



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

Tatiana Paula Teixeira Ferreira

**Efeito do tratamento com a proteína quimérica IL-13PE sobre a inflamação pulmonar induzida por partículas de sílica em camundongos.**

**Rio de Janeiro**  
**2009**

Tatiana Paula Teixeira Ferreira

**Efeito do tratamento com a proteína quimérica IL-13PE sobre a inflamação pulmonar induzida por partículas de sílica em camundongos.**

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**

**Rio de Janeiro  
2009**

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

F383 Ferreira, Tatiana Paula Teixeira.  
Efeito do tratamento com a proteína IL-13PE sobre a inflamação pulmonar induzida por partículas de sílica em camundongos / Tatiana Paula Teixeira Ferreira. - 2009.  
107f. : il.

Orientador: Patrícia Machado Rodrigues e Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental.  
Bibliografia: f. 51-60.

1. Pulmões - Doenças - Tratamento - Teses. 2. Pulmões - Inflamação - Teses. 3. Interleucina-13 - Teses. 4. Fibrose pulmonar - Teses. 5. Sílica - Teses. 6. Fibroblasto - Teses. I. Silva, Patrícia Machado Rodrigues e. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.24-08

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

---

Assinatura

---

Data

Tatiana Paula Teixeira Ferreira

**Efeito do tratamento com a proteína quimérica IL-13PE sobre a inflamação pulmonar induzida por partículas de sílica em camundongos.**

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.

Aprovado em: \_\_\_\_\_

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva (Orientadora)  
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Andrea Monte Alto Costa  
Instituto de Biologia – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Patricia Rieken Macedo Rocco  
Instituto de Biofísica – UFRJ

**Rio de Janeiro  
2009**

Aos meus pais, Maria das Graças e Sebastião Ferreira (*in memoria*), por toda educação, dedicação, respeito, paciência e, principalmente, pelo grande exemplo de amor e fé. E aos meus irmãos Paulo e Patrícia, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da minha vida e por estar sempre à minha frente iluminando os meus caminhos;

À Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva pela grande orientação. Por estar presente em todos os momentos em minha vida, seja dentro ou fora do laboratório. O meu muito obrigada, também, por ser mais do que minha orientadora, por ser uma grande amiga, uma mãe;

Ao Dr. Marco Aurélio Martins, por ser o grande chefe do Laboratório de Inflamação. Pela amizade, respeito, atenção, por todos os puxões de orelha, e pelo grande exemplo do que é pesquisa e como fazer pesquisa;

Ao Dr. Renato Cordeiro, pela sabedoria e luta dedicada em favor da ciência;

Ao Dr. Cory Hogaboam pela contribuição ativa e importante em todos os momentos deste trabalho;

Ao Dr. Raj Puri por nos ceder a proteína quimérica (IL-13PE) utilizada nesta dissertação e, também, por contribuições importantes no desenvolvimento deste trabalho;

À minha grande amiga e irmã Ana Carolina S. de Arantes, por me indicar para estagiar no Laboratório de Inflamação há seis anos atrás e até hoje estar sempre disponível nos momentos mais complicados de experimentos, principalmente no Buxco. A você, o meu muito obrigada;

Às grandes amigas de dentro e fora do laboratório, Kene “Maria” Gallois e Grazielle Guedes. Vocês não imaginam a falta que irão fazer neste laboratório. Por todos os momentos de brigas e brigas, de bate-papo, risos, saídas e, também, de desespero por conta da dissertação;

Às amigas Luisa Florim e Michelle Oliveira, por todos os momentos que passamos juntas no laboratório e pela grande amizade que conquistamos fora dele;

À secretária do laboratório, “Dadazinha”, por estar sempre pronta, todas as vezes que precisávamos de um material para o laboratório, pelo controle de tudo, pela grande amizade e altos papos agradáveis;

A Ana Lucia de Aguiar Pires que me ensinou ao longo desses anos que a organização é tudo na vida. E, também, por sempre me socorrer nos momentos laboratoriais mais difíceis;

À Dra. Edna Valotta pela agradável convivência e por sempre dizer: “Calma, no final tudo dará certo”, nos momentos estressantes da escrita da tese;

À Dra Iolanda Margherita Fierro por ter aceitado ser leitora prévia e pelas sugestões e críticas extremamente pertinentes;

À grande família do Laboratório de Inflamação, Vinicius Frias, Magda Serra, Adriana Ribeiro, Sandra Aurora Perez, Adriana Santos, Priscilla Olsen, Luciana Coelho, Francisco, Alves Filho, Sabrina de Lucena, Davidson Dias, Bianca Ciambarella, Rodrigo Azevedo e a

todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Néelson Jorge Rego e Edson Alvarenga, pelo cuidado com os nossos animais, sem a ajuda de vocês este trabalho não seria realizado;

A todas as pessoas do Pavilhão Ozório de Almeida, pelo bom relacionamento e eventual ajuda quando necessário;

Ao meu pai pelo exemplo de caráter, responsabilidade e amor. Você faz muita falta!

À minha mãe por seu amor incondicional, por ser a mulher que mais admiro nesta vida, e por me ensinar com seu exemplo conceitos de fortaleza, confiança e senso crítico;

À minha irmã Patrícia, pela convivência, respeito, carinho, estresse, e, principalmente, pela grande amizade;

Ao meu irmão Paulo, pela disponibilidade constante, carinho e alegre convívio;

Aos meus grandes amigos Arthur Januário, Barbara Lucia, Pedro Augusto e Valber Rodrigues, por todos os momentos que passamos juntos, por agüentarem o meu grande estresse no período de construção desta dissertação, pela grande amizade, carinho e respeito;

Aos órgãos financiadores FAPERJ e CNPq e, também, a UNESCO e a Global REACH – UMMS International Health Planning Grants.

De antemão, à banca examinadora.

"Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses quefazerem que se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino, continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a verdade."

Paulo Freire



## RESUMO

**FERREIRA, Tatiana Paula Teixeira.** Efeito do tratamento com a proteína quimérica IL-13PE sobre a inflamação pulmonar induzida por partículas de sílica em camundongos. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

A interleucina 13 (IL-13) tem sido apontada como um dos principais mediadores em processos de ativação de fibroblastos e indução de fibrose pulmonar, sendo, portanto, considerada como um alvo terapêutico importante. A silicose é uma doença pulmonar inflamatória crônica, de caráter ocupacional, caracterizada por uma intensa resposta fibrótica e granulomatosa. Com base nestas observações, tivemos por objetivo investigar o potencial efeito da administração da imunotoxina IL-13-PE38QQR (IL-13PE) sobre o modelo de silicose em camundongos. Camundongos Swiss-Webster foram anestesiados e instilados intranasalmente com partículas de sílica (10 mg), sendo a administração da IL-13PE (200 ng/dia) realizada por via intranasal, uma vez ao dia em dias alternados no período entre 21 a 27 dias após a provocação. Analisamos o componente inflamatório, a deposição de colágeno e a área de granuloma avaliados através de técnicas clássicas de histologia, incluindo coloração com H&E e Picrus-sirius, ou ainda a quantificação do conteúdo de colágeno por Sircol. Os componentes de matriz extracelular fibronectina e laminina foram avaliados através de imunohistoquímica. Citocinas e quimiocinas foram quantificadas por sistema de ELISA. As medidas de função pulmonar e resposta de hiperreatividade foram realizadas através do sistema de pletismografia de corpo inteiro invasiva. Verificamos que o tratamento curativo com a IL-13PE inibiu de forma acentuada o comprometimento da função pulmonar nos camundongos silicóticos, incluindo tanto aumento da resistência como da elastância, assim como a resposta de hiperreatividade das vias aéreas ao agente broncoconstrictor metacolina. De forma coerente, os animais silicóticos quando submetidos ao tratamento com IL-13PE apresentaram marcada redução do componente inflamatório pulmonar e da resposta fibrótica, atestado pela diminuição na produção de colágeno, laminina e fibronectina e redução importante da área de granuloma. De forma semelhante, as citocinas (TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ) e quimiocinas (MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, TARC, IP-10, MDC) detectadas em quantidade aumentada no pulmão de animais silicóticos foram reduzidas pelo tratamento com a IL-13PE. Em conclusão, nossos resultados mostram que a administração curativa da IL-13PE foi capaz de inibir os componentes inflamatórios e fibróticos da fase crônica do quadro silicótico em camundongos, o que se refletiu de forma clara na melhora da função pulmonar. Em conjunto, nossos achados indicam que a utilização da IL13PE parece constituir uma abordagem terapêutica extremamente promissora para aplicação em casos de doenças crônicas de natureza fibrótica como a silicose.

Palavras-Chave: IL-13. IL-13PE. Fibrose. Sílica. Silicose.

## ABSTRACT

The interleukin 13 (IL-13) has been identified as a key mediator in process of activation of fibroblasts and induction of pulmonary fibrosis, and it is therefore, considered an important therapeutic target. The silicosis is a chronic inflammatory lung disease, occupational beginning, characterized by an intense fibrotic and granulomatous response. Based on these observations, we had the aim to investigate the potential effect of administration of immunotoxin IL-13-PE38QQR (IL-13PE) on the silicotic fibrotic component. In this regard, Swiss-Webster mice were anesthetized and intranasally instilled with silica particles (10 mg), some of them were treated with IL-13PE (200 ng / day) performed by intranasal via once daily on alternate days in the period between 21 to 28 days after challenge. We analyzed the inflammatory component, the deposition of collagen and the area of granuloma evaluated using classical histological techniques, including staining with HE and Picrus sirius or the system of colorimetric quantification of collagen content by Sircol. The components of extracellular matrix fibronectin and laminin were evaluated by immunohistochemistry. Cytokines and chemokines were quantified by ELISA system. Measures of pulmonary function and hyperreactivity response were performed through the invasive whole body plethysmography. We found that the curative treatment with IL-13PE dramatically inhibited the lung function in silicotic mice, including increased resistance and the elastance, and the response of airway hyperreactivity to methacholine bronchoconstrictor agent. In agreement, when silicotic mice were treated with IL-13PE a marked reduction in the inflammatory component and the pulmonary fibrotic response were noted, attested by the decrease in the collagen production, as well as laminin and fibronectin and significant reduction in the area of granuloma. Similarly, cytokines (TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ ) and chemokines (MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, TARC, IP-10, MDC) found in increased levels in the lungs of silicotic mice were sensitive to the IL-13PE treatment. In conclusion, our results show that the curative administration of IL-13PE was able to inhibit the inflammatory and fibrotic components of the chronic phase of the silicosis in mice, which is clearly reflected by the impairment of lung function. Thus, together our findings indicate that the use of IL-13PE appears to be a very promising therapeutic approach in cases of fibrotic diseases such as silicosis.

Keywords: IL-13. IL-13PE. Fibrosis. Silica. Silicosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mecanismos envolvidos na iniciação e progressão da silicose.....	5
<b>Figura 2</b> – A IL-13 induz produção de TGF- $\beta$ em macrófagos através de dois mecanismos aditivos.....	14
<b>Figura 3</b> - Ilustração esquemática da construção quimérica da IL-13PE.....	16
<b>Figura 4</b> - Esquema de indução da silicose, tratamento e análise de parâmetros inflamatórios.....	18
<b>Figura 5</b> - Retículo com 50 linhas e 100 pontos utilizado para a análise morfométrica.....	20
<b>Figura 6</b> - Avaliação da função pulmonar e da hiperreatividade das vias aéreas de camundongos silicóticos.....	25
<b>Figura 7</b> - Avaliação morfológica do parênquima pulmonar de camundongos silicóticos.....	27
<b>Figura 8</b> - Avaliação morfológica do parênquima pulmonar de camundongos normais e silicóticos.....	28
<b>Figura 9</b> - Quantificação dos níveis de IL-13 no parênquima pulmonar de camundongos silicóticos.....	30
<b>Figura 10</b> - Efeito do tratamento com IL-13PE sobre a função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de camundongos silicóticos.....	32
<b>Figura 11</b> - Efeito do tratamento com IL-13PE sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos.....	34
<b>Figura 12</b> - Efeito do tratamento com IL-13PE sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos.....	35
<b>Figura 13</b> - Efeito do tratamento com IL-13PE sobre a expressão de laminina no pulmão de camundongos silicóticos.....	36
<b>Figura 14</b> - Efeito do tratamento com IL-13PE sobre a expressão de fibronectina no pulmão de camundongos e silicóticos.....	37
<b>Figura 15</b> - Efeito do tratamento com IL-13 PE sobre a geração de quimiocinas no pulmão de animais silicóticos.....	38
<b>Figura 16</b> - Efeito do tratamento com IL-13 PE sobre a geração de citocinas no pulmão de camundongos silicóticos.....	39

<b>Figura 17</b> - Efeito do tratamento com IL-13PE sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos silicóticos.....	42
<b>Figura 18</b> - Efeito do tratamento com IL-13PE sobre a expressão de $\alpha$ -actina de músculo liso (SMA) no pulmão de camundongos silicóticos.....	43

## LISTA DE ABREVIÇÕES

- $\alpha$ - SMA -  $\alpha$ -Actina de Músculo Liso
- AHR- Hiperresponsividade das vias aéreas
- AP-1 - Ativador de Proteína 1
- FGF- Fator de Crescimento de Fibroblasto
- ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1
- IFN- $\gamma$  - Interferon –  $\gamma$
- IgG - Imunoglobulina G
- IL – Interleucina
- IL-13R- Receptor para Interleucina -13
- IL13PE - Interleucina 13 exotoxina de *Pseudomonas*
- JAK-“Janus kinase”
- M1- Macrófago com polarização do tipo 1
- M2- Macrófago com polarização do tipo 2
- MCP-1 –Proteína quimiotática de monócitos 1
- MDC- Quimiocina derivado de macrófagos
- MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
- MIP – Proteína Inflamatória de Macrófagos
- MMAD- Massa Media de Diâmetro Aerodinâmico
- MMP - Metaloproteinase de Matriz
- NF-kB - Fator de Transcrição Nuclear- kappa B
- PAF- Fator de ativação plaquetária
- PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PE- *Pseudomonas*
- pET – Sistema Pro cariótico de *Escherichia coli*
- PMN- Polimorfonuclear
- RANTES-“ Regulated on activated normal T cell expressed and secreted “
- ROS – Espécies reativas de oxigênio
- SARA- Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto
- STAT- “Signal Transducers and Activators of Transcription”
- TARC - Quimiocinas ativadas e reguladas pelo timo
- TGF - Fator Transformador de Crescimento
- TIMP - Inibidor Tecidual de Metaloproteinase

## SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Pulmão.....	1
1.2 Disfunções pulmonares.....	2
1.3 Pneumoconioses.....	3
1.4 Silicose.....	3
1.4.1 Epidemiologia.....	5
1.4.2 Sílica.....	6
1.5 Fibrose Pulmonar.....	8
1.5.1 Células epiteliais.....	8
1.5.2 Macrófagos alveolares.....	9
1.5.3 Fibroblastos / Miofibroblastos.....	10
1.6 Mediadores da resposta à sílica.....	11
1.6.1 Citocinas e quimiocinas.....	11
1.6.1.1 Interleucina 13 (IL-13).....	13
1.6.1.1.1 IL-13PE.....	15
2. OBJETIVO GERAL.....	17
2.1 Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais.....	18
3.2 Indução da silicose e tratamento.....	18
3.3 Avaliação da função pulmonar e hiperreatividade pulmonar.....	19
3.4 Análise histopatológica.....	19
3.4.1 Análise morfométrica.....	20
3.4.2 Imunohistoquímica.....	20
3.4.3 Análise digital.....	21
3.5 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA.....	21
3.6 Quantificação do conteúdo de colágeno por kit de Sircol.....	22
3.7 Análise estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	24

4.1 Avaliação da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas em camundongos silicóticos.....	24
4.2 Avaliação morfológica do pulmão de camundongos silicóticos.....	26
4.3 Avaliação da geração de IL-13 no pulmão de camundongos silicóticos.....	29
4.4 Efeito do tratamento curativo com IL-13PE sobre a resposta silicótica em camundongos.....	31
4.4.1 Avaliação da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas em camundongos silicóticos.....	31
4.4.2 Avaliação das alterações morfológicas pulmonares em camundongos silicóticos.....	33
4.4.3 Avaliação da geração de citocinas e quimiocinas no pulmão de camundongos silicóticos.....	38
4.4.4 Avaliação da expressão de F4/80 e $\alpha$ -SMA no pulmão de camundongos silicóticos.....	41
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	50
7. REFERÊNCIAS.....	51
8. ANEXOS.....	58

## **1 INTRODUÇÃO**

As doenças pulmonares de origem ocupacional são causadas pela inalação de partículas, névoas, vapores ou gases nocivos no ambiente de trabalho (Rushton, 2007). O local exato das vias aéreas ou dos pulmões onde a substância inalada irá se depositar e o tipo de doença pulmonar que irá ocorrer dependerão do tamanho e do tipo das partículas inaladas. As partículas maiores poderão ficar retidas nas narinas ou nas grandes vias aéreas, porém as partículas menores atingirão os pulmões. Nestes, células como os macrófagos retiram a maioria das partículas, tornando-as inofensivas. Porém, algumas delas podem produzir reações distintas no organismo, como o pólen de plantas que pode causar reações alérgicas (Robbins e col., 2000). Outras, como o pó de quartzo que contém dióxido de silício, implicam no aparecimento de uma resposta inflamatória pulmonar aguda, que é seguida, em tempos mais tardios, pelo desenvolvimento de um processo fisiológico de reparo, associado à ocorrência de fibrose, com acúmulo excessivo de matriz extracelular e células mesenquimatosas, ou de remodelamento tecidual. Em conjunto, estes eventos levam a uma progressiva alteração da arquitetura das vias aéreas, redução no processo de trocas gasosas e perda funcional do órgão (Mazurek e col., 2008).

### **1.1 Pulmão**

O pulmão é um órgão que atua efetivamente no processo de trocas gasosas entre o sangue e o ar inspirado, tendo como estrutura básica de condução o sistema da árvore respiratória que se constitui da traquéia, a qual ao ramificar-se origina dois brônquios, também conhecidos como primários. Estes ao penetrarem nos pulmões irão dirigir-se para baixo e para fora, e ao ramificarem-se darão origem aos brônquios lobares. Estes últimos ao se dividirem repetidas vezes formam estruturas cada vez menores e dão origem a uma estrutura complexa que constitui os bronquíolos (terminais). Estes por sua vez terminam nos bronquíolos respiratórios que marcam, então, o início da porção respiratória. Esta compreende os ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos que compõem no seu todo o parênquima pulmonar (Kobzik e col., 1999).

Desta forma, fica claro que o pulmão encontra-se em contato amplo com o meio externo, ficando, assim, exposto à ação de diversos agentes agressores incluindo patógenos, poluentes, substâncias antigênicas e xenobióticos. Para manter a integridade indispensável ao fenômeno de trocas gasosas que se dá ao nível dos alvéolos e capilares, o pulmão, no curso do processo evolutivo, manteve um sistema de detoxificação e de defesa particularmente



adaptativos e eficazes. No entanto, as estruturas alveolares são bastante finas e com grande susceptibilidade a respostas de natureza inflamatória, o que tem por consequência a ocorrência de uma ampla gama de patologias inflamatórias (Caramori e col., 2003, Kobzik e col., 1999).

## **1.2 – Disfunções pulmonares**

As doenças pulmonares de caráter difuso são classificadas em duas categorias: (1) as doenças obstrutivas, caracterizadas por aumento da resistência ao fluxo de ar devido à presença de obstrução parcial ou completa em qualquer nível, desde a traquéia e brônquios principais até os bronquíolos terminais e respiratórios; e (2) as doenças restritivas, caracterizadas por redução da expansão do parênquima pulmonar, com diminuição da função pulmonar total. Algumas disfunções podem ainda apresentarem-se como mistas, com características tanto de natureza obstrutiva quanto restritiva (Rushton, 2007).

Os principais distúrbios obstrutivos (excluindo tumores ou a inalação de corpo estranho) são verificados em patologias como enfisema, bronquite crônica, bronquiectasia e asma. Em pacientes com essas doenças, as provas de função pulmonar revelam uma limitação das taxas de fluxo aéreo máximo durante a expiração forçada. A obstrução do fluxo aéreo expiratório pode resultar do estreitamento anatômico das vias aéreas, conforme observado classicamente na asma, ou da perda da retração elástica do pulmão, que tipicamente ocorre no enfisema (Robbins e col., 2000).

Por outro lado, as doenças restritivas são identificadas por uma redução da capacidade pulmonar total, enquanto o fluxo expiratório apresenta-se normal ou proporcionalmente reduzido. Duas são as condições gerais nas quais podem-se observar alterações de caráter restritivo: (1) distúrbios da parede torácica na presença de pulmões normais como, por exemplo, doenças pleurais; e (2) doenças infiltrativas e intersticiais agudas ou crônicas (Castranova e col., 2000). A Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (SARA) é considerada uma doença restritiva clássica. As doenças restritivas crônicas incluem as que são causadas pela inalação de poeira ou pneumoconioses e a maioria das condições infiltrativas, como é o caso da silicose (Castranova e col., 2000). Embora a patogênese das disfunções pulmonares obstrutivas e restritivas seja complexa e não completamente elucidada, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e reguladores de apoptose têm sido implicados nestes processos (Kobzik e col., 1999, Rushton, 2007).

### 1.3 Pneumoconioses

O termo pneumoconiose foi criado por Zenker, em 1866, para designar um grupo de doenças pulmonares como, por exemplo, a **antracose** que é causada por pó-de-carvão, a **asbestose** por asbestos, a **beriliose** por berílio e a **silicose** causada por partículas de sílica cristalina, cujas poeiras fibrosantes são comumente encontrada em locais de trabalho. Em 1971, este termo foi redefinido para "acúmulo de poeiras nos pulmões e a reação tecidual a sua presença" ficando estabelecido como "poeira" um aerossol composto de partículas sólidas inanimadas (Fujimura, 2000). O desenvolvimento de pneumoconioses depende: (1) da quantidade de poeira retida no pulmão e nas vias aéreas; (2) do tamanho e da forma e, portanto, da flutuação das partículas; (3) da solubilidade e das propriedades fisicoquímicas das partículas; e (4) de possíveis efeitos adicionais de outros irritantes (por exemplo, tabagismo) (Godleski, 1994).

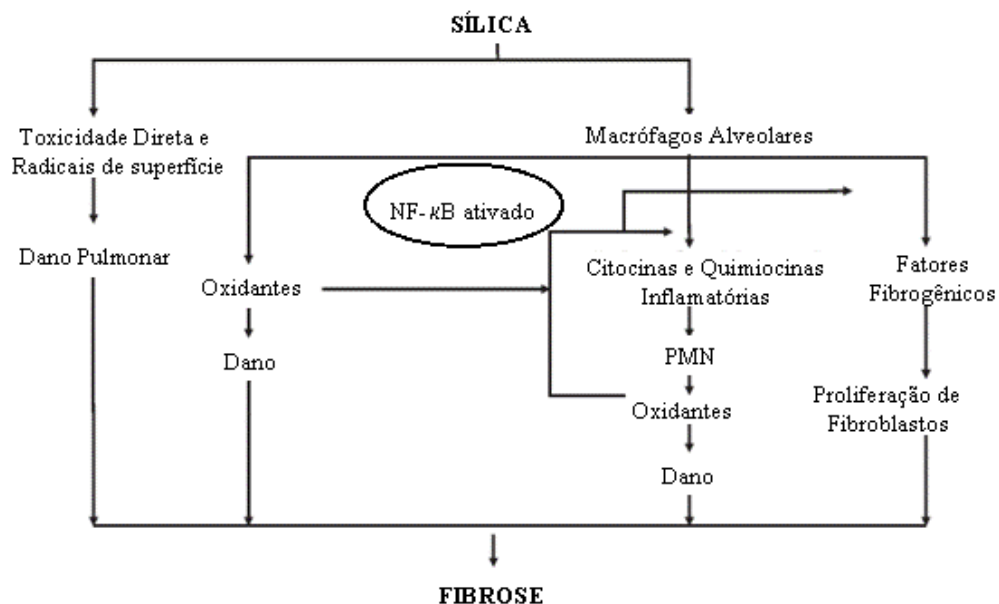
### 1.4 Silicose

Dentro do contexto acima mencionado situa-se a silicose, que é uma doença pulmonar causada pela inalação de dióxido de silício ou sílica na sua forma livre e cristalina (Castranova, 2004, Christie e col., 2004, Godleski, 1994). A silicose, que atualmente constitui a doença ocupacional crônica de maior prevalência no mundo, manifesta-se habitualmente, após várias décadas de exposição, sob a forma de pneumoconiose fibrosante nodular lentamente progressiva. É diagnosticada através da radiografia de tórax simples que revela a presença de finas nodulações nas regiões superiores dos pulmões (Terra Filho e col., 2006). A função pulmonar pode estar na condição normal ou moderadamente afetada, sendo que na maioria dos pacientes a dispnéia surge numa fase mais tardia. Esta patologia apresenta, em geral, uma evolução bastante lenta, progressiva e irreversível, levando à insuficiência respiratória, que é decorrente de alterações da ventilação pulmonar e das trocas gasosas. Estas consistem então em um fator limitante para as atividades cotidianas do paciente (Morgan e col., 1995, Rimal e col., 2005) mesmo em situações onde o paciente não esteja mais exposto à inalação de partículas de sílica (Godleski, 1994). Em humanos, a silicose caracteriza-se por nódulos fibróticos causados por uma inflamação persistente que leva à proliferação de fibroblastos e acúmulo exagerado de colágeno (Cook e col., 2002, Hunninghake e col., 1984).

Entre as atividades de maior risco encontram-se aquelas que envolvem jateamento de areia, mineração, trabalho em fundição de ferro, indústrias de cerâmica e abrasivos, pedreiras e moagem de granito (Mossman e col., 1998). A silicose caracteriza-se pela ocorrência em

três diferentes formas: aguda, acelerada e crônica, estando a progressão da doença vinculada à taxa de deposição e quantidade de partículas de sílica inaladas (Driscoll e col., 1997b). A silicose aguda resulta da exposição a elevados níveis de poeira associados a jateamento com areia e pedra de perfuração, sendo caracterizada por um início rápido (após poucos anos de exposição) e consiste de proteinose alveolar, edema e recrutamento celular, o que acaba resultando em uma dramática diminuição da troca gasosa. A forma acelerada desenvolve-se mais lentamente e caracteriza-se por lipoproteinose alveolar, inflamação crônica e fibrose com presença de granulomas (Castranova, 2004). Já a forma crônica tem um período de latência de 20-40 anos. É caracterizada por infiltrado celular intenso, deposição de colágeno, nódulos silicóticos e perda da função pulmonar. Este processo envolve citotoxicidade direta da partícula de sílica cristalina em células pulmonares, devido às propriedades da sua superfície. Além disso, macrófagos alveolares e/ou células epiteliais são estimulados a produzir citocinas e quimiocinas inflamatórias (Misson e col., 2004). Como resultado do recrutamento e ativação de macrófagos alveolares e neutrófilos, ocorre a produção elevada de espécies reativas de oxigênio (ROS) que irão causar lesão no parênquima pulmonar (Castranova, 2004, Misson e col., 2004). Em resposta ao dano pulmonar causado pelo estresse oxidativo, macrófagos alveolares e/ou células epiteliais sofrem processo de ativação seguido da geração e conseqüente liberação de fatores de crescimento e mediadores fibrogênicos, resultando na ativação de fibroblastos e subsequente fibrose pulmonar (Castranova e col., 2000, Driscoll e col., 1997b) (Figura. 1).

