

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

***TATIANA MARON GUTIERREZ***

TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES  
DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA EM MODELO  
MURINO DE SILICOSE

RIO DE JANEIRO

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

***TATIANA MARON GUTIERREZ***

TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES  
DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA EM MODELO  
MURINO DE SILICOSE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Orientadores: Marcelo Marcos Morales  
Patrícia Rieken Macedo Rocco



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2009**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**“TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES DERIVADAS DE MEDULA  
ÓSSEA EM MODELO MURINO DE SILICOSE”**

**TATIANA MARON GUTIERREZ**

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE  
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)**

**Rio de Janeiro, 12 de Fevereiro de 2009.**

---

**Dra. REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG**

---

**Dr. MARCELO EINICKER LAMAS**

---

**Dra. PATRICIA MACHADO RODRIGUES E SILVA MARTINS**

---

**Dr. MARCELO MARCOS MORALES (ORIENTADOR)**

---

**Dra. PATRICIA RIEKEN MACEDO ROCCO (ORIENTADOR)**

---

**Dra. DORIS ROSENTHAL (REVISOR)**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular e no Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-FAPERJ).

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores Marcelo Morales e Patrícia Rocco, meus orientadores, por me ensinarem os caminhos da pesquisa científica. Trago como referência o importante trabalho que realizam como pesquisadores, professores e orientadores. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e pela dedicação.

À professora Christina Takyia, pela participação essencial na elaboração de técnicas histológicas e discussão sobre o presente trabalho.

Ao professor Milton Moraes e Ramon Peçanha, pela realização dos experimentos de PCR em tempo real e pela amizade. Agradeço também as suas alunas, Ana Beatriz Robotton, Cynthia Chester, Alejandra e Luana.

À Raquel, Débora Ornellas, Débora Xisto, Mariana Oliveira e Fernanda Cruz, que fizeram parte das etapas deste projeto e cuja participação foi fundamental para torná-lo realidade.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular: Felipe O, Roberta, Sabrina, Miquéias, Carol, Carolzinha, Horácio, Jackson, Felipe P, Vera e Helber. Obrigada pelos ensinamentos e por tornar o nosso ambiente de trabalho tão especial.

Aos amigos do Laboratório de Investigação Pulmonar: Cristiane, Indianara, Gisele, Johnatas, Soraia, Mariana, Pedro e Andréia. Aprendi e continuo aprendendo muito com vocês. Obrigada pelo incentivo e por poder contar sempre com vocês.

Às minhas amigas queridas, Patrícia, Aninha, Bárbara, Helena e Flávia, que estão sempre ao meu lado.

Ao André, Vivi, Verônica e Jack, que estão sempre dispostos a ajudar com atenção e dedicação para que tudo corra bem no Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular e no Laboratório de Investigação Pulmonar.

À professora Dóris pela revisão da dissertação. Muito obrigada.

Aos meus pais, pelos ensinamentos valiosos e força para continuar sempre.

À minha irmã Débora, por sempre me apoiar, estimular e por me amparar.

À minha madrinha, Teresa, pelo carinho, apoio, incentivo e impressões coloridas.

Ao meu namorado, Fabio, pelo amor, incentivo, paciência, compreensão e por manter meus pés no chão.

A todos da minha família pela alegria, incentivo e palavras amigas.

A todos os amigos que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

## **RESUMO**

MARON-GUTIERREZ, Tatiana. Terapia com células mononucleares derivadas de medula óssea em modelo murino de silicose. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

