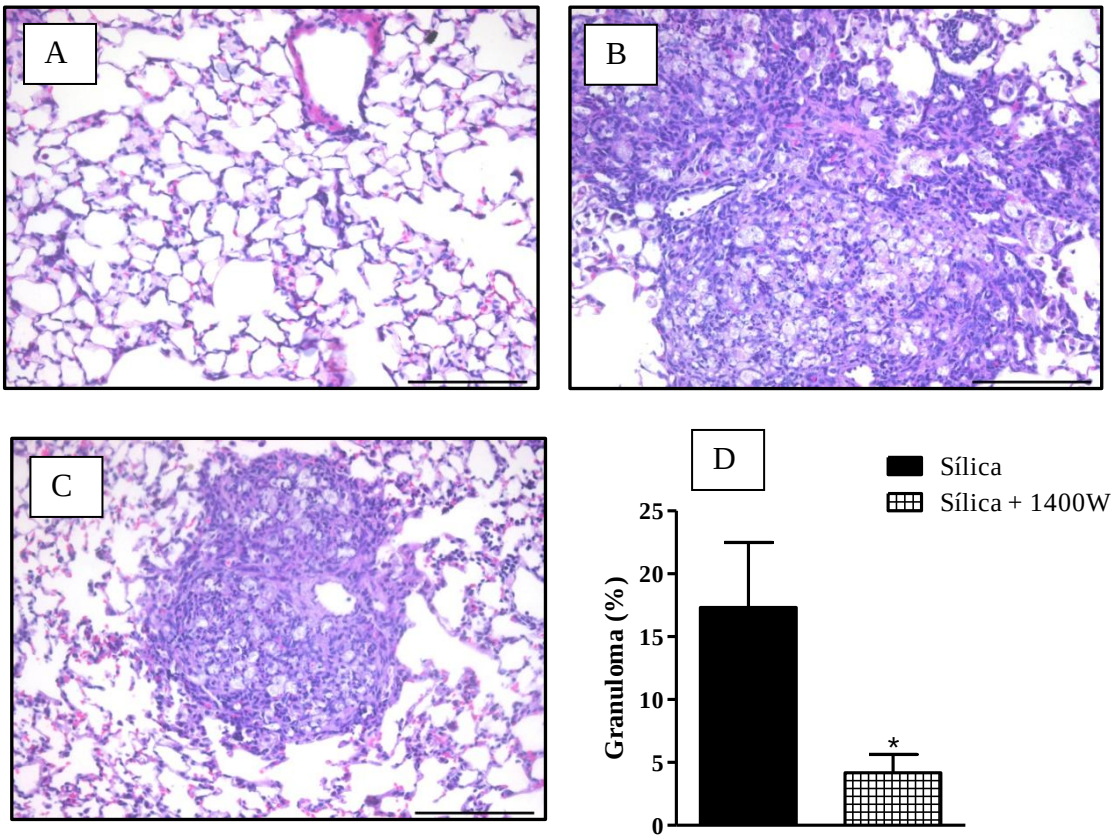


Figura 19: Análise morfológica dos pulmões de camundongos iNOS$^{+/+}$ e iNOS$^{-/-}$ submetidos à instilação de sílica (10 mg/50 µl i.n.) e ao composto 1400W (2 mg/kg, i.p.). Fotomicrografias do tecido pulmonar de camundongos instilados com salina (A), sílica (B) e sílica tratados com o inibidor 1400W (C). As análises foram realizadas 28 dias pós-sílica. Percentagem da área de tecido pulmonar ocupada por granulomas (D). Os valores representam a média ± E.P.M de no mínimo 5 animais. *$p<0,05$ em comparação ao grupo instilado com sílica. Os cortes histológicos foram corados com H&E. As barras de calibração correspondem a 50 µm.

5 **DISCUSSÃO**

A inalação de partículas de sílica, a longo prazo, está associada ao desenvolvimento de uma doença inflamatória denominada silicose (Terra Filho e Santos, 2006). Estudos sobre a silicose em humanos são escassos e difíceis de serem implementados, pois, além das limitações éticas, geralmente ocorre o diagnóstico tardio da doença, numa fase cujo processo fibrótico já foi estabelecido no parênquima pulmonar. No entanto, existem algumas pesquisas que utilizam trabalhadores voluntários que estão expostos às partículas de sílica em seus locais de trabalho, monitorando-os durante determinados períodos de tempo (de Freitas Luz *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011; Scarselli *et al.*, 2011; Vacek *et al.*, 2011). Porém, tais estudos ainda não são realizados em caráter detalhado ou sistemático. Além disso, aumenta-se o número de variáveis, como o fumo, bebida alcoólica, sexo, idade, que podem gerar resultados imprecisos sobre o efeito exclusivo da sílica no organismo do ser humano. Nestes moldes, foi escolhida uma espécie animal filogeneticamente próxima ao ser humano para investigar a silicose pulmonar: o camundongo. De acordo com Leon (2005), este animal é excelente como modelo experimental, pois possui um período gestacional curto, altas taxas de natalidade e similaridades genéticas com os seres humanos e, além disso, são suscetíveis à manipulação de seu genoma.

Para indução da silicose, existem alguns modelos descritos na literatura, como a aerossolização e a instilação intratraqueal. O primeiro, no entanto, apesar de mimetizar a via natural de indução de silicose, demanda enormes períodos de exposição aos aerossóis de sílica para alcançar quantidade de partículas suficientes nas vias aéreas, a fim de desencadear a silicose nos pulmões (5 h por dia durante 12 dias) (Davis *et al.*, 2006). Todavia, na administração de sílica por via intratraqueal os animais são submetidos a um procedimento invasivo de traqueostomia, onde é injetada uma suspensão de sílica através de uma cânula (Choi *et al.*, 2008). Esse método requer grau de competência técnica, exigindo-se um período oneroso de treinamento, além de poder sofrer uma elevada taxa de insucesso (Lakatos *et al.*, 2006). Tendo as observações acima como base, desenvolvemos em nosso laboratório, a técnica de instilação de uma suspensão de sílica por via intranasal (10 mg em 50 µL de salina), que mostrou ser eficaz na indução da silicose, sem apresentar as desvantagens das outras técnicas. Sendo assim, no presente trabalho optamos pelo uso de sílica por instilação intranasal por mimetizar a exposição aguda e crônica da silicose, e ser a melhor relação tempo e custo-benefício dentre as técnicas existentes.