Até a década de 80, não havia sido feita uma correlação entre a presença de sílica e o câncer de pulmão. Porém, em 1994, Parkes, descreveu a associação entre o carcinoma broncogênico e pacientes com silicose. A (Saúde)Organização Mundial de Saúde - OMS (1986), afirmou que não há risco de câncer de pulmão em exposições ocupacionais até 40 mg/m<sup>3</sup>. No entanto, o parecer publicado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer da OMS – IARC (Cancer, 1997) indica que há evidências tanto em humanos como em modelos experimentais, de que a sílica cristalina inalada na forma de quartzo ou cristobalita de fontes ocupacionais é carcinogênica.



**Figura 1: Mecanismos envolvidos na iniciação e progressão da silicose.** Produtos oxidantes são gerados diretamente a partir da superfície reativa da sílica e como resultado da fagocitose das partículas. Essas espécies reativas de oxigênio em macrófagos ativam a transcrição de fatores que controlam a expressão gênica de uma variedade de quimiocinas e citocinas inflamatórias e fatores fibrogênicos. Adaptada de Castranova, 2004.

#### 1.4.1 Epidemiologia

A silicose representa um sério problema de saúde pública uma vez que, apesar de ser evitável, apresenta altos índices de incidência e prevalência, especialmente nos países em desenvolvimento (Rees e col., 2007). É uma doença irreversível e, apesar do arsenal terapêutico disponível, não há um tratamento específico para a silicose até o presente momento. A terapia de suporte inclui procedimentos que trazem alívio ao paciente e inclui o uso de antitussígenos, broncodilatadores e oxigênio quando necessário (Rimal e col., 2005). No entanto, a remoção das partículas coloca-se como uma alternativa para evitar o agravamento da doença (Terra Filho e col., 2006). De acordo com a publicação da OMS(Saúde) ([http://www.who.int/occupational\\_health](http://www.who.int/occupational_health)), a silicose é uma doença ocupacional que produz o maior número de vítimas e mata anualmente centenas de pessoas em todo o mundo, podendo promover com graves transtornos para a saúde do trabalhador, assim como resultar em um sério impacto sócio-econômico. Embora várias medidas sanitárias tenham sido implementadas para o controle da silicose, a incidência desta patologia em países desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento é ainda bastante elevada.

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

O número estimado de trabalhadores potencialmente expostos a poeiras contendo sílica é superior a 6 milhões somente no Brasil (em torno de 4 milhões na construção civil, 500 mil em mineração e garimpo e acima de 2 milhões em indústrias de transformação de minerais, metalurgia, indústria química, cerâmicas e vidros), em particular na região sudeste, onde a mineração (9%), exploração de pedreira (16%), construção civil (67%) e indústrias de processamento de minerais (34%) constituem atividades econômicas predominantes. Nas regiões de seca no nordeste, a escavação de poços com alto conteúdo de quartzo resulta em uma prevalência de 26% de silicose nos indivíduos (FUNDACENTRO, 2008) (<http://www.fundacentro.gov.br>). Estas taxas de prevalência referem-se aos trabalhadores em atividade e o contraste entre as mesmas reflete as condições de exposição dentro de cada grupo analisado. Somente no estado de Minas Gerais, calcula-se que haja cerca de 7400 casos provenientes da mineração de ouro - Ministério da Saúde (Saúde, 1997), sendo cerca de 4500 casos na região de Nova Lima. Os números de casos provenientes de garimpo e lapidação não são bem conhecidos.

### **1.4.2 Sílica**

A sílica é o nome genérico utilizado para denominar compostos que possuem um átomo de silício e dois de oxigênio, e que ao se estruturarem entre si formam diversas substâncias químicas. Apresenta-se na forma cristalina (quartzo, cristobalita e tridimita) ou amorfa, sendo a primeira a de maior importância no contexto ocupacional, já que a forma amorfa praticamente é atóxica para os pulmões (Balaan e col., 1993). As partículas de poeira inalada depositam-se em vários locais do sistema respiratório dependendo do tamanho, forma, massa, características aerodinâmicas e outras propriedades físicas (Hounam e col., 1983). Como as partículas são irregulares, seu tamanho é expresso em diâmetro aerodinâmico, um parâmetro que descreve o movimento da partícula inalada no ar inspirado. O diâmetro

aerodinâmico determina onde as partículas inaladas se depositaram no pulmão (Hounam e col., 1983). Partículas maiores do que 15  $\mu\text{m}$  de massa media de diâmetro aerodinâmico (MMAD) ficam retidas na região nasal, chamadas de fração inalável. As intermediárias, entre 5 a 10  $\mu\text{m}$  depositam-se nos brônquios e bronquíolos, chamadas de fração respirável, sendo removidas através do mecanismo mucociliar. As menores penetram nos bronquíolos terminais e alvéolos e são parcialmente removidas pelos macrófagos alveolares. No pulmão humano verificou-se que as partículas de sílica retidas têm diâmetro que varia entre 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$ . Outras partículas entram em contato com o epitélio alveolar levando ao aumento da síntese da Proteína Inflamatória de Macrófagos 2 (MIP-2) e outras quimiocinas que atuam atraindo neutrófilos (Barrett e col., 1998). Além disso, parte das partículas atravessa o epitélio respiratório, sendo fagocitadas pelos macrófagos intersticiais, ou deposita-se diretamente no interstício (Brody e col., 1982). Horas após a exposição a aerossóis de sílica, foi verificado que macrófagos alveolares, fisiologicamente dispostos ao acaso nos alvéolos pulmonares, encontram-se concentrados na bifurcação do duto alveolar, local onde as partículas depositam-se (Brody e col., 1980). Evidências indicam que a interação das partículas de sílica com os macrófagos alveolares se faz através de receptores do tipo “scavenger” (Kobzik, 1995, Palecanda e col., 2000). Vale ressaltar que a sílica tem propriedades citotóxicas, em grande parte devido a radicais livres presentes na superfície cristalina. Estes radicais, intermediários reativos de oxigênio (ROS) são formados durante a ruptura ou esmagamento da sílica e têm uma meia-vida de cerca de 1 - 2 dias (Lapp e col., 1993, Vallyathan e col., 1988). Os ROS podem atuar como mensageiros secundários estimulando a translocação do fator de transcrição relacionado com estresse, o fator nuclear kappa B (NF-kB) (Schreck e col., 1992). As citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) também possuem um papel crítico na silicose pulmonar, mediando inicialmente a reação inflamatória aguda e participando mais tardiamente da indução do processo fibrogênico (Piguet e col., 1990).

Dados na literatura relatam evidências de que a IL-1 apresenta um potencial fibrogênico (Lappalainen e col., 2005). Alguns estudos, tanto em humanos como em animais, demonstraram a presença de IL-1 $\beta$  na inflamação crônica e em processos de fibrogênese pulmonar, associada ao acúmulo de miofibroblastos e depósito de matriz extracelular (Dinarello, 1997, Phan, 2002).

## **1.5 Fibrose Pulmonar**

Para muitos a resposta de fibrose pulmonar é vista tradicionalmente como um fenômeno que ocorre posteriormente a uma resposta inflamatória de caráter agudo, muito embora até o presente momento não haja evidências conclusivas que comprovem a real existência de uma correlação direta entre parâmetros inflamatórios e a evolução da doença. No entanto, tem sido descrito na literatura que a fibrose tecidual se amplifica a partir da ocorrência de uma lesão inicial e atua modulando o fenômeno de reparo tecidual, no que tange tanto ao acúmulo de células mesenquimatosas como à síntese de componentes da matriz extracelular (Keane e col., 2002). Este fato tem direcionado diversos grupos de pesquisadores a focar seus estudos na expressão de componentes da matriz extracelular e moléculas normalmente envolvidas na regulação da homeostase. No caso particular da matriz extracelular, evidências indicam que sua manutenção é um processo dinâmico, no qual há a síntese de proteínas como colágeno fibrilar, fibronectina e proteoglicanas, sempre balanceada por uma taxa equivalente de proteólise (Castranova, 2004). Como reguladores tem sido dada ênfase a uma classe de proteases conhecida como metaloproteinases de matriz (MMP), cuja atividade enzimática é regulada por uma família de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP). Tem sido reportado na literatura que durante a desregulação do processo homeostático ocorre a formação de fibrose tecidual, que corresponde a um fenômeno de reparo excessivo, traduzido por alterações funcionais importantes (Keane e col., 2002). Neste cenário amplo incluem-se, também, outras células residentes como as epiteliais, de revestimento da árvore brônquica, bem como outras células constitutivas (macrófagos), que desempenham uma participação importante como contribuintes do processo de agressão tecidual mediante a ativação em cascata de diferentes tipos celulares e fenômenos de reparo (Mossman e col., 1998, Rocco e col., 2003).

### **1.5.1 Células epiteliais**

Células epiteliais têm como característica básica a função de revestimento de diferentes locais do organismo, dentre os quais a árvore respiratória. No caso particular dos alvéolos, adquirem a denominação de pneumócito I e II e possuem participação ativa no processo de trocas gasosas. Neste sentido, um crescente número de evidências aponta para um papel importante das células epiteliais das vias aéreas no estabelecimento do quadro inflamatório. Este fenômeno parece estar associado a uma alteração fenotípica que leva à produção de uma variedade de mediadores que incluem prostaglandinas, fator de agregação plaquetária (PAF),

citocinas e quimiocinas (Jany e col., 1995, Kinnula, 1992, Smith e col., 1990). Estudos complementares demonstraram a capacidade de células epiteliais brônquicas de expressar moléculas de adesão (CD 11b/CD18, molécula de adesão intercelular 1- ICAM-1), o que de forma clara reforça a potencial contribuição destas células no recrutamento leucocitário para o foco inflamatório (Kai e col., 1994).

### **1.5.2 Macrófagos alveolares**

Os macrófagos alveolares aparecem, em geral, localizados no interior dos alvéolos e constituem as primeiras células residentes que entram em contato com o agente agressor. Apresentam-se em número elevado no interstício pulmonar e dentro dos alvéolos, constituindo, assim, importantes células efetoras do processo de imunidade imediata. Sua implicação no processo de reparação é relevante uma vez que possuem a capacidade de liberar citocinas e fatores quimiotáticos que podem regular tanto o acúmulo local de células mesenquimatosas (fibroblastos) como de matriz extracelular.

Os macrófagos são importantes membros da linhagem de células mononucleares, e apresentam heterogeneidade fenotípica de forma associada: i) ao processo de diferenciação celular que está diretamente relacionado ao tipo de citocina com a qual faz contato e interação com o estroma em órgãos hematopoiéticos; ii) a uma ampla distribuição em tecidos do organismo e; iii) à variada responsividade a estímulos endógenos e exógenos. O reconhecimento destes estímulos faz-se mediante interação com uma gama extensa de receptores ligados à membrana plasmática, que irá resultar em fagocitose ou endocitose, sinalização intracelular e alterações complexas de ativação e repressão de genes. Os ligantes reconhecidos por macrófagos incluem os receptores do tipo "scavenger", opsoninas (no caso de anticorpos, complemento, colectinas e proteína ligante de lipopolissacarídeo), ou ainda o reconhecimento direto de carboidratos, proteínas, lipídios e ácido nucléico através dos receptores do tipo "Toll" e lectinas. Estes últimos possuem marcada importância no reconhecimento não apenas de resíduos bacterianos conservados como também de estruturas endógenas como lipoproteínas, hidrolases lisosomais, proteínas de choque térmico e complexos de proteinases, o que os torna peças fundamentais no "clearance" do espaço extracelular e homeostase tecidual, compondo parte do mecanismo de defesa do organismo (Dunn e col., 2003). De forma interessante, dados de literatura relataram que na condição da ativação clássica de macrófagos por agentes microbianos e/ou citocinas do tipo Th1 como o interferon gama (IFN- $\gamma$ ), em particular, foi verificada a produção de grandes quantidades de



óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias envolvidas em processos de citotoxicidade, “killing” microbiano e regulação da proliferação celular (M1 ou polarização do tipo 1). Mais recentemente, entretanto, foi demonstrado que macrófagos podem sofrer processo de ativação alternativo quando na condição de estimulação por citocinas Th2 como IL-4 e IL-13 (M2 ou polarização do tipo 2) (Misson e col., 2004). Nesta condição de ativação alternativa de macrófagos, foi detectada a indução da enzima arginase, associada à síntese de poliaminas e biossíntese de prolina, indicando assim que estas células poderiam desempenhar um papel importante no controle da proliferação celular, deposição de colágeno e reparo tecidual (Misson e col., 2004).

No caso particular da silicose, macrófagos pulmonares constituem as células de defesa mais importantes uma vez que atuam como primeiro elemento de contato com as partículas de sílica. Em um primeiro contato, os macrófagos alveolares ligam-se e engolfam as partículas de sílica, e aqueles que sobrevivem ao processo de apoptose, conseqüente da interação com a sílica, escapam através dos linfonodos proximais ou eventualmente são expelidos para fora do trato respiratório (Hamilton e col., 2008). Alternativamente, os macrófagos ativados migram para o espaço intersticial, onde liberam uma ampla gama de mediadores inflamatórios e prófibróticos, contribuindo desta forma para a progressão do quadro fibrótico induzido pela sílica ao nível pulmonar (Hamilton e col., 2008).

### **1.5.3 Fibroblastos/Miofibroblastos**

Fibroblastos são células mesenquimais que normalmente se encontram no estroma de vários tecidos, e, no caso do pulmão, estão presentes na adventícia de estruturas vasculares e nas vias respiratórias (Phan, 2008). Na condição de lesão tecidual, semelhante ao que ocorre na silicose, os fibroblastos proliferam, migram e produzem grandes quantidades de componentes da matriz extracelular, que ajuda a reparar o tecido lesado. Essa população apresenta fenótipo diferente, sendo assim heterogênea e ocupa grande parte da lesão durante o período ativo do processo de fibrose. Um desses fenótipos corresponde ao miofibroblasto que se caracteriza por ser uma célula com alta plasticidade fenotípica, por possuir função primária no processo de reparo e remodelamento, ou seja, atuante na regulação da degradação da matriz via secreção das metaloproteinases e substituição por matriz recém sintetizada. Nesta condição, estas células passam a expressar a proteína  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) (Hamilton e col., 2008, Sappino e col., 1990) e adquirem características morfológicas, com clara presença de fibras de estresse (Eckes e col., 2006, Kinnula, 1992).

Durante o desenvolvimento da resposta fibrótica, os miofibroblastos sofrem ativação por uma série de fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Kovacs e col., 1994, Schafer e col., 2007). Dentre estes, recebe destaque o TGF- $\beta$  por seu potente efeito indutor de proliferação e ativação de fibroblastos, com consequente expressão de  $\alpha$ -SMA e aumento da produção de colágeno (Phan, 2008, Powell e col., 1999). Leucócitos, células do parênquima e células epiteliais são os responsáveis pela produção destes fatores, incluindo os próprios fibroblastos que se mostram aptos a secretar TGF- $\beta$ , configurando assim um processo de regulação autócrina (Border e col., 1994).

Somado ao processo de diferenciação e proliferação dos miofibroblastos, estas células atuam como principais produtoras dos componentes da matriz extracelular no processo fibrótico, secretando principalmente colágeno dos tipos I, III e IV (Phan, 2008), assim como fibronectina. Não somente os miofibroblastos são fontes de colágeno e outras proteínas de matriz, mas também são consideradas células altamente dinâmicas e ativas. Estas células podem gerar um arsenal de mediadores químicos, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e mediadores lipídicos, que de um modo geral, amplificam e sustentam a resposta crônica (Phan, 2002, Powell e col., 1999). Portanto, os miofibroblastos além de funcionarem como células estruturais principais produtores de colágeno, parecem possuir também uma função imunoreguladora, assim como as células inflamatórias.

## **1.6 Mediadores da resposta à sílica.**

### **1.6.1 Citocinas e quimiocinas**

Citocinas são proteínas de aproximadamente 25 kDa produzidas por diversos tipos de células do organismo. Geralmente são liberadas em resposta a um estímulo e atuam através da ligação a um receptor específico presente na membrana celular. Estas moléculas podem agir de forma autócrina, afetando o comportamento das células que as liberaram ou de forma parácrina, afetando o comportamento de células adjacentes. Algumas citocinas podem atuar, também, de forma endócrina, afetando células distantes, porém isso depende do tempo de meia-vida e da sua produção na circulação (Barnes e col., 1998). Estas proteínas têm como característica uma ação pleiotrópica, ou seja, uma única citocina pode atuar em diferentes células induzindo diferentes efeitos biológicos. Na fase de ativação das respostas imunológicas as citocinas estimulam o crescimento e a diferenciação das células do sistema imune, enquanto que na fase efetora podem induzir a ativação de células como linfócitos e

macrófagos. Assim, as citocinas são consideradas como proteínas reguladoras do sistema imunológico, sendo essenciais na formação das repostas imunológicas tanto inata como adaptativa, bem como no estabelecimento e manutenção da memória imunológica (Chabalgoity e col., 2007).

As quimiocinas compõem um grupo particular de citocinas quimiotáticas, tendo sido identificados mais de 30 exemplares até o presente momento (Barnes e col., 1998, Wynn, 2008). Possuem características semelhantes como o baixo peso molecular, similaridades em suas sequências iniciais, assim como a presença de uma região contendo dois ou quatro resíduos de cisteína, que formam pontes dissulfídicas na estrutura terciária da proteína. São subdivididas em quatro subfamílias, a saber, CXC, CC, C e CX<sub>3</sub>C, cujo elemento de diferenciação é dependente da presença ou ausência de um resíduo de aminoácido localizado entre os dois primeiros dos quatro resíduos conservados de cisteína (Chabalgoity e col., 2007). Estudos demonstraram que as quimiocinas podem ter diversas funções durante o processo inflamatório, as quais podem estar relacionadas ao recrutamento celular, ativação e diferenciação das células que participam deste processo (Wynn, 2008). Dentre as quimiocinas mais atuantes em processos de natureza fibrótica merecem destaque MIP-1 $\alpha$  (CCL3), Proteína quimiotática de monócitos 1 - MCP-1 (CCL2), “Regulated on activated normal T cell expressed and secreted” - RANTES (CCL5) e Quimiocina derivado de macrófagos - MDC (CCL22) (Wynn, 2008).

Na condição de exposição às partículas de sílica foi verificada a produção de citocinas e quimiocinas, além de fatores de crescimento provenientes de macrófagos alveolares e pneumócitos tipo II, que estão associados tanto ao início como à progressão da doença (Castranova e col., 2000, Driscoll e col., 1997a). Dentre estes, o TNF- $\alpha$  tem sido proposto como uma citocina crucial na patogênese da silicose (Driscoll e col., 1997b). Driscoll e colaboradores (1996) demonstraram haver uma relação direta entre a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos alveolares e a infiltração de células inflamatórias no pulmão de ratos expostos à sílica. A IL-1 também foi descrita como uma citocina importante no quadro silicótico, atuando na expressão de moléculas de adesão através da geração de quimiocinas (Driscoll e col., 1996).

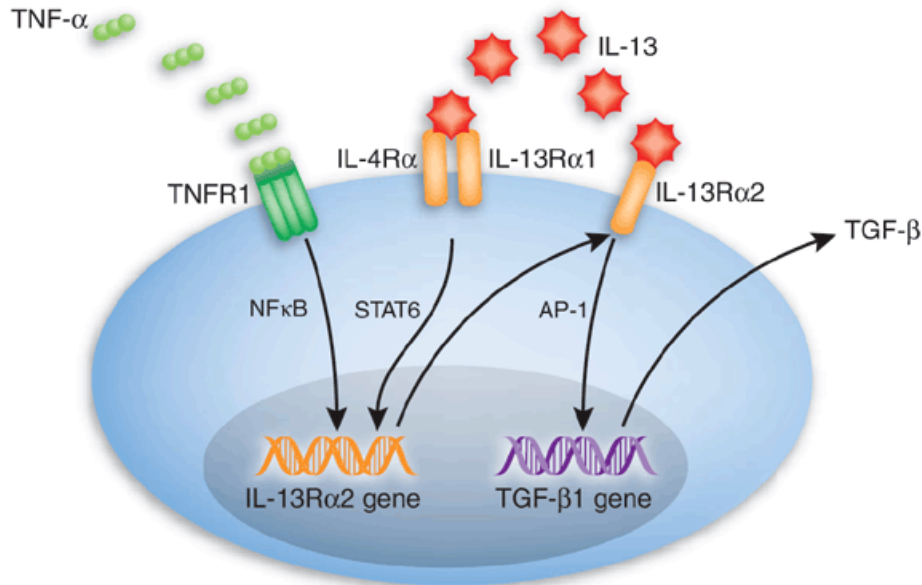
Dentro do contexto da fibrose, uma citocina tem recebido especial atenção, a IL-13, em função de sua capacidade de agir diretamente sobre fibroblastos pulmonares (Doucet e col., 1998) e células mononucleares/macrófagos (Belperio e col., 2002), além de induzir hiperresponsividade das vias aéreas (AHR), alterações nas células epiteliais, hipersecreção de

muco, inflamação das vias aéreas, remodelamento tecidual e fibrose (Karp e col., 2004, Wynn, 2003). Evidências apontam para o envolvimento da IL-13 em diversas patologias inflamatórias crônicas de caráter fibrótico como esquistossomose, hepatite viral, asma brônquica, doença de Crohn, doença pulmonar intersticial (Fuss e col., 2004, Hasegawa e col., 1997, Ray e col., 2000).

### **1.6.1.1 Interleucina 13**

A IL-13 é uma citocina do tipo Th2, primeiramente descrita por seus efeitos em linfócitos B e monócitos, promovendo mudança de classe de imunoglobulina para IgE e induzindo a expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II (Wynn, 2003). A IL-13 desencadeia seus efeitos através da ligação ao receptor IL-13R $\alpha$ 1, que, por sua vez, forma um heterodímero com o receptor da IL-4 (IL-4R $\alpha$ ), com processo de sinalização intracelular sendo dependente da via JAK-STAT6 (Kelly-Welch e col., 2003, Murata e col., 1999). Entretanto, foi demonstrado que a IL-13 possui grande afinidade de ligação à cadeia  $\alpha$ 2 de seu receptor IL-13R $\alpha$ 2, que é reconhecido como um receptor “decoy” (Kawakami e col., 2001). Faltam evidências indicativas da efetividade da transmissão do sinal celular, fato este atribuído ao curto domínio citoplasmático deste receptor (Fichtner-Feigl e col., 2006), tendo sido então proposta uma ação antagonista para este receptor (Bataller e col., 2005, Kasaian e col., 2008, Wynn, 2004). Entretanto, Fichtner-Feigl e colaboradores (2005), de forma contrária, propuseram ser o receptor IL-13R $\alpha$ 2 capaz de desencadear uma resposta biológica, uma vez que foi detectada a produção de TGF- $\beta$  mediada pela ativação deste receptor. Isto claramente apontava para um potencial envolvimento deste receptor na fibrose. Através de ensaios utilizando uma linhagem de macrófagos murinos, os autores observaram que a ativação com IL-13 não era capaz de induzir a geração de TGF- $\beta$  ou de induzir a expressão do receptor IL-13R $\alpha$ 2 (Fichtner-Feigl e col., 2006). Entretanto, de forma curiosa, quando as células eram estimuladas com IL-13 e TNF- $\alpha$ , ambas as respostas passavam a ser detectadas, sugerindo que a ligação do TNF- $\alpha$  ao receptor TNFR1 e da IL-13 ao complexo IL-4R $\alpha$  – IL-13R $\alpha$ 1 resultaria na expressão do receptor IL-13R $\alpha$ 2. A IL-13, através da ligação ao receptor IL-13R $\alpha$ 2, levaria à ativação do fator de transcrição do ativador de proteína 1 (AP-1) direcionando a síntese de TGF- $\beta$  (Figura 2). De forma elegante, os autores demonstraram em um modelo de fibrose pulmonar que o tratamento com antagonista de TNF- $\alpha$  inibiu a expressão do receptor IL-13R $\alpha$ 2 *in vivo*, reduzindo os níveis de TGF- $\beta$  e suprimindo a fibrose pulmonar (MacDonald, 2006). Vale mencionar, entretanto, que uma vez

que a resposta fibrótica apresenta particularidades inerentes ao órgão e ao agente etiológico em questão, estudos mais aprofundados se fazem necessários para o melhor entendimento acerca da real importância do receptor  $IL-13R\alpha2$  para a fibrose.



**Figura 2: A IL-13 induz produção de TGF-β em macrófagos através de dois mecanismos aditivos.** Em resposta à estimulação combinada de TNF-α no receptor TNFR1 e da IL-13 no receptor  $IL-13R\alpha1$  há ativação dos fatores de transcrição NFκB e STAT6 que atuam induzindo a expressão de  $IL-13R\alpha2$ . A ligação da IL-13 ao receptor  $IL-13R\alpha2$ , através da ativação do fator de transcrição AP-1, induz a expressão e conseqüente liberação de TGF-β, que aumenta a produção de matriz extracelular por fibroblastos. Retirada de MacDonald, 2006.

No entanto, tomando por base as evidências indicativas da relevância da IL-13 no contexto do componente fibrótico, especial atenção foi destinada à esta citocina por alguns grupos de pesquisa que a consideram como um alvo terapêutico em potencial. Neste sentido algumas tentativas foram realizadas, dentre as quais destaca-se o desenvolvimento de proteínas quiméricas ou imunotoxinas (Jakubzick e col., 2004b, Joshi e col., 2005, MacDonald, 2006).

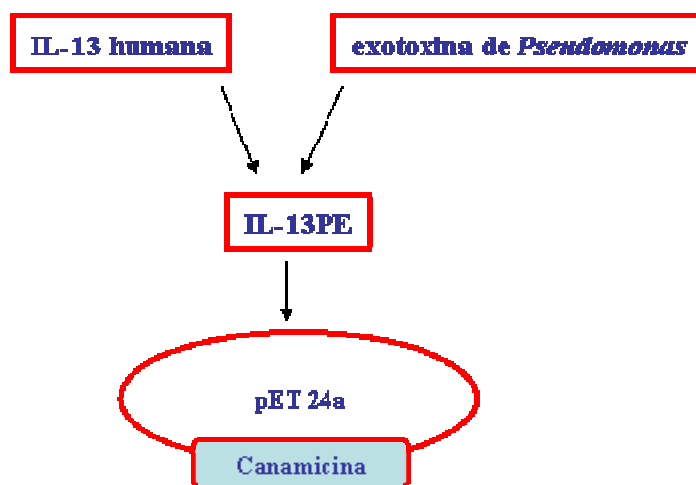
#### 1.6.1.1.1 IL-13PE

As imunotoxinas compõem uma nova classe de proteínas terapêuticas que consiste da fusão de uma molécula de anticorpo ou fator de crescimento a uma toxina de planta (Bagga e col., 2003, Batra e col., 1992) ou de bactéria (Batra e col., 1991), incluindo neste último caso a exotoxina de *Pseudomonas* (PE) (Batra e col., 1990, Puri e col., 1992) ou a toxina do Antrax (Liu e col., 2003a, Liu e col., 2003b). A proteína conjugada liga-se a seus respectivos antígenos ou receptores localizados em células alvos, este conjunto é internalizado, e medeia citotoxicidade celular após ser processado no compartimento intracelular específico (Joshi e col., 2005).

No caso da IL-13 foi desenvolvida a quimera (IL-13PEQQR38 ou IL-13PE) que é derivada da fusão de uma molécula de IL-13 humana, que reconhece e liga-se ao receptor para IL-13, e de uma forma mutada da exotoxina de *Pseudomonas* (Debinski e col., 1995). A PE é uma cadeia simples de proteína bacteriana com três grandes domínios (Puri e col., 1992). O N-terminal localizado no domínio Ia liga-se ao receptor  $\alpha$ 2-macroglobulina, e o complexo ligante-receptor sofre endocitose para permitir o encaminhamento e processamento da toxina (Puri e col., 1992). O domínio II é um sítio de clivagem proteolítica que ativa a PE e que é essencial para catalisar a translocação da toxina para o citoplasma. O domínio III contém a seqüência REDLK, que dirige o fragmento processado da PE para o retículo endoplasmático onde ocorre a etapa final de indução da morte celular (Puri e col., 1992). O domínio Ia PE é então substituído por uma IL-13 humana para construir a proteína quimérica IL-13PE (Debinski e col., 1995) (Figura4). Essa proteína é altamente tóxica para células que possuem o receptor para IL-13 (Joshi e col., 2005).

