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

Ana Carolina Santos de Arantes

Efeito do inibidor de quinase da região NH_2 terminal de c-Jun SP 600125 sobre a resposta fibrótica pulmonar induzida por sílica em camundongos

Rio de Janeiro
2009

Ana Carolina Santos de Arantes

Efeito do inibidor de quinase da região NH_2 terminal de c-Jun SP 600125 sobre a resposta fibrótica pulmonar induzida por 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

A662 Arantes, Ana Carolina Santos de.
Efeito do inibidor de quinase da região NH2 terminal de c-Jun SP 600125 sobre a resposta fibrótica pulmonar induzida por sílica em camundongos / Ana Carolina Santos de Arantes. - 2009.
61f. : il.

Orientadora : 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.

1. Silicose - Teses. 2. Proteínas quinases - Teses. 3. Fibrose pulmonar - Teses. 4. Sílica - Teses. I. Silva, Patrícia Machado Rodrigues e. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.24-003.662

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

_____ _____
Assinatura Data

Ana Carolina Santos de Arantes

Efeito do inibidor de quinase da região NH_2 terminal de c-Jun SP 600125 sobre a resposta fibrótica pulmonar induzida por 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.

Aprovada em 17 de agosto de 2009.

Banca Examinadora:

_____

Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva (Orientadora)

Fundação Oswaldo Cruz

_____

Prof[a]. Dra. Iolanda Margherita Fierro

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.[a] Dra. Magda Fráguas Serra

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2009

DEDICATÓRIA

Aos meus avós Gessilda e Malbeçan (*in memorian)* por todo carinho, atenção, criação, educação e exemplo dedicados. Aos meus pais Roberto e Marinalva por todo amor, força e presença. Meus irmãos Felipe e Gabriela por estarem de alguma, forma sempre presentes em minha vida. E ao meu sobrinho Gabriel, por tornar mais doce nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades concedidas e estar sempre guiando meus passos;

À Dra. Patrícia M.R. e Silva, pela orientação e ensinamentos durante todos estes anos de laboratório. Pelo carinho, conversas, oportunidades e grande exemplo a cerca da pesquisa científica;

Ao Dr. Marco Aurélio Martins, por abrir as portas do Laboratório de Inflamação e fornecer a infra-estrutura necessária para a realização dos experimentos;

Ao Dr. Vincent Lagent por nos ceder o inibidor de JNK SP 600125 utilizado nesta dissertação;

À Dra. Patrícia Rocco por abrir as portas do Laboratório de Investigação Pulmonar para a realização dos experimentos de função pulmonar, e a Dra. Cristiane Baez Garcia pela ajuda na realização dos mesmos;

À Dra. Iolanda M. Fierro por ter aceitado ser membro da banca desta dissertação e colaboração nos experimentos de western blot;

Ao Rafael Simões pelo auxílio nos experimentos de western blot;

À minha grande amiga e irmã Tatiana Paula T. Ferreira, pela ajuda nos experimentos, puxões de orelha, conselhos e grande amizade dentro e fora do laboratório. Companheira em todos os momentos, obrigada por tudo pelo carinho e por me aturar durante todos esses anos;

Às amigas Michelle Oliveira, Kene Gallois e Grazielle Guedes que mesmo distantes estão sempre presentes, pelos momentos de diversão, brigas, risadas, passeios divertidos e almoços deliciosos;

Às amigas da sala de cultura, Patrícia Trentin, Diana Dalzy, Daniele Souza, Andressa Moraes, pela grande ajuda nos experimentos *in vitro*, momentos de risada e apoio durante a tese;

Ao meu ex-co-Orientador durante a época de iniciação científica, Emiliano Barreto por todo carinho, exemplo e incentivo durante o período em que trabalhamos juntos;

À secretária do Laboratório de Inflamação “Dadá”, por nos fornecer sempre o material do laboratório e divertidos papos durante o expediente;

À Dra. Andrea Monte Alto por ter aceito o convite para ser leitora prévia e por suas valiosas sugestões;

À Dra. Magda Serra pelo carinho e por ter aceito o convite e fazer parte da banca desta dissertação;

À Priscilla Olsen, Francisco Farias-Filho e Bianca Ciambarella pelo carinho e amizade durante o todo tempo no laboratório;

Aos amigos do Laboratório de Inflamação, Aline Vieira, Luciana Coelho, Sabrina Lucena, Davidson Dias, Rafael “mineiro”, Tatiane Perez “baixinha” esta pela imensa ajuda no buxco, Ana Lúcia Pires, Rodrigo Azevedo, Vinicius Carvalho, Patrícia Jurgilas, Edna Valotta e Magda Serra, a todos os outros membros aqui não mencionados, mas que contribuíram de alguma forma;

À equipe do Biotério do Pavilhão Osório de Almeida, pelo grande cuidado e limpeza dos animais;

Ao meu pai e minha mãe pelo amor, carinho, compreensão e exemplos de dedicação ao trabalho;

A minha querida avó por sua grande força, coragem, amor dedicado à toda família. Por sempre me incentivar nos estudos. Muito obrigada, pelo apoio, criação e por ser mais que uma avó, uma mãe;

A minha irmã Gabriela, pelo grande carinho, por nos dar meu lindo sobrinho Gabriel, e por muitas vezes entender as não constantes visitas;

Ao meu irmão Felipe pelo carinho, convívio e risadas;

A minha grande e “velha” amiga Juliana Roque, companheira em todos os momentos alegres, divertidos, tristes e nas brigas. Por ser amiga, mesmo não estando sempre nos encontrando, mas por estar sempre presente.

À Dra. Maria Tereza e Dr.Alberto Nogueira pelo grande incentivo e apoio a minha família;

Aos secretários do BHEx Simone e Ciro Reis;

Aos órgãos financiadores CNPq, FAPERJ.

RESUMO

ARANTES, Ana Carolina Santos de. *Efeito do inibidor de quinase da região NH_2 terminal de c-Jun SP600125 sobre a resposta fibrótica pulmonar induzida por sílica em camundongos*. 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009.

A silicose é uma disfunção causada pela inalação de partículas de sílica cristalina, caracterizando-se por intensa inflamação e fibrose, com ocorrência de granulomas dispersos no parênquima pulmonar. Apesar de ser uma doença grave, não há até o momento uma terapia eficaz. A enzima JNK é um membro da família das MAP quinases, atuante no processo de sinalização intracelular por atuar fosforilando a região NH_2 terminal do fator de transcrição c-Jun, tendo sua implicação descrita em doenças inflamatórias crônicas. Neste estudo investigamos o potencial efeito do inibidor de JNK, SP600125, sobre a resposta fibrótica verificada na silicose experimental murina. Para tanto foram utilizados camundongos Swiss-Webster instilados com sílica (10 mg), por via intranasal, e posteriormente submetidos ao tratamento curativo diário com o inibidor SP 600125 (2 e 5 mg/Kg, p.o.), entre os dias 21 e 28 após a provocação com sílica. As análises foram realizadas 24 h após a última administração do composto e constaram de: i) área de granuloma pulmonar (coloração por H&E) e deposição de colágeno (coloração por Picrus-sirius e quantificação pela técnica de Sircol); ii) mecânica pulmonar por sistema invasivo (resistência e elastância); iii) quantificação de citocinas e quimiocinas por sistema de ELISA; iv) quantificação dos níveis de fosfo-JNK por meio de western blot. Verificamos que o tratamento curativo com o composto de JNK SP 600125 (2 e 5 mg/Kg, p.o.) inibiu de forma marcada a resposta inflamatória e fibrótica pulmonares, conforme atestado pelo menor infiltrado leucocitário e diminuição da área do parênquima pulmonar ocupada por granulomas. Importante redução na deposição de colágeno foi também evidenciada através da coloração com picrus sirius e pela técnica de Sircol. De forma coerente, o tratamento com SP 600125 também inibiu o aumento de resistência e de elastância pulmonares, característico de animais silicóticos. A geração de fatores inflamatórios e prófibróticos, assim como aumento no conteúdo de macrófagos e miofibroblastos no pulmão dos animais silicóticos foram significativamente reduzidos pelo tratamento com o composto SP 600125. Por último, vimos que o aumento nos níveis de fosfo-JNK foi também sensível ao tratamento com o composto. Em conclusão, nossos resultados mostram que o tratamento com o inibidor de JNK SP 600125 foi eficaz em inibir curativamente a resposta fibrótica associada à fase crônica da silicose experimental murina, indicando ser promissora a futura aplicação desta classe farmacológica na condição de doenças inflamatórias de natureza fibrótica como a silicose.

Palavras-chave: SP600125. JNK. Fibrose. Silicose.

ABSTRACT

ARANTES, Ana Carolina Santos de. *Effect of c-Jun NH_2 terminal kinase inhibitor SP600125 in lung fibrosis on experimental silicosis in mice.* 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009.

The silicosis is a dysfunction caused by inhalation of crystalline silica particles, characterized by intense inflammation and fibrosis, including the presence of granulomas dispersed in the lung parenchyma. Although silicosis is a serious disease there is no effective therapy until now. The JNK is an enzyme, member of the MAP kinases family, active signal transduction process by the phosphorylating the NH_2 terminal region of the transcription factor c-Jun, and which was described to be implicated in chronic inflammatory diseases. In this study, we investigated the potential effect of the JNK inhibitor, SP 600125, on the fibrotic component of the experimental model of silicosis in mice. Swiss-Webster mice were injected intranasally with silica particles (10mg), and further, daily treated curatively with the inhibitor SP 600125 (2 and 5 mg/Kg, p.o), from day 21 to 27 after silica provocation. The analyses were performed 24 h after the last dose and consisted of: i) granuloma area (H&E staining) and collagen deposition (Sirius Red staining and quantification by Sircol technique); ii) pulmonary mechanics by invasive system (resistance and elastance); iii) quantification of cytokines and chemokines by ELISA; iv) quantification of phosphor-JNK levels by western blot. We verified that the curative treatment with the JNK SP 600125 (2 and 5 mg/Kg, p.o) markedly inhibited the lung inflammatory and fibrotic responses as attested by the decrease in leukocyte infiltration and granuloma area. A significant reduction of collagen deposition was evidenced by Picrus sirius staining and Sircol technique. Coherently, treatment with SP 600125 also inhibited the increase of lung resistance and elastance in silicotic animals. The generation of inflammatory and fibrotic mediators as well as increased labeling for macrophages and myofibroblasts in silicotic animals were significantly reduced by the treatment with SP 600125. At last, we noted that the increased levels of phosphor-JNK were sensitive to treatment with the compound. In conclusion, our results show that treatment with the JNK inhibitor SP 600125 effectively inhibited curatively the fibrotic response associated to the chronic phase of murine silicosis, indicating that the use of such pharmacological class of compounds seems to be a promising approach for the treatment of fibrotic diseases such as silicosis.

Keywords: SP600125. JNK.Fibrosis.Silicosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sílica induzindo resposta celular.....19
Figura 2 – Família das MAPK.....23
Figura 3 – Estrutura química do composto SP 600125.....24
Figura 4 – Imagem do retículo utilizado para análise morfométrica.....29
Figura 5 – Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP 600125 sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos.....34
Figura 6 – Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP 600125 sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos.....35
Figura 7– Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP 600125 sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos.....36
Figura 8 – Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP 600125 sobre o conteúdo de colágeno no pulmão de camundongos silicóticos.....37
Figura 9 – Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP 600125 (5 mg/Kg) sobre a função pulmonar de camundongos silicóticos.....38
Figura 10 – Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP 600125 (5mg/Kg) sobre a geração de mediadores inflamatórios no pulmão de animais silicóticos.....40
Figura 11 – Efeito do tratamento com o inibidor de JNK SP 600125 (5mg/Kg) sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos silicóticos.....42
Figura 12– Efeito do tratamento com o inibidor de JNK SP 600125 (5mg/Kg) sobre a expressão de α-SMA no pulmão de camundongos silicóticos.....43
Figura 13– Efeito do tratamento com o inibidor de JNK SP 600125 (5mg/Kg) sobre a expressão de fosfo-JNK(p-JNK) no pulmão de camundongos silicóticos.....45

LISTA DE ABREVIAÇÕES

α- SMA - α	Actina de Músculo Liso
AP-1	Ativador de Proteína 1
CO_2	Dióxido de Carbono
ERK	Quinases Reguladas por Sinal Extracelular
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
JNK	Quinase da Região NH_2 Terminal de c-Jun
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno
MCP -1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MMP	Metaloproteinase de Matriz
NFκB	Fator de Transcrição Nuclear-kappa B
O_2	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
RANTES	Regulated on activated normal T cell expressed and secreted
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SiO_2	Dióxido de Silício
TGF- β	Fator Transformador de Crescimento
TIMP	Inibidores de Metaloproteinases Teciduais
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	**PULMÃO**	14
1.1	**Pneumoconiose**	14
1.1.1	Silicose	15
1.1.1.1	Sílica	16
1.1.1.2	Epidemiologia	16
1.1.1.3	Diagnóstico e tratamento	17
1.1.1.4	Patogênese	18
1.2	**Macrófagos.**	18
1.3	**Fibroblastos/Miofibroblastos**	20
1.4	**Fibrose Pulmonar**	21
2	**ATIVAÇÃO CELULAR**	22
2.1	**Quinase da região NH_2 terminal de c-Jun (JNK)**	23
2.1.1	Inibidores de JNK	24
3	**OBJETIVO**	26
3.1	**Objetivo geral**	26
3.2	**Objetivos específicos**	26
4	**MATERIAL E MÉTODOS**	27
4.1	**Animais**	27
4.2	**Indução de silicose**	27
4.3	**Tratamento**	27
4.4	**Função pulmonar**	27
4.5	**Obtenção de tecido pulmonar**	28
4.5.1	Análise histológica	28
4.5.2	Análise morfométrica	28
4.6	**Análise imunohistoquímica.**	29
4.7	**Análise quantitativa do colágeno pulmonar**	30
4.8	**Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA**	30
4.9	**Western blot**	31
4.10	**Análise estatística**	31

5 **RESULTADOS**..... 33
5.1 **Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP 600125 sobre as alterações morfológicas pulmonares de camundongos silicóticos**..... 33
5.2 **Efeito do tratamento com o inibidor de JNK SP 600125 sobre a função pulmonar de camundongos silicóticos** 37
5.3 **Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP 600125 sobre a geração de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos silicóticos**..... 39
5.4 **Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP 600125 sobre a expressão de F4/80 e α-SMA no pulmão de camundongos silicóticos**..... 41
5.5 **Efeito do tratamento com inibidor SP 600125 sobre a expressão de JNK no pulmão de camundongos silicóticos**..... 44
6 **DISCUSSÃO**..... 46
CONCLUSÃO..... 52
REFERÊNCIAS..... 53

INTRODUÇÃO

Diversas doenças que acometem os pulmões podem modificar sua função devido ao aparecimento de uma resposta inflamatória aguda pulmonar, seguida em tempos mais tardios, pelo desenvolvimento de um processo de reparo tecidual, associado à ocorrência de fibrose. Dentre as várias doenças que afetam o pulmão, destaca-se a silicose, que resulta da exposição prolongada a poeiras inaladas que contenham partículas de sílica cristalina, possui caráter crônico e caracteriza-se por ocorrer de forma difusa no parênquima pulmonar (Beckett e cols., 1997).

No Brasil, a silicose é a pneumoconiose, ou seja, doença decorrente da inalação de poeiras, de maior prevalência no país. Para efeito prático, podemos considerar como pneumoconiose toda doença pulmonar decorrente de inalação de poeiras inorgânicas (minerais) e orgânicas em suspensão nos ambientes de trabalho, levando a alterações do parênquima pulmonar e suas possíveis manifestações clínicas, radiológicas e da função pulmonar.

A silicose é uma doença pulmonar crônica consequente da inalação recorrente a partículas de sílica na sua forma livre e cristalina. O número estimado de trabalhadores potencialmente expostos a poeiras contendo sílica no Brasil é superior a 6 milhões, sendo cerca de 4 milhões na construção civil, 500.000 em mineração e garimpo e acima de 2 milhões em indústrias de transformação de minerais, metalurgia, indústria química, de borracha, cerâmicas e vidros. Em 1978, estimou-se entre 25 e 30 mil o número de portadores de silicose no Brasil, através de estatísticas realizadas em hospitais de tisiologia na região Sudeste.