Neste estudo, em um primeiro momento, os animais foram avaliados em relação à mecânica respiratória, através da aerossolização com concentrações crescentes do agonista colinérgico metacolina (3, 9 e 27 mg/mL), em diversos tempos da doença (2, 7, 14 e 28 dias pós-sílica). De acordo com os resultados obtidos, os animais silicóticos mostraram-se com uma resposta basal de resistência e elastância pulmonar maior que os respectivos controles, em todos os tempos analisados. Na condição de estimulação com o agonista colinérgico metacolina, os grupos silicóticos apresentaram níveis exacerbados, em ambos os parâmetros analisados, quando comparados aos animais instilados somente com salina, caracterizando assim um quadro de hiper-reatividade pulmonar. Em determinadas doenças inflamatórias crônicas, como a asma brônquica, existe o fenômeno de hiper-reatividade das vias aéreas, que consiste numa resposta mais intensa do que a esperada no músculo liso das vias respiratórias, frente a um determinado estímulo com característica de indução de broncoconstrição. Hipóteses foram propostas no sentido de esclarecer o mecanismo envolvido neste processo, com destaque para a verificação de alteração da via MAPK resultando no favorecimento da contratilidade das vias aéreas (An e Fredberg, 2007).

Nos pacientes silicóticos, foi anteriormente constatada uma redução da capacidade respiratória, devido à diminuição da distensibilidade pulmonar e dificuldade em retornar a condição de repouso, durante a inspiração e expiração, respectivamente (Hertzberg *et al.*, 2002). Estudos realizados com trabalhadores expostos à partícula de sílica comprovaram que houve uma diminuição nos valores do volume de expiração forçada em 1 segundo (VEF_1), refletindo redução da resposta de resistência pulmonar total (de Mesquita Junior *et al.*, 2006). Estes parâmetros puderam ser analisados no presente estudo, quando foi mensurada a função pulmonar em modelo experimental de silicose murina, procedimento realizado através de um sistema de pletismografia de corpo inteiro invasiva. Com este sistema pudemos avaliar o volume, fluxo e pressão envolvidos na mecânica respiratória, fornecendo parâmetros de resistência ao fluxo de ar e complacência dinâmica (Glaab *et al.*, 2007; Hoymann, 2007). Até o presente momento não há estatísticas precisas quanto à correlação de ocorrência de hiper-reatividade das vias aéreas na condição da silicose. Porém, existem registros da ocorrência deste fenômeno em trabalhadores de processamento de minério que possuem quadro de pneumoconiose, o que é indicativo da existência de alguma correlação (Guerrin e Voisin, 1980). De forma semelhante ao observado em outros exemplos de disfunções pulmonares, onde há alteração da função pulmonar, como a asma brônquica, o fenômeno de hiper-reatividade na silicose pode ser considerado um potencial alvo terapêutico na busca de novas terapias (Lauzon *et al.*, 2012).

No contexto histológico da silicose murina, a técnica de H&E revelou uma morfologia íntegra nos animais instilados com salina, apresentando parênquima e vias aéreas bem preservados. Todavia, nos animais silicóticos foi possível observar, em um tempo inicial (2 dias), o princípio de uma resposta inflamatória, com transudado, infiltrado celular difuso, espessamento de septos alveolares e formação inicial de granulomas. Em outros tempos (7 e 14 dias) houve um aumento progressivo das áreas pulmonares ocupadas por fibrose e granulomas, que se mostraram densos de forma tempo-dependente. Na fase crônica (28 dias) ocorreu uma intensificação da resposta inflamatória visualizada nos tempos iniciais, apresentando uma intensa resposta fibrótica e granulomatosa no parênquima pulmonar. Estes resultados estão de acordo com dados na 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) afirmam 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. Essas análises qualitativas foram ratificadas com a morfometria, que revelou a existência de aumento progressivo da área de parênquima pulmonar ocupada pelos granulomas. De acordo com (Crosby e Waters, 2010), este remodelamento tecidual na silicose ocorre principalmente pela migração e proliferação de fibroblastos nos focos pulmonares da inflamação, com posterior substituição do parênquima por componentes de matriz extracelular, sendo esse fibrosamento um dos fatores comprometedores da função pulmonar (Yang *et al.*, 2012). De fato, ensaios *in vitro* mostraram que fibroblastos oriundos de camundongos silicóticos possuem maiores taxas de proliferação celular (dado não mostrado). Em conjunto, esses achados revelaram que parece haver uma correlação entre o fenômeno de hiper-reatividade e a perda da integridade no parênquima pulmonar na silicose murina.

Para o estabelecimento de doenças de caráter inflamatório, é necessário ter a ação conjunta de uma ampla gama de mediadores, incluindo-se o óxido nítrico (NO). Atualmente, já consta na literatura que o NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares, no contexto de doenças pulmonares, atuando como indutor de aumento da reatividade das células musculares lisas das vias aéreas, diminuição da resposta a alguns agentes antiespasmódicos, além de propiciar um aumento na expressão das moléculas de adesão, com a consequente intensificação do processo inflamatório (Hesslinger *et al.*, 2009). Tendo em vista sua pluralidade de efeitos biológicos, no presente estudo objetivamos investigar o papel do NO na silicose, com ênfase sobre o comprometimento da função

pulmonar, e especial foco sobre a hiper-reatividade das vias aéreas. Buscamos, ainda, verificar uma possível correlação entre função pulmonar e os componentes inflamatórios e fibróticos ao nível do parênquima pulmonar.

Em sistemas biológicos, o NO pode ser diretamente quantificado de duas formas: *in situ*, através do emprego de sensores eletroquímicos (Lowinsohn e Bertotti, 2006) ou *in vivo*, utilizando os ensaios de captação ("Trap assays"), que consistem na produção de um radical reativo à molécula alvo, produzindo cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR ("Electron Spin Resonance") ou outra mudança mensurável (Vasconcelos *et al.*, 2007). Uma outra alternativa seria estimar a produção de NO por via indireta, com base na determinação das concentrações dos subprodutos nitrito e nitrato. Estas moléculas podem ser mensuradas através de várias técnicas, como a eletroforese capilar, eletrodos íons-seletivos, entre outras (Jie Sun *et al.*, 2003). Todavia, devido aos elevados custos, grande consumo de tempo no preparo dos procedimentos e/ou limitações de sensibilidade dos aparelhos, geralmente o NO é quantificado indiretamente pelo total de nitrito presente na amostra através da técnica colorimétrica de Griess (Tsikas, 2007). Por estes motivos, optou-se quantificar as amostras oriundas do LBA pelo ensaio de Griess.