A IL-13PE foi inicialmente desenvolvida para alvejar e matar seletivamente células tumorais pelo fato de ter sido verificado que estas células apresentavam uma maior expressão do receptor tanto para IL-4 quanto para IL-13 (Debinski e col., 1995, Puri e col., 1996). Posteriormente foi evidenciado que a administração intranasal de IL-13PE mostrou-se eficiente em reduzir o quadro de fibrose peribrônquica pulmonar induzida por *Aspergillus fumigatus* (Blease e col., 2001b, Blease e col., 2002), fibrose granulomatosa induzida por *Schistosoma mansoni* (Jakubzick e col., 2002) e, também, fibrose pulmonar induzida por bleomicina (Jakubzick e col., 2003a). A IL-13PE após ligar-se ao receptor para a IL-13 na superfície celular, impede a iniciação da síntese protéica levando à morte celular através de processos de necrose e/ou apoptose (Kawakami e col., 2002, Shimamura e col., 2008).

### CONSTRUÇÃO QUIMÉRICA DA IL-13PE



**Figura 3: Ilustração esquemática da construção quimérica da IL-13PE.** A forma truncada da exotoxina de *Pseudomonas* foi expressa em um sistema procariótico de *Escherichia coli* (pET 24a), sendo feita a inserção de um gene resistente à canamicina como antibiótico seletor. Adaptada de Joshi e Puri, 2004.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Tomando por base a inexistência de um tratamento eficiente para a silicose, torna-se premente a necessidade da identificação de alvos terapêuticos e consequente busca por uma terapia eficaz no controle desta doença. Considerando-se, então, o papel prófibrótico da IL-13 e a propriedade antifibrótica da imunotoxina IL-13PE, neste trabalho tivemos como objetivo investigar o potencial efeito do tratamento com a IL-13PE sobre o quadro silicótico em camundongos. Para tanto foi utilizado o modelo experimental de silicose murina e a administração curativa da IL-13PE.

### **2.1. Objetivos específicos**

- ❖ Avaliar a cinética de alteração da função pulmonar (resistência e elastância) e a hiperreatividade das vias aéreas ao agente broncoconstrictor metacolina, bem como as alterações morfológicas do parênquima pulmonar, 7 e 28 dias após a provocação;
- ❖ Avaliar a cinética de geração de IL-13 no pulmão de camundongos silicóticos, 7 e 28 dias após a provocação;
- ❖ Avaliar o efeito do tratamento com IL-13PE sobre a função pulmonar (resistência e elastância) e hiperreatividade das vias aéreas, 28 dias após a provocação;
- ❖ Avaliar o efeito do tratamento com IL-13PE sobre geração de mediadores inflamatórios e prófibróticos (citocinas e quimiocinas), bem como de componentes da matriz extracelular (colágeno, fibronectina e laminina), 28 dias após a provocação;
- ❖ Avaliar o efeito do tratamento com a IL-13PE sobre macrófagos e miofibroblastos presentes no tecido pulmonar de camundongos silicóticos, 28 dias após a provocação.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

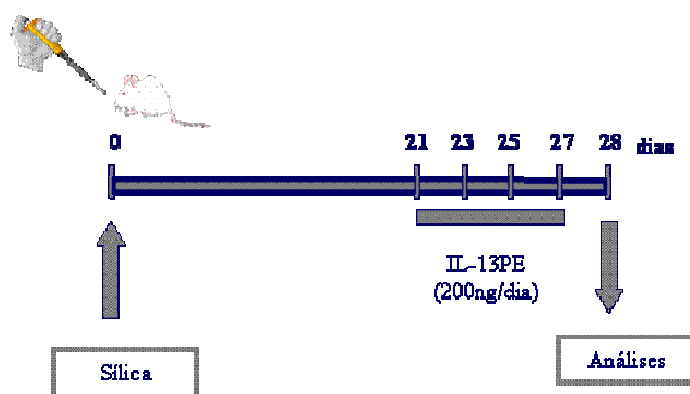
#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss-Webster (machos, peso corporal de 18 a 20 g) provenientes do Centro de Criação de Animais (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) (Protocolo 0213-4). Os animais foram mantidos sob condições de temperatura entre 25 e 28°C, ciclo de luz definido em 12 h de claro e 12 h de escuro e livre acesso à ração e água.

#### 3.2 Indução da silicose e tratamento

Os animais foram submetidos à anestesia por halotano (Tanohalo, Cristália, São Paulo) sendo em seguida instilados por via intranasal com 10 mg sílica ( $\text{SiO}_2$ ), ( $\text{SiO}_2$ , S-5631 Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA, tamanho de partícula: 0,5 -10  $\mu\text{m}$ ) diluídos em 50  $\mu\text{l}$  de salina estéril. Os animais do grupo controle receberam igual volume de salina estéril intranasal. As análises foram realizadas 28 dias após a instilação (Figura 4).

Para o estudo acerca do efeito do tratamento com IL-13PE, os animais foram divididos em três grupos: salina, sílica ou sílica + IL-13PE (200 ng/dia) por via intranasal. A IL-13PE foi diluída previamente em solução salina tamponada (PBS) + albumina humana (HSA, 0,2 %) e armazenada em geladeira (4°C). A administração de IL-13PE em camundongos silicóticos foi realizada no período do 21º ao 27º dia em dias alternados (Figura 5).



**Figura 4.** Esquema de indução da silicose, tratamento e análise de parâmetros inflamatórios.

### **3.3 Avaliação da função pulmonar e hiperreatividade pulmonar**

Para avaliação da função pulmonar foram utilizados seis camundongos por grupo. Os animais foram submetidos à análise através de um plestimógrafo de corpo inteiro invasivo (Sistema Buxco, UK), permitindo a obtenção dos parâmetros de resistência das vias aéreas (cmH<sub>2</sub>O/mL/s) e elastância pulmonar (mL/cmH<sub>2</sub>O). Os animais foram anestesiados com 60 mg/kg de nembutal i.p. e 20 mg/kg i.v. e curarizados com brometo de pancuronio (Pavulon®, 1 mg/kg), sendo em seguida traqueostomizados para introdução de uma cânula. Os animais foram posicionados em uma cama aquecida na câmara, mantendo à temperatura corporal normal dos mesmos. A cânula traqueal foi conectada a um ventilador respiratório, onde parâmetros como fluxo e volume corrente eram mantidos constantes. Foi introduzido por via oral um cateter preenchido com água para captura da pressão esofágica. O pneumotacógrafo acoplado à câmara do plestimógrafo coletou o fluxo respiratório. Um transdutor ligado à câmara permitiu que os dados de pressão esofágica e pressão resultante do fluxo fossem transferidos para um computador. O *software* BioSystem XA processou os sinais de fluxo e pressão, determinando parâmetros importantes como a resistência e a elastância (Hoymann, 2007).

Para avaliação da hiperreatividade pulmonar foi realizada aerolização de concentrações crescentes e cumulativas do agente broncoconstritor metacolina (3 - 27 mg/mL) por um período de 5 minutos para cada dose.

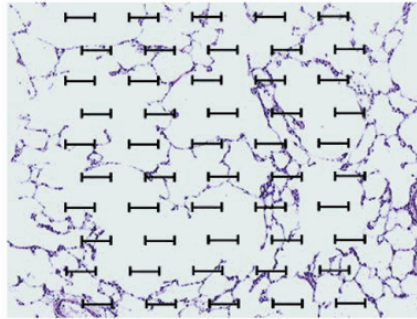
### **3.4 Análise histopatológica**

Os animais foram eutanasiados com pentobarbital sódico, 500 mg/kg, i.p., 28 dias após a instilação de sílica. Posteriormente, a perfusão foi realizada por meio de uma cânula intracárdica com solução de salina e EDTA (10 mM) para a retirada do sangue. O pulmão direito foi então retirado, congelado e armazenado em freezer -20°C para posterior quantificação de mediadores inflamatórios. Em seguida, o pulmão esquerdo foi perfundido com uma solução de paraformaldeído tamponado a 4% e fixado em formol tamponado a 10% (24 h), desidratado em soluções crescentes de etanol, clarificado em xileno e incluído em parafina. Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram realizados utilizando-se blocos de parafina contendo fragmentos do tecido pulmonar, e submetidos à coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) para análise da estrutura do tecido pulmonar, Picro-Sírius para avaliação da deposição de colágeno e imunohistoquímica.

### 3.4.1 Análise Morfométrica

Para a análise das alterações morfológicas do tecido pulmonar, cortes histológicos foram corados com HE, analisados em microscópio de luz (BX51, Olympus) e fotografados através de câmera digital (C-7070, Olympus).

A análise morfométrica foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”) (Cruz-Orive e col., 1990, Sake e col., 1994), onde utilizamos uma ocular acoplada ao microscópio, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo (Figura 6). Em um aumento de 200x, foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. Foi quantificada então, a fração de área ocupada por granulomas. O número de pontos na área de granuloma foi dividido pelo total de pontos contados em cada campo analisado e expresso sob a forma de percentual.



**Figura 5.** Retículo com 50 linhas e 100 pontos utilizado para a análise morfométrica.

### 3.4.2 Imunohistoquímica

Para verificar a expressão de diferentes proteínas utilizamos a técnica de imunohistoquímica. Após desparafinização, os cortes foram hidratados com TBS (Tris/HCl 0,05M + NaCl 0,5M, pH 7,6), bloqueados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em metanol por 15 minutos e posteriormente as lâminas foram lavadas três vezes com TBS e bloqueadas com Tris-HCl + BSA 5% por 1 hora. Os anticorpos primários anti-fibronectina e anti-laminina foram diluídos com Tris-HCl + BSA 1% na proporção de 1:100. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário por 12 horas a 4°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas por duas vezes com TBS. O anticorpo secundário, anti-IgG HRP conjugado, foi diluído em Tris-HCl e incubado por 2 horas. A revelação foi feita com 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) por aproximadamente 15 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas com água destilada,

contra-coradas com hematoxilina de Mayer e montadas em meio aquoso contendo gelatina. No quadro abaixo estão listados todos os anticorpos e diluições utilizadas.

<b>Anticorpo Primário</b>	<b>Diluição do anticorpo primário</b>	<b>Anticorpo Secundário</b>	<b>Diluição do anticorpo secundário</b>
Anti-fibronectina (24951, Novotec, França)	1:100	Anti-IgG de camundongo (HAF007, R&D, USA)	1:80
Anti-laminina (24851, Novotec, França)	1:100	Anti-IgG de camundongo (HAF007, R&D, USA)	1:80
Anti-F4/80 (MCAP497, Serotec, USA)	1:100	Anti-IgG de cabra (STAT72, Serotec, USA)	1:80
Anti- $\alpha$ SMA (A2547, Sigma, USA)	1:400	Anti-IgG de camundongo (HAF007, R&D, USA)	1:80
Anti-IL-4R (AF530, R&D, USA)	1:100	Anti-IgG de cabra (STAT72, Serotec, USA)	1:80
Anti-IL-13R $\alpha$ 2 (AF539, R&D, USA)	1:100	Anti-IgG de cabra (STAT72, Serotec, USA)	1:80

### 3.4.3 Análise digital

A análise digital das imagens foi realizada com o auxílio de um microscópio acoplado a uma câmera de vídeo e a um sistema de análise de imagens. As imagens, obtidas das áreas de interesse nos fragmentos de pulmão dos animais experimentais, foram obtidas mediante uso do microscópio de luz (BX 50 - Olympus) acoplado a uma vídeo-câmera (Optronics Engineering, DEI-750), digitalizadas e armazenadas no computador; com o auxílio de um software – Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics, USA) – foram identificados padrões de coloração relacionados à presença e/ou quantidade de marcação presente nas estruturas de interesse e os resultados foram expressos pela unidade arbitrária “pixel” (Mattos e col., 2006).

### 3.5 Quantificação de Citocinas e Quimiocinas por ELISA

Foram utilizadas placas de 96 poços, às quais foram adicionados 50  $\mu$ L/poço do anticorpo de captura diluído em tampão (NaCl 1,5M, H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 0,5M e NaOH 1N) pelo período de incubação de 12 horas a 4°C. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes (200  $\mu$ L/poço)

com tampão 1 (timerosal,  $\text{KPO}_4$  1M e Tween 20 0,005%). Após esta etapa, para bloqueio de sítios inespecíficos, a placa foi preenchida (250  $\mu\text{L}$ /poço) com PBS/albumina sérica bovina (BSA, 1%) por 1 hora à 20°C. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com tampão 1 (200  $\mu\text{L}$ /poço). As amostras e os padrões foram diluídos em tampão 2 (2% de soro fetal bovino - SFB em PBS) e adicionados aos poços (50  $\mu\text{L}$ /poço). Após o período de incubação (2 horas a 37°C), procedeu-se a nova seqüência de 3 lavagens (200  $\mu\text{L}$ /poço) com tampão 1. A seguir foi acrescentado (50  $\mu\text{L}$ /poço) o anticorpo detector biotilado (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sendo mantida a incubação por 1 hora a 20°C. Os poços foram lavados com o tampão 1 (200  $\mu\text{L}$ /poço), seguindo-se a etapa de incubação por 1 hora a 20 °C (50  $\mu\text{L}$ /poço) com a mistura neutravidina- “horseradish peroxidase” (HRP) diluído no tampão 2. Após a última lavagem com tampão 1 (200mL/poço), foi feita a adição do substrato (K-Blue®) (50  $\mu\text{L}$ /poço) para o desenvolvimento da reação colorimétrica (aproximadamente 5 a 30 minutos), que foi interrompida após acréscimo de 50  $\mu\text{L}$ /poço de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,19 M). A análise espectrofotométrica foi realizada em leitora de placa no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados obtidos foram expressos em quantidade de citocina ou quimiocina (ng) por mg de proteína.

A quantificação dos mediadores inflamatórios incluiu as citocinas  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{TGF-}\beta$  e as quimiocinas  $\text{MIP-1}\alpha$ ,  $\text{MIP-2}$ ,  $\text{MDC}$ ,  $\text{TARC}$ ,  $\text{IP-10}$ . Foram utilizados kits comerciais (R&D System, Estados Unidos), sendo seguidas as recomendações do fabricante. As amostras analisadas foram provenientes de tecido pulmonar que foi homogeneizado em 1 mL de PBS contendo um coquetel de inibidores de proteases (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suíça), seguido de centrifugação a 3000 RPM por 15 minutos e o sobrenadante foi recuperado para posterior quantificação de mediadores.

### **3.6 Quantificação de colágeno**

A técnica de Sircol (Kit Biocolor, UK) tem como base a análise quantitativa de colágeno através do processamento do tecido pulmonar em solução de Tris 0,05M + NaCl 1M. O material foi centrifugado a 15000  $\times g$  por 1h a 4°C, em seguida, retirado uma alíquota do sobrenadante e a esta foi adicionado, o reagente Sirius Red. Após 30 min de reação, o material foi novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e ao “pellet” foi adicionado o reagente Alkaline. As amostras foram colocadas em placas de 96 poços e a absorbância determinada no comprimento de 590 nm e o resultado foi expresso em  $\mu\text{g}$  de colágeno/mg de proteína.

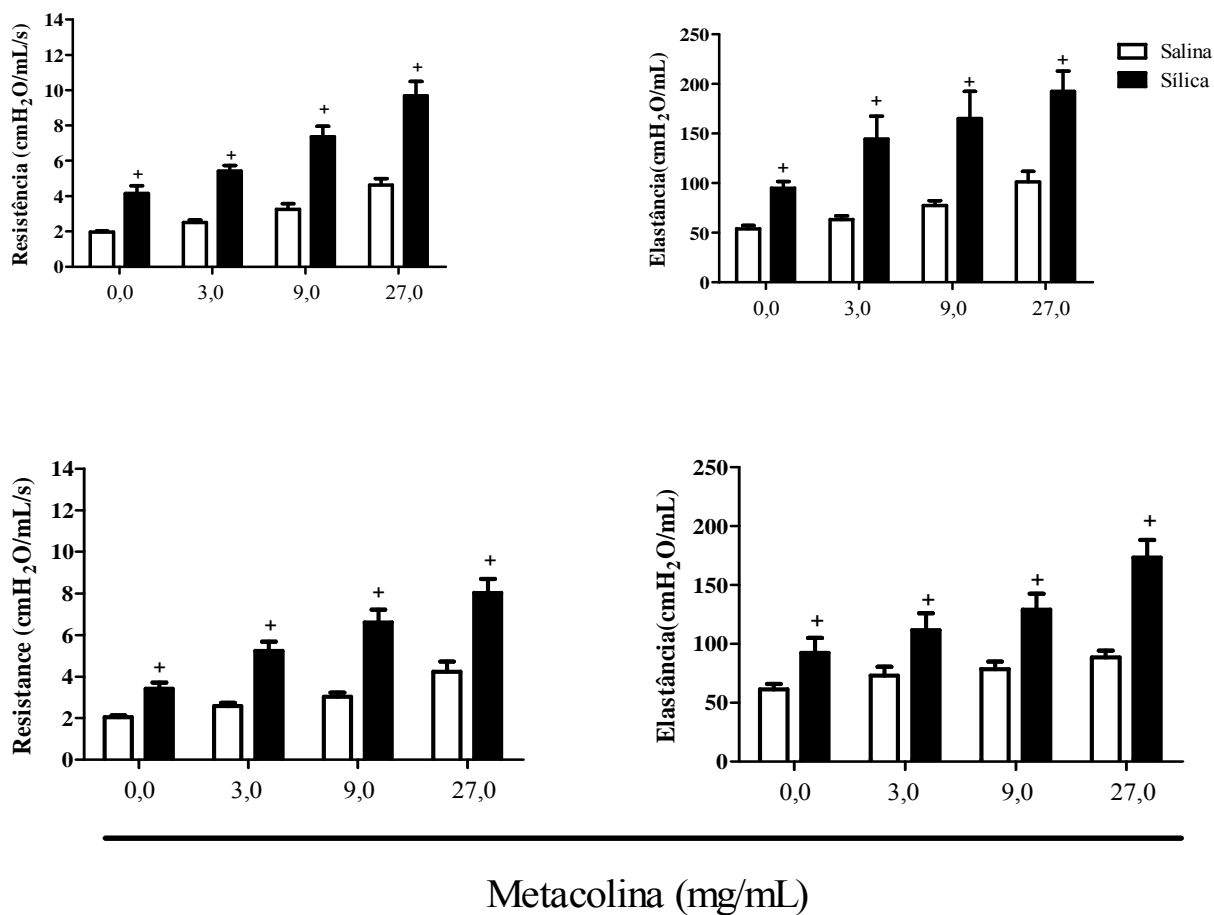
### **3.7 Análise estatística**

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de Newman-Keuls-Student. Para ambos os testes, os 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, 1996).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Avaliação da função pulmonar e da hiperreatividade das vias aéreas de camundongos silicóticos.**

Sabendo que a silicose é uma doença crônica grave caracterizada por importante comprometimento pulmonar (Lopes e col., 2008), em uma primeira etapa foi realizada a análise da função pulmonar em camundongos tornados silicóticos mediante instilação intranasal de sílica. Como parâmetros de análise constaram tanto a resistência como a elastância, avaliadas em 7 (Figura 6 A e B) e 28 dias (Figura 6 C e D) após a indução da silicose, tempos correspondentes às fases aguda e crônica, respectivamente. Verificamos que os camundongos silicóticos apresentaram aumento nos níveis basais tanto da resistência como da elastância pulmonar, em relação aos animais controle (salina), em ambos os tempos de análise. Após aerolização com concentrações crescentes (3 – 27mg/mL) do agente colinérgico metacolina, observamos um significativo aumento da resposta de resistência pulmonar nos camundongos silicóticos, em ambos os tempos de análise, em comparação àquela verificada no caso dos animais controle aerolizados com igual volume de PBS. Perfil semelhante foi evidenciado no caso da elastância pulmonar, caracterizando assim um estado de hiperreatividade pulmonar associado à condição da silicose.



**Figura 6:** Avaliação da função pulmonar e da hiperreatividade das vias aéreas de camundongos silicóticos. As análises de resistência (A, C) e elastância (B, D) foram realizadas nos tempos de 7 (painéis superiores) e 28 dias (painéis inferiores) após a estimulação com sílica por via intranasal (10mg). Os resultados representam média  $\pm$  erro padrão da média (n=6). + p<0.05 comparado com o grupo salina



## **4.2 Avaliação morfológica do pulmão de camundongos silicóticos**

Através da análise histopatológica verificamos que os animais controle apresentaram padrão morfológico pulmonar normal, quando puderam ser observadas as vias áreas preservadas, assim como os septos e sacos alveolares claramente identificados (Figura 7A). Na condição de instilação das partículas de sílica houve uma marcada modificação na arquitetura pulmonar em relação ao grupo controle. Na fase aguda (7 dias), foi observada a presença de um intenso infiltrado leucocitário inflamatório e formação de granulomas dispersos no parênquima pulmonar, com brotamento a partir das vias aéreas (Figura 7B). Em 28 dias, verificamos a intensificação da resposta fibrótica com marcado aumento no número e tamanho dos granulomas (Figura 7C e D), que se apresentam bem delimitados. Partículas de sílica puderam ser claramente detectadas no interior dos granulomas.

Objetivando melhor caracterizar os componentes da matriz extracelular, inicialmente focamos nossa atenção em fibras colágenas. Para tanto, foi utilizada a coloração com Pírcus sirius, a qual nos permitiu evidenciar a presença dessas fibras principalmente ao redor de vasos sanguíneos e bronquíolos no parênquima pulmonar dos animais controle (Figura 8A). Já no caso dos camundongos silicóticos, foi detectado um aumento no conteúdo de fibras colágenas, de forma tempo-dependente, com resposta máxima no tempo de 28 dias (Figura 8 B e C). Conforme ilustrado na figura D, a análise quantitativa do conteúdo de colágeno confirmou os achados histológicos, mostrando claramente um aumento no conteúdo de colágeno no pulmão dos animais silicóticos, com resposta mais acentuada na fase crônica da doença.

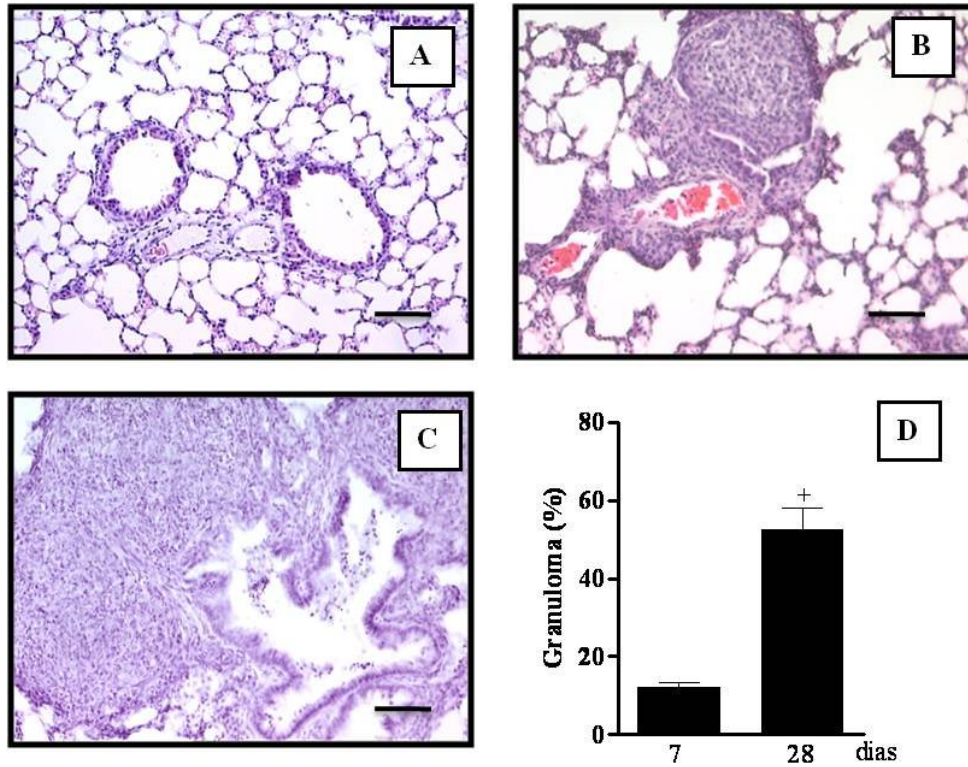


Figura 7: Avaliação morfológica do parênquima pulmonar de camundongos silicóticos. Os grupos incluem: (A) salina, (B) sílica 7 dias, (C) sílica 28 dias. Os pulmões foram processados, os cortes histológicos (5 $\mu$ m) corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. (D) Análise quantitativa da área do pulmão ocupada por granulomas (%). As barras correspondem a 100  $\mu$ m. Os resultados representam média  $\pm$  erro padrão da média (n=8). +p<0,05 comparado com o grupo sílica.

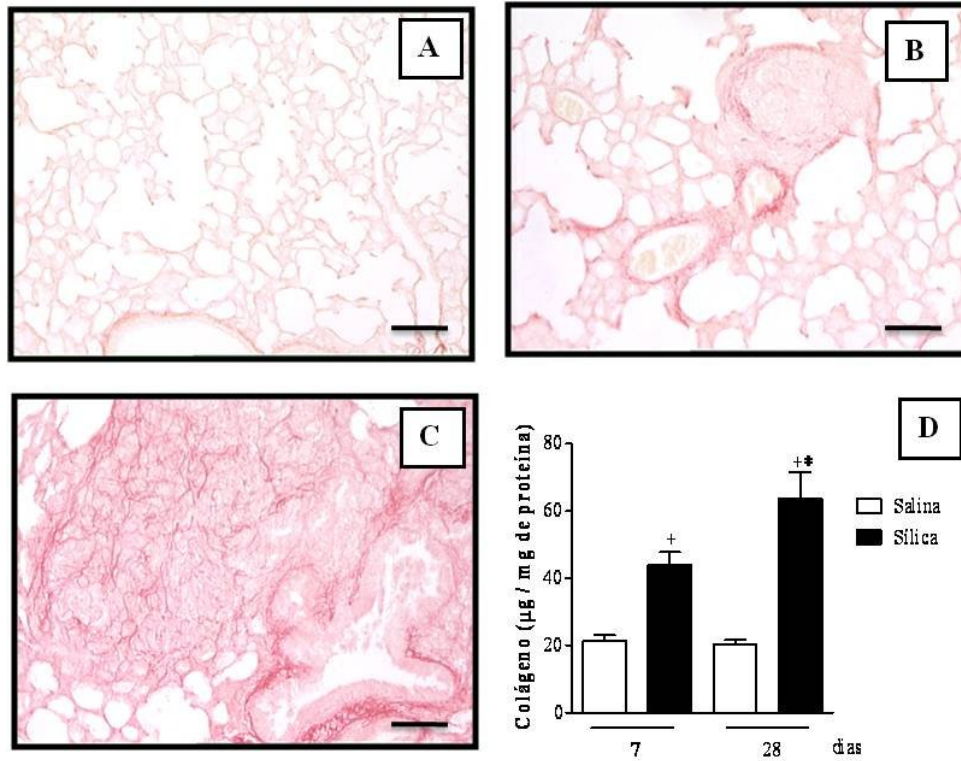
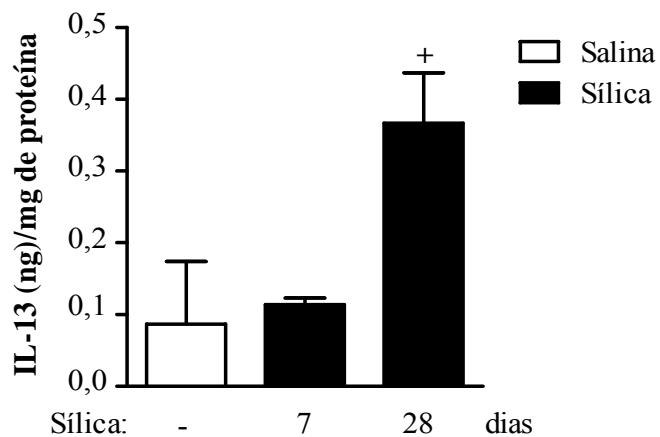


Figura 8 : Avaliação morfológica do parênquima pulmonar de camundongos normais e silicóticos. Os grupos incluem: (A) salina, (B) sílica 7 dias, (C) sílica 28 dias. Os pulmões foram processados, os cortes histológicos (5 µm) corados com Picro sirius e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. (D) análise quantitativa do conteúdo de colágeno no pulmão através da técnica de Sircol. As barras correspondem a 100 µm. Os resultados representam média ± erro padrão da média (n=8). +p<0,05 comparado com o grupo salina, \*p<0,05 comparado com o grupo sílica.