A silicose, em humanos, é caracterizada por nódulos fibróticos causados por uma inflamação persistente que leva à proliferação de fibroblastos e acúmulo exagerado de colágeno (Hunninghake e cols., 1984). O infiltrado inflamatório mononuclear e a fibrose subseqüente ocorrem nos locais de deposição da partícula mineral. O macrófago alveolar é a principal célula na resposta tecidual à sílica, uma vez que, após a ingestão da partícula, há o desenvolvimento de uma série de eventos dependentes da sua ativação. Os macrófagos ativados produzem algumas citocinas e quimiocinas que promovem recrutamento e ativação de neutrófilos e linfócitos, a proliferação fibroblástica e a deposição excessiva de proteínas de matriz extracelular (Davis, 1986; Davis & Giemsa, 1996).

Dentro deste contexto, diversos estudos vem sendo realizados no sentido de melhor

compreender os mecanismos determinantes do processo da silicose, bem como propostas terapêuticas potencialmente eficazes no tratamento desta fisiopatologia.

1 **PULMÃO**

O aparelho respiratório é constituído pelos pulmões e por um sistema de tubos que comunicam o parênquima pulmonar com o meio exterior, no qual podemos distinguir uma porção condutora composta pelas fossas nasais, nasofaringe, laringe, traquéia, brônquios e bronquíolos, e uma porção respiratória representada pelas porções terminais da árvore brônquica e que possui os alvéolos aonde no pulmão, é realizada as trocas gasosas (Junqueira LC e cols.,1999).

O pulmão possui a função primária de troca do dióxido de carbono (CO_2) pelo oxigênio (O_2), processo essencial para a manutenção do metabolismo aeróbico. O pulmão frequentemente encontra-se exposto a uma variedade de agentes presentes no ambiente que são potencialmente prejudiciais ao organismo. O organismo na tentativa de debelar os agentes patogênicos indesejáveis, responde de forma defensiva com a montagem de uma resposta inflamatória e ativação do sistema imune que tem como conseqüência a injúria tecidual, seguida por ativação de um sistema de reparo ao dano causado diretamente por este agente no foco do processo (Griffith B ,e cols.2009). Isso caracteriza a ocorrência de uma ampla gama de doenças pulmonares, classicamente divididas em dois grupos: obstrutivas e restritivas. No primeiro caso é verificado um aumento na resistência à entrada do fluxo de ar e no segundo um comprometimento tecidual intenso e perda da função do órgão (Levitzky 2004).

1.1 **Pneumoconioses**

As pneumoconioses constituem uma classe de doenças restritivas, sendo causadas pela inalação poeira e acúmulo de partículas no tecido pulmonar (Castranova V, 2004 e Chong S e cols, 2006). O termo foi criado em 1866 por Zenker para caracterizar as alterações no parênquima pulmonar causadas pela inalação de poeiras (Corn J, e cols., 1980). Entretanto, essa terminologia não é adequada para utilização de algumas pneumopatias associadas com inalação de partículas como hipersensibilidade, alveolites alérgicas (Capitani E. e Algranti E. 2006).

Podem ser divididas em não- fibrogênicas e fibrogênicas, sendo no primeiro caso observado o envolvimento de macrófagos carregados por partículas com pouca ou ausência de fibrose, como verificado na siderose (ferro) e a baritose (Chong S e cols.2006), sendo estas formas mais incomuns. No caso das fibrogênicas, observa-se a presença de nódulos focais

e/ou fibrose difusa, tendo-se como exemplos a antracose (carvão), asbestose (asbestos), beliriose (berílio) e a silicose (sílica).

1.1.1 Silicose

O termo silicose é derivado do latim *sílex* (rocha sedimentar constituída de quartzo) e caracteriza uma das doenças de caráter ocupacional mais antigas dentro do grupo das pneumoconioses, havendo inclusive a possibilidade de ter existido no período paleolítico. Foi descrita por Hipócrates, como uma dada dificuldade respiratória em trabalhadores (Abú-Shams K e cols.2005).

A prolongada inalação de poeira, contendo finas partículas de sílica livre e cristalina, leva a cada ano milhões de pessoas à morte em todo o mundo. Caracterizada por uma inflamação intensa, proliferação de fibroblastos localizada e excesso de produção de colágeno determinando a formação de nódulos fibróticos (Thakur S, e cols., 2009).

A silicose é classificada em três subtipos, que têm como base a quantidade e o tempo de exposição à poeira contendo partículas de sílica cristalina. A silicose aguda ou silicoproteinose desenvolve-se dentro de poucas semanas ou em até aproximadamente 5 anos, sendo decorrente de uma alta exposição às partículas de poeira causando os sintomas dentro de pouco tempo, sendo morfologicamente caracterizada por edema pulmonar, inflamação intersticial e uma severa alveolite, acompanhada de uma consistente lipoproteinose dentro dos alvéolos com fluído rico em surfactante. Os pacientes apresentam sintomas como tosse, fadiga, perda de peso, redução da função pulmonar e comprometimento da troca gasosa (Castranova V e Vallyathan V, 2000)

A silicose acelerada resulta da alta exposição e desenvolve-se dentro de 5 a 10 anos, possuindo um perfil parecido com aquele da silicose aguda, exibindo uma lipoproteinose alveolar associada com inflamação crônica. Ela está associada com os granulomas fibróticos contendo colágeno, reticulina e uma grande quantidade de partículas de sílica (Castranova V e Vallyathan V, 2000).

A silicose crônica ocorre geralmente depois de 10 ou mais anos de exposição. A doença pode evoluir depois de cessada a exposição à sílica (Langley R, 2004), levando à formação de nódulos fibróticos característicos com arranjos de fibras colágenas concêntricas e com zonas de centrais hialinizadas (Castranova V e Vallyathan V, 2000).

1.1.1.1 Sílica

A crosta terrestre é composta por diversos minerais e o mais abundante deles é a sílica ou dióxido de silício (SiO_2), que é formado por um átomo de silício e dois átomos de oxigênio. A sílica ocupa mais de 28% da crosta terrestre, sendo encontrada na natureza nas formas amorfa e cristalina (Castranova V e Vallyathan V, 2000), e quando combinada a metais e óxidos dá origem aos silicatos como talco, feldspalto, caulim e mica (Terra Filho M, e cols., 2006).

A sílica cristalina possui uma estrutura tetraédrica na qual o silício é o átomo central e as extremidades são ocupadas pelo oxigênio. Possui três principais polimorfos: o quartzo encontrado em diversos tipos de rochas, a tridimita e a cristobalita, esses últimos provenientes de rochas vulcânicas, sendo o quartzo a forma mais comumente encontrada (Peretz A, e cols., 2006). A sílica amorfa possui propriedades menos tóxicas ao pulmão, sendo menos fibrogênica que a forma cristalina (Langley R,e cols., 2004).

Tendo como fato que a sílica está presente em toda superfície terrestre e em diversos tipos de matéria prima, a doença por ela causada possui caráter ocupacional afetando trabalhadores de diversas áreas como indústria, mineração: extração mineral e processamento, construção civil e jateamento de areia dentre outras (FUNDACENTRO, 1995).

As partículas de sílica possuem diâmetro médio de 0,5 - 10 μm e podem penetrar nos alvéolos, sendo citotóxicas para as células fagocíticas (Fishwick D, e cols., 2004). As de tamanho médio entre 5 - 10 μm depositam-se nos brônquios e broquíolos, enquanto que as de tamanho superior a 10 μm ficam retidas na nas vias aéreas superiores.

1.1.1.2 Epidemiologia

Atualmente a silicose é uma das pneumoconioses mais prevalentes no Brasil e em todo o mundo, representando um sério problema de saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), tanto países desenvolvidos quanto em desenvolvimento apresentam uma super exposição na poeira inalável contendo sílica e levando assim à doença.

Segundo a OMS, no período de 1991-1995, na China, foram registrados mais de 500.000 casos de silicose, com cerca de 6.000 novos e mais de 24.000 mortes a cada ano. Nos EUA, estima-se que mais de 1 milhão de trabalhadores estejam expostos às partículas de sílica livre e cristalina.

O número estimado de trabalhadores potencialmente expostos a poeiras contendo sílica é superior a 6 milhões somente no Brasil, 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). Somente no estado de Minas Gerais mais de 4.500 trabalhadores têm sido diagnosticados com silicose. Na região nordeste, no Ceará, um estudo realizado com escavadores de poços revelou uma prevalência de cerca de 27 % de indivíduos com a doença. Análises de tendências entre 1985-2001 mostram um aumento na exposição à sílica no Brasil de 19,6 para 21,7% entre homens e uma redução de 3,7 para 3,2% entre as mulheres (Algranti E, e cols.,2004).

1.1.1.3 Diagnóstico e tratamento

As pneumoconioses são freqüentemente assintomáticas na fase inicial, o que torna as medidas diagnósticas prévias de suma importância, com benefícios evidentes para o trabalhador. Os principais sintomas clínicos são: falta de ar, tosse, perda de apetite, febre e dores no corpo. O diagnóstico das pneumoconioses é feito de acordo com o histórico ocupacional de exposição à poeira mineral e radiografia com imagens compatíveis com a doença. O exame médico inclui todo o histórico do paciente e, raio x simples de tórax (Ress D, e cols., 2007). A prova de função pulmonar é um procedimento complementar realizado, que busca estabelecer o grau de disfunção e incapacidade do trabalhador (Gevernois P, e cols., 1998). Testes mais sofisticados como a difusão pulmonar do monóxido de carbono e tomografia computadorizada não são utilizados de forma rotineira, mas quando realizados auxiliam e complementam o diagnóstico (Filho M e Santos U , e cols., 2007).

Devido à coexistência de fatores como tabagismo e infecções pulmonares, torna-se cada vez mais difícil estabelecer um padrão funcional que caracterize as pneumoconioses (Greenberg M, e cols., 2007). A susceptibilidade individual ao adoecimento é um dos fatores que dificulta o diagnóstico, pois, nem todos os trabalhadores adoecem durante a exposição e podem passar muitos anos da sua vida sem apresentar sintomas ou lesões, que poderão surgir depois de cessado o contato com o agente.

É uma doença irreversível e, apesar do arsenal terapêutico disponível, não há um tratamento específico para a silicose até o presente momento. Tem sido utilizada como terapia de suporte estratégias que trazem alívio ao paciente e inclui o uso de antitussígenos, broncodilatadores e oxigênio quando necessário (Rimal B, e cols., 2005). No entanto, a remoção das partículas coloca-se como uma alternativa para evitar o agravamento da doença (Terra Filho M, e cols., 2006). De acordo com a publicação da OMS (Saúde)

(http://www.who.int/occupational_heatth), a silicose é uma doença ocupacional que produz o maior número de vítimas e mata anualmente centenas de pessoas em todo o mundo, podendo acarreta graves transtornos para a saúde do trabalhador, assim como resultar em um sério impacto sócio-econômico.

1.1.1.4 Patogênese

As partículas de poeira ao serem inaladas pelos trabalhadores depositam-se em diferentes níveis da árvore respiratória de acordo com o seu tamanho, forma e massa (Abú S, e cols.,2005). As características como carga elétrica oposta na estrutura física do cristal podem igulamente contribuir para o estabelecimento da doença. Há teorias que indicam que esta característica pizoelétrica pode favorecer a produção de radicais livres de oxigênio produzidos a partir da superfície das moléculas de sílica e gerando dano a diversos tipos celulares (Greenberg M, e cols., 2007).

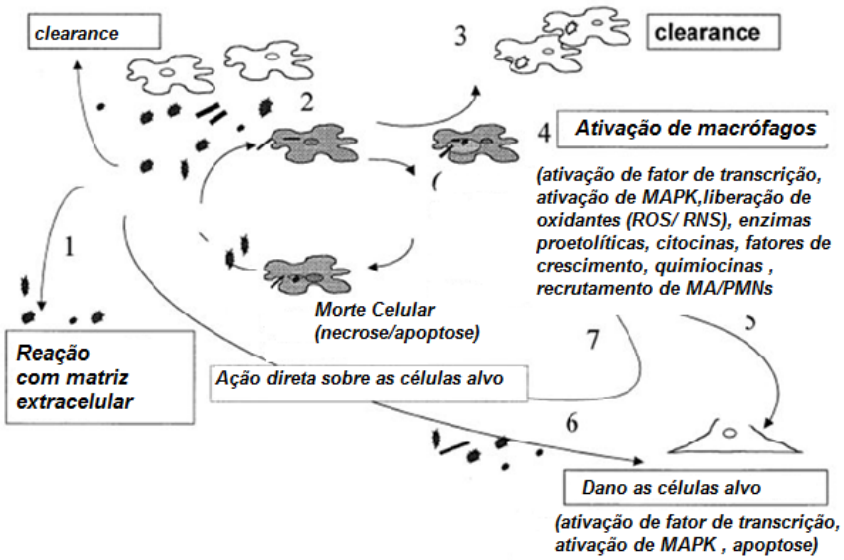
1.2 **Macrófagos**

Os macrófagos alveolares normalmente são encontrados dentro dos alvéolos, e são as primeiras células pulmonares residentes a entrar em contato com o agente agressivo. Estão presentes em grandes quantidades no interstício pulmonar e dentro dos alvéolos, sendo uma parte importante e eficaz do processo de imunidade imediata. A participação dos macrófagos no processo de reparação é importante, já que eles têm a capacidade de secretar citocinas e fatores quimiotáticos que podem regular o acúmulo local de células mesenquimatosas (fibroblastos), além das células da matriz extracelular. Essas células são membros importantes da família das células macrofágicas, que existem com fenótipos heterogêneos, dependendo i) do processo de diferenciação celular, diretamente relacionado ao tipo de citocina com a qual entrou em contato e à sua interação com o estroma nos órgãos hematopoiéticos, e ii) da sua ampla distribuição nos tecidos do organismo e das suas variadas respostas a estímulos endógenos e exógenos. Os diferentes tipos de estímulos são reconhecidos através da interação com uma ampla gama de receptores conectados à membrana plasmática, o que resulta em fagocitose ou endocitose, sinalização intracelular e alterações complexas de ativação e repressão de genes (Dunn K, 2003).

Estudos sugerem a interação com receptores de superfície presentes nessas células, receptores denominados “scavenger” (Hamilton R, e cols., 2006; Palecanda A e cols., 1999), como uma etapa importante no reconhecimento das partículas de sílica. São conhecidas várias

classes desses receptores, com destaque para o receptor MARCO na patologia da silicose (Palecanda A e Kobzik L, 2001). Evidências na literatura atribuem sua ligação às partículas ambientais inaladas não-opsonizadas, através de seu domínio semelhante ao colágeno dotado de carga positiva, o que possibilitaria a interação com partículas de carga negativa, como a sílica (Iyer R ,e cols., 1996). A partir do contato via receptor "scavenger", o processo de fagocitose mediado por macrófagos alveolares é iniciado imediatamente. A partícula de sílica é então, internalizada e mantida no compartimento lisossomal sob condições de pH reduzidas, propiciando a ativação de enzimas digestivas na tentativa de degradar o material ali presente ou caso contrário, os macrófagos alveolares tornam-se ativados apresentando função altamente secretora, liberando diferentes mediadores inflamatórios a partir de transcrição gênica (Barbarin V,e col., 2005). Participam, também, da liberação de radicais livres, assim como, são ativados pelos mesmos (Blackford J, e cols., 1994; Castranova V e Vallyathan V, 2000).

Figura 1: Resposta celular induzida pela Sílica



Legenda: (1) Interação com a matriz extracelular; (2) fagocitose por macrófagos alveolares (MA); (3) clearance; (4) ativação e morte de macrófagos; (5) resposta de células alvo a produtos liberados dos MA; (6) ação direta das partículas sobre as células alvo; (7) geração adicional de ROS/RNS. Adaptado de Fubini B e col., 2003.

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, consequente da interação com a sílica, escapam através dos linfonodos proximais ou eventualmente são expelidos para fora do trato respiratório (Hamilton R, e cols., 2008). Alternativamente, os macrófagos ativados migram para o espaço intersticial, onde liberam uma ampla gama de mediadores inflamatórios e pró-fibróticos, contribuindo dessa forma para a progressão do quadro fibrótico induzido pela sílica no pulmão (Hamilton R,e cols., 2008).

1.3 **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 S, 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 ajudam 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 protomiofibroblasto, representando uma etapa intermediária, passando então ao estágio diferenciado de miofibroblasto, que por sua vez possui 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. Nessa condição, essas células passam a expressar a proteína α-actina de músculo liso (α-SMA) (Hinz B, 2007;Sappino A, e col., 1990) e adquirem características morfológicas como a clara presença de fibras de estresse (Eckes B, e cols., 2006; Kinnula V, 1992)

Durante o desenvolvimento da resposta fibrótica, os miofibroblastos sofrem ativação por uma série de fatores de crescimento (Kovacs E, e cols., 1994; Schafer M,e cols., 2007). Dentre estes, recebe destaque o TGF-β1 por seu potente efeito indutor de proliferação e ativação de miofibroblastos, com conseqüente expressão de α-SMA e aumento da produção de colágeno (Phan S, 2008; Powell D ,e col., 1999). Células do parênquima, células epiteliais e macrófagos alveolares são os responsáveis pela produção destes fatores, incluindo os próprios fibroblastos, que se mostram aptos a secretar TGF-β1, configurando assim um processo de regulação autócrina (Border W,e cols., 1994).