Nossos achados mostraram que uma maior concentração de NO gerado foi detectada nos pulmões dos camundongos expostos às partículas de sílica em comparação àquela dos animais controles (instilados com salina), tanto na fase aguda quanto crônica da doença. Estes dados estão de acordo com aqueles observados por Sauni *et al.* (2012), onde a sílica foi capaz de induzir a liberação de NO nas vias aéreas. No entanto, Carlsten *et al.* (2007) não encontraram diferença entre os níveis de NO exalado nos trabalhadores expostos ou não à sílica. Uma provável explicação para este achado negativo, seria a sensibilidade da metodologia utilizada para quantificação de NO, visto que a técnica utilizada não permitia detecção do NO oriundo das vias aéreas periféricas, contabilizando somente o mediador presente nos brônquios. De toda forma, achados de literatura reforçam a proposição de que o NO poderia contribuir para o comprometimento da função pulmonar verificado na silicose (Zeidler *et al.*, 2004; Porter *et al.*, 2006).

Dentro deste contexto, a formação de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e de nitrogênio, como o NO, ocorre continuamente em células aeróbicas (Ribeiro *et al.*, 2005). Estas moléculas, até pouco tempo desconhecidas, possuem uma indubitável importância nos processos fisiopatológicos, despertando, atualmente, um grande interesse da comunidade científica. Com relação à silicose, o aumento da produção de NO evidenciado em nossos resultados pode ser fundamental na etiologia da doença, pois este

mediador pode ligar-se ao superóxido e originar o peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente agente oxidante que causa fragmentação do DNA e oxidação lipídica (Beckman *et al.*, 1990). A alta produção de peroxinitrito e a diminuição na disponibilidade de NO resulta no desequilíbrio da relação [NO]/[$ONOO^-$]. Tal disfunção pode ser utilizada com precisão como um indicador de estresse nitrosativo/oxidativo nos tecidos (Villa *et al.*, 1994; Kalinowski *et al.*, 2004). Atualmente, tem sido sugerido que o estresse oxidativo induz a ativação de fatores de transcrição, como o NF-κB (Tumur *et al.*, 2010). Quando ativados, estes fatores são translocados para o núcleo celular e iniciam a transcrição de vários genes envolvidos com processos inflamatórios (Hayden e Ghosh, 2012). A maior parte das lesões causadas pelo estresse oxidativo ocorre devido ao grande poder oxidante do peroxinitrito, que reage com estruturas biológicas, como as proteínas, principalmente através dos radicais $HO^{\bullet}$, NO_2^- e $CO_3^{\bullet -}$ (Pacher *et al.*, 2007). Um clássico subproduto deste processo é a oxidação e nitração da proteína tirosina, indiretamente através de seus produtos radicais (Rubbo *et al.*, 2000), produzindo uma molécula denominada nitrotirosina (Radi, 2004). Esta, por sua vez, pode ser medida através de ELISA ou por meio de imuno-histoquímica, representando um índice de produção/ação do peroxinitrito. Em nossos achados pela técnica de imuno-histoquímica, foram observadas grandes áreas pulmonares com marcações de nitrotirosina nos animais silicóticos, nos tempos agudo e crônico da silicose experimental murina. Estes resultados corroboram dados na literatura, que mostraram a presença de marcação para nitrotirosina em áreas de granulomas e de brônquios nos pulmões de ratos estimulados com sílica, por meio de aerossol (Castranova *et al.*, 2002), reforçando que a presença de NO e consequente produção de peroxinitrito, ao nível pulmonar, pode induzir o desenvolvimento de dano, granuloma e fibrose, importantes para o estabelecimento da silicose.

Atualmente, sabe-se que o NO está envolvido em uma diversidade de vias metabólicas (Kelm, 1999). No entanto, para entender as funções e os mecanismos de ação na presença ou ausência desta molécula, alguns estudos utilizam fármacos que bloqueiam a sua produção ou liberam o NO de forma contínua e gradual, mantendo elevados os níveis deste mediador. Neste sentido, a L-Nitro-Arginina-Metil-Ester, também chamada de L-NAME, é apontada na literatura como um potente inibidor da síntese de NO, pois devido à sua similaridade estrutural, ela consegue ligar-se no sítio catalítico da NOS, competindo com o substrato natural desta enzima, a arginina, e impedindo a formação de NO (Conners *et al.*, 2006). Alternativamente, hoje existem diversos tipos de doadores de NO, que incluem nitratos orgânicos (como o gliceril trinitrato), S-nitrosotiols (como a S-nitroglutationa), nitrosils de metais de transição (como o nitroprussiato de sódio) e Nonoatos (como o , (Z) -1 - [2 - (2-

aminoetil)-N-(2-amonioetil) amino] diazen-1-ium-1,2-diolato, também conhecido como DETANonoato). Este último é o doador de NO mais utilizado, pois possui uma meia-vida longa de cerca de 20 h, que mantêm elevado os níveis de NO no organismo por grandes períodos; sua ação não sofre influência da luz, metais, tiols ou células e sua decomposição produz somente NO e uma porção não tóxica denominada dietilenotriamina (DETA) (Feelisch, 1998; Yamamoto e Bing, 2000; Wang *et al.*, 2002). Em nossos resultados, a análise de função pulmonar, utilizando pletismógrafo de corpo inteiro invasivo, revelou que a liberação de NO pelo fármaco DETANonoato foi capaz de interferir na resposta pulmonar dos camundongos, os quais apresentaram aumento nos parâmetros de resistência e elastância pulmonares, quando comparados aos animais instilados somente com salina. Além disso, o aumento do nível de NO tornou os animais hiper-reativos ao agente broncoconstritor metacolina. Em contrapartida, o tratamento com L-NAME foi capaz de inibir o fenômeno da hiper-reatividade pulmonar nos animais silicóticos, que apresentaram níveis de resistência pulmonar e elastância das vias aéreas próximos aos dos animais salina. Na literatura, embora não haja nada relacionado a hiper-reatividade na silicose, dados sobre este fenômeno na asma brônquica, revelam um aumento na resposta da musculatura lisa traqueal em resposta a histamina, nos animais tratados com L-NAME (Strapkova *et al.*, 2008). Além disto, existem evidências que a administração exógena de NO pode exercer efeitos no organismo, que incluem: mudanças na hemodinâmica (Macrae *et al.*, 2004), relaxamento a via aérea central (Gustafsson, 1993) e implicações nos mecanismos celulares anti-inflamatórios (Wenk *et al.*, 2004).