### **4.3 Avaliação da geração de IL-13 no pulmão de camundongos silicóticos**

Várias citocinas possuem reconhecida participação em processos inflamatórios crônicos de natureza fibrótica (Lukacs e col., 2001). Mais recentemente, a IL-13 vem recebendo atenção especial, uma vez que foi demonstrada sua participação em processos de remodelamento e fibrose tecidual (Kasaian e col., 2008). Desta feita, resolvemos investigar a geração de IL-13 na condição da silicose. De forma bastante interessante e totalmente original, observamos que a instilação de sílica levou ao aumento no conteúdo de IL-13 produzida ao nível do parênquima pulmonar. Este fenômeno mostrou-se ser dependente do tempo, com níveis significativamente elevados da citocina sendo detectados 28 dias após a instilação da sílica (Figura 9).



**Figura 9:** Quantificação dos níveis de IL-13 no parênquima pulmonar de camundongos silicóticos. As análises de foram realizadas 7 e 28 dias após a estimulação com sílica intranasal (10mg). Os resultados representam média  $\pm$  erro padrão da média (n=6). +p<0,01 comparado com grupo instilado com salina.

#### **4.4. Efeito do tratamento curativo com IL-13PE sobre a resposta silicótica em camundongos**

Com interesse em verificar o potencial efeito curativo da IL-13PE, aspecto relevante com aplicabilidade no caso da doença humana, optamos por fixar nossa análise no tempo de 28 dias após a indução do quadro silicótico. A administração da IL-13PE foi então realizada em dias alternados, iniciando-se aos 21 dias após a instilação das partículas de sílica.

##### **4.4.1. Avaliação da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas em camundongos silicóticos**

Verificamos que o tratamento com a IL-13PE mostrou-se eficiente em inibir o aumento dos níveis basais de resistência (Figura 10A) e de elastância (Figura 10B) pulmonares nos animais silicóticos. Na condição de aerolização com metacolina, foi também notada uma marcada inibição da resposta de aumento de resistência e elastância pulmonares, revelando claramente o potencial supressor da IL-13PE sobre a hiperreatividade das vias aéreas na silicose.

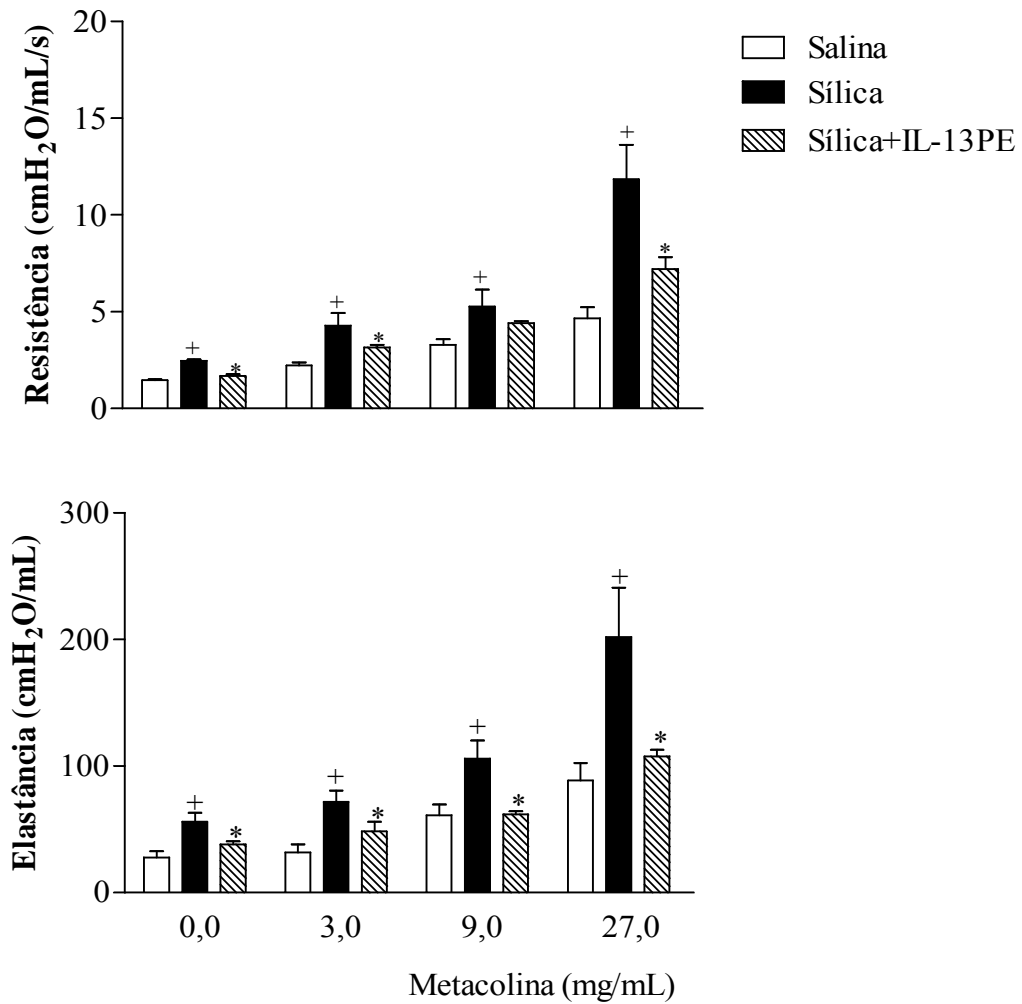


Figura 10: Efeito do tratamento com IL-13PE sobre a função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de camundongos silicóticos. As análises de resistência (A) e elastância (B) foram realizadas no tempo de 28 dias após a estimulação com sílica intranasal (10mg). Os resultados representam média  $\pm$  erro padrão da média (n=6). <sup>+</sup>p<0.05 comparado com o grupo salina; \*p<0.05 comparado com o grupo sílica.

#### **4.4.2 Avaliação das alterações morfológicas pulmonares em camundongos silicóticos**

De forma coerente com o anteriormente relatado, os pulmões dos animais controle exibiram um parênquima pulmonar preservado e com espaços alveolares livres de células inflamatórias (Figura 11A). O tratamento dos animais silicóticos com IL-13PE foi efetivo em diminuir o infiltrado inflamatório tecidual, assim como o número e tamanho dos granulomas, em comparação aos animais silicóticos controle (Figura 11 B e C). Através da avaliação morfológica verificamos que o aumento do percentual de área pulmonar ocupada por granulomas foi significativamente inibido após tratamento com IL-13PE (Figura 11D).

Posteriormente, avaliamos a deposição de fibras colágenas no pulmão de animais controle e silicóticos. O aumento significativo nos animais silicóticos mostrou-se inibido após o tratamento com a IL-13PE (Figura 12A, B e C). Para confirmação, avaliamos o conteúdo de colágeno total no pulmão dos animais o aumento na produção de colágeno nos animais silicóticos (Figura 12D) mostrou-se marcadamente sensível ao tratamento com IL-13PE, reforçando nossos resultados anteriores.

A laminina e a fibronectina são proteínas também constituintes da matriz extracelular relevantes em diferentes etapas do desenvolvimento e do processo de reparo tecidual (Christie e col., 2004). Para avaliação destas proteínas, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica. Observamos que os animais controle apresentaram níveis bastante reduzidos de expressão tanto de laminina como de fibronectina no parênquima pulmonar (Figura 13A e 14A), enquanto nos camundongos silicóticos foi verificado um marcado aumento nos níveis destas proteínas (Figura 13B e 14B). O tratamento com IL-13PE inibiu a expressão de ambas as proteínas no pulmão dos camundongos silicóticos (Figura 13C e 14C). A análise quantitativa através da identificação de “pixels” claramente confirmou a propriedade supressora da IL-13PE sobre a expressão de lamina e fibronectina na silicose (Figura 13D e 14D).



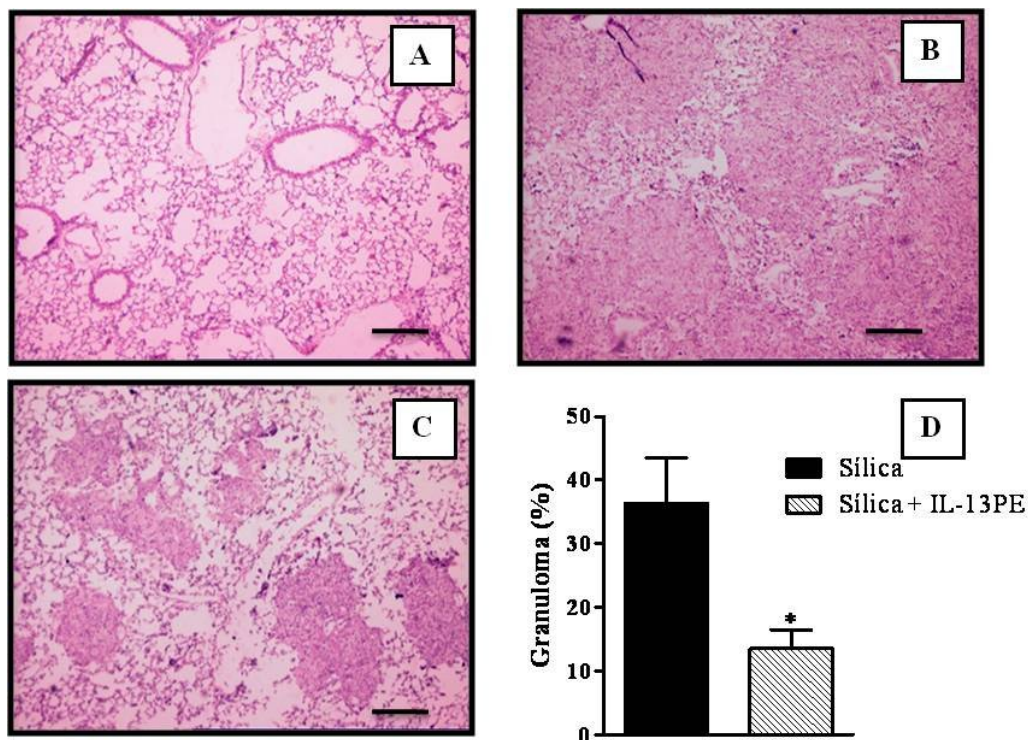


Figura 11: Efeito do tratamento com IL-13PE sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos. Os grupos incluem: (A) salina, (B) sílica, (C) sílica + IL-13PE. As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com sílica intranasal (10mg). Os pulmões foram processados, os cortes histológicos (5 $\mu$ m) corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. (D) análise quantitativa da área do pulmão ocupada por granulomas (%). As barras correspondem a 100  $\mu$ m. Os resultados representam média  $\pm$  erro padrão da média (n=6). \* P<0,05 comparado com o grupo sílica.

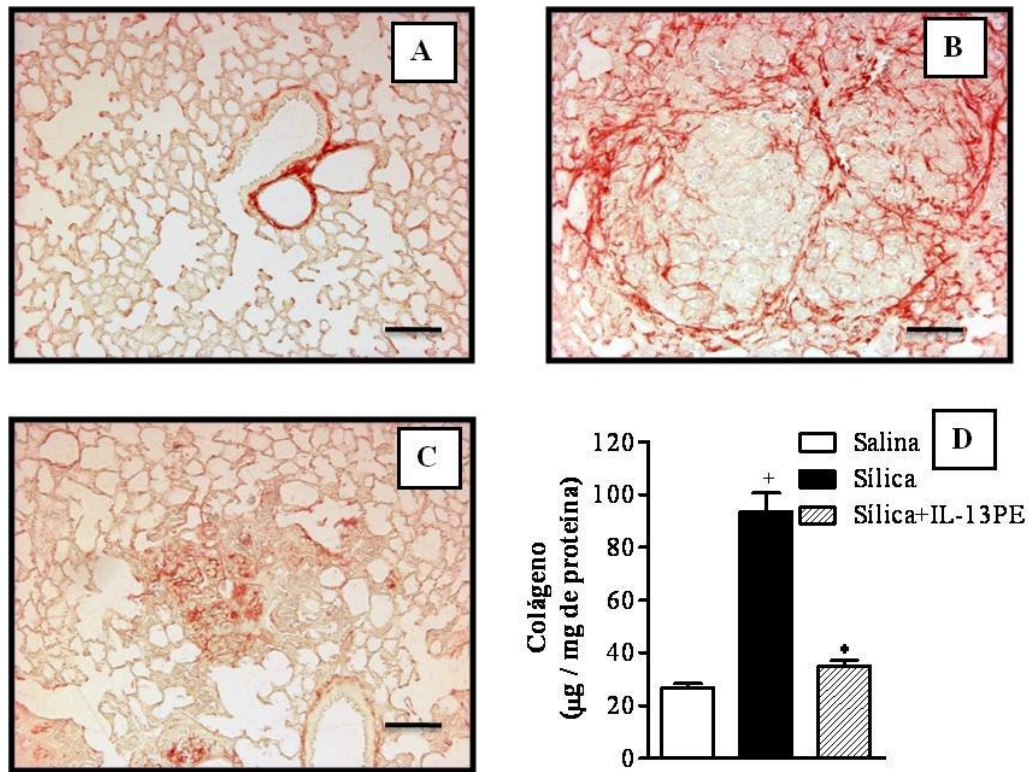


Figura 12: Efeito do tratamento com IL-13PE sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos. Os grupos incluem: (A) salina, (B) sílica e (C) sílica + IL-13PE. As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com sílica intranasal (10mg). Os pulmões foram processados, os cortes histológicos corados com Picro sirius e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. (D) Análise do conteúdo de colágeno presente no pulmão de animais silicóticos. As barras correspondem a 100 µm. Os resultados representam média ± erro padrão da média (n= 8). +p<0,01 comparado com o grupo salina, \*p<0,05 comparado ao grupo sílica.

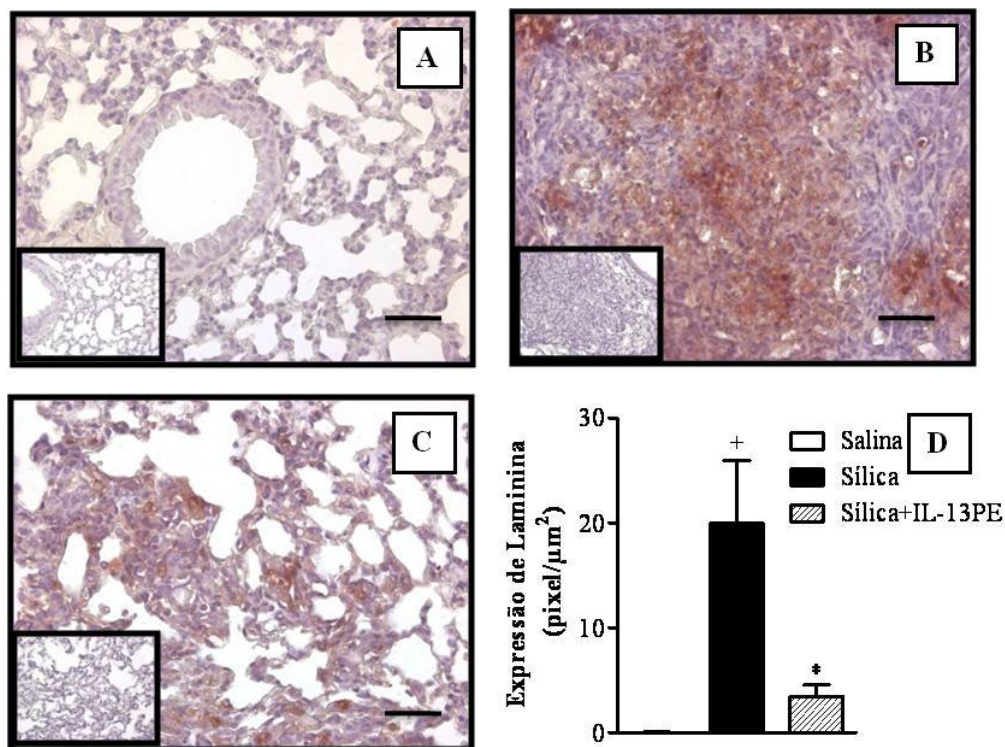


Figura 13: Efeito do tratamento com IL-13PE sobre a expressão de laminina no pulmão de camundongos silicóticos. Os grupos incluem: (A) salina, (B) sílica, (C) sílica+IL-13PE. As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com sílica intranasal (10mg). Os pulmões foram processados os cortes histológicos (5µm) utilizados para imunohistoquímica e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. (D) indica o quantitativo de pixel/µm<sup>2</sup> (Análise através do software - Image Pro Plus 4.0). As figuras inseridas representam o controle negativo do ensaio, ou seja, sem a adição do anticorpo primário. As barras correspondem a 100 µm. Os resultados representam média ± erro padrão da média (n= 6). +*p*<0,05 comparado com o grupo salina. \**P*<0,05 comparado com o grupo sílica.

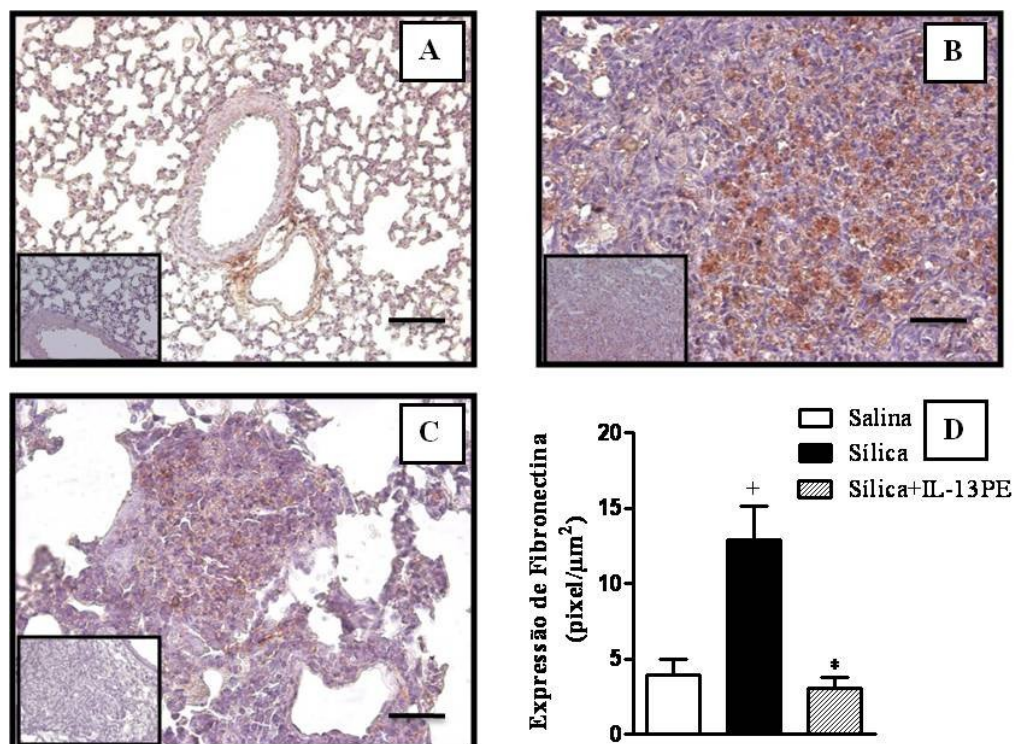
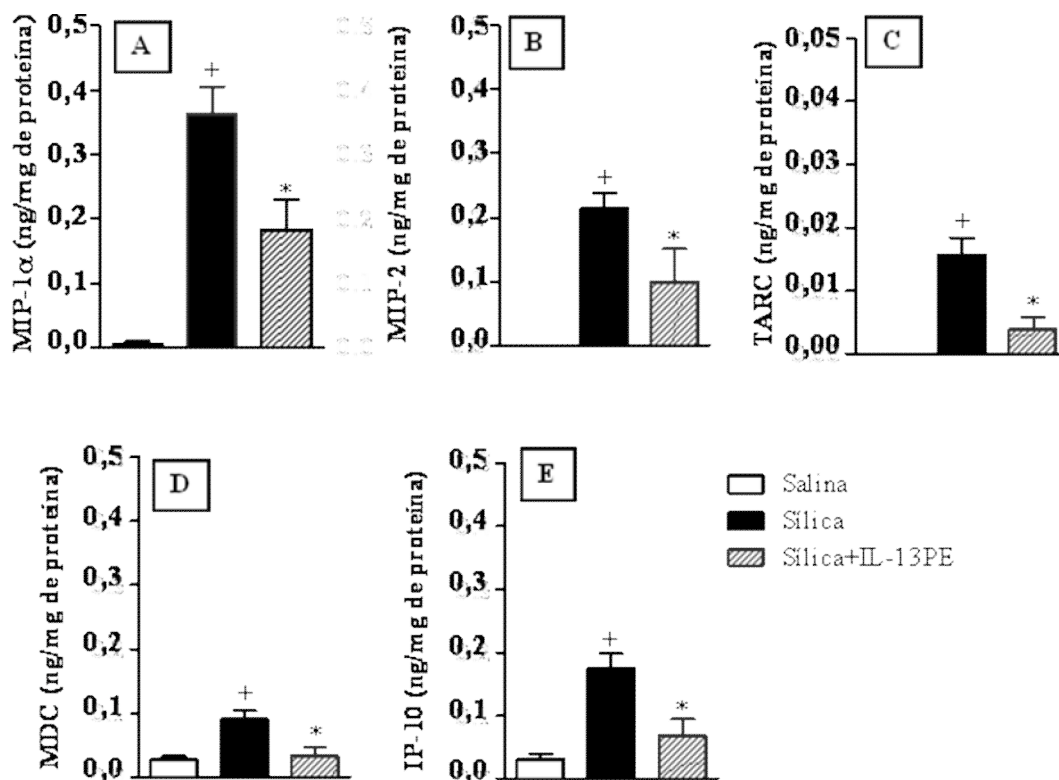


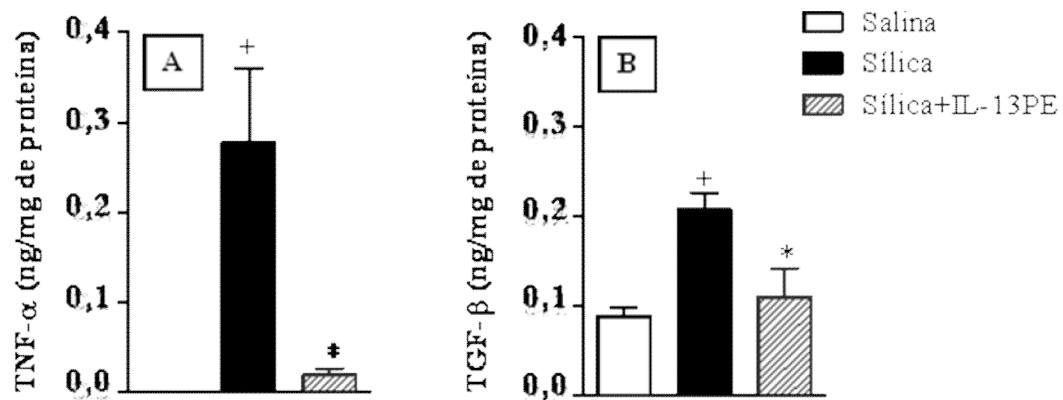
Figura 14: Efeito do tratamento com IL-13PE sobre a expressão de fibronectina no pulmão de camundongos e silicóticos. Os grupos incluem: (A) salina, (B) sílica, (C) Sílica+IL-13PE. Os pulmões foram processados, os cortes histológicos utilizados para imunohistoquímica e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. (D) indica o quantitativo de pixel/μm<sup>2</sup> (Análise através do software - Image Pro Plus 4.0). As figuras inseridas representam o controle negativo do ensaio, ou seja, sem a adição do anticorpo primário. As barras correspondem a 100 μm. Os resultados representam média ± erro padrão da média (n= 6). +*p*<0,05 comparado com o grupo salina. \**p*<0,05 comparado com o grupo sílica.

#### **4.4.3 Avaliação da geração de citocinas e quimiocinas no pulmão de camundongos silicóticos**

Objetivando identificar mediadores inflamatórios potencialmente alvos na resposta silicótica, partimos para analisar algumas citocinas e quimiocinas relevantes para o processo. Inicialmente, avaliamos as quimiocinas com propriedades inflamatórias e fibróticas incluindo MIP-1 $\alpha$  (Figura 15A), MIP-2 (Figura 15B), TARC (Figura 15C), MDC (Figura 15D) e IP-10 (Figura 15E). Os níveis destas proteínas apresentaram-se elevados nos camundongos silicóticos em comparação com aqueles verificados nos controles, e o tratamento com IL-13PE foi altamente eficaz em inibir a produção de todas as quimiocinas analisadas. Além disso, verificamos também a existência de níveis elevados dos fatores fibrogênicos clássicos TNF- $\alpha$  (Figura 16A) e TGF- $\beta$  (Figura 16B) nos animais silicóticos, fenômeno esse marcadamente suprimido pelo tratamento com a IL-13PE.



**Figura 15:** Efeito do tratamento com IL-13 PE sobre a geração de quimiocinas no pulmão de animais silicóticos. As análises foram realizadas no tempo de 28 dias após a estimulação com sílica intranasal (10mg). Os resultados representam média  $\pm$  erro padrão da média (n= 6). <sup>+</sup>p<0,01 comparado ao grupo instilado com salina, \*p<0,01 comparado ao grupo instilado com sílica.



**Figura 16:** Efeito do tratamento com IL-13 PE sobre a geração de citocinas no pulmão de camundongos silicóticos. As análises foram realizadas no tempo de 28 dias após a estimulação com sílica intranasal (10mg). Os resultados representam média  $\pm$  erro padrão da média (n= 6). +p<0,01 comparado ao grupo instilado com salina, \*p<0,01 comparado ao grupo instilado com sílica.

#### **4.4.4 Avaliação da expressão de F4/80 e $\alpha$ -SMA no pulmão de camundongos silicóticos**

Considerando a importância de macrófagos e fibroblastos para o processo fibrótico, passamos à análise da presença destas células nos pulmões dos animais silicóticos. Para tanto foi utilizada a técnica de imunohistoquímica, sendo realizada a identificação dos antígenos F4/80 e  $\alpha$ -SMA para macrófagos ativados e miofibroblastos, respectivamente. Inicialmente vimos que os pulmões dos animais controle apresentaram marcação praticamente inexistente, tanto para F4/80 (Figura 17A) como para a  $\alpha$ -SMA (Figura 18A), conforme esperado. No caso dos camundongos silicóticos, foi evidenciada uma marcação bastante intensa tanto para o F4/80 (Figura 17B) como para  $\alpha$ -SMA (Figura 18B), de forma preferencialmente localizada nas áreas de parênquima ocupadas por granulomas. Os animais silicóticos submetidos ao tratamento com IL-13PE apresentaram uma diminuição significativa da marcação para ambos os antígenos (Figura 17 e 18C). A análise quantitativa realizada mediante contagem de “pixels” confirmou estes resultados, reforçando a propriedade inibitória da IL-13PE sobre a presença de macrófagos (Figura 17D) e miofibroblastos (Figura 18D) no pulmão de animais silicóticos.