Somado ao processo de diferenciação e proliferação, os miofibroblastos atuam como principais produtores de componentes da matriz extracelular no processo fibrótico, secretando principalmente o colágeno dos tipos I, III e IV (Phan S, 2008) bem como a fibronectina. Não somente considerados como fontes de colágeno e outras proteínas de matriz extracelular, os miofibroblatos são células altamente dinâmicas e ativas, podendo 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 inflamatória crônica. Dessa forma, os miofibroblastos além de atuarem como células estruturais importantes produtoras de uma ampla gama de fatores, podem também exercer função imunoreguladora (Phan S, 2002; Powell D, e cols., 1999).

1.4 **Fibrose Pulmonar**

A resposta de fibrose pulmonar é tradicionalmente vista como um fenômeno que ocorre após uma resposta inflamatória crônica, embora até o momento não existam evidências clínicas que provem a real existência de uma relação direta entre parâmetros inflamatórios e a evolução da doença. No entanto, a literatura especializada já descreveu que a fibrose tecidual inicia sua amplificação a partir de uma lesão inicial, e age modulando o fenômeno de reparação tecidual, tanto no sentido do acúmulo de células mesenquimatosas quanto da síntese de componentes da matriz extracelular (Keane M e Strieter R, 2002). Isto levou alguns grupos de pesquisadores a concentrar seus estudos na expressão de alguns componentes da matriz extracelular e em moléculas normalmente envolvidas na regulação da homeostase. No caso particular da matriz extracelular, existem evidências de que a sua manutenção é um processo dinâmico, envolvendo a síntese de proteínas como fibrilas de colágeno, fibronectina e proteoglicanas, sempre equilibradas através de uma proporção equivalente de proteólise. No caso dos reguladores, também vem sendo enfatizada uma certa classe de proteases: as metaloproteinases (MMPs), cuja ação enzimática é regulada por uma família de inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs). Alguns estudos demonstram que durante um processo de desregulação do processo homeostático é possível observar a formação de fibrose tecidual, correspondendo ao fenômeno secreção de proteínas de matriz extracelular em excesso , dando origem a importantes alterações funcionais (Keane M e Strieter R, 2002). Em um cenário assim tão amplo, também há outras células residentes envolvidas, como as células epiteliais de revestimento da árvore brônquica, além de outras células constitutivas (macrófagos), que têm um papel importante no processo de agressão tecidual através da ativação em cascata de

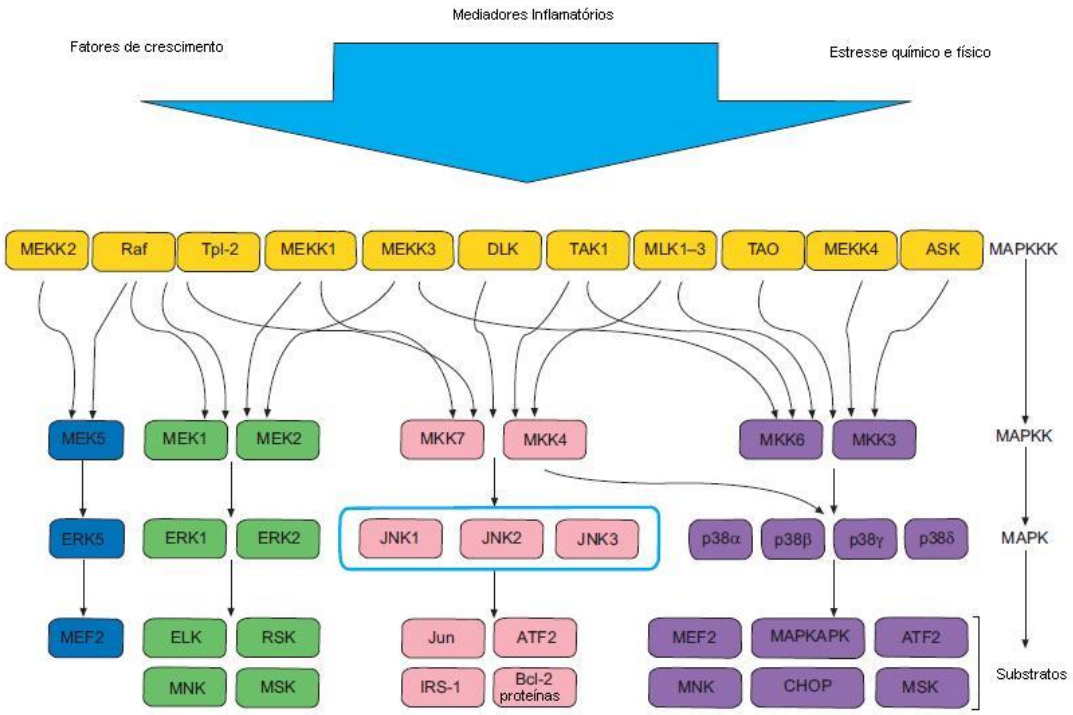
diferentes tipos de células e de fenômenos de reparação (Mossaman B e Churg A, 1998; Rocco P, e cols., 2003).

2 ATIVAÇÃO CELULAR

Durante o processo de ativação celular, dependendo do tipo de célula e do estímulo, várias são as vias de sinalização envolvidas com especial destaque para as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (Krishna M e Narang H, 2008), consideradas cruciais na regulação de várias funções celulares. As MAPK compõem uma família extensa de enzimas que atuam de forma conservada ao longo de todo o processo evolutivo (Johnson G e Lapdat R, 2007). Uma vez ativadas, as MAPK atuam perpetuando o processo de transdução de sinalização, assim como modulando a fosforilação de fatores de transcrição como o NFkB e a proteína ativadora (AP-1), fatores que medeiam a resposta inflamatória, sendo ativados por estímulos como LPS, citocinas e diversas condições de estresse, e que por sua vez regulam a expressão de genes que codificam citocinas inflamatórias como TNF-alfa, IL-6, e IL-8 (Shukla A e col., 2003; Enslen H e col., 2001).

Nos mamíferos os três principais membros da família das MAPK (fig.2) são: ERK (1, 2, 3,4 e 5), p38 (1-3) e JNK (1 ,2, 3), sendo diferenciados pela especificidade quanto ao substrato. Atuam regulando diversos processos celulares incluindo proliferação, diferenciação e apoptose. Podem ser ativadas por inúmeros estímulos, como fatores de transcrição, proteínas do citoesqueleto e exercem grande influência na expressão gênica, metabolismo e divisão celular (Maosog Q e Elion A, 2005, Adcock E, e cols., 2006). A cascata das MAPK consiste da fosforilação e ativação sequencial das enzimas MAPKKK (MAP3K), MAPKK (MAP2K) e da MAPK, que ao fosforilarem fatores de transcrição específicos irão permitir a iniciação do processo de transcrição gênica e consequente geração de mediadores inflamatórios de origem protéica como citocinas e quimiciocinas. Compondo parte do processo de regulação da ação das quinases intracelularmente, encontram-se diferentes famílias de fosfatases que atuam desativando o sistema através de desfosforilação (Enslen H, e cols., 2001, Maosog Q e Elion A, 2005). Dados da literatura apontam para uma participação ativa da via das MAPK em diversos processos inflamatórios crônicos como asma brônquica e COPD, muito embora na condição da silicose muito pouco tenha sido estudado (Ding M, e cols. 2005).

Figura 2: Cascata de sinalização em células de mamíferos, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK).



Legenda: Sumário esquemático das interações entre as vias quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), c-Jun N-terminal quinase (JNK) e p38. Interações exclusivas podem existir em determinados tipos celulares e com estímulos específicos. Não são mostrados todos os substratos de MAPK. Destaque para a localização do JNK na rede de sinalização. Adaptado de Bennet BL. 2006.

2.1 **Quinase da região NH_2 terminal de c-Jun (JNK)**

A enzima JNK foi primeira mente descrita no início dos anos 90, como uma família de proteínas que fosforilam resíduos serina/treonina e que são ativadas mediante situações que incluam condição de estresse. Davis e colaboradores (2000) reportaram que a JNK ativada, ou seja fosforilada, é translocada para o núcleo onde é capaz de ligar-se à região de domínio NH_2 terminal de c-Jun, ativando AP-1 e promovendo a transcrição de genes (Adcock I, e cols.2006; Bogoyevitch M, e cols.,2007). Até o momento cerca de três isoformas são conhecidas, sendo estas codificadas por três genes diferentes: as isoformas JNK 1 e JNK 2

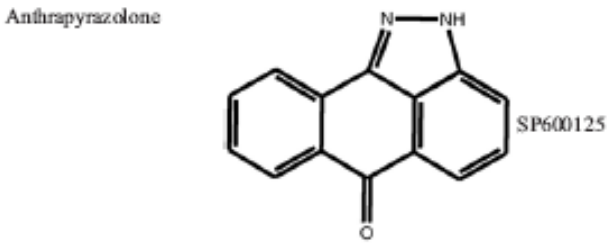
que estão amplamente distribuídas, enquanto que a isoforma JNK 3 encontra-se localizada principalmente no tecido neuronal (Manning A e Davis R,2003).

A JNK é fosforilada e ativada por duas MAPK específicas a MAPKK4 que preferencialmente fosforila o resíduo tirosina e MAPKK7 que fosforila o resíduo treonina. Já foi descrito na literatura que a MAPKK 7 é essencial para a ativação do JNK pelo TNF-α (Manning A e Davis R,2003). Após a ativação, a JNK é translocada para o núcleo, onde atua fosforilando c-Jun, no domínio de transativação N-terminal (resíduos Ser 63 e Ser 73) (Hess J,e cols., 2004).

2.1.1 Inibidores de JNK

A complexidade da via da JNK favoreceu múltiplas oportunidades para o desenho químico de várias moléculas pequenas com a propriedade de modular negativamente a via da JNK, sendo uma das principais estratégias ter a enzima como alvo principal de ação. Neste sentido, foi sintetizado pela companhia farmacêutica Celgen, o composto SP600125 (fig.3), que é um derivado de uma série de pirazoloantronas e que têm como alvo o sítio ATP da quinase. Seu desenho teve como base teste em doenças autoimunes, inflamatórias e neurodegenerativas. Este composto apresentou valores de CI de 100 nM para JNK1 e JNK 2 e de 150 nM para JNK 3, tendo como característica a inibição competitiva de ATP atuando tanto em JNK1, JNK2 como em JNK3 (Bogoyevitch M, e cols., 2004). Interferência pequena ou nenhuma foi verificada no caso das quinases ERK e p38.

Figura 3 - Estrutura química do composto SP600125.



Evidências da literatura indicam que em ensaios celulares *in vitro*, o inibidor SP600125 suprimiu a produção de TNF-α em monócitos humanos e IL-2 em células Jukart,

assim como de GM-CSF, RANTES e IL-8 em células da musculatura lisa de humanos (Oltamans U, e cols.,2003). SP6000125 igualmente preveniu a morte celular através da inibição da ativação da família pró-apoptótica Bax/Bad, a liberação do citocromo c mitocondrial para o citoplasma (Bogoyevitch M e Arthur P, 2008). Em outros modelos experimentais de inflamação crônica como de artrite reumatóide em ratos, foi também observada diminuição de sinais como inchaço, destruição das articulações e dano tecidual (Han Z,e cols,2001). Respostas de injúria pulmonar causada por LPS foram igualmente sensíveis ao efeito do composto SP600125, quando foi observada redução do infiltrado neutrofílico no parênquima pulmonar, LDH no lavado broncoalveolar, geração de óxido nítrico e níveis de MMP-9 (Arnd P, e cols., 2004, Lee H,e cols,2004). Além disso, em modelos experimentais inflamação crônica como a asma brônquica, este inibidor mostrou-se apto em inibir o acúmulo de eosinófilos e linfócitos no lavado broncoalveolar, liberação de citocinas e produção de IgE (Eynott PR,e cols,2003, Nath P, e cols., 2005).

Tomando por base os resultados promissores indicativos do envolvimento da enzima JNK em condições de fisiopatologia, novos compostos foram sintetizados, incluindo-se AS602801. De forma bastante interessante, o tratamento de camundongos, por via oral, foi capaz de inibir a resposta fibrótica verificada na condição de estimulação com bleomicina. Corroborando estes achados, camundongos nocautes para JNK-1, apresentaram nítida proteção da resposta fibrótica e expressão de genes pró-fibróticos na condição da estimulação com bleomicina (Alcorn J, e cols., 2009). Estes achados claramente apontam para a implicação de JNK em processos fisiopatológicos de caráter fibrótico.

3 **OBJETIVOS**

3.1 **Objetivo geral**

Tendo como fato que a silicose é uma doença grave e incapacitante, para a qual não há um tratamento eficaz, e que a JNK se coloca como um alvo terapêutico de relevância, no presente estudo investigamos o potencial efeito curativo do inibidor de JNK SP600125 sobre a resposta fibrótica (fase crônica) da silicose experimental murina.

3.2 **Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito do tratamento com o inibidor de JNK SP600125 sobre a função pulmonar (resistência e elastância) em camundongos silicóticos, 28 dias após a provocação com sílica;
- Avaliar o efeito do tratamento com o inibidor de JNK SP600125 sobre alterações morfológicas e depósito de colágeno no parênquima pulmonar de camundongos silicóticos, 28 dias após a provocação com sílica;
- Analisar o efeito do tratamento com o inibidor de JNK SP600125 sobre a geração de mediadores inflamatórios e prófibróticos (quimiocinas e citocinas) no pulmão de camundongos silicóticos, 28 dias após a provocação com sílica;
- Analisar o efeito do tratamento com o inibidor de JNK SP600125 sobre macrófagos e miofibroblastos presentes no tecido pulmonar de camundongos silicóticos, 28 dias após a provocação com sílica;
- Avaliação dos níveis de JNK ativada (fosfo-JNK) no tecido pulmonar de camundongos silicóticos, 28 dias após a provocação com sílica.

4 MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss-Webster machos (18-20g), provenientes do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente constante de 24 - 26ºC e ciclo de claro e escuro de 12/12 h, com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos experimentais aos quais os animais foram submetidos encontram-se aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (licença nº 0213-4).

4.2 Indução de silicose

Os animais foram submetidos à anestesia mediante aerossolização de halotano (Tanohalo) sendo em seguida submetidos à instilação por via intranasal de 10 mg sílica (SiO_2), (tamanho de partícula: 0,5 - 10 µm) dissolvidos em 50 µl de solução salina estéril. Os animais do grupo controle receberam igual volume de solução salina estéril.

4.3 Tratamento

Os animais foram tratados por via oral (v.o) com o composto inibidor de JNK SP600125, na dose de 2 e 5 mg/Kg, dissolvido em solução salina estéril (NaCl 0,9%). A administração foi uma vez ao dia, iniciando-se aos 21 dias após a instilação da sílica até o dia 27, com as análises 24 h após a última administração do fármaco. Os animais do grupo controle receberam igual volume do veículo. As análises foram realizadas 28 dias após a instilação com sílica.

4.4 Função pulmonar

Para os testes de mecânica respiratória, os animais foram sedados com diazepam (5mg/kg, i.p.), anestesiados com pentobarbital sódico (20mg/Kg, i.p.). Os animais foram paralisados com brometo de pancurônio (1mg/Kg, i.v.) e ventilados mecanicamente com fluxo e volume corrente constantes. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e realizada uma pequena incisão na região anterior do pescoço para introdução de uma cânula que é conectada a um pneumotacógrafo (Mortola & Noworaj, 1983). A mecânica respiratória foi analisada pelo método de oclusão ao final da inspiração, que se baseia na insuflação do sistema respiratório, com fluxo aéreo constante, seguida de um rápido fechamento da via aérea ao final da inspiração. Foram avaliados os parâmetros de variação da pressão total (ΔPtot) e as pressões correspondentes às vias aéreas centrais (ΔP1) e periféricas (ΔP2) e elastância estática (Est) pulmonar (Rocco P e col., 2003).

4.5 **Obtenção de tecido pulmonar**

Os animais foram sacrificados com pentobarbiatal sódico (500mg/Kg, i.p.), sendo inserida uma cânula no ventrículo esquerdo para realização do procedimento de perfusão com solução de salina (0,9%) + EDTA 20 mM. O lobo esquerdo foi recuperado para posterior processamento para a análise histológica e o lobo direito foi retirado e mantido a -20 ºC para quantificação de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar.