A silicose é uma doença fibrosante do parênquima pulmonar causada por inalação de partículas de sílica, sendo que, até o momento, não há nenhuma terapia eficaz disponível. Este estudo visa a testar a hipótese de que a terapia com células mononucleares derivadas de medula óssea (CMMO) é importante na prevenção do processo inflamatório e de fibrose pulmonar na silicose. Trinta e dois camundongos fêmeas C57BL/6 foram aleatoriamente divididos em 4 grupos (n=8/cada). Os camundongos foram anestesiados com sevoflurano e receberam instilação intratraqueal de salina (50  $\mu$ l, C) ou suspensão de sílica (SiO<sub>2</sub>; 20 mg/50  $\mu$ l de solução salina, SIL). As células mononucleares derivadas de medula óssea foram geradas a partir de camundongos doadores do sexo masculino. Uma hora após a instilação de salina ou sílica, as CMMO ( $2 \times 10^6$ ) foram injetadas via jugular (C-Cell e SIL-Cell, respectivamente). Após quinze dias, a elastância estática do pulmão (Est,L) e as pressões necessárias para vencer os componentes resistivos ( $\Delta P1,L$ ) e viscoelásticos ( $\Delta P2,L$ ) do pulmão foram mensurados. Os pulmões foram fixados em formol 10% tamponado, e corados com hematoxilina-eosina e Sirius red. A avaliação histológica dos animais tratados com sílica demonstrou edemas intersticial e alveolar, e a presença de granulomas com grande acúmulo de células inflamatórias. A Est,L (177%),  $\Delta P1,L$  (150%), e  $\Delta P2,L$  (177%), a quantidade de fibras colágenas no parênquima pulmonar (152%) e no granuloma (65%) e o número de macrófagos ativados (141 %) foram maiores no grupo SIL em comparação a C. A terapia com as células mononucleares derivadas de medula óssea reduziu a fração de área do granuloma, bem como evitou alterações no número de macrófagos ativados, no conteúdo de fibras colágenas e na mecânica pulmonar. No entanto, não foi constatada a presença de células mononucleares derivadas de medula óssea no parênquima pulmonar. Em conclusão, as células mononucleares derivadas de medula óssea atuaram no processo inflamatório e de fibrogênese levando a melhora morfofuncional.

## **ABSTRACT**

MARON-GUTIERREZ, Tatiana. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy in a murine model of silicosis. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Silicosis is a chronic lung fibrotic disorder caused by prolonged inhalation of silica particles with no available effective therapy. This study tests the hypothesis that bone marrow derived mononuclear cell (BMMC) therapy is important in preventing lung inflammation and fibrosis in silicosis. Thirty-two female C57Bl/6 mice were randomly divided into 4 groups (n=8/each). Mice were anesthetized with sevoflurane and received intratracheal instillation of either saline (50  $\mu$ l, C) or silica suspension (SiO<sub>2</sub>; 20 mg/50  $\mu$ l in saline, SIL). BMMC were generated from male donor mice. One hour after saline or silica instillation, BMMC ( $2 \times 10^6$ ) were intravenously injected (C-Cell and SIL-Cell, respectively). At day fifteen, lung resistive ( $\Delta P1,L$ ) and viscoelastic pressures ( $\Delta P2,L$ ) and static elastance (Est,L) were measured. Lungs were fixed in 10% formalin and stained with haematoxylin-eosin and Sirius red. Silica-stimulated macrophages were counted (lectin histochemistry). Histological evaluation of silica-treated mice demonstrated interstitial and alveolar edema, and granulomatous nodules with great accumulations of inflammatory cells. Lung Est (177%),  $\Delta P1$  (150%), and  $\Delta P2$  (177%), the amount of collagen fibers in alveolar septa (152%) and into the granuloma (65%) and the number of activated macrophages (141%) were higher in SIL group compared to C. BMMC therapy reduced the size of granuloma as well as avoided changes in the number of activated macrophages, collagen fiber content and lung mechanics. Nevertheless, BMMC were not observed in lung parenchyma. In conclusion, bone marrow derived mononuclear cells acted both in inflammatory and fibrogenic processes leading to lung mechanical and morphological improvement.