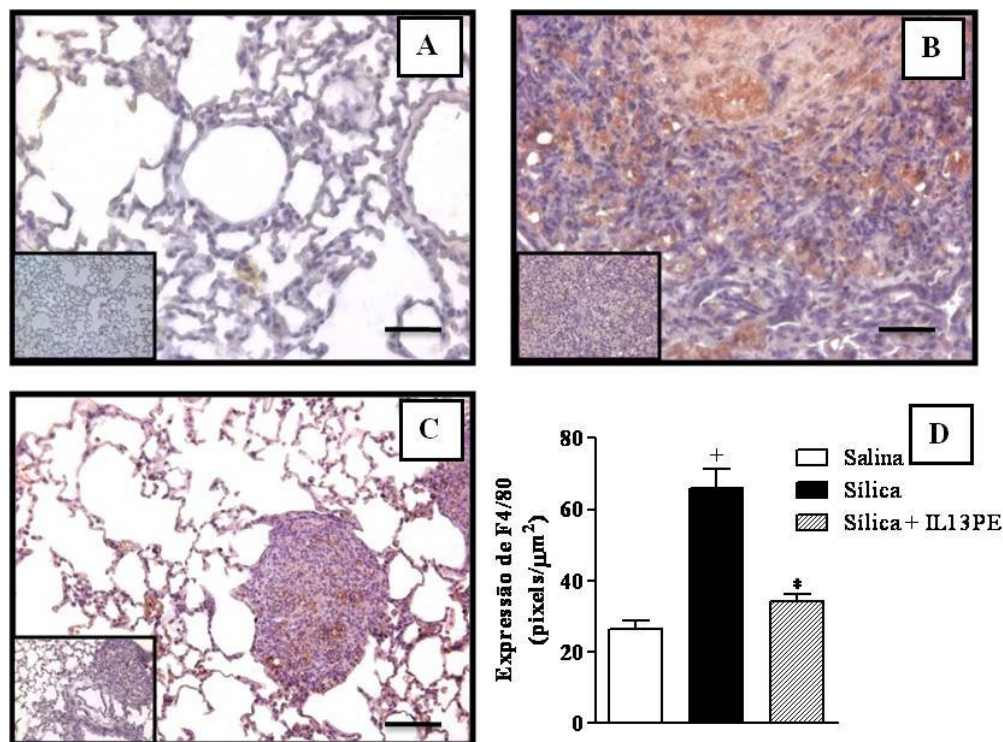


Figura 17: Efeito do tratamento com IL-13PE sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos silicóticos. Os grupos incluem: (A) salina, (B) sílica, (C) sílica + IL-13PE. As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com sílica intranasal (10mg). Os pulmões foram processados, os cortes histológicos utilizados para imunohistoquímica e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. (D) quantitativo de pixel/ $\mu\text{m}^2$  (Análise através do software - Image Pro Plus 4.0). As barras correspondem a 100  $\mu\text{m}$ . As figuras inseridas representam o controle negativo do ensaio, ou seja, sem a adição do anticorpo primário. Os resultados representam média  $\pm$  erro padrão da média (n= 6).  $+p < 0,05$  comparado com o grupo salina.  $*p < 0,05$  comparado com o grupo sílica.

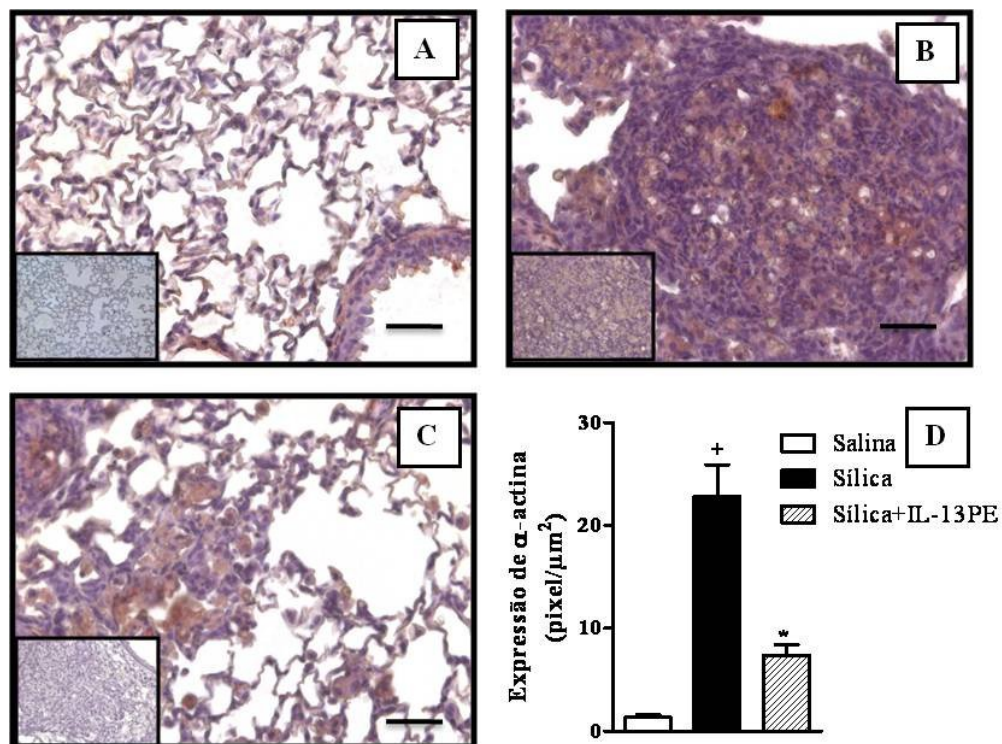


Figura 18: Efeito do tratamento com IL-13PE sobre a expressão de a-actina de músculo liso (SMA) no pulmão de camundongos silicóticos. Os grupos incluem: (A) salina, (B) sílica, (C) sílica + IL-13PE. As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com sílica (10mg). Os pulmões foram processados, os cortes histológicos utilizados para imunohistoquímica e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. (D) quantitativo de pixel/μm<sup>2</sup> (Análise através do software - Image Pro Plus 4.0). As figuras inseridas representam o controle negativo do ensaio, ou seja, sem a adição do anticorpo primário. As barras correspondem a 100 μm. Os resultados representam média ± erro padrão da média (n= 6). +*p*<0,05 comparado com o grupo salina. \**p*<0,05 comparado com o grupo sílica.



#### 4. DISCUSSÃO

A silicose é uma doença causada pela exposição prolongada à poeira contendo partículas de dióxido de silício ou sílica na sua forma livre e cristalina. O desenvolvimento e gravidade da silicose dependem da quantidade de sílica inalada e da duração da exposição à sílica (Terra Filho e col., 2006). Em humanos, a silicose é caracterizada pela presença de nódulos fibróticos consequentes a um processo inflamatório persistente e à proliferação de fibroblastos e acúmulo de componentes da matriz extracelular, como o colágeno, por exemplo, (Hunninghake e col., 1984), localizados principalmente no ápice do pulmão (Fujimura, 2000).

Ao longo dos anos, vários modelos de silicose experimental foram desenvolvidos com o intuito de melhor caracterizar o quadro da doença, buscando ao máximo reproduzir as condições encontradas na em humanos (Arras e col., 2001, Borges e col., 2001, Desaki e col., 2002, Ortiz e col., 2001). Em camundongos, estudos apontaram que há uma dependência da cepa utilizada, com diferenças quanto à intensidade da lesão tecidual, tamanho e quantidade de granulomas (Zeidler e col., 2004). Dentre os até então descritos, destacam-se os modelos de aerolização e injeção intratraqueal das partículas de sílica. No primeiro caso, apesar da maior similaridade com o que se verifica no homem, coloca-se como limitante um fator técnico importante que é o tempo de exposição à sílica (5 h por 12 dias consecutivos durante 16 a 20 semanas após o término da indução) (Davis e col., 1998). No caso do modelo de instilação intratraqueal, o processo é como mais invasivo uma vez que a indução da silicose é realizada através de uma pequena cirurgia para exposição da traquéia e a sílica inserida por meio de uma seringa (Borges e col., 2001, Faffé e col., 2001). Considerando-se a importância da e busca por uma terapia eficaz para a silicose, e sendo esta uma doença de caráter crônico, a necessidade da utilização de tratamentos de mais longo prazo tornou necessário o desenvolvimento de um modelo que nos permitisse acesso de forma menos invasiva. Neste sentido, desenvolvemos em nosso laboratório um sistema de instilação intranasal de 10 mg de sílica, uma dose eficiente em reproduzir fenômenos observados na silicose humana, como a presença de nódulos na região de terço médio e ápice dos pulmões, granulomas extensos e densos, resposta fibrótica expressiva. A cepa de camundongos escolhida foi a Swiss-Webster, que por ser não isogênica, a nosso ver reproduziria melhor a variabilidade encontrada na silicose humana.

É bem descrito na literatura que a ocorrência da resposta inflamatória de caráter tanto agudo como crônico ao nível pulmonar reflete-se diretamente em um comprometimento da mecânica respiratória (Macedo-Neves e col., 1998, Parker e col., 1999, Peták e col., 2002).

Dentre os componentes que caracterizam o processo inflamatório, o aumento da permeabilidade vascular e consequente ocorrência de edema tecidual determinam importantes alterações, tanto na resistência como na elastância pulmonares (Parker e col., 1999, Peták e col., 2002). Em humanos, o teste de função pulmonar é uma das formas para o diagnóstico da silicose, permitindo, também, o acompanhamento da evolução do quadro da doença (Gamble e col., 2004). No presente trabalho, inicialmente, avaliamos a função pulmonar através do sistema de plestimografia de corpo inteiro invasiva, sendo avaliados dois principais parâmetros incluindo i) a resistência, que é definida como a diferença de pressão entre os alvéolos e as vias aéreas centrais e periféricas, verificada por uma unidade de fluxo, e ii) a elastância, que é definida como a tendência de algo se opor à distensão ou à distorção do parênquima, assim como a sua capacidade de retornar à configuração original depois da remoção da força de distensão (Saavedra e col., 2002). Observamos, então, que os animais silicóticos apresentaram aumento nos níveis basais de resistência e elastância, tanto na fase aguda como na crônica, em comparação com os animais controle. Quando da aerolização de concentrações crescentes do agente broncoconstrictor colinérgico metacolina, verificamos que os animais silicóticos apresentaram um aumento de resistência e de elastância de maior intensidade do que aquela apresentada pelos camundongos controle, em ambos os tempos analisados. Os resultados obtidos foram indicativos da existência de um quadro de hiperreatividade das vias aéreas em associação com a silicose. Estes achados são importantes e originais no que tange a modelos experimentais desta doença. Vale ressaltar que a resposta de hiperreatividade das vias aéreas é um fenômeno associado a outras patologias pulmonares crônicas como a asma brônquica (Barnes e col., 1998). No que tange à silicose, em 1968, um grupo francês relatou pela primeira vez a ocorrência de hiperreatividade brônquica em pacientes portadores de antracosilicose (Groetenbriel e col., 1968). No entanto, um número reduzido de estudos foi realizado até então, o que torna necessária a melhor descrição e compreensão acerca deste processo (Guerrin e col., 1980). Dados do nosso laboratório constataram que a hiperreatividade brônquica evidenciada na silicose experimental murina mostrou-se dependente da dose de sílica instilada, e não seletiva, uma vez que camundongos Swiss-Webster silicóticos mostraram-se igualmente hiperreativos à aerolização com outro agente broncoconstrictor, a serotonina (dados não mostrados).

Conforme descrito anteriormente, a silicose caracteriza-se por um componente inflamatório persistente, proliferação de fibroblastos e deposição excessiva de colágeno resultando na formação de nódulos no pulmão (Thakur e col., 2009). Em nosso estudo, foi

verificado que os camundongos silicóticos apresentaram um intenso infiltrado inflamatório no tecido pulmonar, na fase aguda, constituído principalmente por macrófagos e neutrófilos, embora já com presença de pequenos nódulos nas porções superiores do pulmão. Com a evolução da doença, na fase crônica, foram identificados os nódulos característicos da silicose humana, coalescentes, possuindo acúmulo de células internamente e grande deposição de fibras colágenas.

Os processos fibróticos estão associados à migração e intensa proliferação de fibroblastos, fenômenos estes dependentes de fatores prófibróticos, com destaque para TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Bataller e col., 2005). Níveis aumentados destes fatores foram por detectados no parênquima pulmonar dos camundongos silicóticos, com máximo sendo observado no tempo de 28 dias pós-sílica. No entanto, de forma totalmente original, verificamos níveis aumentados de IL-13 no pulmão dos animais silicótico, compatíveis com a progressão da doença. Este nos pareceu um resultado bastante interessante, uma vez que já foi descrito na literatura que, além dos fatores classicamente conhecidos, a IL-13 também coloca-se como um mediador prófibrótico em diferentes condições fisiopatológicas. Foi constatada a contribuição da IL-13 para o desenvolvimento da fibrose pulmonar intersticial (Blease e col., 2001a) e formação de granuloma (Jakubzick e col., 2003a, Jakubzick e col., 2003b, Jakubzick e col., 2002), atuando através de sua habilidade em ativar diretamente fibroblastos pulmonares e macrófagos (Jakubzick e col., 2003a, Jakubzick e col., 2003b). Desta forma, fica patente que a IL-13 coloca-se como um potencial alvo terapêutico para o tratamento de doenças fibróticas como a silicose.

Dentro deste contexto, para testar esta hipótese, neste estudo tivemos por objetivo investigar o possível efeito do tratamento curativo com a imunotoxina IL-13PE, uma proteína que já se mostrou ativa em processos fibróticos incluindo asma e granuloma associado à esquistossomose (Jakubzick e col., 2003a, Jakubzick e col., 2002). De forma a buscar maior proximidade com o paciente, fizemos a escolha de usar administração curativa local de IL-13PE e o tempo mais tardio (28 dias) da silicose, já que representa o máximo da resposta fibrótica em nosso modelo experimental.

Inicialmente, analisando o efeito da IL-13PE sobre o comprometimento da função pulmonar em camundongos silicóticos, vimos que houve uma redução significativa dos níveis basais de ambos os parâmetros de resistência e elastância pulmonares nos animais tratados. Este efeito fenômeno foi detectado tanto em 7 como em 28 dias pós-sílica. Após aerolização com metacolina, notamos que a administração de IL-13PE nos camundongos silicóticos inibiu

a resposta de hiperreatividade pulmonar com redução da resistência e elastância das vias aéreas. De forma coerente, através da análise morfológica, verificamos que o tratamento com IL-13PE promoveu marcada supressão de parâmetros inflamatórios, como infiltrado de macrófagos, bem como da resposta fibrótica. Dados de análise quantitativa dos níveis de colágeno, confirmaram os achados morfológicos. Foram detectados níveis sensivelmente menores do conteúdo de colágeno no pulmão dos animais silicóticos tratados com IL-13PE em comparação com os silicóticos não tratados. Corroborando nossos achados, estudos recentes documentaram que a IL-13 é um potente indutor da produção de colágeno *in vivo* no pulmão (Lee e col., 2001) *in vitro* através de sua ação sobre fibroblastos provenientes da pele e de quelóides (Oriente e col., 2000).

Além do colágeno, foi evidenciado que a IL-13 atua como um potente estímulo para a produção de outros componentes da matriz extracelular secretados por fibroblastos (Giri e col., 1986, Phan, 2008). A laminina e a fibronectina são proteínas importantes na constituição da matriz extracelular e estão envolvidas no processo de fibrose pulmonar (Christie e col., 2004). Desta forma, avaliamos se outras proteínas da matriz extracelular, como laminina e fibronectina, poderiam estar sendo também afetadas pelo tratamento com a IL-13PE. Através de imunohistoquímica, vimos primeiramente que a expressão de laminina e fibronectina encontrava-se aumentada no pulmão dos camundongos silicóticos, em comparação com os controles. O tratamento dos animais silicóticos com IL-13PE foi capaz de suprimir a expressão tanto de laminina como de fibronectina no parênquima pulmonar. Uma possível explicação seria que a IL-13PE estaria interferindo negativamente sobre a expressão dos genes dessas proteínas (Jakubzick e col., 2004b). Mais estudos são necessários para esclarecer este fenômeno.

Os fibroblastos são cruciais no processo fibrótico, e a ativação destas células é uma das características marcantes neste tipo de resposta. Os fibroblastos ativados passam a apresentar modificação fenotípica e a expressar a proteína de músculo liso do tipo  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA), recebendo, assim, a denominação de miofibroblastos (Phan, 2008). Desta forma, com vistas à identificação de possíveis células alvos para o efeito supressor da IL-13PE, passamos a avaliar a população de miofibroblastos no pulmão de camundongos silicóticos. Por meio de técnica de imunohistoquímica, verificamos que os animais silicóticos apresentaram aumento no quantitativo de células positivas para  $\alpha$ -SMA, de forma localizada na região dos granulomas. O tecido pulmonar dos animais controle não apresentou qualquer marcação no parênquima, conforme já esperado. O tratamento dos camundongos silicóticos com a IL-13PE

levou a uma marcada redução na expressão da  $\alpha$ -SMA, o que foi indicativo da menor presença de miofibroblastos. Estes dados concordam com aqueles que mostraram uma redução da percentagem de granuloma após tratamento com a IL-13PE e sugestivos de que os miofibroblastos poderiam ser potenciais alvos para o efeito antifibrótico da IL-13PE. Dando suporte aos nossos achados, dados da literatura já indicaram a capacidade da IL-13PE de suprimir funções de fibroblastos pulmonares como a resposta de proliferação pulmonar (Jakubzick e col., 2004a).

Considerando o contexto da fibrose como extremamente complexo, é fácil compreender que vários são os tipos celulares envolvidos. No caso da silicose, os macrófagos residentes e monócitos ativados recrutados colocam-se como importantes participantes da resposta de fibrose pulmonar (Carre e col., 1991, Hamilton e col., 2008, Martinet e col., 1987, Misson e col., 2004, Nagaoka e col., 1990). Assim, buscando complementar nossa análise acerca de potenciais alvos para a IL-13PE, partimos para a avaliação de macrófagos utilizando um marcador para macrófagos ativados – o F4/80. Observamos que no pulmão de animais silicóticos houve aumento importante da expressão de F4/80, em relação aos animais controle (marcação nula), com uma marcação distribuída pelo parênquima pulmonar, porém mais concentrada na região de granuloma. Estes dados indicaram que macrófagos também parecem constituir alvos importantes para o efeito antifibrótico da IL-13PE. Uma questão relevante quanto à IL-13 diz respeito ao fato desta citocina exercer seus efeitos através da ligação à cadeia IL-13 $\alpha$ 1, que compõe parte do receptor funcional com o IL-4R, e à IL-13 $\alpha$ 2 (Shimamura e col., 2008). Dados de literatura demonstraram que a IL-13 $\alpha$ 2 apresenta-se mais expressa em condições patológicas sendo então relevante em diferentes contextos. De forma interessante, estudos relacionados a IL-13PE descreveram sua maior afinidade por esta cadeia. Assim, poderíamos especular que o aumento na expressão do receptor IL-13 $\alpha$ 2 em células alvo (macrófagos e fibroblastos), na condição da silicose, poderia contribuir para a eficácia da IL-13PE. Neste sentido, Jakubzick e colaboradores (2003) observaram aumento na expressão do gene que codifica o receptor IL-13 $\alpha$ 2 na resposta fibrótica induzida pela bleomicina, e que o tratamento com IL-13PE inibiu este fenômeno em nítida associação com a supressão da área de fibrose pulmonar. Dados preliminares mostraram, também, um aumento na expressão de IL-13 $\alpha$ 2 no pulmão silicótico, e sua supressão na condição com o tratamento com IL-13PE, o que dá suporte à nossa hipótese. No entanto, outros experimentos fazem-se necessários no sentido de melhor caracterizar o envolvimento dos receptores da IL-13 no processo silicótico.



Finalmente focamos nossa atenção sobre os mediadores pro-fibróticos, incluindo tanto citocinas como quimiocinas, e verificamos que o tratamento com a IL-13PE reduziu marcadamente os níveis de TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  no pulmão dos camundongos silicóticos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Lee e colaboradores (2001) que mostraram clara atenuação da resposta fibrótica induzida por IL-13 quando do tratamento com anticorpo neutralizante para TGF- $\beta$ . Dentro do mesmo contexto, a IL-13PE foi capaz de reduzir significativamente os níveis de MIP-1 $\alpha$  (CCL3) e MIP-2 (CXCL2), quimiocinas produzidas por células mononucleares e macrófagos (Gordon, 2003) após estimulação com IL-13. A produção de outras quimiocinas pro-fibróticas os incluindo TARC (CCL17), MDC (CCL22) e IP-10 (CXCL10) foi igualmente sensível ao tratamento com a IL-13PE. Considerando que os mediadores avaliados são em sua maioria, produzidos de forma expressiva por macrófagos e fibroblastos, em processos inflamatórios crônicos, podemos sugerir de forma mais enfática que a supressão de função/morte de macrófagos e fibroblastos parece contribuir de forma relevante para o efeito antifibrótico da IL-13PE.

## 5. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que:

1. O modelo de indução de silicose experimental não invasivo reproduziu um parâmetro característico do quadro silicótico, que inclui o comprometimento da função pulmonar, com aumento da resistência e da elastância. Evidenciamos, também, a existência de um quadro de hiperreatividade das vias aéreas frente à aerolização com metacolina. Um infiltrado de células inflamatórias foi observado no parênquima pulmonar assim como formação de granulomas, de forma mais acentuada na fase crônica da doença;
2. O tratamento curativo de camundongos silicóticos com a imunotoxina IL-13PE foi eficaz em inibir o comprometimento da função pulmonar, no que se refere tanto à resistência quanto à elastância, bem como a hiperreatividade das vias aéreas à metacolina;
3. A formação de granulomas, produção de componentes de matriz extracelular (colágeno, fibronectina e laminina), assim como a geração de citocinas (TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e quimionas (MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, TARC, MDC, IP-10) associadas ao quadro silicótico foram sensíveis ao tratamento com a IL-13PE;
4. A presença de macrófagos ativados e miofibroblastos no parênquima pulmonar dos animais silicóticos, identificada através dos marcadores F 4/80 e  $\alpha$ -SMA, respectivamente, foi significativamente inibida quando da administração de IL-13PE;

Em conjunto, nossos achados mostram que a IL-13PE foi eficaz em suprimir vários parâmetros importantes do quadro da silicose, colocando-se, assim, como uma estratégia terapêutica inovadora e extremamente promissora a ser adotada no caso de doenças pulmonares fibróticas de caráter restritivo como a silicose.

## 7 REFERÊNCIAS

- 1 Arras, M, Huaux, F, Vink, A, Delos, M, Coutelier, JP, Many, MC, Barbarin, V, Renauld, JC, Lison, D. Interleukin-9 reduces lung fibrosis and type 2 immune polarization induced by silica particles in a murine model. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001 Apr;24(4):368-75.
- 2 Bagga, S, Hosur, MV, Batra, JK. Cytotoxicity of ribosome-inactivating protein saporin is not mediated through alpha2-macroglobulin receptor. *FEBS Lett*. 2003 Apr 24;541(1-3):16-20.
- 3 Balaan, MR, Weber, SL, Banks, DE. Clinical aspects of coal workers' pneumoconiosis and silicosis. *Occupational medicine (Philadelphia, Pa)*. 1993 Jan-Mar;8(1):19-34.
- 4 Barnes, PJ, Chung, KF, Page, CP. Inflammatory Mediators of Asthma: An Update. *Pharmacol Rev*. 1998(50):515-96
- 5 Barrett, EG, Johnston, C, Oberdorster, G, Finkelstein, JN. Silica-induced chemokine expression in alveolar type II cells is mediated by TNF-alpha. *The American journal of physiology*. 1998 Dec;275(6 Pt 1):L1110-9.
- 6 Bataller, R, Brenner, DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005 Feb;115(2):209-18.
- 7 Batra, JK, FitzGerald, D, Gately, M, Chaudhary, VK, Pastan, I. Anti-Tac(Fv)-PE40, a single chain antibody Pseudomonas fusion protein directed at interleukin 2 receptor bearing cells. *J Biol Chem*. 1990 Sep 5;265(25):15198-202.
- 8 Batra, JK, Fitzgerald, DJ, Chaudhary, VK, Pastan, I. Single-chain immunotoxins directed at the human transferrin receptor containing Pseudomonas exotoxin A or diphtheria toxin: anti-TFR(Fv)-PE40 and DT388-anti-TFR(Fv). *Mol Cell Biol*. 1991 Apr;11(4):2200-5.
- 9 Batra, JK, Kasprzyk, PG, Bird, RE, Pastan, I, King, CR. Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jul 1;89(13):5867-71.
- 10 Belperio, JA, Dy, M, Burdick, MD, Xue, YY, Li, K, Elias, JA, Keane, MP. Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2002 Oct;27(4):419-27.
- 11 Blease, K, Jakubzick, C, Schuh, JM, Joshi, BH, Puri, RK, Hogaboam, CM. IL-13 fusion cytotoxin ameliorates chronic fungal-induced allergic airway disease in mice. *J Immunol*. 2001a Dec 1;167(11):6583-92.

- 12 Blease, K, Jakubzick, C, Westwick, J, Lukacs, N, Kunkel, SL, Hogaboam, CM. Therapeutic effect of IL-13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma. *J Immunol.* 2001b Apr 15;166(8):5219-24.
- 13 Blease, K, Schuh, JM, Jakubzick, C, Lukacs, NW, Kunkel, SL, Joshi, BH, Puri, RK, Kaplan, MH, Hogaboam, CM. Stat6-deficient mice develop airway hyperresponsiveness and peribronchial fibrosis during chronic fungal asthma. *Am J Pathol.* 2002 Feb;160(2):481-90.
- 14 Border, WA, Noble, NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 1994 Nov 10;331(19):1286-92.
- 15 Borges, VM, Falcao, H, Leite-Junior, JH, Alvim, L, Teixeira, GP, Russo, M, Nobrega, AF, Lopes, MF, Rocco, PM, Davidson, WF, Linden, R, Yagita, H, Zin, WA, DosReis, GA. Fas ligand triggers pulmonary silicosis. *The Journal of experimental medicine.* 2001 Jul 16;194(2):155-64.
- 16 Brody, AR, Roe, MW, Evans, JN, Davis, GS. Deposition and translocation of inhaled silica in rats. Quantification of particle distribution, macrophage participation, and function. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 1982 Dec;47(6):533-42.
- 17 Brody, AR, Roe, MW, Evans, JN, Davis, GS. Use of backscattered electron imaging to quantify the distribution of inhaled crystalline silica. *Scanning electron microscopy.* 1980(3):301-6.
- 18 Cancer, IAFRo. 1997.
- 19 Caramori, G, Adcock, I. Pharmacology of airway inflammation in asthma and COPD. *Pulmonary pharmacology & therapeutics.* 2003;16(5):247-77.
- 20 Carre, PC, Mortenson, RL, King, TE, Jr., Noble, PW, Sable, CL, Riches, DW. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Invest.* 1991 Dec;88(6):1802-10.
- 21 Castranova, V. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free radical biology & medicine.* 2004 Oct 1;37(7):916-25.
- 22 Castranova, V, Vallyathan, V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environ Health Perspect.* 2000 Aug;108 Suppl 4:675-84.