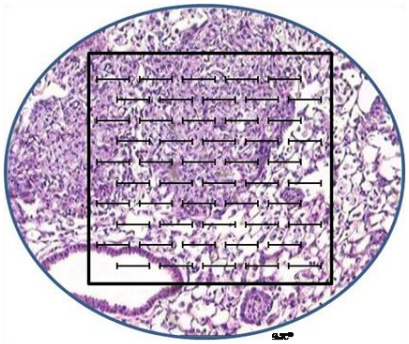
4.5.1 Análise histológica

Após obtenção do lóbulo esquerdo, o mesmo foi imerso em solução de Milloning (formol tamponado) para fixação. Procederam-se, em seguida, as etapas de desidratação com concentrações crescentes de etanol (70, 80 90 e 100%), clarificação em xilol e posterior inclusão em parafina. Os cortes foram confeccionados com o auxílio do micrótomo (Leica – RM2125RT), possuindo 5 µm de espessura. Por último, o material foi submetido à coloração com a utilização dos seguintes corantes: i) Hematoxilina-Eosina (H&E) para visualização dos componentes pulmonares estruturais e ii) Picrus Sirius para visualização de fibras colágenas. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Olympus – U-TV1X), acoplado a uma câmera (Olympus Q Color 3 – 0044C-194) e a captura da imagem feita mediante o uso de um “software” de análise (Q Capture).

4.5.2 Análise morfométrica

A análise quantitativa da área do parênquima pulmonar ocupado por nódulos fibróticos foi realizada utilizando um retículo morfométrico com 50 linhas e 100 pontos (figura 4) acoplado à ocular do microscópio de luz (BX51, Olympus) (aumento de 200 x), sendo avaliados um total de 20 campos/pulmão/animal. Os valores de pontos coincidentes com os granulomas foram submetidos a tabelas para cálculo específico das médias. Deste calculada a área do tecido pulmonar ocupada por granulomas. Os valores foram expressos em fração de granuloma (%).

Figura 4: Imagem do retículo utilizado para análise morfométrica.



4.6 **Análise imunohistoquímica**

Após a confecção das lâminas, os cortes histológicos foram submetidos à desparafinização em xilol e hidratação dos tecidos, através de uma seqüência de etanol nas respectivas concentrações: 100%, 90%, 80% e 70%. Em seguida foi utilizada uma solução de uréia (3M) para promover a recuperação antigênica tecidual. Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes com solução de TBS, por 10 minutos, realizado o inativação da peroxidase endógena com H_2O_2 3% por 10 minutos, seguida pelo bloqueio de sítios inespecíficos com Tris-HCL + BSA 5 % por 1 hora. O material foi lavado por 5 minutos com TBS e incubado com os anticorpos primários: i) anti- α-SMA (1:400) (A2547, Sigma, USA)

e anti- F4/80 (1:100) (MCAP497, Serotec, USA), diluídos em Tris- HCL 0,05M ,e mantidos por 12 horas a 4^0C. Para o controle negativo foi feita omissão do anticorpo primário, sendo então utilizada solução de Tris-HCl 0,05 M. Depois do período de incubação, foram feitas duas lavagens com TBS e feita incubação com os anticorpos secundários (1:80) anti-IgG HRP (anti-IgG de camundongo (HAF007, R&D, USA) e anti-IgG de cabra (STAT72, Serotec, USA) diluídos em Tris-HCl. A revelação da atividade da peroxidase foi realizada utilizando-se aminoetilcarbazol (AEC) e do substrato H_2O_2, por cerca de 10 minutos. As lâminas foram preparadas utilizando-se o meio de gelatina-glicerina e as análises foram realizadas por meio de um microscópio de luz, acoplado a uma câmera de vídeo conforme descrito no item 3.5.1. A quantificação de pixel foi feita através do "software" Image Pro-plus, sendo os valores expressos por pixel/μm^2.

4.7 **Análise quantitativa do colágeno pulmonar**

O conteúdo de colágeno presente no tecido pulmonar foi analisado por meio de uma reação colorimétrica utilizando a técnica de Sircoll (Biocolor, UK). O tecido pulmonar foi macerado em uma solução de Tris 0,05M + NaCl 1M, e mantido por 18 horas a 4°C. Posteriormente, o material foi submetido a centrifugação de 10.000 *x g* por 1 hora a 4^0C, retirada uma alíquota do sobrenadante e feita adição do reagente Sirius Red. Após 30 minutos de reação, o material foi novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e o "pellet" ressuspendido adicionado ao reagente Alkalin, por 10 minutos. As amostras foram colocadas em placas de 96 poços e a absorbância determinada em 540 nm e o resultado foi expresso em µg de colágeno/ pulmão direito.

4.8 **Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA**

O tecido pulmonar foi processado mediante homogeneização em 1 ml de PBS contendo um coquetel de inibidores de proteases (Hoffman-La Roche Ltda,Basel, Suiça), e em seguida centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante recuperado para análise da geração de mediadores inflamatórios.

A geração de citocinas (TNF-α e TGF-β) e quimiocinas (MCP-1 e KC) foi analisada através da técnica de "enzyme-Lynked Immunosorbent Assay" (ELISA). Para recobrir a placa de 96 poços foi utilizado um anticorpo capturador (de acordo com o indicado pelo kit), processo feito por 18 horas a temperatura ambiente. A placa foi lavada em tampão "Coat

Buffer" e bloqueada com PBS-BSA 1% (250µl por poço), permanecendo em contato como anticorpo capturador durante 1 hora. Após esta incubação ocorreu uma lavagem, seguida da aplicação das amostras e dos padrões com diluição seriada nas concentrações indicadas nos kits (R&D Systems), permanecendo durante 18 horas na temperatura de 4^0 C. A placa foi, então, lavada com tampão "Assay Buffer" para posterior adição do anticorpo de detecção, permanecendo incubado por 1 hora. Após esse tempo, a placa foi novamente lavada com o respectivo tampão e adicionou-se a enzima (estreptoavidina por1 hora). O substrato (K-Blue) foi adicionado e a reação interrompida com H_2SO_4 (0,19M). A leitura da placa (450 nm) foi realizada com a utilização de um espectrofotômetro (Versamax-Molecular Devices). Os resultados obtidos foram expressos por pg/pulmão direito.

4.9 **Western blot**

O tecido pulmonar foi processado conforme descrito no item 6.8 e realizada a quantificação de proteínas através do método de Bradford (Bradford, 1976), de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad cat: 500-0203). Às amostras, foi adicionado tampão concentrado, seguido de aquecimento a 100° C por 3 minutos. O volume de extrato correspondente a 30 µg de proteínas foi submetido à eletroforese em gel com 12% de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando-se tampão de corrida, a 150 V/50 mA por aproximadamente 1 hora. As proteínas separadas foram eletroforeticamente transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose PVDF (Hybond C), em sistema de cuba de transferência "semi-dry" (BIO-RAD) por 1 hora a 15 V/328 mA. Para bloqueio das ligações não-específicas, as membranas foram tratadas com BSA 2% por 45 minutos à temperatura ambiente e incubadas com anticorpo anti-fosfo-JNK (1:10000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a 4^oC por 12 horas. Após 3 lavagens sucessivas com T-PBS, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico, conjugado a biotina, por 1 hora a temperatura ambiente. Após 3 lavagens sucessivas com T-PBS, as membranas foram incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase numa diluição de 1:10000 (Zymed). A marcação foi revelada por ECL (Pierce – Thermo Scientific, Rockford, USA). As diferentes bandas foram analisadas por densitometria usando Scion Image Software (Scion Co., MD, USA).

4.10 **Análise estatística**

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

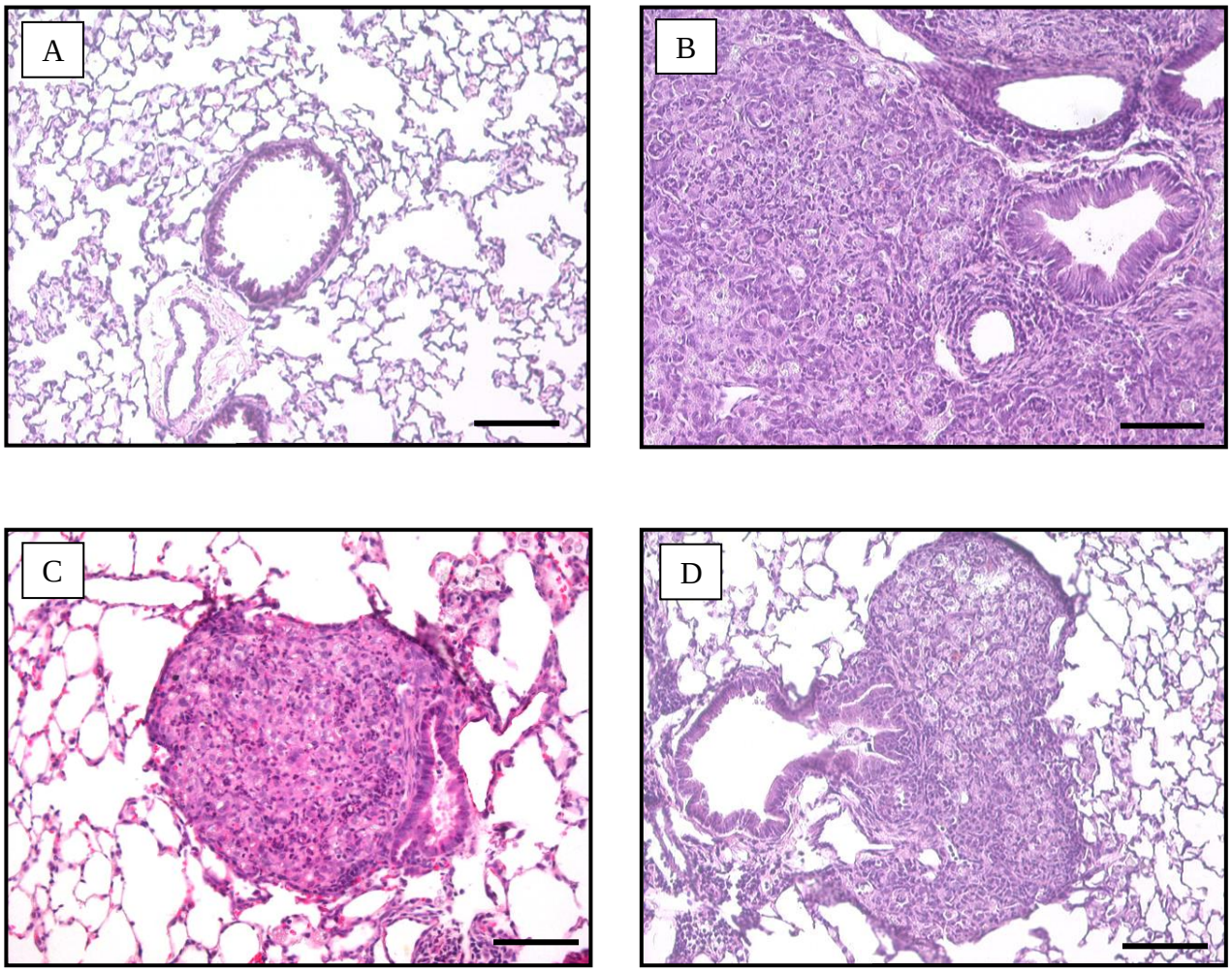
5 RESULTADOS

5.1 Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP 600125 sobre as alterações morfológicas pulmonares de camundongos silicóticos

Através da análise histopatológica vimos que os animais controle apresentaram uma arquitetura pulmonar normal com vias áreas bem preservadas, assim como os septos e sacos alveolares claramente identificados (Fig. 5A). Após a instilação de sílica, observamos uma marcada alteração no parênquima pulmonar destes animais, onde foi vista a presença de infiltrado inflamatório intenso e uma resposta fibrótica acentuada com presença de granulomas (Fig. 5B). O tratamento curativo dos animais silicóticos com o inibidor SP600125, nas doses de 2 e 5 mg/kg, foi eficaz em reduzir significativamente o infiltrado inflamatório tecidual, assim como o número e tamanho da área dos granulomas em comparação aos animais silicóticos (Fig. 1C e 1D, respectivamente). A análise morfométrica, nos permitiu verificar que o aumento do percentual de área pulmonar ocupada por granulomas nos animais silicóticos, foi significativamente reduzido após tratamento com o composto SP600125 em ambas as doses testadas (Fig. 6).

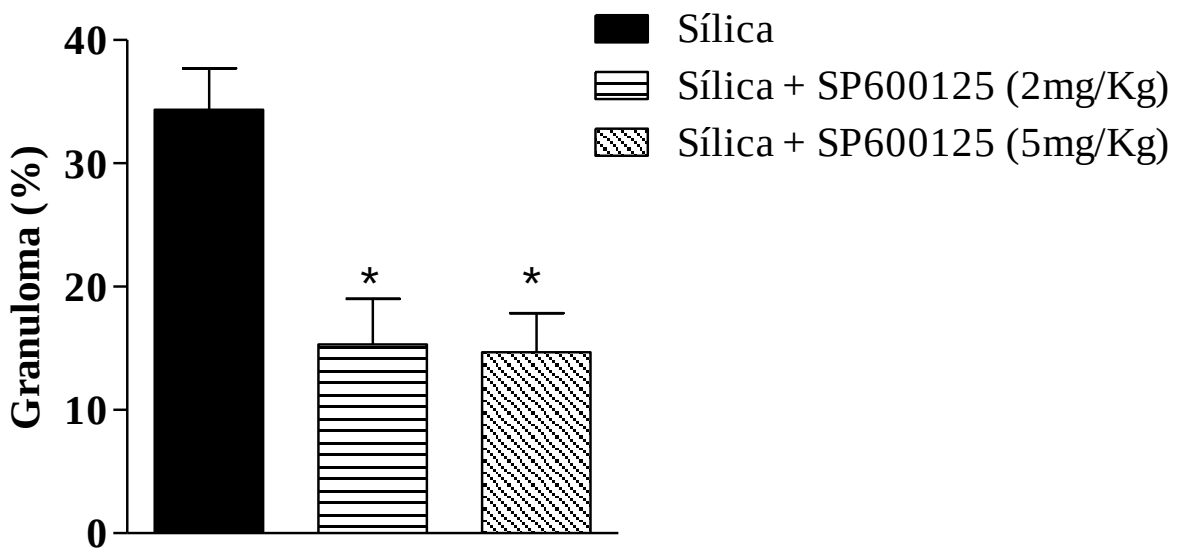
Na seqüência, passamos a avaliar o conteúdo de fibras colágenas, um componente importante da matriz extracelular e de relevância no contexto da fibrose (Terra-FilhoM, 2006), sendo para tanto foi utilizada a coloração com Picrus Sirius. Observamos a presença de um depósito basal de fibras colágenas no parênquima pulmonar, principalmente ao redor de vasos sanguíneos e bronquíolos, no caso dos animais controle (Fig. 7A). Na condição dos animais silicóticos, verificamos um marcado aumento no tempo de 28 dias, o que corresponde à fase de resposta fibrótica mais acentuada da doença, (Fig. 7B). O tratamento com o composto SP600125 mostrou-se apto a inibir significativamente o componente fibrótico do quadro silicótico (Fig. 7C e 7D). Como podemos observar na figura 8, a análise quantitativa do conteúdo de colágeno confirmou os achados histológicos, mostrando claramente um aumento no conteúdo de colágeno no pulmão dos animais silicóticos e que o tratamento mostrou-se eficaz em suprimir esta resposta. Considerando-se que o efeito inibitório das duas doses testadas do composto SP600125 foi de intensidade equivalente, nas etapas subseqüentes optamos por utilizar apenas a dose de 5 mg/Kg.