Dentre as isoformas da NOS, a forma induzível, também chamada de iNOS, parece ser a forma mais relevante em diversos processos inflamatórios (Murakami, 2009). Sua presença é induzida em diversas células, como os macrófagos, neutrófilos, plaquetas, entre outras, devido a algum patógeno ou citocina (Bruckdorfer, 2005). Após sua indução, a iNOS é capaz de sintetizar o NO em grandes quantidades, por longos períodos, e isso vem a caracterizar seu envolvimento em vários processos patológicos. O alto nível de NO produzido por macrófagos, neutrófilos ou outras células inflamatórias ativadas, pode corroborar para a lesão das células saudáveis adjacentes, instaurando um processo inflamatório que é a principal causa das doenças inflamatórias e autoimunes. Neste contexto, a análise da imuno-histoquímica dos pulmões dos animais silicóticos revelou níveis aumentados da enzima iNOS, tanto com 7 quanto com 28 dias pós-sílica. Dando suporte ao nosso achado, dados na literatura observaram um aumento da presença da iNOS nos processos inflamatórios causados pela sílica (Fubini e Hubbard, 2003; Park e Park, 2009).

Para avaliar o papel do NO na função e hiper-reatividade pulmonar associada à silicose, de forma mais específica, utilizamos animais geneticamente modificados, os quais foram submetidos à deleção dos genes codificantes para a enzima iNOS ($iNOS^{-/-}$). Com relação à função pulmonar, os animais silicóticos $iNOS^{+/+}$, destoando do grupo $iNOS^{+/+}$ instilado com salina, mostraram-se com aumento da resposta de resistência e elastância pulmonar. Os dados também revelaram que ambos os níveis analisados nos animais $iNOS^{-/-}$ silicóticos estavam reduzidos quando comparados àqueles dos camundongos $iNOS^{-/-}$ instilados com salina. Na condição de aerossolização de metacolina, o grupo silicótico $iNOS^{+/+}$ mostrou-se hiper-reativo nos parâmetros de resistência e elastância, de forma dose dependente, em todas as concentrações analisadas do agonista. Todavia, este fenômeno foi abolido nos animais nocautes silicóticos. Estes padrões de respostas foram observados em ambos os tempos analisados da silicose murina (7 e 28 dias pós-sílica). De acordo com Castranova (2004), o NO realmente está associado ao dano pulmonar, inflamação e evolução da doença à partículas de sílica, sendo o quadro de inflamação e injúria tecidual inibido nos animais $iNOS^{-/-}$ silicóticos.

Após esta etapa, procuramos investigar a potencial correlação entre a resposta de hiper-reatividade e o comprometimento tecidual. Através do uso de técnicas histológicas clássicas, verificamos que os animais $iNOS^{-/-}$ silicóticos apresentaram uma clara inibição no processo inflamatório, com a consequente redução da resposta fibrogênica e da formação de granulomas, nos tempos de 7 e 28 dias. A análise morfométrica confirmou os dados descritos acima, quando foi observada uma marcada redução da área do parênquima pulmonar ocupada por granulomas. Neste contexto, para Yoshimura *et al.* (2006) o NO pode atuar como antifibrótico em determinados modelos de fibrose experimental. Geralmente, porque a ausência da iNOS induz uma diminuição na taxa de NO/ERO, favorecendo o desenvolvimento da fibrose (Dooley *et al.*, 2012). Desta forma a iNOS pode ser considerada como um elemento protetor contra a fibrose e a cicatrização anormal dos tecidos, o que sugere a participação do NO nos fenômenos inflamatórios associados à resposta fibrótica da silicose (Ferrini *et al.*, 2002).

Apesar dos animais nocautes serem uma grande ferramenta no estudo de diversas doenças, este modelo possui certas limitações, pois não precisa a origem do fenômeno observado nos animais, ou seja, sempre existe a possibilidade de tal efeito ser indireto ou decorrente do silenciamento gênico. Para solucionar tal questionamento, existe em alguns casos a alternativa da inibição por via farmacológica. Sendo assim, o 1400W tem sido considerado como o melhor inibidor seletivo da iNOS (Garvey *et al.*, 1997; Thomsen *et al.*,

1997). Neste estudo, o efeito do 1400W nos camundongos silicóticos ratificou os dados obtidos anteriormente, nos quais os animais silicóticos tratados com este fármaco tiveram uma diminuição significativa do processo inflamatório decorrente da sílica, inibindo também o fenômeno de hiper-reatividade pulmonar nestes camundongos. As análises histológicas reproduziram os dados da mecânica respiratória, na qual a inibição da iNOS culminou na diminuição da inflamação e lesão tecidual nos animais silicóticos tratados com o 1400W. Ao que consta, a liberação de NO nas vias aéreas e pulmões tem sido implicada em células inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos, células epiteliais ciliadas, células alveolares do tipo II e fibras neurais, que inervam a musculatura lisa das vias aéreas (Ricciardolo *et al.*, 2004). De acordo com Belvisi *et al.* (1995), o NO é sugerido como causador da diminuição da resistência das vias aéreas, sendo este mediador um neurotransmissor não adrenérgico e não colinérgico responsável pelo relaxamento da musculatura lisa. Todavia, a reação entre o NO e o ânion superóxido, culminando na formação de peroxinitrito, poderia justificar o aumento dos parâmetros de resistência e elastância pulmonares observados, pois sua produção *in vivo* pode estar associada à lesão tecidual (Villa *et al.*, 1994).

Na silicose, este foi o primeiro estudo a analisar o processo inflamatório das vias aéreas e pulmões, correlacionando ao fenômeno de hiper-reatividade pulmonar associada ao mediador NO. No entanto, os mecanismos responsáveis por estas alterações fisiopatológicas nessa doença ainda não estão completamente esclarecidos.