## **SUMÁRIO**

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
I.1 – O Sistema Respiratório	1
I.2 – Silicose	4
I.2-1 – Fisiopatologia	7
I.2-2 – Formas de manifestação clínica e patologia	13
I.2-3 – Diagnóstico	14
I.2-4 – Tratamento	16
I.2-5 – Estudos Experimentais	17
I.2-6 – Estudos Clínicos	18
I.3 – Células-Tronco	19
I.3-1 – Células-Tronco Embrionárias	21
I.3-2 – Células-Tronco Adultas	22
I.3-3 – Células-Tronco de Medula Óssea	22
I.3-4 – Mecanismos de Ação	24
I.3-5 – Terapia Celular em Doenças Respiratórias	25
II. OBJETIVOS	29
II.1 – Objetivo Geral	29
II.2 – Objetivos Específicos	29
III. MATERIAIS E MÉTODOS	30
III.1 – Animais Utilizados	30
III.2 – Grupos Experimentais	30
III.3 – Protocolo experimental	31
III.3-1 – Instilação dos animais	31
III.3-2 – Extração de Células Mononucleares de Medula Óssea (CMMO)	31
III.3-3 – Contagem de Células	32

III.3-4 – Injeção de Células Mononucleares de Medula Óssea	33
III.4 - Mecânica Respiratória	33
III.5 – Remoção dos Pulmões	39
III.6 - Análise Histológica	39
III.6-1 – Histopatologia	39
III.6-2 – Análise morfométrica no granuloma	39
III.6-3 – Detecção e quantificação dos macrófagos pulmonares através de imunomarcagem para a glicoproteína F4/80	41
III.6-4 – Detecção e quantificação dos macrófagos pulmonares através da marcação de radicais carboidráticos	42
III.6-5 – Histoquímica para quantificação de fibras colágenas	43
III.7 – Extração de DNA	44
III.8 – PCR em tempo real – SYBR Green I®	45
III.9 – Análise Estatística	48
IV. RESULTADOS	49
IV.1 – Mecânica Respiratória	49
IV.2 – Análise Histológica	51
IV.2-1 – Histopatologia	51
IV.2-2 – Análise morfométrica no granuloma	53
IV.2-3 – Detecção e quantificação dos macrófagos pulmonares através de imunomarcagem para a glicoproteína F4/80	54
IV.2-4 – Detecção e quantificação dos macrófagos pulmonares através da marcação de radicais carboidráticos	56
IV.2-5 – Histoquímica para quantificação de fibras colágenas	58
IV.3 – Detecção do cromossomo Y	60
V. DISCUSSÃO	63
VI. CONCLUSÕES	69
VII. REFERÊNCIAS	70

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1 - Representação esquemática da fisiopatologia da silicose	9
Figura 2 – Representação esquemática do método de oclusão ao final da inspiração	37
Figura 3 – Representação esquemática do retículo utilizado para a técnica de contagem de pontos	40
Figura 4 – Curva de diluição do DNA extraído	46
Figura 5 – Elastância estática e variações das pressões pulmonares	50
Figura 6 – Fotomicrografias do parênquima pulmonar corado com hematoxilina-eosina	52
Figura 7 – <i>Box plot</i> da quantificação da fração de área de granulomas	53
Figura 8 – Detecção e quantificação dos macrófagos pulmonares através de imunomarcação para a glicoproteína F4/80	55
Figura 9 – Detecção histoquímica da lectina <i>Griffonia</i> e quantificação de macrófagos ativados	57
Figura 10 – Detecção de fibras colágenas e quantificação do conteúdo de colágeno	59
Figura 11 – Curva de amplificação do SRY e GAPDH	61
Figura 12 – Nível de detecção do gene SRY	62

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1 – Classificação em relação ao potencial de diferenciação celular.	20
Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados para o PCR em tempo real	48
Tabela 3 – Quantificação da celularidade no granuloma.	53

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

$\Delta P_{1,L}$  – Variação de pressão resistiva do pulmão

$\Delta P_{2,L}$  – Variação de pressão viscoelástica e/ou inhomogênea do pulmão

$\Delta P_{tot,L}$  – Variação total de pressão pulmonar do pulmão

BSS – Solução salina balanceada

DAB – Diaminobenzidina

DMEM – *Dulbecco Modified Eagle Medium*

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

DEPC – Dietil pirocarbonato

Est,L – Elastância estática do pulmão

GFP – Proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)