Figura 5: Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP600125 sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos



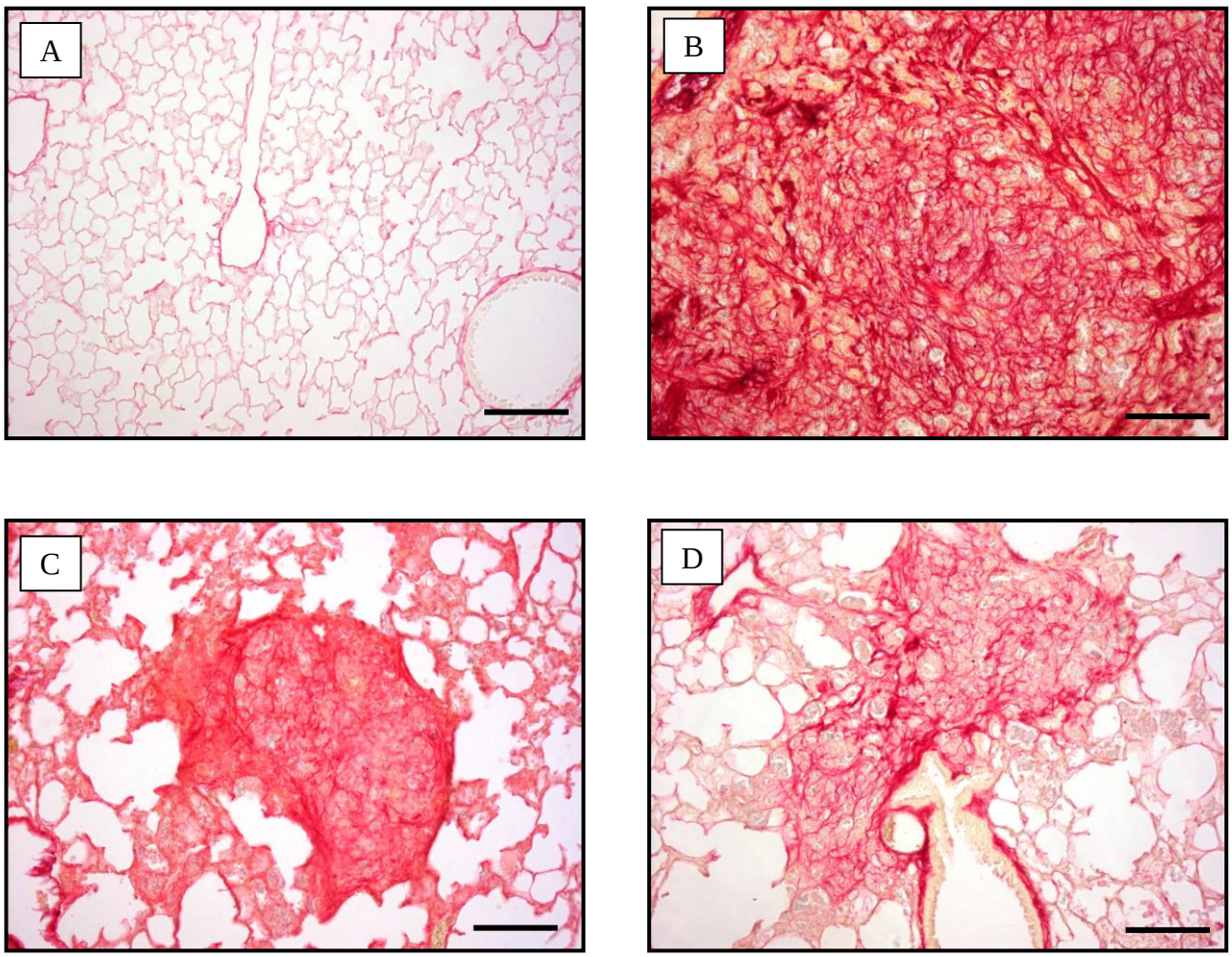
Legenda: Os grupos incluem: (A) salina, (B) sílica, (C) sílica + SP600125 (2 mg/Kg) e (D) sílica + SP600125 (5mg/Kg). As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com sílica intranasal (10mg). Os pulmões foram processados, os cortes histológicos (5 µm) corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. As barras correspondem a 100 µm. Os resultados representam média ± erro padrão da média (n=5). * P<0,05 comparado com o grupo sílica.

Figura 6: Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP600125 sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos



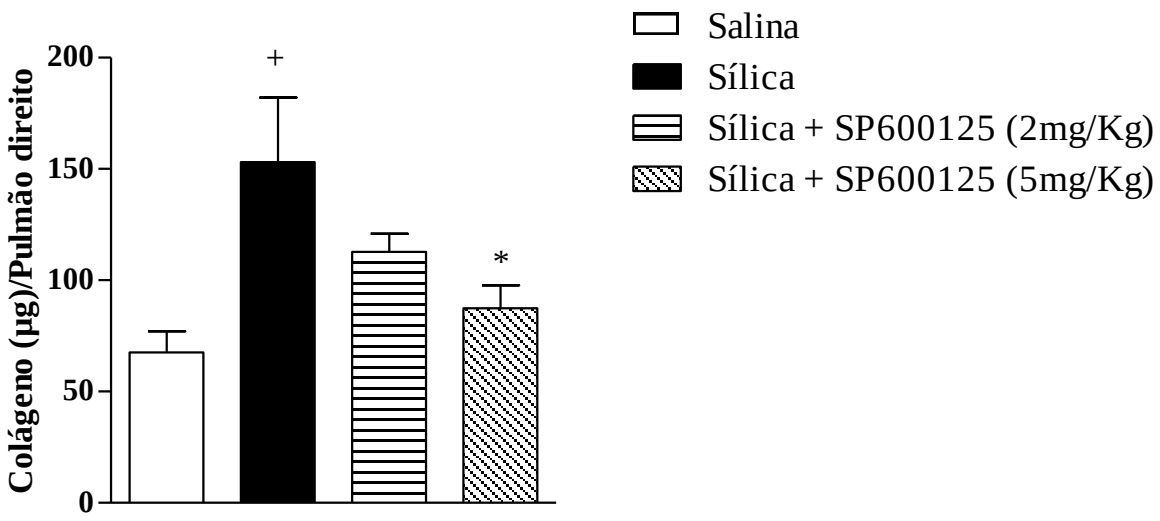
Legenda**:** Os grupos incluem: sílica, sílica + SP600125 (2 mg/Kg) e sílica + SP600125 (5mg/Kg). As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com sílica intranasal (10mg). Análise quantitativa da área do pulmão ocupada por granulomas (%). Os resultados representam média ± erro padrão da média (n=5). * P<0,05 comparado com o grupo sílica.

Figura 7: Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP600125 sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos silicóticos



Legenda:Os grupos incluem: (A) salina, (B) sílica, (C) sílica + SP 600125 (2m/Kg) e (D) sílica + SP 600125 (5mg/Kg). 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. As barras correspondem a 100 µm. Os resultados representam média ± erro padrão da média (n= 5). +p<0,01 comparado com o grupo salina,*p<0,05 comparado ao grupo sílica.

Figura 8: Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP600125 sobre o conteúdo de colágeno no pulmão de camundongos silicóticos



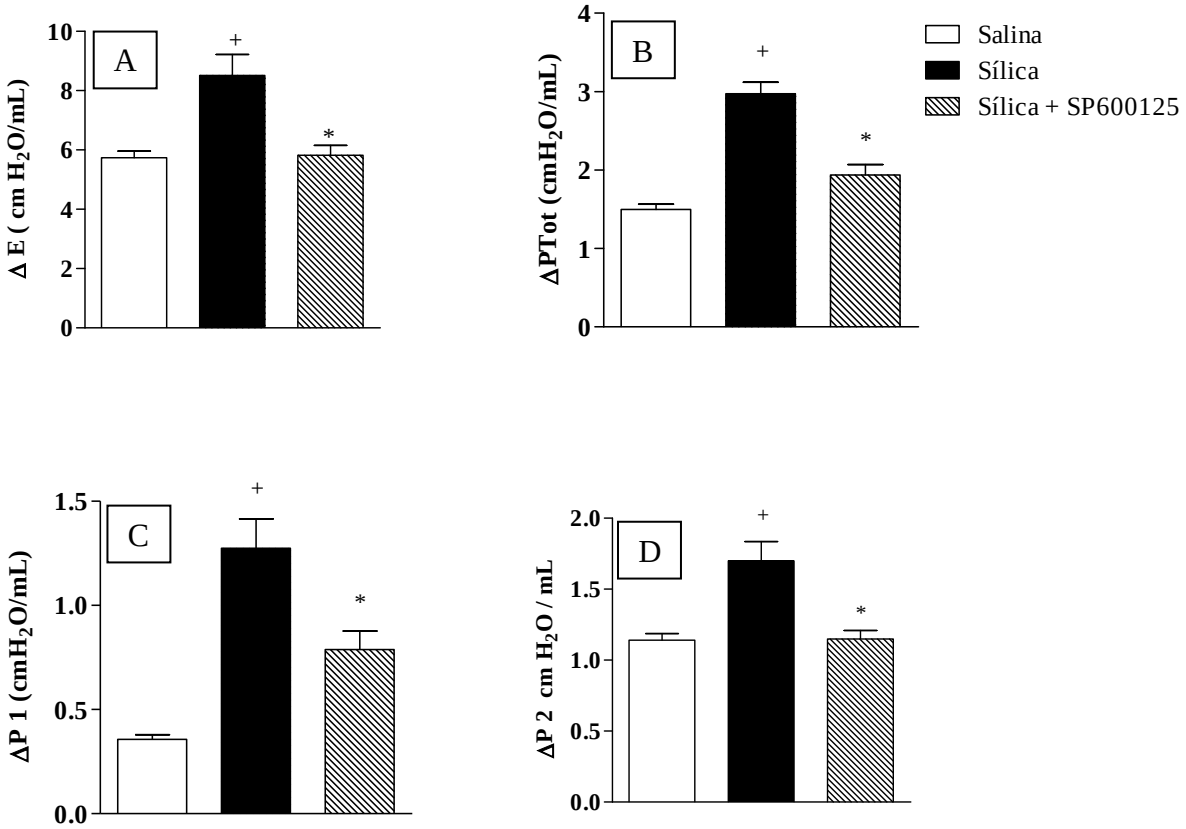
Legenda: Os grupos incluem: salina, sílica, sílica + SP600125 (2 mg/Kg) e sílica + SP600125 (5mg/Kg). As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com sílica intranasal (10mg). Os resultados representam média ± erro padrão da média (n= 5). +p<0,01 comparado com o grupo salina,*p<0,05 comparado ao grupo sílica.

5.2 **Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP 600125 sobre a função pulmonar de camundongos silicóticos**

Tendo em vista que a silicose é uma doença pulmonar crônica e que acarreta em uma grave alteração no quadro respiratório (Castranova V e Vallyathan V, 2000), como próximo passo, realizamos a análise da mecânica respiratória de camundongos silicóticos. Os parâmetros avaliados constaram de resistência de vias aéreas, que foi obtida através das variações das pressões resistivas ΔP1 (relacionado a vias aéreas centrais); ΔP2 (relacionado a vias aéreas periféricas) e ΔPtot (soma das duas pressões, ΔPtot= ΔP1 + ΔP2), e elastância pulmonar, avaliados 28 dias após a indução de sílica. Verificamos que os animais silicóticos apresentaram um aumento da elastância pulmonar quando comparados aos animais controle (salina) (Fig 9A). Observamos também um aumento significativo das variações das pressões resistivas ΔPtot (Fig. 9B), ΔP1 (Fig. 9B), ΔP2 (Fig. 9C) e nos animais silicóticos em relação

ao grupo controle. Ao analisarmos a função respiratória dos animais tratados com o inibidor de JNK, SP600125, observamos uma clara redução significativa tanto nos parâmetros resistivos quanto na elastância pulmonar nos animais silicóticos (Fig. 9).

Figura 9: Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP600125 (5 mg/Kg) sobre a função pulmonar de camundongos silicóticos

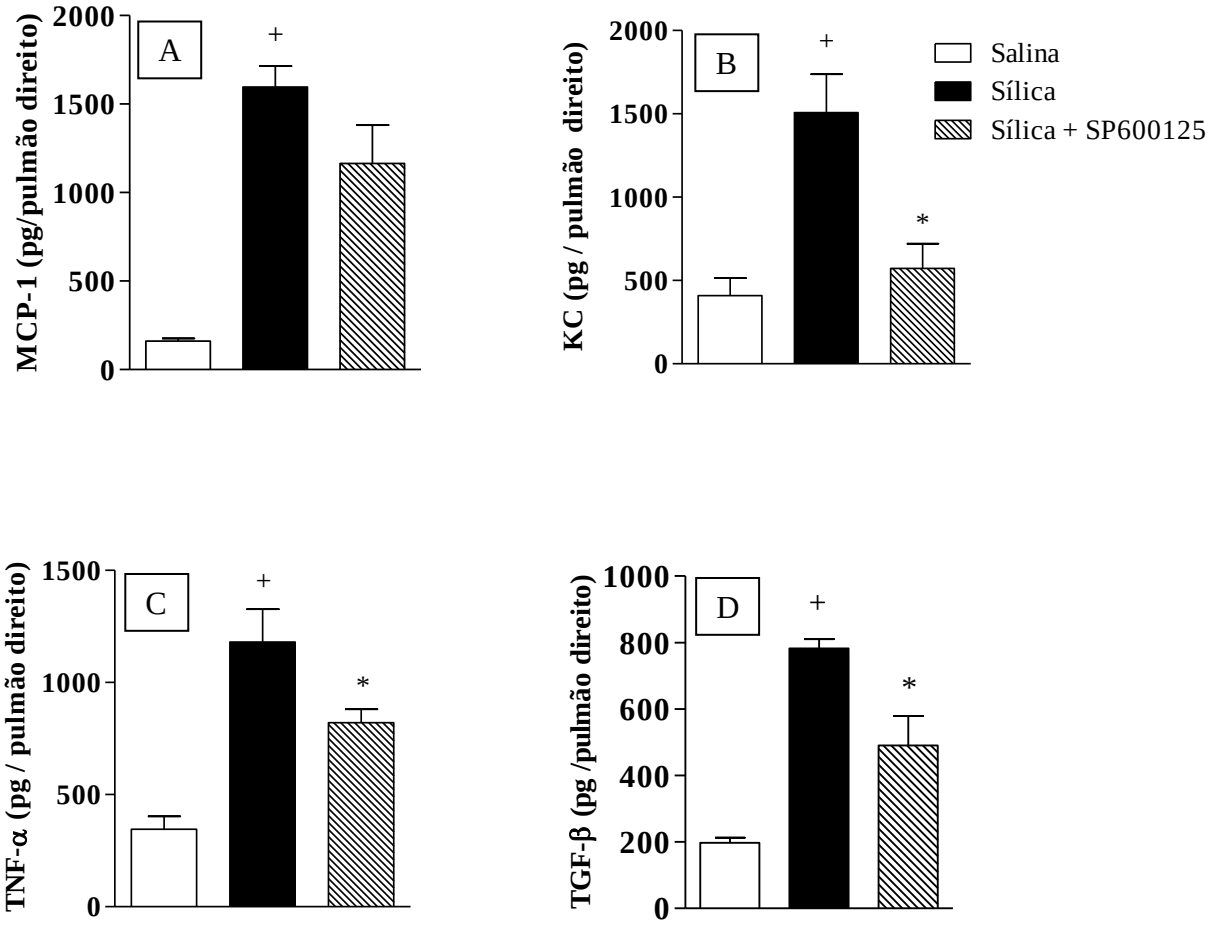


Legenda: As análises de elastância (A), ΔPTot (B), ΔP1 (C) e ΔP2 (D) foram realizadas 28 dias após a estimulação com sílica por via intranasal (10 mg). Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média de no mínimo 5 animais. + $p < 0,05$ comparado ao grupo salina; * $p < 0,05$ comparado ao grupo sílica.

5.3 **Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP 600125 sobre a geração de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos silicóticos**

Já é bem descrito na literatura, que diversos são os mediadores que ajudam a montar efetivamente a resposta inflamatória observada na silicose, incluindo-se dentre estes, tanto quimiocinas como citocinas (Haux F, 2007; Hocevar B, e cols.,1999). Como primeira análise, verificamos que as quimiocinas MCP-1 (Fig. 10 A) e KC (Fig. 10 B) apresentaram-se em níveis aumentados no pulmão de camundongos silicóticos, assim como as citocinas pró-fibróticas TNF-α (Fig. 10 C) e TGF-β (Fig. 10 D). Na condição do tratamento com o inibidor SP600125 foi evidenciada inibição na geração da quimiocina KC (Fig. 10 A), porém não da MCP-1 (Fig. 10 B), enquanto que as citocinas TNF-α e TGF-β mostram-se ambas sensíveis ao tratamento com o fármaco (Fig. 10 C e 10 D, respectivamente).