- 23 Chabalgoity, JA, Baz, A, Rial, A, Grille, S. The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007 Feb-Apr;18(1-2):195-207.
- 24 Christie, PE, Jonas, M, Tsai, CH, Chi, EY, Henderson, WR, Jr. Increase in laminin expression in allergic airway remodelling and decrease by dexamethasone. *Eur Respir J.* 2004 Jul;24(1):107-15.
- 25 Cook, DN, Brass, DM, Schwartz, DA. A matrix for new ideas in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002(27):122-4.
- 26 Cruz-Orive, LM, Weibel, ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *The American journal of physiology.* 1990 Apr;258(4 Pt 1):L148-56.
- 27 Davis, GS, Leslie, KO, Hemenway, DR. Silicosis in mice: effects of dose, time, and genetic strain. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1998;17(2):81-97.
- 28 Debinski, W, Obiri, NI, Pastan, I, Puri, RK. A novel chimeric protein composed of interleukin 13 and Pseudomonas exotoxin is highly cytotoxic to human carcinoma cells expressing receptors for interleukin 13 and interleukin 4. *J Biol Chem.* 1995 Jul 14;270(28):16775-80.
- 29 Desaki, M, Sugawara, I, Iwakura, Y, Yamamoto, K, Takizawa, H. Role of interferon-gamma in the development of murine bronchus-associated lymphoid tissues induced by silica in vivo. *Toxicology and applied pharmacology.* 2002 Nov 15;185(1):1-7.
- 30 Dinarello, CA. Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *Journal of biological regulators and homeostatic agents.* 1997 Jul-Sep;11(3):91-103.
- 31 Doucet, C, Brouty-Boye, D, Pottin-Clemenceau, C, Canonica, GW, Jasmin, C, Azzarone, B. Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. *J Clin Invest.* 1998 May 15;101(10):2129-39.
- 32 Driscoll, KE, Carter, JM, Hassenbein, DG, Howard, B. Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ Health Perspect.* 1997a Sep;105 Suppl 5:1159-64.
- 33 Driscoll, KE, Deyo, LC, Carter, JM, Howard, BW, Hassenbein, DG, Bertram, TA. Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis.* 1997b Feb;18(2):423-30.
- 34 Driscoll, KE, Howard, BW, Carter, JM, Asquith, T, Johnston, C, Detilleux, P, Kunkel, SL, Isfort, RJ. Alpha-quartz-induced chemokine expression by rat lung epithelial cells: effects of in vivo and in vitro particle exposure. *Am J Pathol.* 1996 Nov;149(5):1627-37.

- 35 Dunn, KL, Farrant, JL, Langford, PR, Kroll, JS. Bacterial [Cu,Zn]-cofactored superoxide dismutase protects opsonized, encapsulated *Neisseria meningitidis* from phagocytosis by human monocytes/macrophages. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1604-7.
- 36 Eckes, B, Zweers, MC, Zhang, ZG, Hallinger, R, Mauch, C, Aumailley, M, Krieg, T. Mechanical tension and integrin alpha 2 beta 1 regulate fibroblast functions. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2006 Sep;11(1):66-72.
- 37 Faffe, DS, Silva, GH, Kurtz, PM, Negri, EM, Capelozzi, VL, Rocco, PR, Zin, WA. Lung tissue mechanics and extracellular matrix composition in a murine model of silicosis. *J Appl Physiol*. 2001 Apr;90(4):1400-6.
- 38 Fichtner-Feigl, S, Strober, W, Kawakami, K, Puri, RK, Kitani, A. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med*. 2006 Jan;12(1):99-106.
- 39 Fujimura, N. Pathology and pathophysiology of pneumoconiosis. Current opinion in pulmonary medicine. 2000 Mar;6(2):140-4.
- 40 FUNDACENTRO. 2008 [cited; Available from: <http://www.fundacentro.gov.br>
- 41 Fuss, IJ, Heller, F, Boirivant, M, Leon, F, Yoshida, M, Fichtner-Feigl, S, Yang, Z, Exley, M, Kitani, A, Blumberg, RS, Mannon, P, Strober, W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*. 2004 May;113(10):1490-7.
- 42 Gamble, JF, Hessel, PA, Nicolich, M. Relationship between silicosis and lung function. *Scandinavian journal of work, environment & health*. 2004 Feb;30(1):5-20.
- 43 Giri, SN, Hyde, DM, Marafino, BJ, Jr. Ameliorating effect of murine interferon gamma on bleomycin-induced lung collagen fibrosis in mice. *Biochemical medicine and metabolic biology*. 1986 Oct;36(2):194-7.
- 44 Godleski, J. The Pneumoconiosis: silicosis and silicatosi. . In: Saldana, ed. *Pathology of pulmonary disease*. Philadelphia 1994.
- 45 Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jan;3(1):23-35.
- 46 Groetenbriel, C, Marcelle, R, Petit, JM. [Bronchial hyperreactivity and anthracosilicosis]. *Les Bronches*. 1968 Nov-Dec;18(6):510-3.
- 47 Guerrin, F, Voisin, C. [Bronchial hyperreactivity in miners with pneumoconiosis]. *Revue de l'Institut d'hygiene des mines*. 1980;35(2):73-84.

- 48 Hamilton, RF, Jr., Thakur, SA, Holian, A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free radical biology & medicine*. 2008 Apr 1;44(7):1246-58.
- 49 Hasegawa, M, Fujimoto, M, Kikuchi, K, Takehara, K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1997 Feb;24(2):328-32.
- 50 Hounam, RF, Black, A, Morgan, A. Removal of particles deposited in human nasal passages by nose blowing. *Health physics*. 1983 Apr;44(4):418-22.
- 51 Hoymann, HG. Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2007(55):16-26.
- 52 Hunninghake, GW, Garrett, KC, Richerson, HB, Fantone, JC, Ward, PA, Rennard, SI, Bitterman, PB, Crystal, RG. Pathogenesis of the granulomatous lung diseases. *The American review of respiratory disease*. 1984 Sep;130(3):476-96.
- 53 Jakubzick, C, Choi, ES, Carpenter, KJ, Kunkel, SL, Evanoff, H, Martinez, FJ, Flaherty, KR, Toews, GB, Colby, TV, Travis, WD, Joshi, BH, Puri, RK, Hogaboam, CM. Human pulmonary fibroblasts exhibit altered interleukin-4 and interleukin-13 receptor subunit expression in idiopathic interstitial pneumonia. *Am J Pathol*. 2004a Jun;164(6):1989-2001.
- 54 Jakubzick, C, Choi, ES, Joshi, BH, Keane, MP, Kunkel, SL, Puri, RK, Hogaboam, CM. Therapeutic attenuation of pulmonary fibrosis via targeting of IL-4- and IL-13-responsive cells. *J Immunol*. 2003a Sep 1;171(5):2684-93.
- 55 Jakubzick, C, Choi, ES, Kunkel, SL, Joshi, BH, Puri, RK, Hogaboam, CM. Impact of interleukin-13 responsiveness on the synthetic and proliferative properties of Th1- and Th2-type pulmonary granuloma fibroblasts. *Am J Pathol*. 2003b May;162(5):1475-86.
- 56 Jakubzick, C, Kunkel, SL, Joshi, BH, Puri, RK, Hogaboam, CM. Interleukin-13 fusion cytotoxin arrests *Schistosoma mansoni* egg-induced pulmonary granuloma formation in mice. *Am J Pathol*. 2002 Oct;161(4):1283-97.
- 57 Jakubzick, C, Kunkel, SL, Puri, RK, Hogaboam, CM. Therapeutic targeting of IL-4- and IL-13-responsive cells in pulmonary fibrosis. *Immunol Res*. 2004b;30(3):339-49.
- 58 Jany, B, Betz, R, Schreck, R. Activation of the transcription factor NF-kappa B in human tracheobronchial epithelial cells by inflammatory stimuli. *Eur Respir J*. 1995 Mar;8(3):387-91.
- 59 Joshi, BH, Puri, RK. Optimization of expression and purification of two biologically active chimeric fusion proteins that consist of human interleukin-13 and *Pseudomonas* exotoxin in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. 2005 Feb;39(2):189-98.

- 60 Kai, H, Yoshitake, K, Isohama, Y, Hamamura, I, Takahama, K, Miyata, T. Involvement of protein kinase C in mucus secretion by hamster tracheal epithelial cells in culture. *The American journal of physiology*. 1994 Nov;267(5 Pt 1):L526-30.
- 61 Karp, CL, Flick, LM, Park, KW, Softic, S, Greer, TM, Keledjian, R, Yang, R, Uddin, J, Guggino, WB, Atabani, SF, Belkaid, Y, Xu, Y, Whitsett, JA, Accurso, FJ, Wills-Karp, M, Petasis, NA. Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat Immunol*. 2004 Apr;5(4):388-92.
- 62 Kasaian, MT, Miller, DK. IL-13 as a therapeutic target for respiratory disease. *Biochem Pharmacol*. 2008 Jul 15;76(2):147-55.
- 63 Kawakami, K, Kawakami, M, Puri, RK. IL-13 receptor-targeted cytotoxin cancer therapy leads to complete eradication of tumors with the aid of phagocytic cells in nude mice model of human cancer. *J Immunol*. 2002 Dec 15;169(12):7119-26.
- 64 Kawakami, K, Taguchi, J, Murata, T, Puri, RK. The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway. *Blood*. 2001 May 1;97(9):2673-9.
- 65 Keane, MP, Strieter, RM. The importance of balanced pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease. *Respiratory research*. 2002;3:5.
- 66 Kelly-Welch, AE, Hanson, EM, Boothby, MR, Keegan, AD. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science*. 2003 Jun 6;300(5625):1527-8.
- 67 Kinnula, VL. [Oxidant and antioxidant properties of lung cells]. *Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja*. 1992;108(14):1246-52.
- 68 Kobzik, L. Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors. *J Immunol*. 1995 Jul 1;155(1):367-76.
- 69 Kobzik, L, Cotran, RS, Kumar, V, Collins, T. *The Lung*. In: *Pathological basis of disease* 1999.
- 70 Kovacs, EJ, DiPietro, LA. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *Faseb J*. 1994 Aug;8(11):854-61.
- 71 Lapp, NL, Castranova, V. How silicosis and coal workers' pneumoconiosis develop--a cellular assessment. *Occupational medicine (Philadelphia, Pa)*. 1993 Jan-Mar;8(1):35-56.
- 72 Lappalainen, U, Whitsett, JA, Wert, SE, Tichelaar, JW, Bry, K. Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2005 Apr;32(4):311-8.



- 73 Lee, CG, Homer, RJ, Zhu, Z, Lanone, S, Wang, X, Koteliansky, V, Shipley, JM, Gotwals, P, Noble, P, Chen, Q, Senior, RM, Elias, JA. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *The Journal of experimental medicine*. 2001 Sep 17;194(6):809-21.
- 74 Liu, GM, Ding, XQ, Xu, GZ, Wang, JK. [Effects and mechanisms of endotoxin pretreatment on lung of rat in endotoxemia]. *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]*. 2003a Nov;41(11):856-60.
- 75 Liu, TF, Cohen, KA, Willingham, MC, Tatter, SB, Puri, RK, Frankel, AE. Combination fusion protein therapy of refractory brain tumors: demonstration of efficacy in cell culture. *Journal of neuro-oncology*. 2003b Oct;65(1):77-85.
- 76 Lopes, AJ, Mogami, R, Capone, D, Tessarollo, B, de Melo, PL, Jansen, JM. High-resolution computed tomography in silicosis: correlation with chest radiography and pulmonary function tests. *J Bras Pneumol*. 2008 May;34(5):264-72.
- 77 Lukacs, NW, Hogaboam, C, Chensue, SW, Blease, K, Kunkel, SL. Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis. *Chest*. 2001 Jul;120(1 Suppl):5S-8S.
- 78 MacDonald, TT. Decoy receptor springs to life and eases fibrosis. *Nat Med*. 2006 Jan;12(1):13-4.
- 79 Macedo-Neves, A, Santos, L, Menezes, S, Paiva, D, Rocco, P, Zin, W. Respiratory mechanics after prosthetic reconstruction of the chest wall in normal rats. *Chest*. 1998;113(6):1667-72.
- 80 Martinet, Y, Rom, WN, Grotendorst, GR, Martin, GR, Crystal, RG. Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 1987 Jul 23;317(4):202-9.
- 81 Mattos, GM, Lopes, DD, Mamede, RC, Ricz, H, Mello-Filho, FV, Neto, JB. Effects of time of contact and concentration of caustic agent on generation of injuries. *The Laryngoscope*. 2006 Mar;116(3):456-60.
- 82 Mazurek, JM, Attfield, MD. Silicosis mortality among young adults in the United States, 1968-2004. *American journal of industrial medicine*. 2008 Aug;51(8):568-78.
- 83 Misson, P, van den Brule, S, Barbarin, V, Lison, D, Huaux, F. Markers of macrophage differentiation in experimental silicosis. *Journal of leukocyte biology*. 2004 Nov;76(5):926-32.
- 84 Morgan, WKC, Seaton, A. *Occupational Lung Diseases* 1995.

- 85 Mossman, BT, Churg, A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998 May;157(5 Pt 1):1666-80.
- 86 Murata, T, Taguchi, J, Puri, RK, Mohri, H. Sharing of receptor subunits and signal transduction pathway between the IL-4 and IL-13 receptor system. *Int J Hematol*. 1999 Jan;69(1):13-20.
- 87 Nagaoka, I, Trapnell, BC, Crystal, RG. Upregulation of platelet-derived growth factor-A and -B gene expression in alveolar macrophages of individuals with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 1990 Jun;85(6):2023-7.
- 88 Oriente, A, Fedarko, NS, Pacocha, SE, Huang, SK, Lichtenstein, LM, Essayan, DM. Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2000 Mar;292(3):988-94.
- 89 Ortiz, LA, Lasky, J, Gozal, E, Ruiz, V, Lungarella, G, Cavarra, E, Brody, AR, Friedman, M, Pardo, A, Selman, M. Tumor necrosis factor receptor deficiency alters matrix metalloproteinase 13/tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression in murine silicosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001 Jan;163(1):244-52.
- 90 Palecanda, A, Kobzik, L. Alveolar macrophage-environmental particle interaction: analysis by flow cytometry. *Methods (San Diego, Calif)*. 2000 Jul;21(3):241-7.
- 91 Parker, J, Gillespie, M, Taylor, A, Martin, S. Capillary filtration coefficient, vascular resistance, and compliance in isolated mouse lungs. *J Appl Physiol*. 1999;87(4):1421-7.
- 92 Peták, F, Habre, W, Hantos, Z, Sly, P, Morel, D. Effects of pulmonary vascular pressures and flow on airway and parenchymal mechanics in isolated rat lung. *J Appl Physiol*. 2002;92(1):169-78.
- 93 Phan, SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Apr 15;5(3):334-7.
- 94 Phan, SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest*. 2002 Dec;122(6 Suppl):286S-9S.
- 95 Piguet, PF, Collart, MA, Grau, GE, Sappino, AP, Vassalli, P. Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature*. 1990 Mar 15;344(6263):245-7.
- 96 Powell, DW, Mifflin, RC, Valentich, JD, Crowe, SE, Saada, JI, West, AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *The American journal of physiology*. 1999 Jul;277(1 Pt 1):C1-9.

- 97 Puri, RK, FitzGerald, D, Leland, P, Kozak, RW, Pastan, I. In vitro and in vivo suppression of interleukin-2-activated killer cell activity by chimeric proteins between interleukin-2 and Pseudomonas exotoxin. *Cell Immunol.* 1992 Sep;143(2):324-34.
- 98 Puri, RK, Leland, P, Obiri, NI, Husain, SR, Kreitman, RJ, Haas, GP, Pastan, I, Debinski, W. Targeting of interleukin-13 receptor on human renal cell carcinoma cells by a recombinant chimeric protein composed of interleukin-13 and a truncated form of Pseudomonas exotoxin A (PE38QQR). *Blood.* 1996 May 15;87(10):4333-9.
- 99 Ray, A, Cohn, L. Altering the Th1/Th2 balance as a therapeutic strategy in asthmatic diseases. *Curr Opin Investig Drugs.* 2000 Dec;1(4):442-8.
- 100 Rees, D, Murray, J. Silica, silicosis and tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007 May;11(5):474-84.
- 101 Rimal, B, Greenberg, AK, Rom, WN. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Current opinion in pulmonary medicine.* 2005 Mar;11(2):169-73.
- 102 Robbins, ST, Cotran, RS, Kumar, V, Collins, T. *Patologia Estrutural e Funcional Philadelphia: 2000 2000*
- 103 Rocco, PR, Momesso, DP, Figueira, RC, Ferreira, HC, Cadete, RA, Legora-Machado, A, Koatz, VL, Lima, LM, Barreiro, EJ, Zin, WA. Therapeutic potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. *Eur Respir J.* 2003 Jul;22(1):20-7.
- 104 Rushton, L. Chronic obstructive pulmonary disease and occupational exposure to silica. *Reviews on environmental health.* 2007 Oct-Dec;22(4):255-72.
- 105 Saavedra, M, Vasil, M, Randell, S, West, J, Rodman, D. Pseudomonas aeruginosa-human airway epithelial cell interaction: effects of iron on inflammation and apoptosis. *Chest.* 2002 Mar;121(3 Suppl):40S-1S.
- 106 Sake, RS, Leme, AS, Dolhikoff, M. Neonatal capsaicin treatment decrease airway and pulmonary tissue responsiveness to methacholine. *The American journal of physiology.* 1994(266 (1 Pt 1)):L23-L9.
- 107 Sappino, AP, Schurch, W, Gabbiani, G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 1990 Aug;63(2):144-61.
- 108 Saúde, Md. 1997 [cited; Available from: [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)
- 109 Saúde, OMd. [cited 1986 10/14]; Available from: [http://www.who.int/occupational\\_health](http://www.who.int/occupational_health))

- 110 Schafer, M, Werner, S. Transcriptional control of wound repair. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:69-92.
- 111 Schreck, R, Albermann, K, Baeuerle, PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free radical research communications.* 1992;17(4):221-37.
- 112 Shimamura, T, Fujisawa, T, Husain, SR, Kioi, M, Nakajima, A, Puri, RK. Novel role of IL-13 in fibrosis induced by nonalcoholic steatohepatitis and its amelioration by IL-13R-directed cytotoxin in a rat model. *J Immunol.* 2008 Oct 1;181(7):4656-65.
- 113 Smith, BJ, Holladay, SD, Hudson, LC. A simplified method of casting the macroscopic airways of lungs. *Acta anatomica.* 1990;137(2):109-13.
- 114 Terra Filho, M, Santos Ude, P. [Silicosis]. *J Bras Pneumol.* 2006;32 Suppl 2:S41-7.
- 115 Thakur, SA, Beamer, CA, Migliaccio, CT, Holian, A. Critical Role of Marco in Crystalline Silica-Induced Pulmonary Inflammation. *Toxicol Sci.* 2009 Jan 16.
- 116 Vallyathan, V, Shi, XL, Dalal, NS, Irr, W, Castranova, V. Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. Potential role in acute silica-induced lung injury. *The American review of respiratory disease.* 1988 Nov;138(5):1213-9.
- 117 Wynn, TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008 Jan;214(2):199-210.
- 118 Wynn, TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004 Aug;4(8):583-94.
- 119 Wynn, TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:425-56.
- 120 Zar, JH. *Biostatistical analysis.* 3th ed ed. New Jersey. 1996.
- 121 Zeidler, P, Hubbs, A, Battelli, L, Castranova, V. Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *Journal of toxicology and environmental health.* 2004 Jul 9;67(13):1001-26.

## 8 ANEXO

PRELIMINARY VERSION

**Respiratory mechanics and morphological changes in lung injury induced by intranasal silica in mice**

Tatiana P.T. Ferreira; Januário M. Lima; Francisco A. Farias Filho, Patrícia B. Jurgilas<sup>1</sup>, Jonas H. Perales<sup>1</sup>, Grazielle V. Guedes; Marcelo Pelajo<sup>2</sup>, Patrícia R. M. Rocco<sup>3</sup>; Cristiane Garcia<sup>3</sup>, Vincent Lagente<sup>4</sup>, Cory Hogaboam<sup>5</sup>, Marco Martins and Patrícia Silva.

Laboratory of Inflammation, <sup>1</sup>Laboratory of Toxinology, <sup>2</sup>Laboratory of Pathology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Av. Brasil, nº 4365, Manguinhos, CEP 21045-900, <sup>3</sup>Laboratory of Pulmonary Investigation, CCS, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>4</sup>Université de Rennes 1, France; <sup>5</sup>Department of Pathology, University of Michigan, USA.

\*Author for correspondence

E-mail address: patmar@ioc.fiocruz.br

Tel: 55.21.2562-0818, Fax: 55.21.2558-7382

A ser submetido ao American Journal of Pathology

## **Abstract**

Silicosis is one of the oldest occupational diseases, still killing thousands of people in the world. In this study we developed a non-invasive model of silicosis in mice, in order to investigate the role of mediators involved in the genesis of pulmonary fibrosis processes and the chronology of inflammatory phenomena preceding the processes of tissue lesion and repair. The comparative analysis among different strains of mice as C57Black6, Balb/c and Swiss Webster revealed a the occurrence of leukocyte infiltration at day 7, peribronchiolar granuloma formation at day 14, followed by an extensive tissue fibrosis at day 28. As revealed by staining with pricrus-sirius, 28-day silicotic mice exhibited a massive deposition of collagen in the lungs when compared from control mice. Analysis of different mice strain responsiveness to intranasal silica showed that all three species exhibited a similar pattern of response. Further experiments were performed in Swiss Webster mice since this is not an inbred mouse strain thereby modeling the outbred human condition associated with silicosis. The kinetics of leukocyte infiltration in BAL fluid revealed that there is a marked increase in the number of total leukocytes, at 7 days, which reduces progressively with time. A similar profile was noted in the case of mononuclear cells, while neutrophil numbers remained elevated for at least 60 days after the introduction of silica into mice. Tissue analyses showed that there is a marked inflammatory cellIn parallel, a marked increase in the levels of fibrogenic cytokines namely TNF-alpha, TGF-beta and IL-13 was detected. These responses directly correlated with alteration of lung function as attested by elevation in lung resistance and static elastance. Altogether, our findings indicate that the nasal instillation of silica into various strains of inbred and outbred mice reproduces critical features of the human silicosis.

**Key words:** Inflammation, lung, silica particles.

## **Introduction**

Environmental and occupational lung disorders are an important aspect of clinical medicine and the economic costs are staggering. Billions of dollars are paid out in workers compensation annually for job-related illness and injuries associated with silicosis (Castranova, 2004). According to publications by the World Health Organization, silicosis is an occupational disease that produces the largest number of victims and kills thousands worldwide each year.

Silicosis is the consequence of a long-term exposure to inhaled dust of silica dioxide or silica in its free and crystalline form, and it can be detected through a simple chest X ray, which will reveal the presence of small nodules in the upper lungs (Terra Filho *et al.*, 2006). The resulting respiratory insufficiency is a consequence of changes in lung ventilation and gas exchange, and the decrease in respiratory function is a limiting factor for the patient's activities.

Pulmonary fibrosis response is traditionally seen as a phenomenon occurring after an acute inflammatory response, although up to this moment there is no clinical evidence proving the actual existence of a direct relationship between inflammatory parameters and the evolution of this disease. However, it has been described, in specialized literature, that tissue fibrosis begins its amplification from an initial lesion, and thus acts by modulating the phenomenon of tissue repair, regarding both the accumulation of mesenchymal cells and the synthesis of extracellular matrix components (Keane *et al.*, 2002). This has led some research groups to focus their studies on the expression of components of the extracellular matrix and on molecules that are normally involved in the regulation of homeostasis.

Experimental silicosis models attempt to reproduce the sequence of events of human silicosis and have been explored over the years to provide comprehension regarding the determination of cellular and molecular mechanisms of this disease. However, there are very few published articles describing an experimental model which faithfully reproduces the physiopathology of pulmonary silicosis. Basically there are two described forms of inducing silicosis in animals. According to Davis (Davis *et al.*, 1998), animals inhaled aerosol particles during 5 hours a day, during 12 consecutive days, receiving  $70 \text{ mg/m}^3$  of silica dust, and the analysis was carried out from 16 to 20 weeks after instillation. Although it is a good reproduction of what happens in humans, this model requires a long time for the disease to establish itself, besides needing special infrastructure. The other, more commonly used, form of induction involves the intratracheal instillation of silica particles. A small surgical



procedure is performed in which the animal's trachea is exposed and silica dust is introduced with a syringe. The commonly used dose is 20 mg of silica dust diluted in 50µl of sterile saline (Borges *et al.*, 2001; Faffe *et al.*, 2001). Although induction is fast and requires only one dose, this technique has been criticized for being invasive, which might influence the development of the inflammatory process, besides inducing the disease in a completely different manner from what happens in humans.

In this paper we sought to develop a model which reproduced in a more accurate manner the events associated to what happens in the human disease. By inducing silicosis intranasally, we were able to overcome the problems found in aerosol models and in intratracheal models.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

Male C57/BL6, Balb/c and Swiss Webster mice (180-200 g) were obtained from the Oswaldo Cruz Foundation Breeding (Rio de Janeiro, Brazil) and kept in the animal-housing facilities of the Department of Physiology and Pharmacodynamics with controlled room temperature (22-25 °C) and a 12-h (6:00 AM-6 PM) light dark cycle. All the procedures involving care and use of laboratory animals in this study were examined and approved by the Animal Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (licence 0213).

### **Silicosis induction**

Animals were anaesthetised by halothane (Tanohalo, Cristália, São Paulo) and then injected intranasally with 10 mg of silica (SiO<sub>2</sub>), (SiO<sub>2</sub>, S-5631 Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA, particle size: 0.5 -10 µm) diluted in 50 µl of sterile saline intranasal solution. Tests were performed in different times, after 7, 14 and 28 days (figure 1). For comparative analysis between different types of mice, a time of 28 days was fixed after silica dust instillation.

### **Bronchoalveolar Lavage (BAL)**

Bronchoalveolar lavage was carried out with a polyethylene cannula inserted in the trachea and a total volume of 1.5 ml of buffered saline solution (PBS) containing 10 mM of EDTA was instilled and then aspirated in 2 consecutive lavages of 0.75 ml. Samples were centrifuged at 300 x g for 10 minutes, and the supernatant was collected and frozen for later quantification of mediators. The cellular pellet was suspended again in 0.25 ml for cell analysis.

### **Leukocyte counting**

The total number of leukocytes was analyzed by diluting the samples in Türk liquid (1:10), and counting was carried out in a Neubauer chamber with light microscope. The differential analysis used cell smears stained with the May-Grunwald-Giemsa method. Evaluation was carried out with immersion in oil and light microscope (BX51, Olympus).

### **Histopathologic Analysis**

After being put down with a high dose of Thiopental (i.p.), perfusion was performed by means of an intracardiac cannula with a solution of saline and heparin (1:10) for blood collection. All animals later received buffered paraformaldehyde at 4% through the same means. In both procedures the flasks containing the solutions were kept at a height of 110 cm so that hydrostatic pressure would reproduce the physiological conditions of blood circulation. The lungs were then fixed in buffered formaldehyde at 10% for 24 hours, dehydrated in increasingly concentrated ethanol solutions, clarified with xylene and finally set in paraffin. Histologic cuts of 5  $\mu\text{m}$  were performed using paraffin blocks containing fragments of lung tissue, and submitted to the following staining and immunohistochemical methods. For the analysis of general aspects of lung tissue, the histologic cuts were stained with hematoxylin-eosin, analyzed with light microscope (BX51, Olympus) at different magnifications, and photographed with a digital camera (C-7070, Olympus). For collagen quantification we used histologic cuts stained with phosphomolybdic acid-Sirius Red (PMA-SR) technique and observed through a light microscope (BX51, Olympus). Five images were obtained from each slide by using a digital camera (BX51, Olympus), each containing areas with nodular lesions induced by silica dust, visible at 20X magnification. Images were processed and the amount of collagen was quantified by using the image analysis program Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics, USA). In order to evaluate the presence of neutrophils in the lung tissue we used Lennert's Giemsa stain with differentiation in acetic acid at 0.5%. After staining, the slides were photomicrographed for later analysis.