GM-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio

HE – Hematoxilina e eosina

HSC – Célula tronco hematopoética (*hematopoietic stem cell*)

IFN- $\gamma$  – Interferon gama

IL-1 $\beta$  – Interleucina-1 $\beta$

IL-2 – Interleucina-2

IL-4 – Interleucina-4

IL-10 – Interleucina-10

IT – Intratraqueal

IV – Intravenoso

LPS – Lipopolisacarídeo

MIP – Proteína Inibitória de Macrófago

MMPs – Metaloproteinases de Matriz

MMP-2 – Metaloproteinase de Matriz 2

MMP-9 – Metaloproteinase de Matriz 9

MSC – Célula tronco mesenquimal (*mesenchymal stem cell*)

Pel – Pressão de retração elástica pulmonar

Pi – Pressão pulmonar no ponto de inflexão

Pmax – Pressão pulmonar máxima atingida

RNAm – Ácido Ribonucléico Mensageiro

rpm – Rotações por minuto

PCR em tempo real – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SiO<sub>2</sub> – Dióxido de silício

TGF-β – Fator Transformador de Crescimento Beta

TIMP-1 – Inibidor Tecidual da Metaloproteinase de Matriz do tipo 1

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

V<sub>T</sub> – Volume corrente

## **I. INTRODUÇÃO**

### **I.1 – O Sistema Respiratório**

A função básica do sistema respiratório é suprir o organismo com oxigênio ( $O_2$ ) e dele remover o produto gasoso do metabolismo celular, isto é, o dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Tal função é executada de forma adequada quando existe um estreito contato entre o gás alveolar e o capilar pulmonar. Nos seres humanos, a superfície encarregada das trocas gasosas é de 70 a 100  $m^2$  (WEST 1995), contida no interior do tórax, distribuída por aproximadamente 300 milhões de alvéolos pulmonares. Para que as trocas gasosas entre o gás alveolar e o sangue se efetuem adequadamente, a circulação pulmonar é muito rica, sendo de apenas 0,5 micrômetro a espessura entre o tecido a separar o gás alveolar e o sangue (ZIN & ROCCO 1999). Esta estrutura extremamente adaptada é denominada membrana alvéolo-capilar (WEST & MATHIEU-COSTELLO 1999).

A membrana alvéolo-capilar pode ser representada por uma camada endotelial vascular separada do epitélio alveolar por um espaço intersticial extremamente fino onde se depositam os componentes da matriz extracelular (WARE & MATTHAY 2000). A barreira epitelial é formada por dois tipos celulares denominados pneumócitos tipos I e II. Os pneumócitos tipo I são células achatadas, extremamente finas, que totalizam aproximadamente 90% do epitélio alveolar e estão facilmente sujeitos à lesão. Estas características estruturais fazem com que a espessura para difusão na troca gasosa que ocorre através da interface gás-sangue seja a menor possível. Os pneumócitos tipo II, mais resistentes, são células cuboidais com microvilos na superfície apical que compõem os 10% restantes do epitélio alveolar. Essas células são especializadas na síntese e secreção do surfactante alveolar, uma substância tenso-ativa que é armazenada nos corpos

lamelares e tem a função de manter os alvéolos abertos. A interação entre esses dois tipos celulares constitui a principal barreira à passagem de fluidos (água e íons) para o interior do espaço alveolar. A perda da integridade da barreira epitelial alveolar é um fator inerente para o aumento da permeabilidade acarretando o influxo de exudato que, em última análise, contribuirá para a redução da troca gasosa (CARDEN e cols 1998).

Além de exercer importante papel na condução do ar ambiente para os alvéolos, o epitélio pulmonar é fundamental para proteger o organismo contra antígenos e partículas inaladas advindas do meio externo. As células secretórias e as células ciliares funcionando de maneira adequada e em conjunto, permitem a formação de um eficiente sistema de *clearance* mucociliar (KNIGHT & HOLGATE 2003) responsável pela remoção de tais antígenos e partículas do ambiente pulmonar. Uma vez inaladas, as partículas depositam-se principalmente nos bronquíolos respiratórios e alvéolos. Se o *clearance* mucociliar não for capaz de remover as partículas, elas acabam por induzir um processo inflamatório, caracterizado inicialmente como uma alveolite, podendo evoluir para a fase de fibrose (TERRA FILHO & SANTOS 2006).