Figura 10: Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP600125 5 mg/Kg sobre a geração de mediadores inflamatórios no pulmão de animais silicóticos

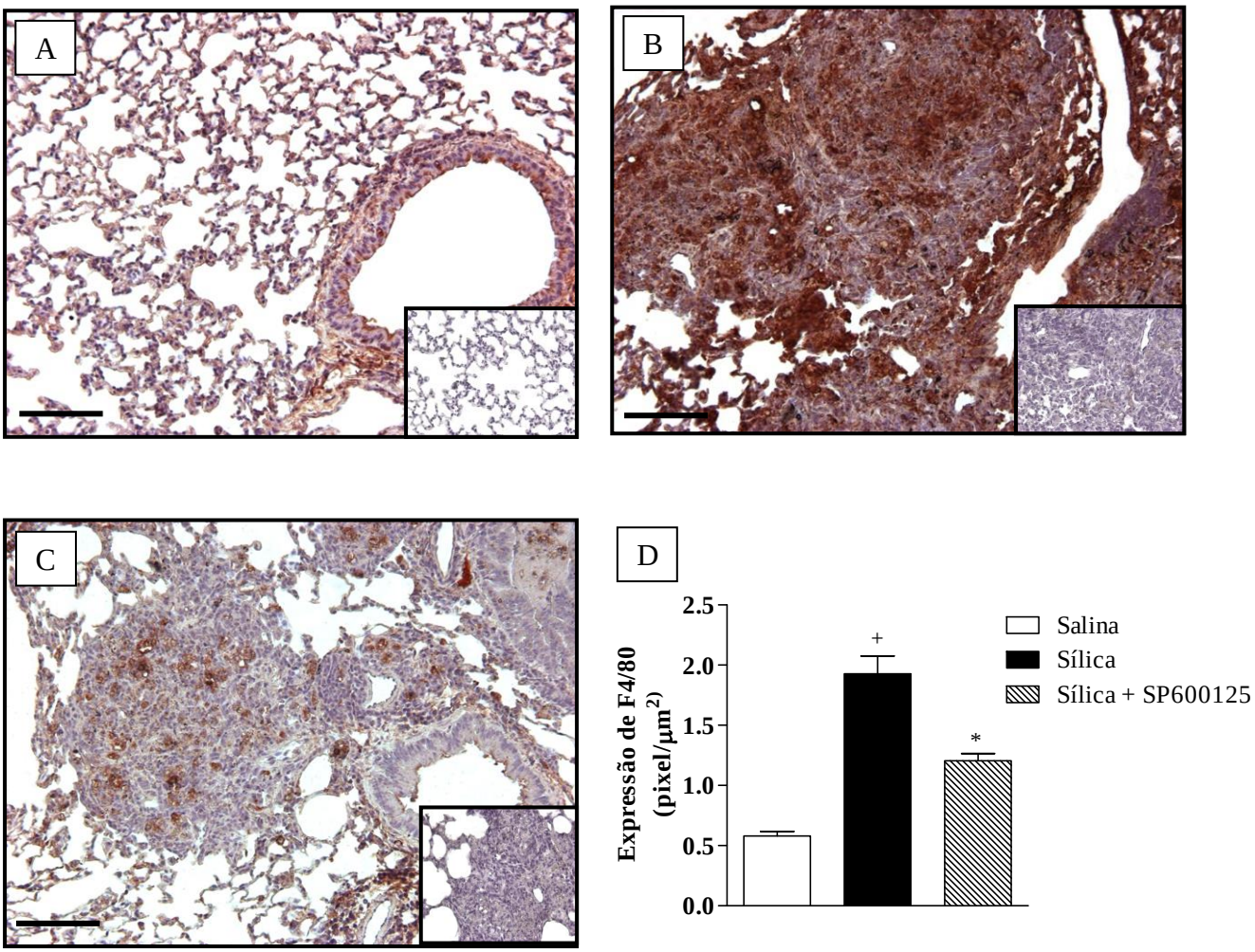


Legenda: As análises incluem: quimiocinas: MCP-1 (A) e KC (B) e citocinas: TNF-α (C) e TGF-β (D) e. As análises foram realizadas no tempo de 28 dias após a estimulação com sílica intranasal (10mg). Os resultados representam média ± erro padrão da média (n= 5). +p<0,01 comparado ao grupo instilado com salina, *p<0,01 comparado ao grupo instilado com sílica.

5.4 **Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP 600125 sobre a expressão de F4/80 e α-SMA no pulmão de camundongos silicóticos**

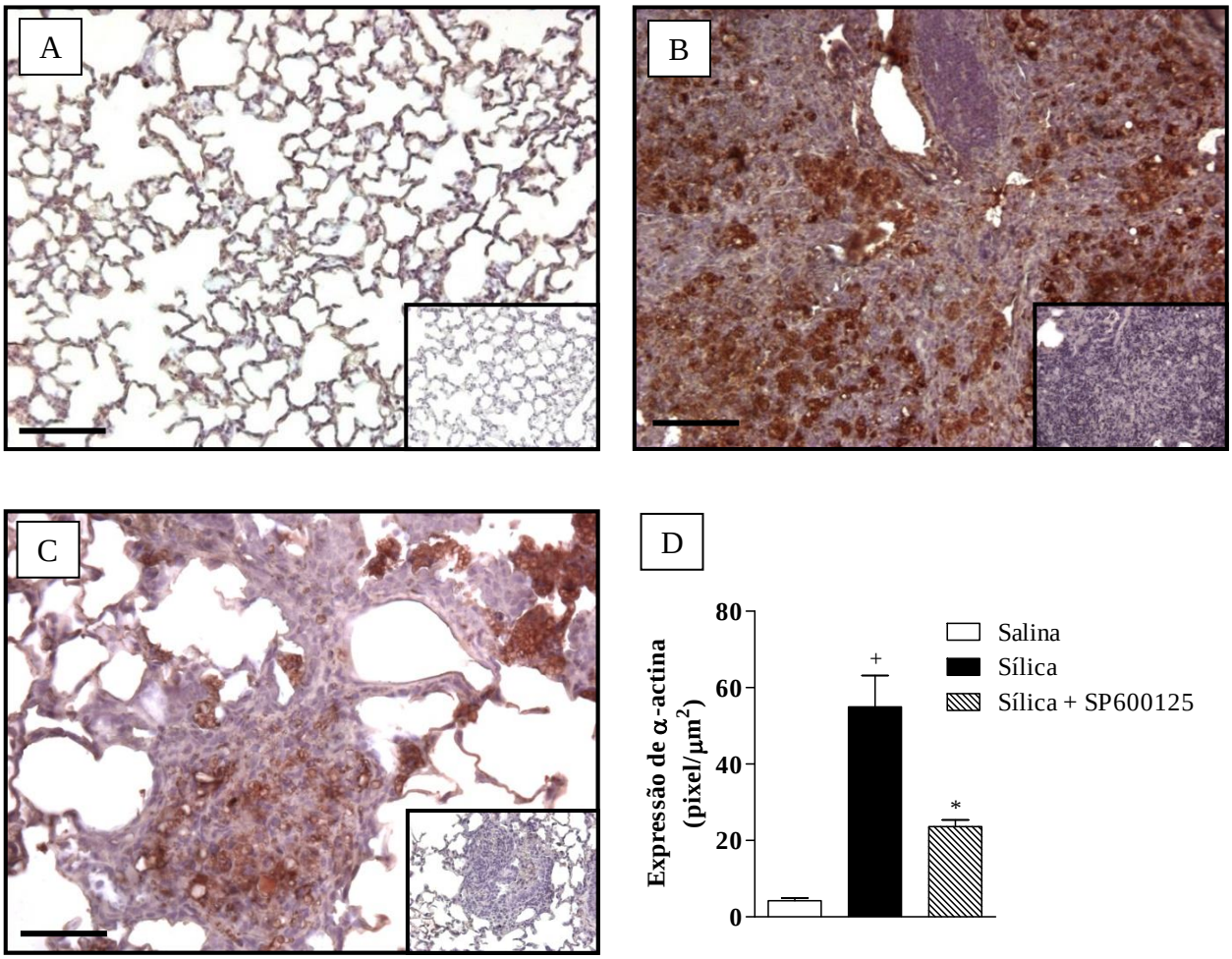
Buscando caracterizar as possíveis células alvos para o processo fibrótico disparado por partículas de sílica, passamos à análise da presença de células como macrófagos e fibroblastos nos pulmões dos animais silicóticos. Para isto foi utilizada a técnica de imunohistoquímica, sendo realizada a identificação da expressão de F4/80 um reconhecido marcador de macrófagos ativados e α-SMA que é uma proteína expressa por miofibroblastos diferenciados. Inicialmente vimos que os pulmões dos animais controle apresentaram marcação praticamente inexistente, tanto para F4/80 (Fig. 11A) como para a α-SMA (Figura 12A), conforme esperado. Em camundongos estimulados com sílica, foi observada uma marcação bastante intensa, visto tanto em F4/80 (Fig. 11B) quanto em α-SMA (Fig. 12C), principalmente no interior do granulomas. Após o tratamento com o inibidor de JNK, SP600125, vimos uma clara redução da marcação no pulmão dos animais silicóticos em ambas as análises realizadas. Para confirmar estes dados, fizemos então uma análise quantitativa realizada mediante contagem de “pixel” que corroborou com os nossos achados prévios, mostrando que o inibidor SP600125 foi eficiente em reduzir a presença de macrófagos (Fig. 11D) e de miofibroblastos (Fig. 12D) no tecido pulmonar de camundongos instilados com sílica.

Figura 11: Efeito do tratamento com o inibidor de JNK SP600125 (5 mg/Kg) sobre a expressão de F4/80 no pulmão de camundongos silicóticos



Legenda: Os grupos incluem: (A) salina, (B) sílica, (C) sílica+SP600125. 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^2 (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= 5). +p<0,05 comparado com o grupo salina. *p<0,05 comparado com o grupo sílica.

Figura 12: Efeito do tratamento com o inibidor de JNK SP600125 (5mg/Kg) sobre a expressão de α-actina de músculo liso (α-SMA) no pulmão de camundongos silicóticos

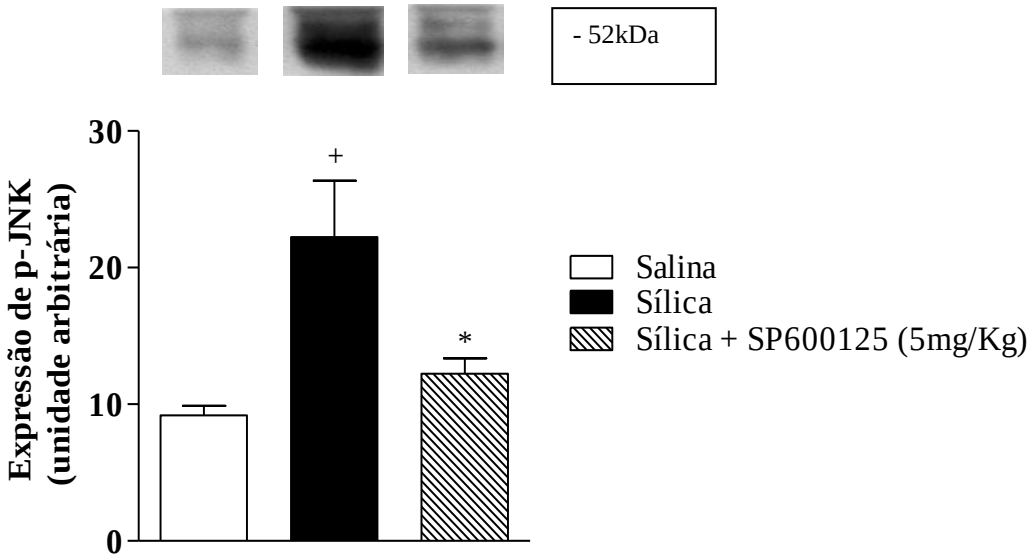


Legenda: Os grupos incluem: (A) salina, (B) sílica, (C) sílica+SP600125. Os pulmões foram processados, os cortes histológicos utilizados para imunohistoquímica e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. (D) indica o quantitativo de pixel/μm^2 (Análise através do software - Image Pro 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= 5). +p<0,05 comparado com o grupo salina. *p<0,05 comparado com o grupo sílica.

5.5 **Efeito do tratamento com inibidor de JNK SP 600125 sobre a expressão de JNK no pulmão de camundongos silicóticos**

Tomando por base que o composto SP600125 possui reconhecida ação inibitória sobre a enzima JNK (Bogoyevitch M, 2008), nesta etapa do trabalho estivemos interessados em avaliar o efeito do referido composto sobre a expressão da enzima JNK na sua condição fosforilada, já que esta corresponde a sua forma ativada. Inicialmente foi realizada uma cinética e identificada a presença de fosfo-JNK apenas no tempo de 28 dias após a instilação de sílica (dados não mostrados). Dando continuidade ao estudo, conforme pode ser observado na Figura 13, em camundongos controles (instilados com salina), verificou-se a presença de uma expressão bastante tênue de fosfo-JNK, enquanto que nos animais silicóticos há uma expressão bastante acentuada desta enzima. Na condição do tratamento com o inibidor SP600125, em sua maior dose, foi observada uma redução significativa na banda correspondente à fosfo-JNK (Fig. 13).

Figura 13: Efeito do tratamento com o inibidor de JNK SP600125 (5 mg/Kg) sobre a expressão de fosfo-JNK (p-JNK) total no pulmão de camundongos silicóticos



Legenda: As análises foram realizadas 28 dias após a estimulação com sílica intranasal (10mg). Os resultados representam média ± erro padrão da média (n= 5). + $p< 0,05$ comparado ao grupo salina; * $p<0,05$ comparado ao grupo sílica.

6 **DISCUSSÃO**

A silicose é uma doença causada pela exposição a partículas de sílica livre e cristalina, associada a várias atividades ocupacionais, sendo considerada de caráter severo em função do grau de incapacitação temporária ou permanente que causa (Fubini B, e cols., 2003). Muito embora exista uma legislação que regula procedimentos preventivos, ainda é elevado o número de óbitos decorrente desta doença em todo o mundo. Esta situação fica ainda mais grave quando se considera a inexistência de um tratamento eficaz até o presente momento (Castranova V e cols., 2001; Craighead J, e cols., 1998; Green F e cols., 1996). Neste sentido vários grupos de pesquisadores têm destinado seus estudos no sentido de buscar a identificação de compostos antifibróticos como opções terapêuticas para o tratamento da silicose.

Dentro deste contexto, com vistas a melhor compreender a patogenia da doença, vários modelos de silicose experimental foram desenvolvidos em pequenos roedores, incluindo-se sistema de indução via aerossol ou injeção intratraqueal. Muito embora ambos tenham reproduzido vários sinais da doença humana, alguns pontos devem ser considerados. No primeiro caso, os animais são submetidos à exposição à sílica por um período de cerca 6 horas por dia, 5 dias por semana por até 2 meses, o que claramente requer um tempo longo de experimentação e uma infra-estrutura especial (Hubbard A, e cols., 2001; Porter D,e cols., 2004). No segundo caso, a indução se dá mediante uma pequena cirurgia na qual há exposição da traquéia do animal, sendo a sílica introduzida através de uma seringa. É um processo invasivo e como tal pode trazer problemas secundários, além da limitação da administração de drogas por períodos prolongados.

Com base nas observações acima, nosso laboratório optou por desenvolver um modelo de indução de silicose não invasivo que nos permitisse avaliar o efeito de fármacos de forma curativa e por períodos mais extensos. Neste sentido, utilizamos a instilação intranasal como via de escolha, sendo os animais submetidos a rápido processo de anestesia seguido da instilação de 10 mg de sílica diluídos em 50 μl de salina. Nestas condições, foram testadas três cepas de camundongos que incluíram não isogênicos Swiss-Webster e isogênicos Balb/c e C57Bl 6 (dados não mostrados). Todas responderam de forma a reproduzir uma lesão extensa e difusa no parênquima pulmonar e formação de granulomas, com comprometimento principalmente do terço médio e ápice dos pulmões. Considerando-se que os camundongos Swiss-Webster são não isogênicos, achamos que poderiam reproduzir melhor a variabilidade de resposta verificada em humanos, sendo, portanto os animais de escolha em estudos futuros.

Desta forma, no presente trabalho fizemos uso do modelo não invasivo de silicose, quando foram avaliados alguns sinais importantes da doença como perda de peso, comprometimento da função pulmonar, reação inflamatória, formação de nódulos fibróticos e deposição de colágeno dentre outros (Greenberg M., e cols., 2007).

Durante o estabelecimento do processo inflamatório, determinado pelo contato das partículas de sílica com as células presentes no ambiente pulmonar, procede-se a etapa de ativação celular que implica em inúmeras cascatas de ativação celular de forma permitir a perpetuação do estímulo e consequente transdução do sinal intracelularmente. Neste contexto, de forma dependente do tipo e intensidade de estímulo, encontram-se as MAP quinases, que compõem uma superfamília de enzimas, cuja função principal é fosforilar resíduos de aminoácidos específicos de forma a permitir a ativação em cascata que culmina com fosforilação/ativação de fatores de transcrição e subseqüente geração de mediadores inflamatórios protéicos (Karin M, 1995). A família das MAP quinases possui três principais subgrupos, com especial destaque sendo dado à JNK neste trabalho. De fato, evidências preliminares foram obtidas indicativas da implicação desta quinase em doenças inflamatórias como asma brônquica, artrite reumatóide e doenças neurodegenerativas (Utsugui M, e col., 2003; Adckoc I,. e cols., 2006; Thalhamer T, e cols., 2008). Além disso, de forma extremamente interessante, a utilização de inibidores desta enzima mostraram-se aptos a inibir a funcionalidade de fibroblastos *in vitro* e reduzir a resposta fibrótica *in vivo* (Kahil N,e cols., 2005; Blease K, e cols., 2003).