6 **CONCLUSÃO**

Nossos resultados mostram que:

- A estimulação intranasal de camundongos com sílica aumentou os níveis basais de resistência/elastância pulmonares e à hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina, de forma tempo dependente, no período que variou de 2 a 28 dias pós-sílica. Uma associação temporal foi observada em relação à resposta inflamatória e fibrótica verificada nos animais silicóticos;
- Níveis aumentados de NO foram detectados no LBA dos camundongos silicóticos, em comparação ao dos controles. Verificamos também elevação nos níveis de peroxinitrito e expressão de iNOS no tecido pulmonar dos animais silicóticos;
- O tratamento com o inibidor L-NAME inibiu a fase aguda da silicose experimental, no que tange comprometimento da função pulmonar e resposta inflamatória fibrótica;
- A deleção do gene codificante para a enzima iNOS ou o bloqueio de sua atividade pelo inibidor 1400W aboliram o quadro de alteração da resposta pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina. Efeito supressor similar foi notado no caso das alterações morfológicas ao nível do parênquima pulmonar de camundongos silicóticos;

Tomados em conjunto, nossos achados indicam que o NO parece desempenhar um papel relevante no quadro de alteração da função pulmonar na silicose, e que este parece estar associado temporalmente ao comprometimento do parênquima pulmonar. Mais ainda, podemos especular que NO possa ser um alvo terapêutico de interesse no caso de doenças inflamatórias pulmonares crônicas de caráter fibróticos como a silicose.

REFERÊNCIAS

AFAQ, F. Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Arch Biochem Biophys,** v. 508, n. 2, p. 144-51, 2011.

AGOSTINI, L. et al. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. **Immunity,** v. 20, n. 3, p. 319-25, 2004.

ALVING, K.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. M. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. **Eur Respir J,** v. 6, n. 9, p. 1368-70, 1993.

AN, S. S.; FREDBERG, J. J. Biophysical basis for airway hyperresponsiveness. **Can J Physiol Pharmacol,** v. 85, n. 7, p. 700-14, 2007.

ANDERSON, S. D. Indirect challenge tests: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. **Chest,** v. 138, n. 2 Suppl, p. 25S-30S, 2010.

ARMINGTON, A. F. Silica, Synthetic Quartz Crystals. In: (Ed.). **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**: John Wiley & Sons, Inc., v.27, 2000. ISBN 9780471238966.

AXER, H.; PRESCHER, A.; KEYSERLINGK, D. G. Evaluation of Fiber Orientation Using Polarized Light and Fuzzy Inference. Proceedings ESIT, 1999.

BANG, K. M. et al. National trends in silicosis mortality in the United States, 1981-2004. **Am J Ind Med,** v. 51, n. 9, p. 633-9, 2008.

BANKS, D. E.; PARKER, J. E. L. C. H. P. C. P. Occupational lung disease: the diagnosis of pneumoconiosis and novel therapies. In: (Ed.). **Occupational lung disease**. Chapman & Hall Medical, 1998. p.119-138.

BARNES, P. J. et al. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: a comprehensive review. **Chest,** v. 138, n. 3, p. 682-92, 2010.

BECKMAN, J. S. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 87, n. 4, p. 1620-4, 1990.

BEGIN, R. O. et al. Spectrum of alveolitis in quartz-exposed human subjects. **Chest,** v. 92, n. 6, p. 1061-7, 1987.

BELL, J. N.; HONOUR, S. L.; POWER, S. A. Effects of vehicle exhaust emissions on urban wild plant species. **Environ Pollut,** v. 159, n. 8-9, p. 1984-90, 2011.

BELVISI, M. G. et al. Nitric oxide as a neurotransmitter in human airways. **Arch Int Pharmacodyn Ther,** v. 329, n. 1, p. 97-110, 1995.

BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nat Rev Microbiol,** v. 7, n. 2, p. 99-109, 2009.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. **Trends Cell Biol,** v. 11, n. 2, p. 66-75, 2001.

BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Mol Aspects Med,** v. 26, n. 1-2, p. 3-31, 2005.

CAMPOS, H. et al. Inibidores de fosfodiesterases: novas perspectivas de uma antiga terapia na asma? **J Pneumologia,** v. 29, p. 405-412, 2003.

CARLSTEN, C. et al. Cell markers, cytokines, and immune parameters in cement mason apprentices. **Arthritis Rheum,** v. 57, n. 1, p. 147-53, 2007.

CARRERAS, M. C.; PODEROSO, J. J. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. **Am J Physiol Cell Physiol,** v. 292, n. 5, p. C1569-80, 2007.

CASSEL, S. L. et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 105, n. 26, p. 9035-40, 2008.

CASTRANOVA, V. Role of nitric oxide in the progression of pneumoconiosis. **Biochemistry (Mosc),** v. 69, n. 1, p. 32-7, 2004.

CASTRANOVA, V. et al. Effect of inhaled crystalline silica in a rat model: time course of pulmonary reactions. **Mol Cell Biochem,** v. 234-235, n. 1-2, p. 177-84, 2002.

CASTRANOVA, V.; VALLYATHAN, V.; WALLACE, W. E. **Silica and silica-induced lung diseases**. Boca Raton: CRC Press, 1996. 418 p.

CENTRO para CONTROLE e PREVENÇÃO de DOENÇAS (EUA). **Morbidity and mortality weekly report MMWR**. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention,**:** CD-ROMs p. 1995.

CHOI, M. et al. Transient pulmonary fibrogenic effect induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica in A/J mice. **Toxicol lett,** v. 182, n. 1-3, p. 97-101, 2008.

CHOW, S. et al. Exhaled breath condensate (EBC) biomarkers in pulmonary fibrosis. **J Breath Res,** v. 6, n. 1, p. 016004, 2012.

CONNERS, W. et al. L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, diminishes oxidative damage in urinary bladder partial outlet obstruction. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 290, n. 2, p. F357-63, 2006.

CONRAD, R. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H2, CO, CH4, OCS, N2O, and NO). **Microbiol Rev,** v. 60, n. 4, p. 609-40, 1996.

COSTANTINI, L. M.; GILBERTI, R. M.; KNECHT, D. A. The phagocytosis and toxicity of amorphous silica. **PLoS One,** v. 6, n. 2, p. e14647, 2011.