O espaço intercelular compreendido entre as barreiras endotelial vascular e epitelial alveolar é preenchido pela matriz extracelular (MEC). A matriz extracelular pode ser definida como uma rede de macromoléculas sintetizadas e secretadas localmente por células do tecido conjuntivo. Sua principal função consiste em fornecer suporte e manutenção estrutural ao tecido (RAGHOW 1994). Ademais, a matriz extracelular é capaz de influenciar processos biológicos como morfogênese, migração e diferenciação celulares. Sua composição está relacionada ao tipo celular que a sintetiza, ao estado metabólico e de diferenciação. As macromoléculas que

compreendem a matriz extracelular podem ser agrupadas em três classes funcionais: (1) proteínas fibrosas como o colágeno e a elastina, (2) proteínas estruturais como a fibronectina e a laminina e (3) proteoglicanos (PELOSI e cols 2007). Cada componente da matriz está perfeitamente organizado para as necessidades individuais das células num determinado órgão, permitindo a manutenção da homeostase, a diferenciação de cada estágio do desenvolvimento e adaptações frente a novos estímulos.

Apesar de particularidades funcionais e estruturais, os diversos tipos de colágeno têm estrutura química e organizacional semelhantes. A molécula de colágeno resulta da associação de três cadeias alfas polipeptídicas em tripla hélice formando homo ou heterotrímeros. Os fibroblastos são as principais células produtoras de colágeno nos pulmões. As diferentes cadeias são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, sob a forma de um polipeptídeo conhecido como pró-colágeno. Estas moléculas se associam de modo complexo, constituindo fibrilas e fibras. As diferenças nos tipos de colágeno residem na composição primária de suas moléculas, no tipo de agregação extracelular e na capacidade de formarem ou não estruturas fibrilares. Dependendo dos tipos de cadeias alfa que os compõem, os colágenos são designados como de tipos I, II, III, IV, V, VI, etc. O colágeno tipo III forma fibrilas que corresponde às fibras reticulares e, quase sempre, aparece co-distribuído com o colágeno tipo I, presente em tecidos que necessitam de um arcabouço estrutural maleável, como os pulmões (PELOSI e cols 2007). Durante os processos de reparo e na fibrose em geral, o colágeno III é o primeiro a ser depositado, sendo posteriormente substituído pelo colágeno tipo I (SANTOS e cols 2006).

Em determinadas situações o desequilíbrio entre a síntese e a degradação resulta na deposição ou retirada excessivas das macromoléculas que compõem a matriz extracelular. Os fenômenos que envolvem o remodelamento da matriz extracelular necessitam de enzimas específicas para iniciar a degradação da matriz como as metaloproteinases (MMPs). A atividade enzimática da matriz extracelular é regulada pelo balanço entre as MMPs e seus inibidores específicos, como por exemplo, os inibidores das metaloproteinases teciduais (TIMP) (SHAPIRO & SENIOR 1999). A perda do equilíbrio entre a expressão das MMPs e seus inibidores pode acarretar lesão tecidual (p.ex. doenças inflamatórias). O restabelecimento funcional de um tecido conjuntivo funcional torna-se o principal objetivo no processo de reparo que irá ocorrer através da deposição de macromoléculas fibrosas e não fibrosas da matriz extracelular bem como seu remodelamento pelas metaloproteinases (PARKS 2003).

## **I.2 – Silicose**

A silicose é uma doença fibrosante do parênquima pulmonar causada por inalação de partículas de sílica ( $\text{SiO}_2$  – dióxido de silício), um dos minerais mais abundantes na Terra (GARN e cols 2000, O'REILLY e cols 2005, DAVIS e cols 2006). A sílica é freqüentemente encontrada na poeira formada durante o processamento de minerais ou materiais rochosos quando cortados, perfurados, triturados ou escavados (RAYMOND & WINTERMEYER 2006).