### **Immunohistochemistry for MMP-2 and MMP-9**

To highlight metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) the antibodies anti-MMP-2 (SC6838, Santa Cruz, CA, USA) and anti-MMP-9 (SC6841, Santa Cruz, CA, USA) were used. After removal from paraffin, the cuts were hydrated with TBS pH 7.6, blocked with  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 3% in methanol for ten minutes and the slides were then washed three times with TBS and blocked with Tris-HCL + BSA 2% for 20 minutes. Primary anti-bodies anti-MMP-2 and MMP-9 were diluted with Tris-HCL + BSA 1% in 1:100 and 1:80 ratios, respectively. The slides were incubated with the primary antibody for 12 hours. After incubation they were washed twice with TBS. The secondary antibody, anti-IgG (goat) (811620 Zymed, USA) was diluted in Tris-HCL and incubated for 30 minutes. Development was performed with AEC for

approximately 10 minutes. The slides were finally washed with distilled water, counter-stained with Mayer's hematoxin and mounted in an aqueous substrate.

### **Immunohistochemistry for the marking of activated Macrophages**

In order to highlight alveolar macrophages, biotinylated BSL 1 lectin (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) was used. After removal from paraffin the cuts were hydrated and endogenous peroxidase was inhibited ( $H_2O_2$  at 3% in methanol) and tissue charges were blocked (3% borax), as were the unspecific reagents links, by means of incubation with phosphate buffered saline (PBS) containing bovine albumin (BSA) at 3%. The biotinylated lectin was incubated for 16 hours at 4° C in a humid room (1:250 dilution in PBS-BSA at 1%) and detected by the Streptavidin-Peroxide conjugate by using diaminobenzidine as chromogenic substrate – FAST DAB (Sigma, St Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instruction. The slides were counter-stained with hematoxin.

### **Quantification of chemokines and cytokines**

We used 96-compartment plates where we added 50 ml/compartment of the capturing antibody, diluted in a buffer composed of 1.5 M NaCl, 0.5 M of  $H_3BO_4$  and 1 N of NaOH; incubation period was 12 hours at 40° C. The compartments were washed 3 times (200 ml/compartment) with buffer 1, composed of buffered saline solution PBS/0.005 % of Tween 20. After this phase, in order to block unspecific sites, the plate was filled (200 ml/compartment) with buffered PBS saline solution/bovine albumin serum (BSA, 2%) for one hour at 37° C. The compartments were washed three times with buffer 1 (200 ml/compartment). Samples and standards were diluted in buffer 1 containing 2% of bovine fetal serum (BFS) (buffer 2) and then added to the compartments (50 ml/compartment). After the incubation period (1 hour at 37° C) a new sequence of 3 washings was performed (200 ml/compartment) with buffer 1. The biotinylated detector antibody (50 mg/ml) was then added and kept in incubation for 45 minutes at 37° C. The compartments were washed with buffer 1 (200 ml/compartment) and incubated for 30 minutes at 37° C (100 ml/compartment) with a NeutrAvidin "horseradish peroxidase" (HRP) mixture diluted in buffer 2. After the last wash with buffer 1 (200 ml/compartment) the orthophenylenediamine dichloride (OPD) substrate was added (100 ml/compartment) to develop the colorimetric reaction (approximately 3 to 5 minutes), which was interrupted by adding 50 ml/compartment of

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 M). The spectrophotometric analysis was carried out in a plate reader for 450 nm wavelength.

The quantification of inflammatory mediators included cytokines TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$  and chemokines KC and MIP-2 $\alpha$ . Commercial kits were used (R&D System, USA) and all manufacturer's instructions were followed. The analyzed samples were taken from the bronchoalveolar lavage (point 3.3) and the lung tissue. In the case of tissue, it was homogenized in 1 ml of PBS containing a "complete" cocktail of protease inhibitors (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland), followed by centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes, and the supernatant was recovered for later quantification of mediators.

### **Respiratory mechanics**

For respiratory mechanic tests we used 5 animals from each group. They were sedated with diazepam (5 mg/kg, i.p.) and then anesthetized with sodium pentobarbital (20 mg/kg, i.p.) and tracheostomized for the introduction of a 20-gauge Jelco needle. The animals were positioned in supine position for the removal of thoracic and abdominal walls, paralyzed with gallamine triethiodide (2 mg/kg i.v.) and then mechanically ventilated with constant flow and volume.

A pneumotacograph was connected to a tracheal cannula to measure air flow ( $V'$ ), and by integrating the flow signal, we obtained the mobilized gas volume ( $V$ ) (Mortola, 1983). Tracheal pressure ( $P_{tr}$ ) was measured through a side exit of the circuit, by means of a differential pressure transducer.

Respiratory mechanics were analyzed with the method of occlusion at the end of inspiration, based on the insufflation of the respiratory system with constant air flow followed by a quick closure of the airway at the end of inspiration. We observed a quick initial drop of  $P_{tr}$  ( $\Delta P_1$ , L) up to a point of curve inflexion ( $P_i$ , L), followed by a slow decrease ( $\Delta P_2$ , L) until it reached a plateau representing the elastic pressure of the respiratory system ( $P_{el}$ , L).  $\Delta P_1$ , L and  $\Delta P_2$ , L respectively correspond to the viscous and viscoelastic components of the respiratory system. The sum of  $\Delta P_1$ , L and  $\Delta P_2$ , L equals  $\Delta P_{TOT}$ . Static and dynamic elasticity values ( $E_{st}$ , L and  $E_{dyn}$ , L, respectively) of the system were calculated by dividing  $P_{el}$ , L and  $P_i$ , L by current volume ( $V_T$ ) (Bates, 1988).

### **Statistic analysis**

The results were expressed as mean  $\pm$  standard error mean (SEM) and statistically analyzed by variance analysis (ANOVA), followed by a Newman-Keuls-Student multiple comparison test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant for both tests.

## **Results**

### **Comparative Analysis of Pulmonary Inflammatory Response Induced by Instilled Silica Dust in Rats**

In order to establish a non-invasive model of silicosis, first we made a comparative evaluation of the silica-induced response in three different species of mice. Two isogenic species were chosen (Balb/c and C57 Bl6), together with a non-isogenic one (Swiss-Webster). For this analysis we chose a period of 28 days, as this corresponds to the chronic phase of the disease and therefore to the most critical stage of the silicotic process. We initially evaluated the cellular content of bronchoalveolar lavage of silicotic animals when compared with controls (instilled with saline). We observed an increased number of leukocytes in the bronchoalveolar lavage (BAL) of the tested animals, with clearly predominant macrophages and a significant infiltrate of neutrophil polymorphonuclears (Fig. 3). All three species analyzed presented a similarly intense granulomatous response, as attested by hematoxylin and eosin stains (Fig. 4). Based on these results we decided to use Swiss-Webster mice in the subsequent essays, as their non-isogenicity may be more representative of the response observed in humans with the disease.

### **Kinetics of Silica-Induced Pulmonary Inflammatory Response in Swiss-Webster Rats**

#### **Evaluation of Leukocyte Contents in Bronchoalveolar Lavage**

Our analysis worked with periods of 7, 14 and 28 days, as these represent the acute, the intermediary and the chronic stages of silicotic disorder. We observed that the bronchoalveolar lavage contained an increased number of total leukocytes, with a peak at 7 days and a progressive decline at 14 and 28 days. The differential analysis revealed a predominance of macrophages, with a significant increase in the number of neutrophils. These latter cells presented constant high levels throughout the analysis period (Fig. 5).

#### **Evaluation of Morphologic Changes in Pulmonary Tissue**

We observed that the lungs of control animals showed preserved pulmonary parenchyma for all times analyzed, with alveolar spaces free of inflammatory cells and bronchiolar structures lined with cuboid to cylindrical pseudo-stratified epithelium (Fig. 6A).

As shown in figures 6 and 7, we observed that after 7 days the silicotic animals showed diffusely altered parenchyma with the presence of inflammatory cells and large areas of alveolar collapse (Fig. 6B). This inflammatory infiltrate had a marked presence of neutrophil polymorphonuclears (Fig. 7A). In the group of 14-day silicotic animals we observed the existence of nodular structures (granulomas), sometimes confluent (Fig. 6C), made up of inflammatory cells among silica particles (Fig. 7B). The 28-day group showed better delimited granulomas and maintained cellularity including macrophages and neutrophils (Fig. 6D). The alveolar walls presented a larger number of mononuclear cells, which determined the identification of evident wall thickening (Fig. 7C).

By using Picrus-Sirius stain to visualize collagen fibers, our microscopy showed a small amount of collagen fibers in the pulmonary parenchyma of control animals, in all analyzed times (Fig. 8A). Silicotic animals showed a time-dependent increased content of collagen fibers; its peak was observed on day 28, corresponding to the chronic phase of silicotic response (Figures 8B, 8C and 8D).

#### **Evaluation of Cellular Infiltrate in Pulmonary Parenchyma**

The macrophages in the lungs of control animals were either not responsive or weakly responsive to BSL-1 (Fig. 9A). In the case of the silicotic animals we observed that interstitial and alveolar macrophages were highly positive in their cell membranes, which favored the identification of the activated population after 7 (Fig. 9B), 14 (Fig. 9C) and 28 (Fig. 9D) days.

Lennert's Giemsa stain showed no markings for neutrophil polymorphonuclears in control animals (Fig. 10A). However, under the same experimental conditions we observed the presence of neutrophils with apoptotic aspect in the pulmonary tissue of silicotic animals in all three times analyzed (Figures 10B, 10C and 10 D).

#### **Identification of Inflammatory Mediators Generated During Silicotic Response in Rats**

With the aim to identify inflammatory mediators which take part in the silicotic response, we went on to analyze some relevant chemokines and cytokines. We studied the bronchoalveolar lavage and pulmonary tissue and initially detected an increased amount of KC in the bronchoalveolar lavage; KC is a C-X-C chemokine which corresponds to human IL-8 (Fig. 11A). Equivalent amounts of KC were detected in different analysis times. Both



TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  were increased in a time-dependant manner in the BAL, with a peak on the 28<sup>th</sup> day after silica instillation (Figures 11B and 11C, respectively).

During pulmonary tissue analysis we observed high levels of KC (Fig. 12A) during all three analysis times. Other mediators showed a progressive increase: chemokines and cytokines were increased in the silicotic animals, with their peak on day 28. MIP-2 (Fig. 12B), IFN- $\gamma$  (Fig. 12C), TNF- $\alpha$  (Fig.12D) and TGF- $\beta$  (Fig. 12E) were analyzed.

### **Analysis of the Presence of Metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) in Pulmonary Tissue**

For the evaluation of MMP-2 and MMP-9 we used the immunohistochemistry technique, which allowed us to observe that the lungs of control animals showed weak marking for MMP-2 and 9 (Figures 13A and 14A). Silicotic animals showed strong marking for MMP-2 and MMP-9 on days 7 and 28 (Figures 13 and 14).

### **Evaluation of Respiratory Mechanics in Silicotic Mice**

The analysis of respiratory mechanics showed a significant increase of variations of resistive pressures  $\Delta P_{1, L}$  (related to central airways),  $\Delta P_{2, L}$  (related to peripheral airways) and  $\Delta P_{tot}$  (the sum of both pressures,  $\Delta P_{tot L} = \Delta P_{1, L} + \Delta P_{2, L}$ ) in silicotic animals when compared to saline animals, in all three analyzed times (Fig. 15). On day 28 the silicotic animals presented a significant increase of  $\Delta P_{2, L}$  when compared with other silicotic animals. This increase is apparently related to pulmonary fibrosis observed in animals after 28 days of silica instillation.

## Discussion

Silicon is a serious public health problem, since its incidence and prevalence are very high, especially in less developed countries, even though it is potentially avoidable (Fujimura, 2000).

Observations in humans showed inter-individual differences regarding the development of silicotic lesions (Honda *et al.*, 1993; Katsnelson *et al.*, 1986). There is some evidence that genetic factors may be related to individual susceptibility, although such evidence is not as yet conclusive.

Experimental silicosis models attempt to reproduce the sequence of events of human silicosis and have been explored over the years to provide comprehension regarding the determination of cellular and molecular mechanisms of this disease. However, there are very few published articles describing an experimental model which faithfully reproduces the physiopathology of pulmonary silicosis.

Basically there are two described forms of inducing silicosis in animals. Davis *et al.* had animals inhale aerosol particles (1998). In his technique, animals were kept in a room for 5 hours during 12 consecutive days, receiving  $70 \text{ mg/m}^3$  of silica dust, and analysis was carried out from 16 to 20 weeks after instillation was concluded. Although it is a good reproduction of what happens in humans, this model requires a long time for the disease to establish itself, besides needing special infrastructure. The other, more commonly used, form of induction involves the intratracheal instillation of silica particles. A small surgical procedure is performed in which the animal's trachea is exposed and silica dust is introduced with a syringe. The commonly used dose is 20 mg of silica dust diluted in  $50 \mu\text{l}$  of sterile saline (Borges *et al.*, 2001; Faffe *et al.*, 2001). Although induction is fast and requires only one dose, this technique has been criticized for being invasive, which might influence the development of the inflammatory process, besides inducing the disease in a completely different manner from what happens in humans.

In this paper we sought to develop a model which reproduced in a more accurate manner the events associated to what happens in the human disease. By inducing silicosis intranasally, we were able to overcome the problems found in aerosol models and in intratracheal models. Our choice for 10 mg of silica dust diluted in  $50 \mu\text{l}$  of saline proved to be efficient as it caused an extensive lesion, compromising mainly the middle third and the apex of mice's lungs.

We chose Swiss-Webster mice since they are not isogenic, therefore more representative of the inflammatory response variability found in humans. There are no other papers in the literature describing the use of Swiss-Webster mice to develop models of pulmonary silicosis. For this reason we compared our animals with two other isogenic mouse types (Balb/c and C57 Bl6) (Borges *et al.*, 2001; Faffe *et al.*, 2001), as Balb/c is the most commonly used in this disease model. Our results showed that there was no significant difference between the analyzed animal strains in terms of cell profile and differential of the bronchoalveolar lavage, or in the alterations observed in pulmonary tissue when stained with hematoxylin and eosin. With these results we realized we could use the Swiss-Webster animals, since they are capable of reproducing the response observed in other strains used by other groups.

Although silicosis in humans develops over years of inhalation, studies with animals have showed that even a single exposure event may lead to similar functional and morphologic changes in the lungs, which clearly validates the use of these models (Kuncova *et al.*, 1971; Lugano *et al.*, 1982; Mariani *et al.*, 1995; Schapira *et al.*, 1998). In spite of the disease's chronic character, we decided to establish analysis times which included 7 to 28 days, as these represent the acute, intermediate and chronic phases of silicosis. Other authors used 10 and 30 days as representatives of acute and chronic phases, respectively (Borges *et al.*, 2001; Faffe *et al.*, 2001).

When the silica particles enter the airways, they move towards the alveoli, where they are phagocytosed by macrophages. The consequence of this is the process of cellular activation and release of inflammatory mediators such as reactive oxygen species, lysosomal enzymes, metabolites of arachidonic acid, chemokines and cytokines, important for cellular recruitment and for the intensification of the fibrogenesis process (Fujimura, 2000).

The cytotoxic action of silica is a consequence of the activation of alveolar macrophages and of the production of reactive oxygen species, causing cellular lesion and the rupture of lysosome membranes (Davis, 1986; Vallyathan *et al.*, 1988). With macrophage lysis, silica particles are phagocytosed by new alveolar macrophages, which also die after ingesting them. For this reason alveolar macrophages cannot completely remove the silica particles from the lungs (Reasor *et al.*, 2001).

As complementary help to macrophages there are also mononuclear cells, the lymphocytes, also shown to take part in pulmonary reaction to silica. In animals as well as in humans, lymphocytes are present in the inflammatory infiltrate around the granulomas, in the

interstice and also forming lymphoid aggregates in the lungs and in the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) (Kumar, 1989; Reiser *et al.*, 1982). Sttruhar *et al.*, (Struhar *et al.*, 1989) demonstrated, in mice, that following silica instillation there was an increase in the number of T-lymphocytes in BAL and in the pulmonary tissue. They also observed that lymphocyte response was dominated by CD4<sup>+</sup> cells, with a response peak between 14 and 30 days after exposure (Kumar, 1989). Furthermore, specific populations of T-lymphocytes in silicotic lungs produce IFN- $\gamma$  in increased quantities. This cytokine could be responsible for the maintenance of macrophage populations activated during silicosis (Davis *et al.*, 2000). The time reduction of inflammatory infiltrate can also be observed by analyzing pulmonary tissue stained with hematoxylin and eosin.

Our results showed that silica stimulation caused a significant increase in the number of neutrophils present in the BAL, a phenomenon which maintained the same intensity throughout the process. We also observed increased levels of KC in the bronchoalveolar lavage of silicotic animals. BAL analysis showed no significant differences in the number of neutrophils among the silicotic groups; the same was observed when quantifying KC (IL-8 murina), which plays an important role in the recruitment of this cell type.

Vanhee (Vanhee *et al.*, 1995) showed that cytokines and growth factors such as TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 and IL-8, TGF- $\beta$ , PDGF and IGF produced by alveolar macrophages are directly involved in the sequence of events which lead to the development of pulmonary fibrosis. It has been demonstrated that during silicosis TGF- $\beta$  promotes the accumulation of extracellular matrix, both because it increases the synthesis of collagen and fibronectin and because it inhibits the degradation of extracellular matrix by reducing the secretion of proteases and/or increasing the secretion of protease inhibitors (Jagirdar *et al.*, 1996). Such phenomena corroborate the results found with the quantification of collagen fibers, when a significant increase was detected mainly in the silicotic group, day 28.

Our work showed a significant increase in the content of some of these cytokines and growth factors involved in the silicosis of animals exposed to silica when compared to the saline group. By analyzing BAL we observed a significant time increase of the levels of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ . However, levels of chemokine KC were increased throughout the analysis period. The analysis of these factors in the pulmonary tissue showed increased levels of KC and MIP-2, as well as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$ . The generation of these factors presents a temporal relation with leukocyte infiltrate and disease chronification, as demonstrated by the occurrence of intense fibrosis and granuloma formation. These findings are backed by the

literature and corroborate the fact that the model developed was capable of reproducing the silicotic scenario observed in other experimental models and in the human disease as well.

The degradation of MEC is an essential event in many physiologic processes such as during embryonic development and in tissue growth and repair. On the other hand, excessive degradation may lead to the development of various pathologic conditions, such as rheumatoid arthritis, osteoarthritis and auto-immune diseases (Westermarck *et al.*, 1999). A few specific proteases known as matrix metalloproteinases (MMPs) are an important family of metal-dependent endopeptidases, secreted in their inactive form with zinc in the active site (Rice *et al.*, 2000). Currently there are 20 known types of human MMPs, grouped according to their structure and specific substrates in: collagenases (MMP-1, 8 and 13), stromelysins, gelatinases (MMP-2 and 9) and metalloproteinases linked to the plasmatic membrane (Nabeshima *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 1999). The existing imbalance between metalloproteinases (MMPs) and their respective tissue inhibitors (TIMPs) allows these proteins, mostly secreted by fibroblasts, to accumulate (Perez-Ramos *et al.*, 1999). When marking for MMP-2 and 9 in pulmonary tissue, we observed strong marking in the case of silicotic animals when compared with controls. In the specific case of MMP-9 we observed predominant marking in macrophages, which strengthen literature findings indicating that this MMP is more associated with inflammatory cells (Lagente *et al.*, 2005). Neutrophils should also be considered cellular sources of MMP-9.

Interestingly we may associate the significant increase of collagen contents in pulmonary tissue in a more chronic stage to the increase of  $\Delta P2, L$  (related to peripheral airways). Faffe *et al.*, (Faffe *et al.*, 2001), when analyzing tissue mechanics of silicotic lungs, also observed a significant increase of tissue resistance when compared with control animals. The increase of  $\Delta P1, L$  (related to central airways) seems to be more related to the inflammatory infiltrate mainly found around the bronchi.

## Legends

**Figure 1.** Comparative analysis of the leukocyte infiltration in the bronchoalveolar lavage (BAL) of three species of mice. *White bars* represent the saline group. *Gray bars* represent the silica group. The mice were divided in three groups: Swiss Webster, Balb/c and C57 Bl6. Total leucocytes (A), mononuclear cells (B) and neutrophils (C). Values are means (SEM) of six animals. (+) Values significantly different between salina and silica ( $p < 0.05$ ). Photomicrographs of lung parenchyma stained with hematoxylin and eosin (E, F and G) or Picro-Sirius (H, I and J) in Swiss-Webster (E and H) Balb/c (F and I) and C57 Bl6 (G and J). 28 days after silica instillation (10 mg). We observed the same nodular infiltration of neutrophils and macrophages in lung. (Magnification  $\times 200$ . *Scale bars* = 200  $\mu\text{m}$ ).

**Figure 2.** Kinetics of leukocyte infiltration in the ronchoalveolar lavage (BAL). *White bars* represent the saline group and *Gray bars* represent the silica group. The mice Swiss Webster were divided in three groups: 7 days, 14 days and 28 days. Total leucocytes (A), mononuclear cells (B) and neutrophils (C). Cytokines and chemokines in Bronchoalveolar Lavage (BAL). KC (D), TNF- $\alpha$  (E) and TGF- $\beta$  (F). Values are means (SEM) of six animals. (+) Values significantly different between salina and silica ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3.** Photomicrographs of lung parenchyma stained with hematoxylin and eosin (A, B, C and D) or Picro-Sirius (E, F, G and H) in Swiss-Webster, saline (A and E), 7 (B and F), 14 (C and G) and 28 days (D and H) after silica instillation (10 mg). We observed a temporal increased in the size of granulomatous nodules secondary to silica exposure. (Magnification  $\times 200$ . *Scale bars* = 200  $\mu\text{m}$ ). Graphic of quantification of collagen fiber content at pulmonary parenchyma. *White bars* represent the saline group and *Gray bars* represent the silica group. (+) Values significantly different from saline,  $P < 0.05$ . (\*) Values significantly different from other silica groups,  $P < 0.05$ .

**Figure 4.** Photomicrographs of imunohistochemistry of lung parenchyma marked with F4/80 (A, B, C and D). Figures (E, F, G and H) were stained with Giemsa of Lennert in Swiss-Webster, saline (A and E), 7 (B and F), 14 (C and G) and 28 days (D and H) after silica instillation (10 mg). We observed a temporal increase in the intensity of marking in silica

groups (B, C and D). In slices stained with Giemsa, we saw a strong marking for neutrophils (F, G and H). (Magnification  $\times 200$ . *Scale bars* = 200  $\mu\text{m}$ ).

**Figure 5.** Cytokines and chemokines on pulmonary tissue. *White bars* represent the saline group and *Gray bars* represent the silica group. KC (A), MIP-2 (B), MIP-1 $\alpha$  (C), TNF- $\alpha$  (D), TGF- $\beta$  (E) and IFN- $\gamma$  (F). Values are means (SEM) of six animals. (+) Values significantly different between saline and silica ( $p < 0.05$ ).

### **Acknowledgements**



## References

- [1]Borges VM, Falcao H, Leite-Junior JH, Alvim L, Teixeira GP, Russo M, Nobrega AF, Lopes MF, Rocco PM, Davidson WF, Linden R, Yagita H, Zin WA, DosReis GA: Fas ligand triggers pulmonary silicosis. *The Journal of experimental medicine* 2001; 194: 155-164.
- [2]Castranova V: Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free radical biology & medicine* 2004; 37: 916-925.
- [3]Davis GS: Pathogenesis of silicosis: current concepts and hypotheses. *Lung* 1986; 164: 139-154.
- [4]Davis GS, Leslie KO, Hemenway DR: Silicosis in mice: effects of dose, time, and genetic strain. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1998; 17: 81-97.
- [5]Davis GS, Pfeiffer LM, Hemenway DR: Interferon-gamma production by specific lung lymphocyte phenotypes in silicosis in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000; 22: 491-501.
- [6]Faffe DS, Silva GH, Kurtz PM, Negri EM, Capelozzi VL, Rocco PR, Zin WA: Lung tissue mechanics and extracellular matrix composition in a murine model of silicosis. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1400-1406.
- [7]Fujimura N: Pathology and pathophysiology of pneumoconiosis. *Current opinion in pulmonary medicine* 2000; 6: 140-144.
- [8]Honda K, Kimura A, Dong RP, Tamai H, Nagato H, Nishimura Y, Sasazuki T: Immunogenetic analysis of silicosis in Japan. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1993; 8: 106-111.
- [9]Jagirdar J, Begin R, Dufresne A, Goswami S, Lee TC, Rom WN: Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in silicosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996; 154: 1076-1081.
- [10]Katsnelson BA, Polzik EV, Privalova LI: Some aspects of the problem of individual predisposition to silicosis. *Environ Health Perspect* 1986; 68: 175-185.
- [11]Keane MP, Strieter RM: The importance of balanced pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease. *Respiratory research* 2002; 3: 5.
- [12]Kumar RK: Quantitative immunohistologic assessment of lymphocyte populations in the pulmonary inflammatory response to intratracheal silica. *Am J Pathol* 1989; 135: 605-614.

- [13]Kuncova M, Havrankova J, Holusa R, Palecek F: Experimental silicosis of the rat. Correlation of functional, biochemical, and histological changes. *Arch Environ Health* 1971; 23: 365-372.
- [14]Lagente V, Manoury B, Nenau S, Le Qument C, Martin-Chouly C, Boichot E: Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 1521-1530.
- [15]Lugano EM, Dauber JH, Daniele RP: Acute experimental silicosis. Lung morphology, histology, and macrophage chemotaxin secretion. *Am J Pathol* 1982; 109: 27-36.
- [16]Mariani TJ, Crouch E, Roby JD, Starcher B, Pierce RA: Increased elastin production in experimental granulomatous lung disease. *Am J Pathol* 1995; 147: 988-1000.
- [17]Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T: Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 2002; 52: 255-264.
- [18]Perez-Ramos J, de Lourdes Segura-Valdez M, Vanda B, Selman M, Pardo A: Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1999; 160: 1274-1282.
- [19]Reasor MJ, Antonini JM: Pulmonary responses to single versus multiple intratracheal instillations of silica in rats. *Journal of toxicology and environmental health* 2001; 62: 9-21.
- [20]Reiser KM, Hesterberg TW, Haschek WM, Last JA: Experimental silicosis. I. Acute effects of intratracheally instilled quartz on collagen metabolism and morphologic characteristics of rat lungs. *Am J Pathol* 1982; 107: 176-185.
- [21]Rice DS, Curran T: Disabled-1 is expressed in type AII amacrine cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 2000; 424: 327-338.
- [22]Schapira RM, Wiessner JH, Morrisey JF, Almagro UA, Nelin LD: L-arginine uptake and metabolism by lung macrophages and neutrophils following intratracheal instillation of silica in vivo. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1998; 19: 308-315.
- [23]Struhar D, Harbeck RJ, Mason RJ: Lymphocyte populations in lung tissue, bronchoalveolar lavage fluid, and peripheral blood in rats at various times during the development of silicosis. *The American review of respiratory disease* 1989; 139: 28-32.
- [24]Terra Filho M, Santos Ude P: [Silicosis]. *J Bras Pneumol* 2006; 32 Suppl 2: S41-47.
- [25]Thomas AM, Harding KG, Moore K: The structure and composition of chronic wound eschar. *J Wound Care* 1999; 8: 285-287.