Para desenvolvimento deste estudo, fizemos uso do composto SP600125, um dos primeiros inibidores desenvolvidos e para o qual já há vários estudos comprovando sua atividade inibitória sobre a enzima JNK (Bennett B. 2006). Foram utilizadas as doses de 2 e 5 mg/Kg, administradas por via oral no período do dia 21 a 27, com análise feita 24 h após a última dose. A escolha deste esquema de tratamento deu-se em função da busca por uma proximidade com a condição verificada na clínica, uma vez que quando os pacientes procuram assistência médica, o estado de comprometimento pulmonar com a presença de nódulos granulomatosos é evidente.

Em nosso estudo, foi verificado que os camundongos Swiss-Webster silicóticos apresentaram um marcado infiltrado inflamatório no tecido pulmonar, caracterizado na fase crônica pela presença de nódulos característicos da silicose humana, coalescentes, possuindo acúmulo de células internamente e grande deposição de fibras colágenas. Estes resultados encontram respaldo em dados da literatura que descrevem a ocorrência de um processo inflamatório persistente, proliferação de fibroblastos e deposição excessiva de colágeno

resultando na formação de nódulos no pulmão (Thakur S, e cols., 2009). Na condição do tratamento dos animais com o inibidor de JNK SP600125, em ambas as doses testadas e de forma equivalente, verificamos uma redução no infiltrado inflamatório, presença de região septal menos espessa e clara redução no número e tamanho dos granulomas. Este efeito claramente refletiu-se quando da análise quantitativa que revelou uma diminuição da área de parênquima pulmonar ocupada por granulomas. De forma coerente, observamos que tanto através da avaliação morfológica em cortes histológicos corados com picrus sirius, ou pela análise quantitativa dos níveis de colágeno pelo Sircol, detectamos uma marcada redução no conteúdo de colágeno presente no pulmão dos animais silicóticos tratados com SP 600125 em comparação com os silicóticos não tratados. Estes nossos achados estão em acordo com observações da literatura, onde foi descrito o efeito supressor do inibidor de JNK sobre o quadro de infiltrado leucocitário associado à estimulação pulmonar por alérgeno ou LPS (Arndt P, e cols.,2005; Eynott P e cols., 2004), além da resposta fibrótica detectada na condição de desafio com bleomicina (Blease K, e cols., 2003).

De forma bastante interessante e original, vimos através de microscopia de luz polarizada a presença de partículas de sílica que se mostram refringentes, apresentando tom azulado brilhante, o que nos permite analisar quantitativamente a presença das partículas no parênquima pulmonar (dados não mostrados). Verificamos na condição da silicose, a existência de acumulado de partículas principalmente na região de granuloma, embora algumas pudessem ser detectadas dispersas na região do parênquima pulmonar. A análise dos pulmões dos camundongos silicóticos tratado com SP600125 revelou uma redução marcada no quantitativo de partículas de sílica presentes na região de granuloma no pulmão. Esta é uma análise original, embora preliminar, que nos fornece subsídios para melhor compreender o mecanismo de ação de compostos com o potencial antifibrótico. Uma possível hipótese para explicar este fenômeno seria o favorecimento do "*clerance"* das partículas de sílica do tecido pulmonar para órgão linfóides periféricos via o sistema linfático de drenagem pulmonar. Dados prévios indicam que a presença de partículas de em linfonodos de ratos silicóticos, 60 dias após a estimulação com sílica (Porter D e cols., 2004). Estudos mais adicionais encontram-se em andamento de forma podermos melhor caracterizar este fenômeno.

Anteriormente foi descrito por Faffe e cols. (2001), através da análise da mecânica tecidual de pulmões silicóticos, a existência de um aumento significativo da resistência tecidual em relação a dos animais controle. O aumento de ΔP1, L (relacionado com vias aéreas centrais) parece estar mais relacionado com o infiltrado inflamatório encontrado

principalmente ao redor dos brônquios. Aumento na elastância dinâmica (E dyn) reflete claro comprometimento da região periférica correspondente ao parênquima pulmonar.

Neste sentido, na etapa seguinte investigamos a potencial correlação entre a melhora verificada no quadro de fibrose dos animais silicóticos submetidos ao tratamento com o composto SP600125 e o comprometimento da função pulmonar. Vale mencionar que uma vez que ambas as doses testadas produziram efeito inibitório de igual intensidade, optamos pela utilização da dose de 5 mg/Kg para os ensaios posteriores. Apesar de ser a dose mais alta, é interessante comentar que esta dose e bem inferior àquela utilizada em outros modelos experimentais de inflamação, qual seja, 30 mg/Kg.

Inicialmente confirmamos dados de literatura que demonstram que camundongos silicóticos apresentaram um aumento significativo na pressão das variações resistivas em ΔP1 (vias aéreas centrais), ΔP2 (vias aéreas periféricas) e ΔP tot (soma das duas pressões, ΔPtot = ΔP1 + ΔP2), fenômeno este que se mostrou associado ao comprometimento do parênquima pulmonar decorrente da liberação de mediadores pró-inflamatórios no pulmão. No caso da elastância pulmonar, observamos igualmente um aumento significativo em animais silicóticos em comparação aos normais. Analisando, então, os animais silicóticos submetidos ao tratamento com SP600125 (5 mg/Kg), vimos uma redução significativa dos parâmetros avaliados de resistência e de elastância pulmonares, relacionado com a diminuição do infiltrado inflamatório, a formação de nódulos silicóticos no parênquima pulmonar e a diminuição do depósito de fibras colágenas. De forma interessante, achados de literatura comprovaram a capacidade do inibidor SP600125 em regular negativamente a resposta de hiperreatividade brônquica verificada na condição da asma brônquica experimental murina (Eynott P, e cols., 2004).

Como próximo passo, buscamos esclarecer o mecanismo envolvido no efeito inibitório associado ao composto SP600125. Mediadores inflamatórios como quimiocinas e citocinas são produzidas por macrófagos alveolares e células estruturais (epitelial e fibroblastos), e estão diretamente implicadas na cascata de eventos de levam ao desenvolvimento da fibrose pulmonar (Adcock I, e cols.,2006). Já foi demonstrado que na silicose, fatores fibróticos promovem o acúmulo de matriz extracelular tanto por aumentar a síntese de colágeno e fibronectina, quanto por inibir a degradação da matriz extracelular pela diminuição da secreção de proteases e/ou aumento da secreção de inibidores de proteases (Jagirdar J,e cols.,1996). Neste trabalho, focamos nossa atenção em mediadores como quimiocinas e citocinas. No primeiro caso, analisamos os níveis da quimiocina que atuam regulando a transmigração de leucócitos para o compartimento alveolar e interstício pulmonar em

processos inflamatórios (Charo I e Ransohoff R, 2006) como KC, que atua no recrutamento de polimorfonucleares neutrófilos. Analisamos, também, geração de MCP-1, uma quimiocina associada a processo fibróticos.

Verificamos que ambas apresentaram níveis aumentados no pulmão dos animais silicóticos, sendo que apenas a geração de KC foi inibida pelo composto. Quanto às citocinas, demos destaque a dois reconhecidos fatores com propriedades prófibróticas, TNF-α e TGF-ß, verificando que o aumento nos níveis de ambos foi sensível ao tratamento com o inibidor SP600125. Em conjunto, estes resultados indicam que o efeito inibitório do SP600125 sobre a resposta fibrótica no pulmão silicótico, poderia ser pelo menos em parte devida a sua atividade supressora sobre quimiocinas e citocinas. Estes dados confirmam achados de literatura que demonstraram a propriedade de inibidores de JNK em inibir a produção de TGF-ß e deposição de colágeno no processo fibrótico desencadeado pela bleomicina (Lee H e cols.,2004). Mais ainda, inibidores de JNK, porém não de p38 e ERKs, se mostraram ativos em inibir a ativação de fibroblastos por TGF-ß (Utsuki M, e cols., 2003), reforçando a relevância da JNK para processos nos quais há envolvimento de fibroblastos. Em conjunto, estes dados suportam fortemente o potencial terapêutico de inibidores seletivos de JNK na condição de fibrose.

No processo de fibrose pulmonar, duas células alvos se destacam, a saber: macrófagos e fibroblastos. Os macrófagos alveolares têm um importante papel na fagocitose das partículas de sílica induzindo ao processo inflamatório por meio da geração de mediadores e ROS e RNS, são células com grande capacidade fagocítica, reconhecimento e *"clerance"*. A interação entre os macrófagos e as partículas de sílica cristalina determina à ocorrência de uma cascata de eventos que em muito contribuem para o desenvolvimento de resposta fibrótica (Takur S, e cols., 2009). A JNK é uma proteína com um importante papel na proliferação, diferenciação e apoptose, e já foi visto que o uso de inibidores desta enzima, podem seletivamente bloquear funções como proliferação, diferenciação e sobrevivência de macrófagos murinos (Himes S, e cols., 2006). Desta forma, na busca por potenciais alvos terapêuticos, fizemos uso de um anticorpo que reconhece antígeno de superfície F4/80, caracteristicamente presente em macrófagos. Por meio de técnica de imunohistoquímica, verificamos uma intensa expressão de F4/80 no tecido pulmonar de camundongos silicóticos em comparação com aquele dos animais normais. No grupo que recebeu tratamento com o inibidor SP600125, notamos uma redução significativa em relação ao grupo apenas silicótico, fato este confirmado quando da análise quantitativa em pixels. Estes resultados sugerem

fortemente que a regulação negativa sobre a população macrofágica poderia contribuir para o efeito supressor do composto SP 600125 na silicose.

Os fibroblastos são importantes células estruturais constituintes do tecido conjuntivo, presente de forma abundante no tecido pulmonar e vias aéreas (Phan S.,2008). Possuem um importante papel na fibrose pulmonar de forma que, quando ativados são capazes de apresentar modificação fenotípica, quando passam a expressar a proteína α-actina de músculo liso (α-SMA), sendo então denominados de miofibroblastos. Estes últimos possuem participação crucial em lesões fibróticas uma vez que apresentam resposta proliferativa aumenta do aumento na capacidade de secreção de componentes de matriz extracelular como colágeno do tipo I, de citocinas inflamatórias e fibrogênicas (Phan S., 2008) Avaliamos, também, por meio da técnica de imunohistoquímica a expressão da proteína α-SMA no tecido pulmonar silicótico. Foi observado que os animais silicóticos apresentaram uma intensa marcação para esta proteína em relação aos animais controles. Na condição do tratamento com o inibidor SP600125, foi detectada uma marcada redução na expressão de α-SMA em comparação com aquela do grupo controle, fenômeno este indicativo de que fibroblastos parecem também constituir alvos terapêuticos relevantes para o efeito supressor do inibidor de JNK na silicose. Outros estudos utilizando sistema de células isoladas *in vitro* encontram-se em andamento de forma a investigar de forma mais aprofundada o efeito supressor do composto sobre macrófagos e fibroblastos pulmonares.

Por último, avaliamos a ativação da proteína JNK através de ensaio de western blot, quando foram verificados níveis da forma fosforilada da enzima (fosfo-JNK). Para tanto, inicialmente, foi realizado um ensaio de cinética de expressão de JNK no pulmão de camundongos silicóticos, quando observamos claro aumento da fosfo-JNK aos 28 dias pós-sílica em comparação com os valores observados no caso dos animais controles, instilados com salina (dados não mostrados). A avaliação do pulmão de camundongos silicóticos tratados com o inibidor de JNK revelou uma expressiva inibição da forma ativa desta MAPK nos animais silicóticos, reforçando a implicação desta quinase no processo silicótico.

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que:

1. A administração curativa do inibidor de JNK, SP 600125, nas doses de 2 e 5 mg/Kg, foi capaz de inibir o componente fibrótico do quadro silicótico em camundongos, no tempo de 28 dias, conforme atestado pela marcada diminuição da área de parênquima pulmonar ocupada por granulomas e do conteúdo de colágeno produzido;

2. As alterações da mecânica pulmonar associadas à silicose, incluindo tanto aumento na resistência como na elastância, foram igualmente suprimidas na condição do tratamento com o composto SP600125;

3. A geração de fatores inflamatórios no tecido pulmonar incluindo a quimiocina KC, porém não a MCP-1, e de fatores prófibróticos TNF-α e TGF-β foi inibida pelo SP600125;

4. A presença de macrófagos e miofibroblastos no pulmão dos animais silicóticos, identificados através dos marcadores F 4/80 e α-SMA, respectivamente, foi sensível ao tratamento com SP 600125;

5. O aumento nos níveis de fosfo-JNK no parênquima pulmonar, verificado 28 dias após a provocação com a sílica, mostrou-se significantemente suprimido pelo composto SP 600125;

Tomados em conjunto, nossos achados mostram que o inibidor de JNK SP 600125 foi capaz de modular negativamente o quadro de resposta fibrótica verificado na condição da silicose, sugerindo fortemente que o uso desta classe farmacológica pode ser considerada como uma estratégia terapêutica inovadora a ser aplicada em casos doenças inflamatórias de natureza fibrótica.

REFERÊNCIAS

1 Abú-Shams, Fanlo P, Lorente MP. Silicosis. An Sist Sanit Navar 2005; 28 (1): 83-89.

2 Adcock IM, Chung KF, Caramori G, Ito K. Kinase inhibitors and airway inflammation. Eur J Pharmacol 2006; 533: 118-132.

3 Adiseshaiah P, Kalvakolanu DV, Reddy SP. A JNK- independent signaling pathway regulates TNF stimulated,c-Jun driven fra-1 protoncogene transcription in pulmonary epithelial cells. J Immun 2006; 177:7193-7202.

4 Albrecht C, Borm PJ, Adolf B, Timblin CR, Mossman BT. In vitro and in vivo activation of kinases by coal dusts and quartz silica. Toxicol and App Pharmcol 2002; 184:37-45.

5 Alcorn JF, van der Velden J, Brown Al, McElhinney B, Irvin CG, Janssen-Heininger YM. c-Jun N-terminal kinase 1 is required for the development of pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 2009 Apr; 40(4):422-432.

6 Algranti E, Handar Z, Ribeiro FSN, Bon AMT, Santos AM, Bedrikow B. Exposición a sílice y silicosis en Brasil (PNES). Ciencia & Trabajo 2004 Ene-Mar;6 (11):1-13.

7 Arndt PG, Young SK,Lieber JG, Fessler MB, Nick JA, Worthen SG. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase limits lipopolysaccharide –induced pulmonary neutrophil influx. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171:978-976.

8 Barbarin V, Nihoul A, Misson P, Arras M, Delos M, Leclercq I, Lison D, Haux F. The role of pro-and anti-inflammatory responses in silica-induced lung fibrosis. Respir Res 2005; 6(112):1-13.

9 Bennett BL, Sasaki DT ,Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP 600125, and anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 1381-1386.

10 Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N- terminal kinase. PNAS 2001 November 20; 98 (24):13681-13686.

11 Bennett BL. c-Jun N- terminal kinase- dependent mechanisms in respiratory disease. Eur Respir J 2006; 651-661.

12 Blackford JA, Jr., Antonini JM, Castranova V, Dey RD. Intratracheal instillation of silica up-regulates inducible nitric oxide synthase gene expression and increases nitric oxide production in alveolar macrophages and neutrophils. Am J Respir Cell Mol Biol 1994 Oct; 11(4):426-431.

13 Blease K, Leistein JC, Pai S, Groessl T, Shirdley M, Raymon HK. The small molecule JNK inhibitor, SP600125, attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis. Inflamm Res 2003; 52 (2):S153.

14 Bogoyevitch M, Arthur PG. Inhibitors of c-Jun N Terminal Kinases – JuNK no more? Bioch Bioph Acta 2008; 1784:76-93.

15 Bogoyevitch MA, Boehm I, Oakley A, Ketterman AJ, Bar RK. Targeting the MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potencial. Bioch Bioph Acta 2004; 1697:89-101.

16 Bogoyevitch MA, Fairlie DP. A new paradigm for protein kinase inhibition: blocking phosphorylation without directly targeting ATP binding. Drug Discov Today 2007 Aug; 12(15-16):622-633.