CROSBY, L. M.; WATERS, C. M. Epithelial repair mechanisms in the lung. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,** v. 298, n. 6, p. L715-31, 2010.

DA COSTA, J. C. et al. JMF2-1, a lidocaine derivative acting on airways spasm and lung allergic inflammation in rats. **J Allergy Clin Immunol,** v. 119, n. 1, p. 219-25, 2007.

DATASUS. 2012. Disponível em: < http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=01 >. Acesso em: 21/05/2012.

DAVIS, G. S. et al. Interleukin-12 is not essential for silicosis in mice. **Part Fibre Toxicol,** v. 3, p. 2, 2006.

de FREITAS LUZ, F. et al. [Silicosis among former copper mine workers]. **Cien Saude Colet,** v. 16, n. 8, p. 3421-6, 2011.

de MESQUITA JUNIOR, J. A. et al. Using the forced oscillation technique to evaluate respiratory resistance in individuals with silicosis. **J Bras Pneumol,** v. 32, n. 3, p. 213-20, 2006.

DENICOLA, A. et al. Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching. **Arch Biochem Biophys,** v. 328, n. 1, p. 208-12, 1996.

DERAKHSHAN, B.; HAO, G.; GROSS, S. S. Balancing reactivity against selectivity: the evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide. **Cardiovasc Res,** v. 75, n. 2, p. 210-9, 2007.

DING, M. et al. Diseases caused by silica: mechanisms of injury and disease development. **Int Immunopharmacol,** v. 2, n. 2-3, p. 173-82, 2002.

DOOLEY, A.; BRUCKDORFER, K. R.; ABRAHAM, D. J. Modulation of fibrosis in systemic sclerosis by nitric oxide and antioxidants. **Cardiol Res Pract,** v. 2012, p. 521958, 2012.

DUKELOW, A. M. et al. Effects of nebulized diethylenetetraamine-NONOate in a mouse model of acute Pseudomonas aeruginosa pneumonia. **Chest,** v. 122, n. 6, p. 2127-36, 2002.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Nitric oxide revision. **J Bras Patol Med Lab,** v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

ÉVORA, P. R. B. et al. A utilização do óxido nítrico inalado em cirurgia cardíaca: atualização e análise crítica. **Rev Bras Cir Cardiovasc** v. 17, n. 3, p. 221-229, 2002.

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,** v. 358, n. 1, p. 113-22, 1998.

FERRINI, M. G. et al. Antifibrotic role of inducible nitric oxide synthase. **Nitric Oxide,** v. 6, n. 3, p. 283-94, 2002.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect Immun,** v. 73, n. 4, p. 1907-16, 2005.

FOX, J. G. et al. **The mouse in biomedical research**. 2nd. Amsterdam ; Boston: Elsevier, AP, 2007. 2192 ISBN 978-0-12-369454-6 Disponível em: < http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0707/2007270126-d.html >.

FRIEBE, A.; KOESLING, D. The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models. **Nitric Oxide,** v. 21, n. 3-4, p. 149-56, 2009.

FUBINI, B.; HUBBARD, A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. **Free Radic Biol Med,** v. 34, n. 12, p. 1507-16, 2003.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature,** v. 288, n. 5789, p. 373-6, 1980.

GAO, Y. The multiple actions of NO. **Pflugers Arch,** v. 459, n. 6, p. 829-39, 2010.

GARVEY, E. P. et al. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. **J Biol Chem,** v. 272, n. 8, p. 4959-63, 1997.

GASTON, B. et al. S-nitrosothiol signaling in respiratory biology. **Am J Respir Crit Care Med,** v. 173, n. 11, p. 1186-93, 2006.

GHAFOURIFAR, P.; RICHTER, C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. **FEBS Lett,** v. 418, n. 3, p. 291-6, 1997.

GHIAZZA, M. et al. Does vitreous silica contradict the toxicity of the crystalline silica paradigm? **Chem Res Toxicol,** v. 23, n. 3, p. 620-9, 2010.

GLAAB, T. et al. Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. **Respir Res,** v. 8, p. 63, 2007.

GOW, A. J.; ISCHIROPOULOS, H. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. **J Cell Physiol,** v. 187, n. 3, p. 277-82, 2001.

GREENBERG, M. I.; WAKSMAN, J.; CURTIS, J. Silicosis: a review. **Dis Mon,** v. 53, n. 8, p. 394-416, 2007.

GRINNAN, D. C.; TRUWIT, J. D. Clinical review: respiratory mechanics in spontaneous and assisted ventilation. **Crit Care,** v. 9, n. 5, p. 472-84, 2005.

GUERRIN, F.; VOISIN, C. [Bronchial hyperreactivity in miners with pneumoconiosis]. **Rev Inst Hyg Mines (Hasselt),** v. 35, n. 2, p. 73-84, 1980.

GUHA, N.; STRAIF, K.; BENBRAHIM-TALLAA, L. The IARC Monographs on the carcinogenicity of crystalline silica. **Med Lav,** v. 102, n. 4, p. 310-20, 2011.

GUSTAFSSON, L. E. Experimental studies on nitric oxide. **Scand J Work Environ Health,** v. 19 Suppl 2, p. 44-9, 1993.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Guyton and Hall textbook of medical physiology**. 12th. Philadelphia, Pa.: Saunders/Elsevier, 2011. xix, 1091 p. ISBN 9781416045748 (alk. paper).

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol,** v. 186, p. 1-85, 1990.

HAMILTON, R. F., JR.; THAKUR, S. A.; HOLIAN, A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. **Free Radic Biol Med,** v. 44, n. 7, p. 1246-58, 2008.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes Dev,** v. 26, n. 3, p. 203-34, 2012.

HERTZBERG, V. S. et al. Effect of occupational silica exposure on pulmonary function. **Chest,** v. 122, n. 2, p. 721-8, 2002.

HESSLINGER, C. et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in respiratory diseases. **Biochem Soc Trans,** v. 37, n. Pt 4, p. 886-91, 2009.

HNIZDO, E. et al. Emphysema and airway obstruction in non-smoking South African gold miners with long exposure to silica dust. **Occup Environ Med,** v. 51, n. 8, p. 557-63, 1994.

HOYMANN, H. G. Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents. **J Pharmacol Toxicol Methods,** v. 55, n. 1, p. 16-26, 2007.