[26]Vallyathan V, Shi XL, Dalal NS, Irr W, Castranova V: Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. Potential role in acute silica-induced lung injury. *The American review of respiratory disease* 1988; 138: 1213-1219.

[27]Vanhee D, Gosset P, Boitelle A, Wallaert B, Tonnel AB: Cytokines and cytokine network in silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Eur Respir J* 1995; 8: 834-842.

[28]Westermarck J, Kahari VM: Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J* 1999; 13: 781-792.

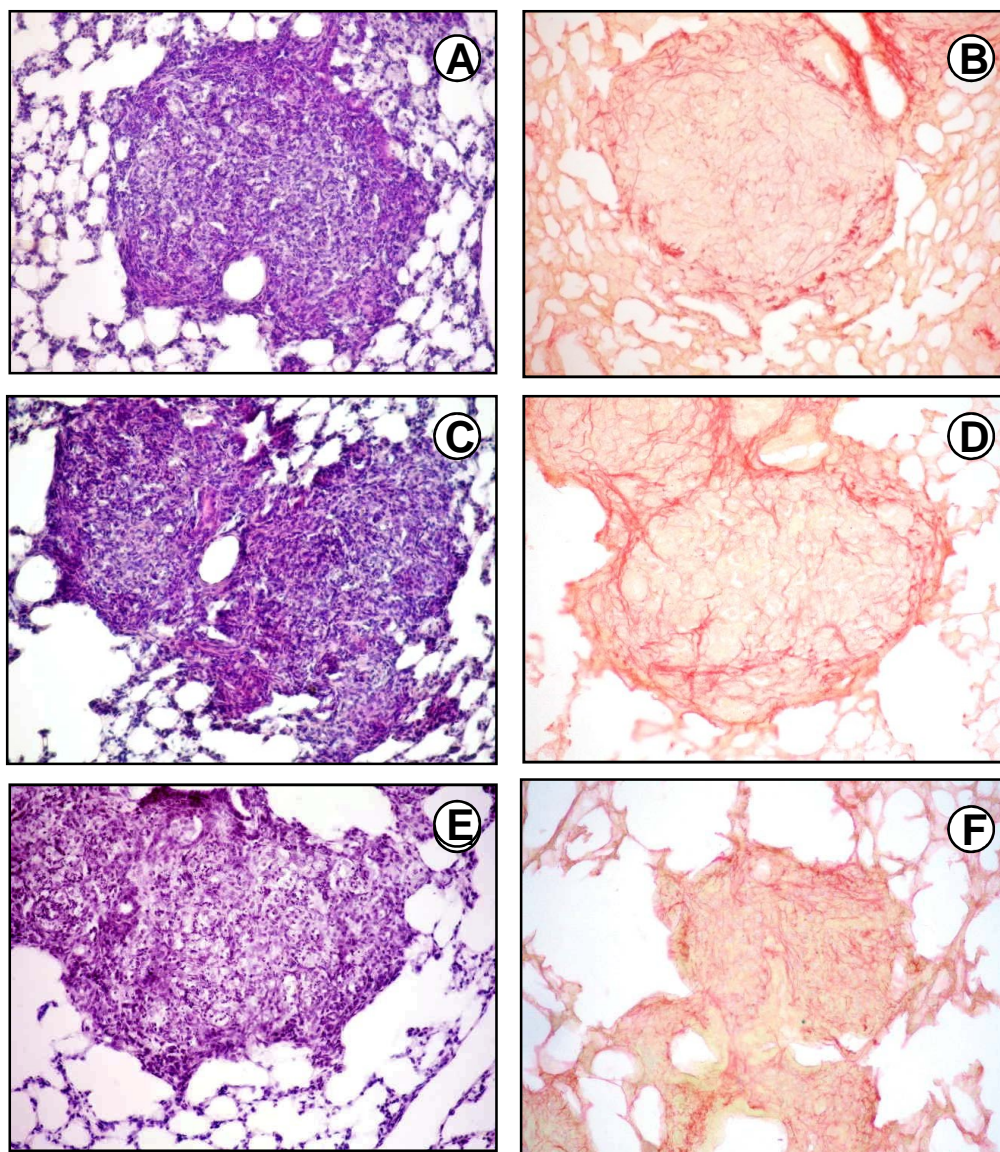
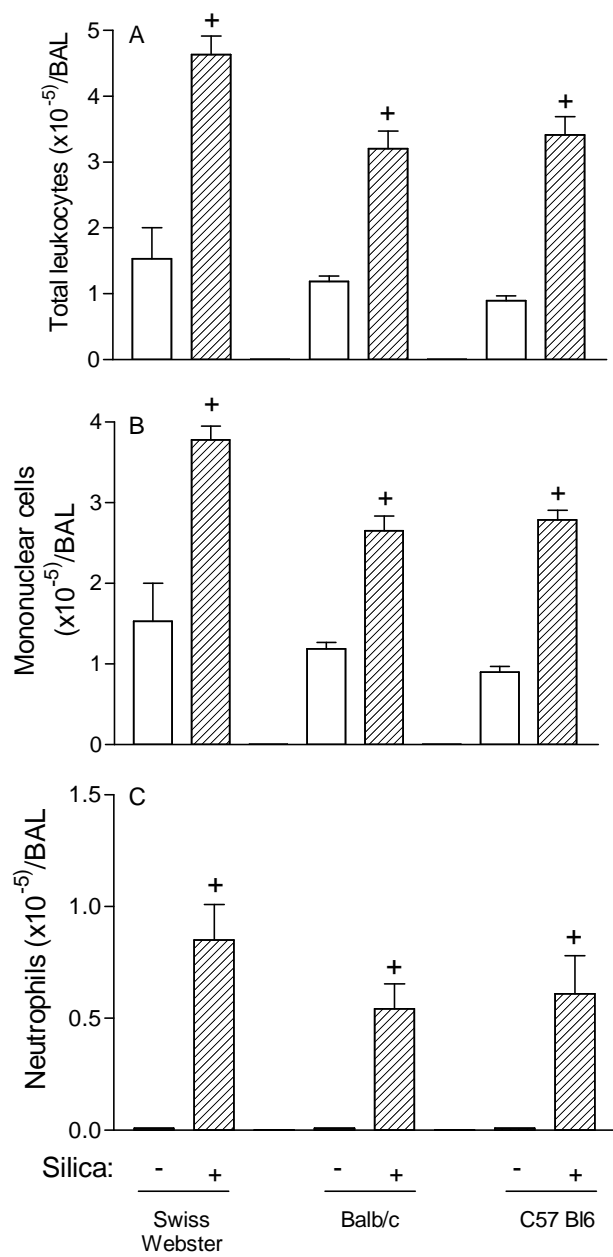


Figure 1

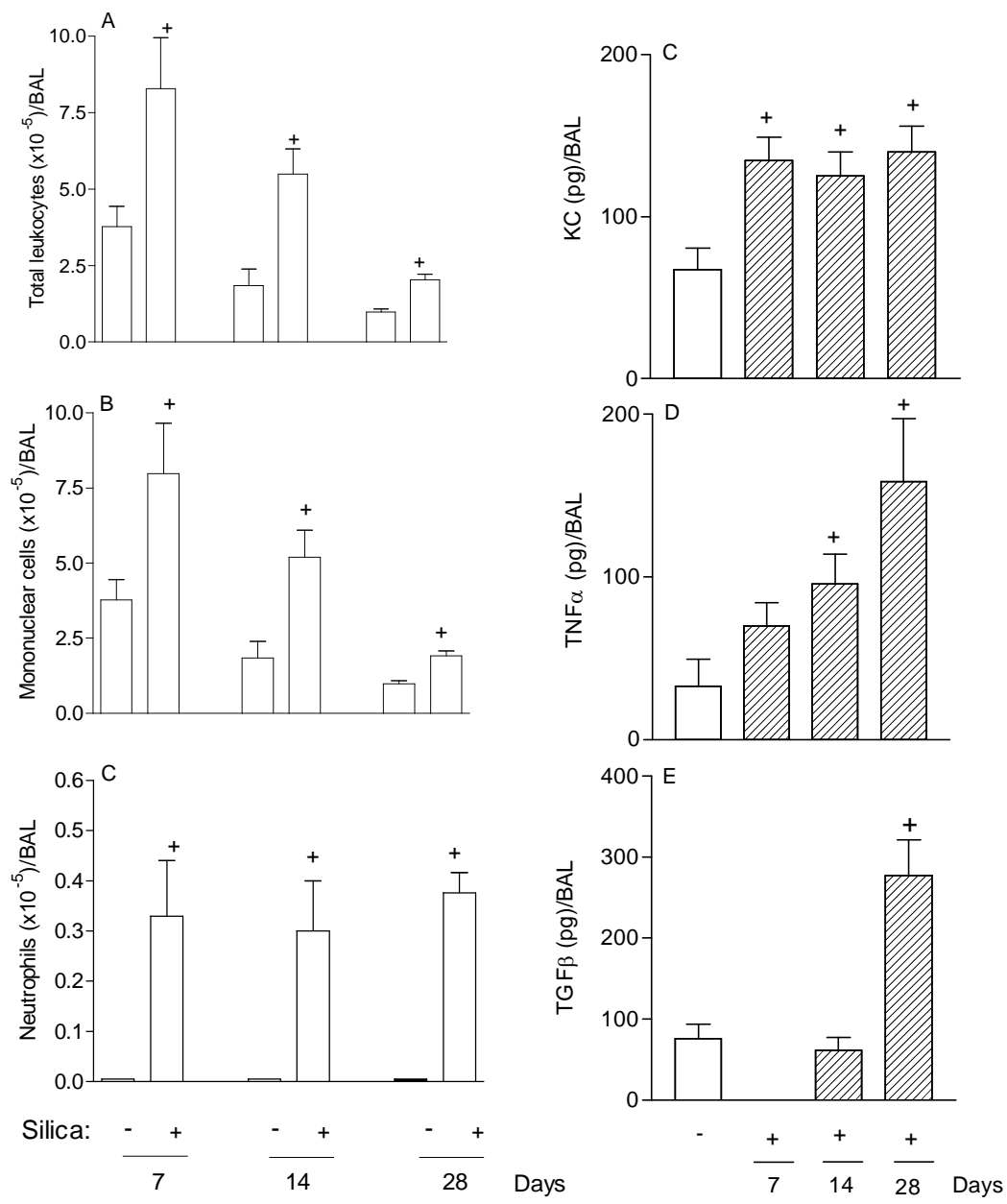


Figure 2

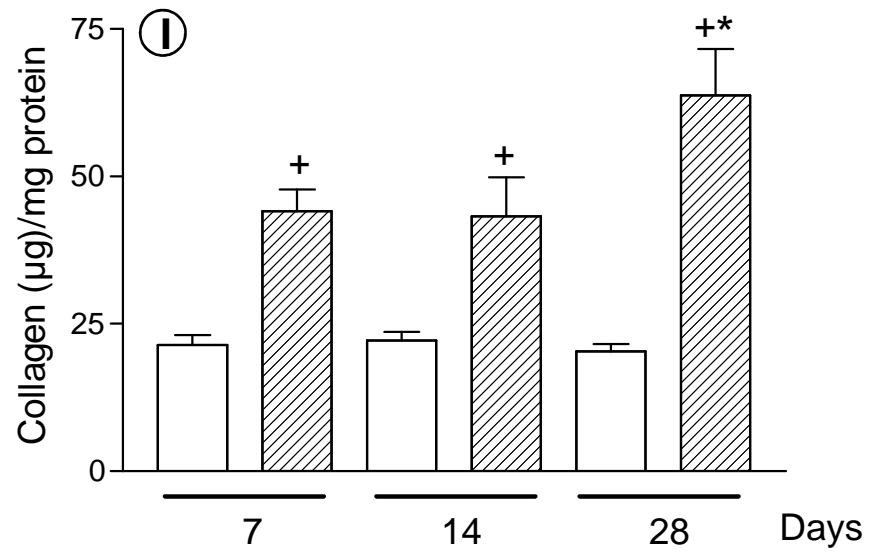
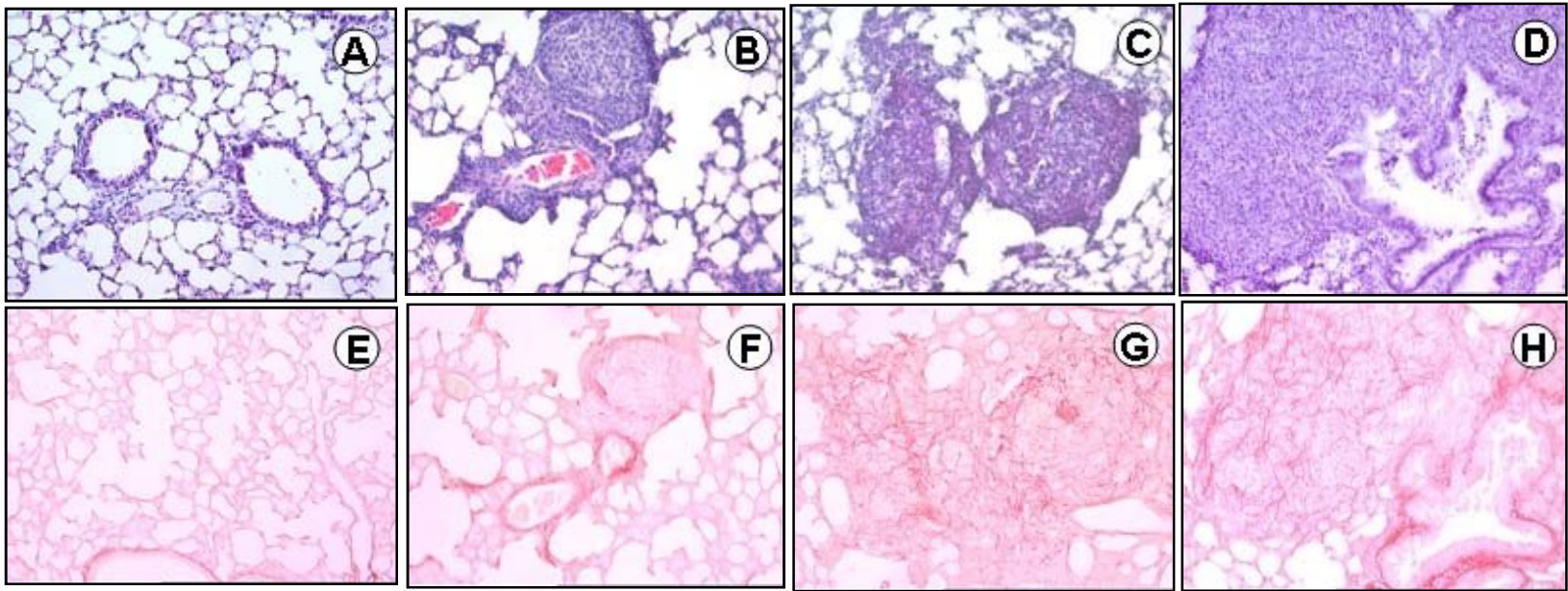


Figure 3

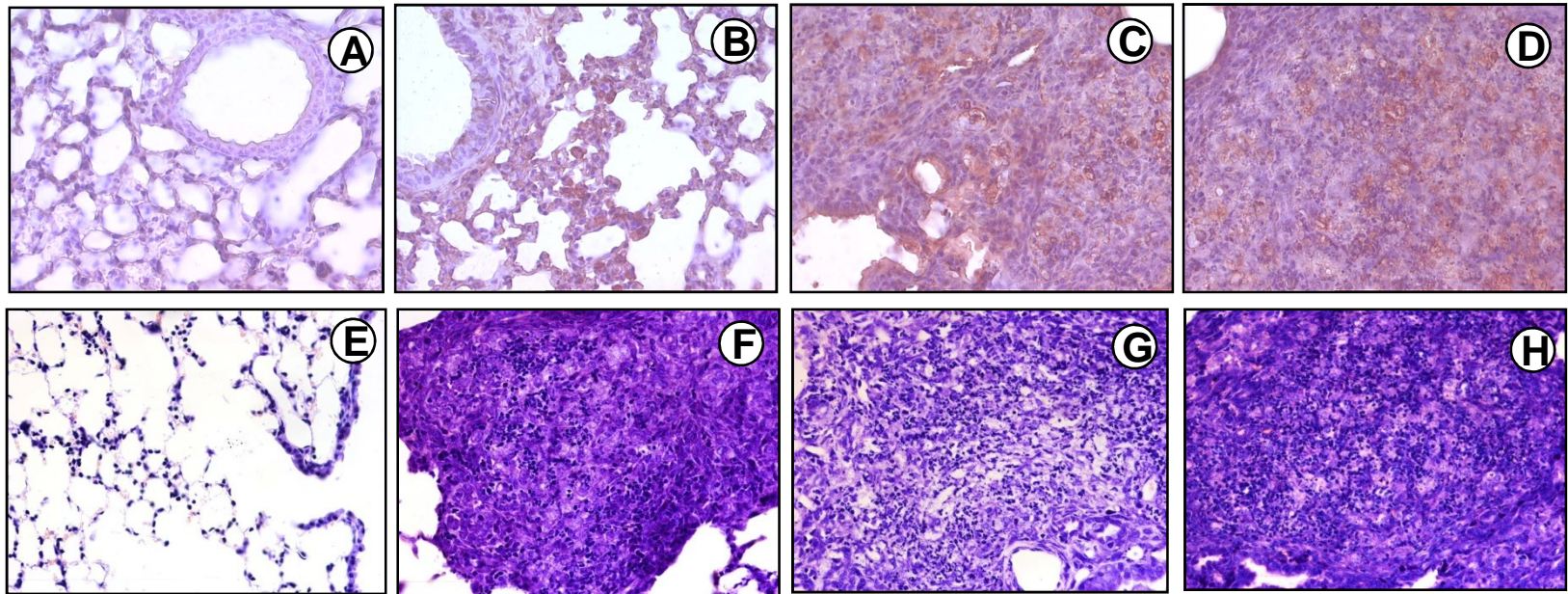


Figure 4

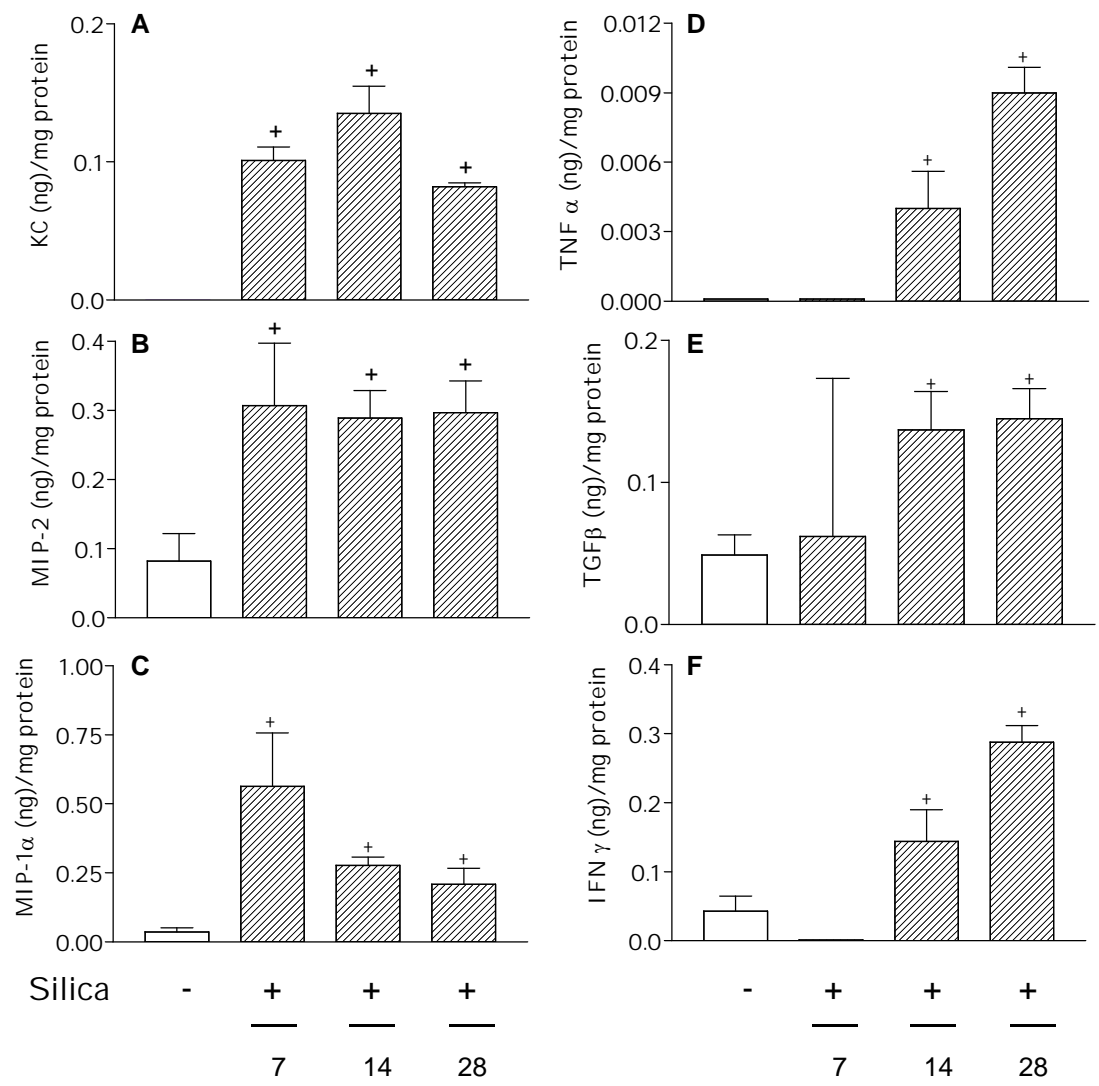


Figure 5



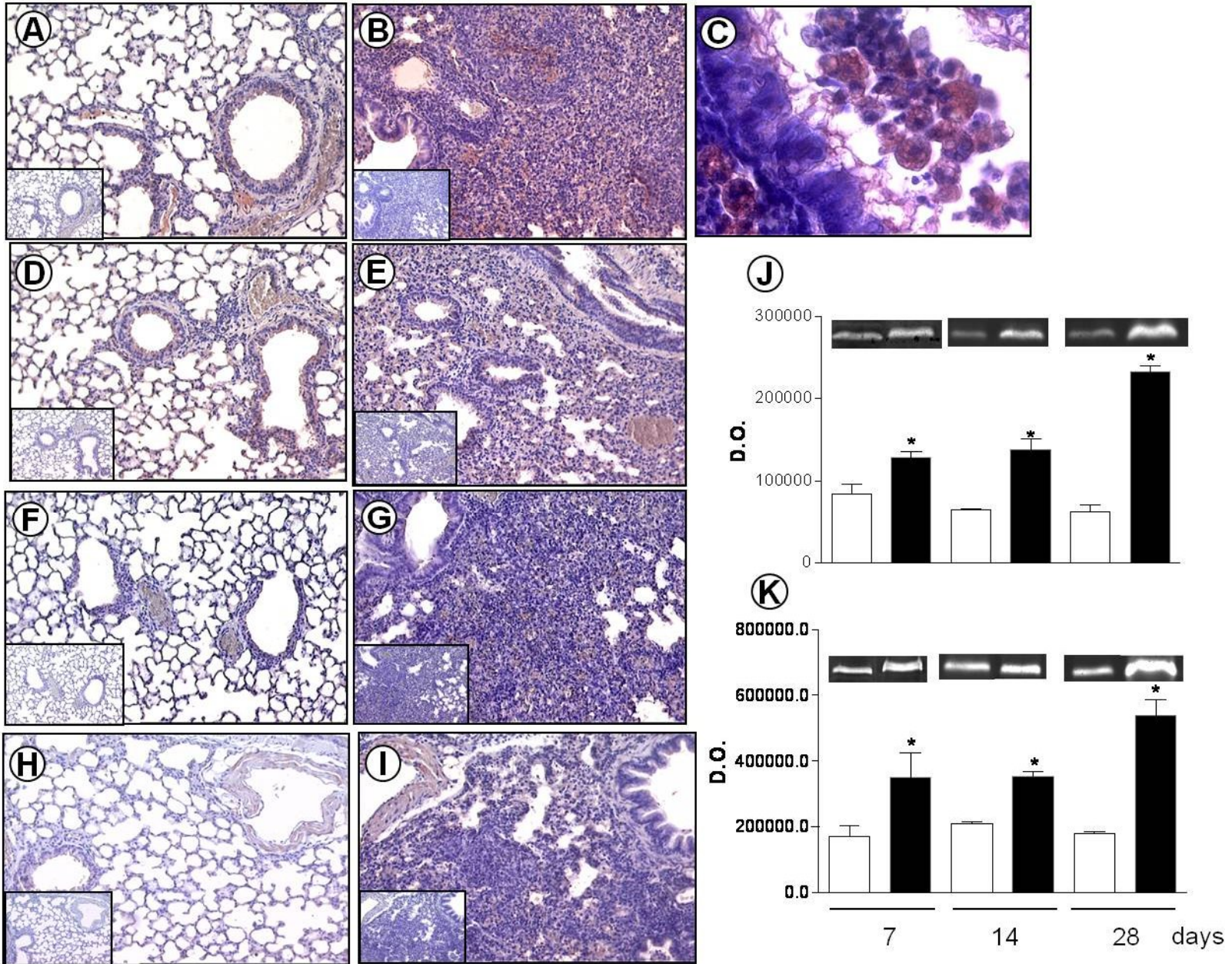


Figure 6

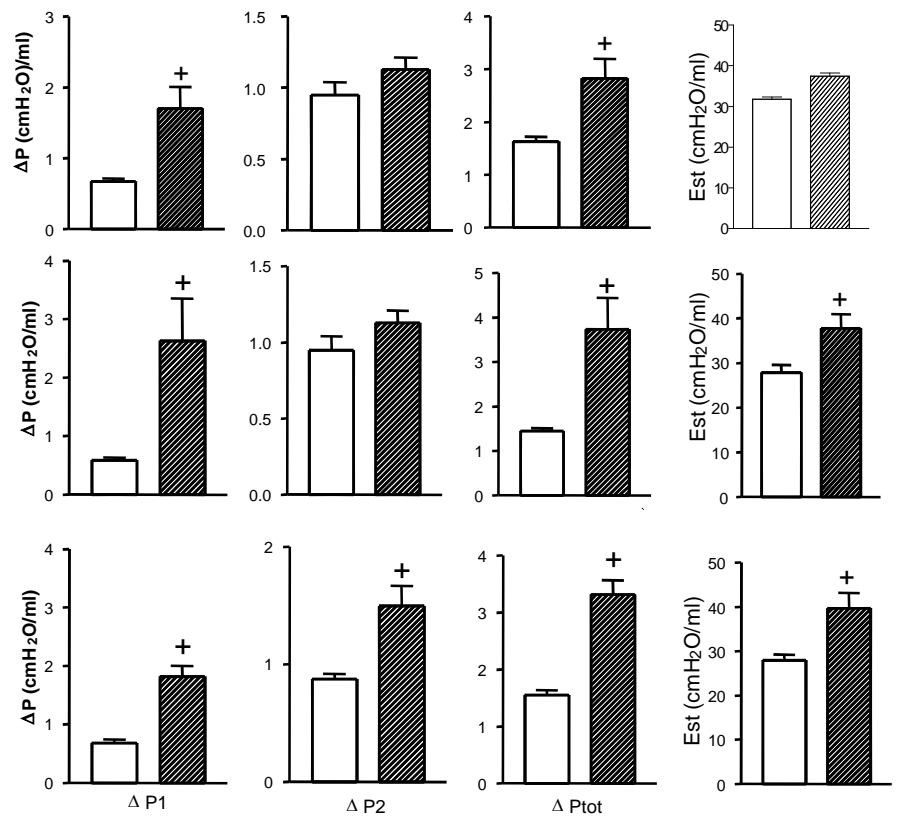


Figure 7