17 Bogoyevitch MA. Therapeutic promise of JNK ATP-noncompetitive inhibitors. TRENDS in Mol Med 2005 May;11(5):232-239.

18 Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. N Engl J Med .1994 Nov 10; 331(19):1286-1292.

19 Capitani EM, Algranti E. Outras pneumoconioses. J Bras Pneumol 2006; 32 (Supl 1): S54-S59.

20 Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, Carter AB, Rothman PB, Flavell RA, Sutterwalla SF. The Nalp 3 inflammassome is essential for the development of silicosis. PNAS 2008 July 1; 105 (26):9035-9040.

21 Castranova V, Frazer DG, Manley LK, Rey RD. Pulmonary alterations associated with inhalation of occupational and environmental irritants. Int Immunoph 2002; 2:163-172.

22 Castranova V, Vallyathan V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. En Health Persp 2000 August; 108 Suppl 4:675-84.

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

24 Charo IF, Randsohoff RM. The many roles of chemokines receptors in inflammation. N Engl J Med 2006 Feb 9; 354(6):610-621.

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

26 Clotier A, Ear T, Borissevitch O, Larive'e P, MacDonald PP. Inflamatory cytokine expression is independent of the c-Jun N-Terminal kinase /AP-1 signaling cascade in human neutrophils. J Imm 2003; 171:3751-3761.

27 Cobb M, Goldsmith EJ. How MAP Kinases are regulated*. J Biol Chem1995 June; 270 (25):14843-14846.

28 Cobb MH. MAP kinase pathways. Prog Bioph Mol Biol 1999; 71:479-500.

29 Corn JK. Historical aspects of industrial hygiene –II. Silicosis. Am Ind Hyg Assoc J 1980 Feb; 41(2): 125-133.

30 Craighead JE, Kleinerman J, Abraham JL, Gibbs AR, Green FHY, Harley RA, Ruttner JR, Vallyathan NV, Juliano EB. Diseases associated with exposure to silica and non-fibrous silicate minerals. Arch Pathol Lab Med 1998; 112:673-720.

31 Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases .Cell 2000 Octuber 13; 103:239-252.

32 Davis RJ. The mitogen – activated protein kinase signal transduction pathway. J Biol Chem 1993 July 15; 268 (20):14553-14556.

33 Ding M, Shi X, Lu Y, Huang C, Leonard S, Roberts J, Antonini J, Castranova V, Vallyathan V. Induction of activator protein-1 through reactive oxygen species by crystalline silica in JB6 cells. J Biol Chem 2001 March 23; 276(12): 9108-9114.

34 Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP Kinases in the immune response. Annu Rev Immunol 2002; 20:55-72.

35 Dunn KL, Farrant JL, Langford PR, Kroll JS. Bacterial [Cu,Zn]-cofactored superoxide dismutase protects opsonized, encapsulated Neisseria meningitides from phagocytosis by human monocytes /macrophages. Infect Immun 2003 Mar; 71 (3):1604-1607.

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 Eferi R, Hasselblatt P, Rath M, Popper H, Zenz R, Komnenovic V, Idarraga MH, Kenner L, Wagner EF. PNAS 2009 July 29; 105(30):10525-10530.

38 Elmes PC, Wagner JC. Fibrosis of lung- an environmental disease? J Clin Path; 12 (31 Roy.Coll.Path): 158-164.

39 English JM, Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. TRENDS Pharmacol Sc 2002 January; 23(1):40-45.

40 Eynott PR, Nath P, Leung SY, Adcock IM, Bennett BL, Chung KF. Allergen –induced inflammation and airway epithelial and smooth muscle cell proliferation: role of Jun N-terminal kinase. Br J Pharm 2003; 140:1373-1380.

41 Eynott PR, Xu L, Bennett BL, Noble A, Leung SY, Nath P, Groneberg DA, Adcock IM, Chung F. Effect of an inhibitor of Jun N-terminal protein kinase,SP600125,in single allergen challenge in sensitized rats. Immun 2004; 112:446-453.

42 Faffe DS, Silva GH, Kurtz PM, Negri E, Capelozzi VL, Rocco PRM, Zin WA. Lung tissue mechanics and matrix composition in a murine modelo f silicosis. J Appl Physiol 2001; 90:1400-1406.

43 Filho TM, Santos UP. Silicose. J Bras Pneumol 2006; 32(1): S41-S7.

44 Fishwick D. Pneumoconiosis. Med 2004; 109-110.

45 Franchi L, Eigenbrod, Muñoz-Panillo R, Nuñes G. Nat Imm 2009 March;10(3):241-247.

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

47 FUNDACENTRO.2008 [cited; Available from: http://www.fundacentro.gov.br

48 Garcia CSNB, Protas LFM, Morales MM, Romero PV, Zin WA, Rocco PRM. Understanding the mechanisms of lung mechanical stress. Brz J Med Biol Res 2006; 39: 697-706.

49 Gevernois PA, Sergent G, De Maertelaer V, Gouat F, Yernault JC, De Vuyst P. Micronodules and emphysema in coal mine dust or sílica exposure: relation with lung function. Eur Respir J 1998 Nov; 12(5):1020-1024.

50 Giuseppe MD, Gambelli F, Hoyle GW, Lungarella G, Studer SM, Richards T, Yousem S, McCurry K, Dauber J, Kaminski N, Leikauf G, Ortiz LA. Systemic inhibition of NF-κB activation protects from silicosis. PLoS 2009 May; 4 (5):1-14.

51 Green FY, VallyathanV.Pathologic responses to inhaled silica. In: Silica and Silica-Induced Lung Diseases. Boca Raton, FL 1996;CRC Press, 39-59.

52 Greenberg MI, Waksman J, Curtis J. Silicosis: A Rev. Dis Mon 2007 August; 53:394-416.

53 Griffith B, Pendayala S, Hecker L, Lee PJ. NOX enzymes and pulmonary disease. Antioxid Redox Sig 2009 Mar 30.

54 Hamilton RF, Jr, Thakur SA, Holian A.Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. Free Radic Biol 2008 April 1; 44(7): 1246- 1258.

55 Hamilton RF, Jr, Thakur SA, Mayfair JK, Holian A. MARCO mediates silica uptake and toxicity in alveolar machophages from C57BL/6 mice. J Biol Chem 2006 November 10; 281(45):34218-34226.

56 Han Z, Boyle L, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning AM, Firestein GS. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. J Clin Invest 2001; 108:73-81.

57 Harington JS. Fibrogenesis .Environmental Health Perspectives 1974; 9: 271-279.

58 Hess J, Angel P, Kistner MS.AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. Journal of Cell Science 2004; 117:5965-5973.

59 Himes SR, Sester DP, Ravasi T, Cronau SL, Samono T, Hume DA. The JNK are important for development and survival of macrophages. J Immun 2006; 176: 2219-2228.

60 Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. J Invest Dermatol 2007; 127:526-537.

61 Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase- dependent, Smad4-independent pathway. EMBO J 1999 Mar 1; 18(5):1345-1356.

62 Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fritzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. Nat Immun 2008 August; 9 (8) 847-856.

63 Huaux F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. Cur Op Allerg Clin Immun 2007; 7: 168-173.

64 Hubbard AK, Thibodeau M, Giardina C. Cellular and molecular mechanisms regulating silica-induced adhesion molecule expression in mice. J Environ Pathol Toxicol Oncol 2001; 20(Supp 1): 45-51.

65 Iyer R, Hamilton RF, li L, Holian A. Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor in human alveolar macrophages. Toxicol App Pharmacol 1996 Nov; 141(1): 84-92.

66 Jargidar J, Begin R, Dufresne A, Goswami S, Lee TC, Rom WN. Transforming growth factor –beta (TGF-beta) in silicosis. Am J Resp Cr Care Med 1996 Oct; 154(4 Pt 1): 1076-1081.

67 Jefrey KL, Camps M, Rommel C, Mackay CR. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signaling and immune responses. Drug Disc 2007 May; 6:391-403.

68 Johnson GL, Lapadat R. Mitogen- activated protein kinase patways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science 2002 December 6; 298:1911-19112.

69 Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica 9^0 ed. Ed Guanabara koogan 1999.

70 Kaminska B. MAPK signaling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy – from molecular mechanisms to therapeutic benefits. Bioch Bioph Acta 2005; 1754: 253-262.

71 Karin M. The regulation of AP-1 activity by Mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem 1995 July 14; 270(28): 16483-16486.

72 Keane MP, Strieter RM. The importance of balanced pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease. Respir Res 2002 Oct 15; 3(5).

73 Khalil N, Xu YD, O'Connor R, Duronio. Proliferation of interstitial fibroblasts is mediates by transforming growth factor-β1-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK. J Biol Chem 2005 December 30; 280 (52): 4300-43009.

74 Kinnula VL. [Oxidant and antioxidant properties of lung cells]. Duodecim; laaketieellinen aikakauskirja. 1992; 108 (14):1246-1252.

75 Koeyano T, Kowithayakornd T, Umezawa K. Suppression of TGF-β signaling by conophyline via upregulation of c-Jun expressions. Cell Mol Life Sci 2003; 60:2516-2525.

76 Kovacs EJ, DiPietro LA. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. Faseb J.1994 August; 8 (11):854-61.

77 Krishna M, Narang H.The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. Cell Mol Life Sci 2008; 65: 3525-3544.

78 Kulcsar Neto, F. Sílica manual do trabalhador. São Paulo: FUNDACENTRO 1995.

79 Langley RJ, Kalra R, Mishra NC, Hahn FF, Boroujerdi SR, Singh SP. A biphasic response to silica.I. Immunostimulation is restricted to the early stage of silicosis in Lewis Rats. Am J Respir Cell Mol Biol 2004; 30: 823-829.

80 Lee HS, Kim HJ, Moon CS, Chong YH, Kang JL. Resp Res 2004; 5 (23):1-15.

81 Levitzky MG. Fisiologia Pulmonar. 6^0 ed. Ed Manole 2004.

82 Manning AM, Davis RJ. Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? Nature 2003 July; 2: 554-565.

83 Mossamn BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157:1666-1680.

84 Mossman BT, Lounsbury KM, Reddy SP. Oxidants and signaling by mitogen-activated protein in lung epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 2006; 34:666-669.

85 Nath P, Eynott PR, Leung SY, Adcock IM, Bennett BL, Chung KF. Potential role of c-Jun NH_2 –terminal kinase in allergic airway inflammation and remodeling: effects of SP600125. Eur J Pharmacol 2005; 506:273-283.

86 OMS. Organização Mundial de Saúde. 1986[cited 2008 15/08]; Available from: http://www.who.int/occupational_health

87 Otsuki T, Maeda M, Murakami S, Hayashi H, Miura Y, Kusaka M, Nakano T, Fukuoka K, Kishimoto T, Hyodoh F, Ueki A, Nishimura Y. Immunological effects of silica and asbestos. Cell & Mol Immunol 2007; 4(4):261-268.

88 Palencada A, Kobzik L. Alveolar macrophage-environmental particle interaction: analysis by flow cytometry. Methods (San Diego, Calif.2000 Jul; 21(3):241-247.

89 Palencada A, Kobzik L. Receptors for unopsonized particles: the role of alveolar macrophage scavenger receptors. Cur Mol Med 2001 Nov; 1(5): 589-595.

90 Palencada A, Paulauskis J, Al-Mutairi E, Imrich A, Qin G, Suzuki H, e cols. Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles. J Exp Med 1999 May 3; 189 (9):1497-1506.

91 Perason G, Robinson F, Gibson TB, Xu BE, Karadikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. End Rev; 22 (2): 153-183.

92 Peretz A, Checkoway H, Kaufman JD, Trajber I, Lerman Y. Silica, silicosis and lung cancer. IMAJ 2006; 8:114-118.

93 Pernis B. Silica and the immune system. Acta Biomed 2005; 2:38-44.

94 Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. Proc Am Thorac Soc 2008; 5:334 - 337.

95 Pimienta G, Pascual J. Canonical and alternative MAPK signaling. Cell Cycle November 2007; 6(21):2628-2632.

96 Poli G, Parola M. Oxidative damage and fibrogenesis. Free Rad Biol & Med 1997; 22(1-2): 287-305.

97 Porter DW, Hubbs AF, Mercer R, Robinson VA, Ramsey D, McLaurin J, Khan A, Batelli L, Brumbaugh K, teass A, Castranova V. Progression of lung inflammation and damage in rats after cessation of silica inhalation. Toxicol Sciences 2004; 79:370-380.

98 Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts I. Paracrine cells important in health and disease. Am J Phys.1999 Jul; 227(1 Pt 1): C1-9.

99 Qi M, Elion EA. MAP kinase pathways. Journal of Cell Science 2005; 118:3569-3572.

100 Ramam M, Chen W, Cobb MH. Diferential regulation and properties of MAPK. Oncogene 2007; 26: 3100-3112.

101 Rees D, Murray J. Silica,silicosis e tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2007; 11(4): 356-369.

102 Rimal B, Greenberg AK, Rom WN, .Basic pathogenic mechanisms in silicosis: current understanding. Cur Op Pulm Med 2005 Mar; 11(2): 169-173.

103 Rocco PR, Momesso DP, Figueira RC, Ferreira HC, Cadete RA, Legora-Machado A, Koatz V, Lima LM, Barreiro EJ, Zin WA. Therapeutic potencial of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. Eur Respir J.2003 Jul; 22(1):20-27.

104 Rocco PRM, Negri EM, Kurtz PM, Vasconcellos FP, Silva GH, Capelozzi VL, Romero PV, Zin WA. Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med 2001; 164:1067-1071.

105 Sappino AP, Schurch W, Gabbiani G. Differentiation repertorie of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. Laboratory insvetigation; a journal of technical methods and pathology.1990 Aug; 63 (2):144-61.

106 Schafer M, Werner S. Transcriptional control of wound repair. Annu Rev Cell Dev Biol.2007; 23:69-92.

107 Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. FASEB J 1995; 9:726-735.

108 Shen F, Fan X, liu B, jia X, Du H, You B, Ye M, Huang C, Shi X.Overxpression of cyclin D1-CDK4 in silica-induced transformed cells is due to activation of ERKs, JNKs/AP-1 pathway. Toxicol Letters 2006; 160:185-195.

109 Shukla A, Nino MR, Mossman B. Cell signaling and transcription factor activating by asbestos in lung injury and disease. Int J Bioch & Cell Biol 2003; 35:1198-1209.

110 Shukla A, Timblin CR, Hubbard AK, Brayman J, Mossman BT. Silica –induced activation of c-Jun-NH_2 –terminal amino kinases,protracted expression of the activator protein-1 proto-oncogene, fra-1, and S-Phase alterations are mediated via oxidative stress. Canc Res 2001 March 1; 61:1791-1795.

111 Stronach B. Dissecting JNK signaling, one KKKinase at a time. Dev Dynam 2005; 232: 575-584.

112 Terra Filho M, Santos UP. Silicose. J Bras Pneumol 2006; 32 (Supl 1): S41-S47.

113 Thakur SA, Bearmer, Migliaccio CT, Holian A. Critical role of MARCO in crystalline silica-induced pulmonary inflammation. Toxicol Sc 2009; 108 (2):462-471.

114 Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPK and their relevance to arthritis and inflammation. Rheumatol 2008; 409-414.

115 Tony Ip Y, Davis RJ. Signal transduction by the by c-Jun N-terminal kinase (JNK) from inflammation to development. Cur Op Cell Biol 1998; 10-205-219.

116 Utsugi M, Dobashi K, Ishizuka T, Masubuchi K, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M. c-Jun NH_2 Terminal Kinase mediates expression of connective tissue growth factor induced by transforming growth factor-1 in human lung fibroblasts. Am J Respir Cell Mol Biol 2003; 28:754-761.

117 Vanhée 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.

118 Vincenti MP, Brienckerhoff CE. The potencial of signal transduction inhibitors for the treatment of arthritis: is it all just JNK? J Clin Invest 2001; 108:73-81.

119 Wang X, Liu Y. Regulation of innate response by MAP kinase phosphatase-1. Cell Signal 2007; 19:1372-1382.

120 Wen XS, Pascual FR, Lamas S, Holmes A, Howat S, Pearson JD, Dashwood MR, Bois RMD, Denton CP, Black CM, Abraham DJ, Leask A. Constitutive ALK-5-independent c-Jun N-Terminal kinase activation contributes to endothelin-1 overexpression in pulmonary fibrosis: Evidence of an autocrine endothelin loop operating through the endothelin A and B receptors. Mol Cell Biol 2006 July; 5518-5527.

121 Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. Curr Op Gen & Dev 2002; 12:14-21.

122 Wong FWS. Inhibitors of the tyrosine kinase signaling cascade for asthma .Curr Op Pharmacol 2005; 5:264-271.

123 Zar JH. Bios Anal.3th ed .New Jersey.1996.