IRVIN, C. G.; BATES, J. H. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. **Respir Res,** v. 4, p. 4, 2003.

JATENE, F. B.; FERNANDES, P. M. P.; MEDEIROS, I. L. Lung transplantation. **Rev Med,** v. 88, n. 3, p. 111-122, 2009.

JIE SUN, J. et al. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors** v. 3, p. 276-284, 2003.

KALINOWSKI, L.; DOBRUCKI, I. T.; MALINSKI, T. Race-specific differences in endothelial function: predisposition of African Americans to vascular diseases. **Circulation,** v. 109, n. 21, p. 2511-7, 2004.

KAUPPINEN, T. et al. Occupational exposure to carcinogens in the European Union. **Occup Environ Med,** v. 57, n. 1, p. 10-8, 2000.

KEFELI, M. et al. Clinical, Histopathological and Mineralogical Analysis Findings of an Unusual Case of Pneumoconiosis. **Turk Patoloji Derg,** v. 28, n. 2, p. 184-188, 2012.

KELM, M. Nitric oxide metabolism and breakdown. **Biochim Biophys Acta,** v. 1411, n. 2-3, p. 273-89, 1999.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histology and cell biology : an introduction to pathology**. 3rd. Philadelphia, PA: Saunders, 2012. xiv, 701 p. ISBN 9780323078429

KNUCKLES, T. L. et al. Formation of vascular S-nitrosothiols and plasma nitrates/nitrites following inhalation of diesel emissions. **J Toxicol Environ Health A,** v. 74, n. 13, p. 828-37, 2011.

KROTZ, F.; SOHN, H. Y.; POHL, U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 24, n. 11, p. 1988-96, 2004.

KUMAR, V. et al. **Robbins basic pathology**. 8th. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2007. xiv, 946 p. ISBN 1416029737.

LAKATOS, H. F. et al. Oropharyngeal aspiration of a silica suspension produces a superior model of silicosis in the mouse when compared to intratracheal instillation. **Exp Lung Res,** v. 32, n. 5, p. 181-99, 2006.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. The inflammasomes. **PLoS Pathog,** v. 5, n. 12, p. e1000510, 2009.

LANGLEY, R. J. et al. Granuloma formation induced by low-dose chronic silica inhalation is associated with an anti-apoptotic response in Lewis rats. **J Toxicol Environ Health A,** v. 73, n. 10, p. 669-83, 2010.

LAUZON, A. M. et al. A multi-scale approach to airway hyperresponsiveness: from molecule to organ. **Front Physiol,** v. 3, p. 191, 2012.

LEON, L. R. The use of geneknockoutmice in thermoregulationstudies. **J Ther Bio,** v. 30, n. 4, p. 273-288, 2005.

LEUNG, C. C.; YU, I. T.; CHEN, W. Silicosis. **Lancet,** v. 379, n. 9830, p. 2008-18, 2012.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Quím Nova,** v. 29, n. 6, p. 1318-1325, 2006.

LUH, S. P. Review: Diagnosis and treatment of primary spontaneous pneumothorax. **J Zhejiang Univ Sci B,** v. 11, n. 10, p. 735-44, 2010.

MACRAE, D. J. et al. Inhaled nitric oxide therapy in neonates and children: reaching a European consensus. **Intensive Care Med,** v. 30, n. 3, p. 372-80, 2004.

MARCHIORI, E.; FERREIRA, A.; MULLER, N. L. Silicoproteinosis: high-resolution CT and histologic findings. **J Thorac Imaging,** v. 16, n. 2, p. 127-9, 2001.

MARCHIORI, E. et al. Silicoproteinosis: high-resolution CT findings in 13 patients. **AJR Am J Roentgenol,** v. 189, n. 6, p. 1402-6, 2007.

MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature,** v. 440, n. 7081, p. 228-32, 2006.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J Biol Chem,** v. 268, n. 17, p. 12231-4, 1993.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell,** v. 10, n. 2, p. 417-26, 2002.

MARTINON, F. et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature,** v. 440, n. 7081, p. 237-41, 2006.

MEIRELLES, G. S.; KAVAKAMA, J. I.; RODRIGUES, R. T. [Imaging in occupational lung diseases]. **J Bras Pneumol,** v. 32 Suppl 2, p. S85-92, 2006.

MILOVANOVIC, A. et al. Silicotuberculosis and silicosis as occupational diseases: report of two cases. **Srp Arh Celok Lek,** v. 139, n. 7-8, p. 536-9, 2011.

MISSON, P. et al. Markers of macrophage differentiation in experimental silicosis. **J Leukoc Biol,** v. 76, n. 5, p. 926-32, 2004.

MURAKAMI, A. Chemoprevention with phytochemicals targeting inducible nitric oxide synthase. **Forum Nutr,** v. 61, p. 193-203, 2009.

NELSON, G. et al. Three decades of silicosis: disease trends at autopsy in South African gold miners. **Environ Health Perspect,** v. 118, n. 3, p. 421-6, 2010.

OLIVEIRA, M. S. et al. Suppressive effects of nitric oxide-releasing prednisolone NCX-1015 on the allergic pleural eosinophil recruitment in rats. **Clin Exp Allergy,** v. 38, n. 11, p. 1830-7, 2008.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL do TRABALHO. **Guidelines for the use of the ILO international classification of radiographs of pneumoconioses**. Revised edition 2011. Geneva: International Labour Office, 2011. xi, 48 pages ISBN 9789221245414.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World Health Statistics 2012**. Geneva, Switzerland**:** 170 p. 2012.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev,** v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PALMER, R. M. et al. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 153, n. 3, p. 1251-6, 1988.

PARK, E. J.; PARK, K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. **Toxicol lett,** v. 184, n. 1, p. 18-25, 2009.

PARK, E. K. et al. Chest pain in asbestos and silica-exposed workers. **Occup Med (Lond),** v. 61, n. 3, p. 178-83, 2011.

PORTER, D. W. et al. Nitric oxide and reactive oxygen species production causes progressive damage in rats after cessation of silica inhalation. **Toxicol Sci,** v. 90, n. 1, p. 188-97, 2006.

RADI, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 101, n. 12, p. 4003-8, 2004.

RIBEIRO, F. S. N. et al. **O mapa da exposição à sílica no Brasil**. 2010. 94p.

RIBEIRO, S. M. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci Journal,** v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RICCIARDOLO, F. L. et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiol Rev,** v. 84, n. 3, p. 731-65, 2004.

ROM, W. N.; MARKOWITZ, S. **Environmental and occupational medicine**. 4th. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 1884 p. ISBN 0781762995.

ROSENMAN, K. D.; REILLY, M. J.; GARDINER, J. Results of spirometry among individuals in a silicosis registry. **J Occup Environ Med,** v. 52, n. 12, p. 1173-8, 2010.

RUBBO, H. et al. Nitric oxide reaction with lipid peroxyl radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alpha-tocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate. **J Biol Chem,** v. 275, n. 15, p. 10812-8, 2000.

SAIYED, H. N.; TIWARI, R. R. Occupational health research in India. **Ind Health,** v. 42, n. 2, p. 141-8, 2004.

SALONEN, I. et al. Exhaled nitric oxide and atherosclerosis. **Eur J Clin Invest**, 2012.

SAUNI, R. et al. Increased alveolar nitric oxide and systemic inflammation markers in silica-exposed workers. **Occup Environ Med,** v. 69, n. 4, p. 256-60, 2012.

SCARSELLI, A. et al. Industry and job-specific mortality after occupational exposure to silica dust. **Occup Med (Lond),** v. 61, n. 6, p. 422-9, 2011.

SCHLESINGER, R. B.; MCFADDEN, L. A. Comparative morphometry of the upper bronchial tree in six mammalian species. **Anat Rec,** v. 199, n. 1, p. 99-108, 1981.

SCICHILONE, N. et al. Clinical implications of airway hyperresponsiveness in COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis,** v. 1, n. 1, p. 49-60, 2006.

SEATON, A. et al. Accelerated silicosis in Scottish stonemasons. **Lancet,** v. 337, n. 8737, p. 341-4, 1991.

SHAW, D. E. et al. The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomized controlled trial. **Am J Respir Crit Care Med,** v. 176, n. 3, p. 231-7, 2007.

STAMLER, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell,** v. 78, n. 6, p. 931-6, 1994.

STRAPKOVA, A.; ANTOSOVA, M.; NOSALOVA, G. Effect of NO-synthase and arginase inhibition in airway hyperreactivity. **Bratisl Lek Listy,** v. 109, n. 5, p. 191-7, 2008.

TAYLOR, D. R. Advances in the clinical applications of exhaled nitric oxide measurements. **J Breath Res,** v. 6, n. 4, p. 047102, 2012.

TENNYSON, A. G.; LIPPARD, S. J. Generation, translocation, and action of nitric oxide in living systems. **Chem Biol,** v. 18, n. 10, p. 1211-20, 2011.

TERRA FILHO, M.; SANTOS, U. D. P. [Silicosis]. **J Bras Pneumol,** v. 32 Suppl 2, p. S41-7, 2006.

THOMSEN, L. L. et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: studies with 1400W, a novel inhibitor. **Cancer Res,** v. 57, n. 15, p. 3300-4, 1997.

TSE, L. A. et al. High prevalence of accelerated silicosis among gold miners in Jiangxi, China. **Am J Ind Med,** v. 50, n. 12, p. 876-80, 2007.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,** v. 851, n. 1-2, p. 51-70, 2007.

TUMUR, Z. et al. Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF-kappaB activation. **Am J Nephrol,** v. 31, n. 5, p. 435-41, 2010.

VACEK, P. M. et al. Mortality in Vermont granite workers and its association with silica exposure. **Occup Environ Med,** v. 68, n. 5, p. 312-8, 2011.

VALLYATHAN, V. et al. Oxidative stress in silicosis: evidence for the enhanced clearance of free radicals from whole lungs. **Mol Cell Biochem,** v. 168, n. 1-2, p. 125-32, 1997.

VANHEE, D. et al. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal workers' pneumoconiosis. **Eur Respir J,** v. 8, n. 5, p. 834-42, 1995.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím Nova,** v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VILLA, L. M. et al. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 91, n. 26, p. 12383-7, 1994.

WANG, P. G. et al. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. **Chem Rev,** v. 102, n. 4, p. 1091-134, 2002.

WANG, X. et al. Dyspnea and exercise testing in workers exposed to silica. **Ind Health,** v. 33, n. 4, p. 163-71, 1995.

WATERER, G. W. Airway defense mechanisms. **Clin Chest Med,** v. 33, n. 2, p. 199-209, 2012.

WENK, G. L. et al. Attenuation of chronic neuroinflammation by a nitric oxide-releasing derivative of the antioxidant ferulic acid. **J Neurochem,** v. 89, n. 2, p. 484-93, 2004.

WOOLCOCK, A. J.; PEAT, J. K. Epidemiology of bronchial hyperresponsiveness. **Clin Rev Allergy,** v. 7, n. 3, p. 245-56, 1989.

XU, W. et al. Role of epithelial nitric oxide in airway viral infection. **Free Radic Biol Med,** v. 41, n. 1, p. 19-28, 2006.

YAMAMOTO, T.; BING, R. J. Nitric oxide donors. **Proc Soc Exp Biol Med,** v. 225, n. 3, p. 200-6, 2000.

YANG, H. Z. et al. TLR4 activity is required in the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis after acute and chronic lung injury. **Am J Pathol,** v. 180, n. 1, p. 275-92, 2012.

YOSHIMURA, S. et al. Overexpression of nitric oxide synthase by the endothelium attenuates bleomycin-induced lung fibrosis and impairs MMP-9/TIMP-1 balance. **Respirology,** v. 11, n. 5, p. 546-56, 2006.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5th ed. Prentice Hall, 2009. p.960

ZEIDLER, P. et al. Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis. **J Toxicol Environ Health A,** v. 67, n. 13, p. 1001-26, 2004.

ANEXO – Certificado de aprovação pela Comissão de ética no uso de animais

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência

CEUA Fiocruz
Comissão de Ética
no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo P-0509/08, intitulado "Farmacologia do Processo Inflamatório Pulmonar Crônico", proposto por Patrícia Machado Rodrigues e Silva, foi licenciado pelo Nº L-034/09.
Sua licença autoriza o uso anual de:

- 4.780 *Mus musculus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ).

Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 20 de julho de 2013.

Rio de Janeiro, 21/07/2009.

Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br