A partícula de sílica pertence a um grupo muito comum de minerais e pode se apresentar na forma não cristalina (amorfa) ou na forma cristalina (RAYMOND & WINTERMEYER 2006). Embora a sílica amorfa seja biologicamente menos ativa que a sílica cristalina, grandes quantidades desse material também podem levar a

lesão pulmonar. Entretanto, a forma cristalina da sílica apresenta maior importância na patogênese da silicose (RAYMOND & WINTERMEYER 2006, GREENBERG e cols 2007).

A superfície da partícula de sílica tem importância fundamental na patogenicidade da doença. As partículas recém-fraturadas são mais tóxicas aos macrófagos alveolares do que partículas mais antigas (VALLYATHAN e cols 1988), provavelmente, por haver um aumento no potencial de gerar radicais livres de oxigênio (GREENBERG e cols 2007). As partículas recém-fraturadas são as principais responsáveis pelo desenvolvimento de silicose pulmonar em trabalhadores.

A silicose pulmonar é, provavelmente, a doença ocupacional mais antiga dentro do grupo das pneumoconioses, sendo inicialmente descrita por Hipócrates, que observou dificuldade respiratória em mineradores (ABU-SHAMS e cols 2005). Medidas de higiene industrial que controlam a concentração de partículas de poeira carregadas pelo ar obtiveram sucesso na redução da prevalência e da gravidade da silicose em muitas indústrias, entretanto, a silicose ainda permanece como um problema de saúde em todo o mundo, apresentando alta incidência e prevalência nos países em desenvolvimento (13 a 31% - África do Sul; 22 a 55% - Índia) (ABU-SHAMS e cols 2005, RAYMOND & WINTERMEYER 2006) e, mesmo em países desenvolvidos, a exposição a partículas de sílica permanece elevada (SANDERSON e cols 2000). No Brasil, a silicose está em primeiro lugar na prevalência das pneumoconioses (DE CAPITANI 2006) devido a inúmeros ofícios que expõem os trabalhadores a um contato direto com a sílica, como por exemplo: extração e beneficiamento de rochas como o granito e pedras em geral, mineração de ouro, arsênico, estanho e pedras preciosas, perfuração de poços, indústrias cerâmicas, de

materiais de construção, de borracha, fabricação de vidro e de fertilizantes (rocha fosfática), em fundições e na produção de talco (comumente contaminado com sílica), operação e jateamento de areia, polimento de metais e minerais com abrasivos contendo sílica, e em atividades de manutenção de limpeza de fornos, moinhos e filtros. Nos últimos anos, tem-se descritos novos casos de silicose em técnicos de laboratórios dentários, devido à utilização de certos materiais que podem gerar poeira de sílica cristalina (ABU-SHAMS e cols 2005, TERRA FILHO & SANTOS 2006). Holanda e colaboradores encontraram uma prevalência de silicose de 27% em cavadores de poços no Ceará, sendo que esse indicador pode ser inferior em atividades profissionais que acarretem menor exposição (HOLANDA e cols 1995).

A silicose é a principal causa de invalidez entre as doenças respiratórias ocupacionais (TERRA FILHO & SANTOS 2006). De acordo com o Ministério da Saúde, o número aproximado de trabalhadores potencialmente expostos a poeiras contendo sílica no país é superior a seis milhões, sendo cerca de quatro milhões na construção civil, 500 mil em mineração e garimpo e acima de dois milhões em indústrias de transformação de minerais, metalurgia, indústria química, de borracha, cerâmicas e vidros (DE MESQUITA JUNIOR e cols 2006).

Existem três formas de apresentação clínica da silicose, que dependem da intensidade e da duração de exposição às partículas de sílica (ABU-SHAMS e cols 2005). A forma aguda ocorre geralmente após meses ou poucos anos de exposição elevada a partículas de sílica. Normalmente, ocorre rápida evolução para o óbito. A forma acelerada ocorre geralmente após um período de exposição de dez anos (TERRA FILHO & SANTOS 2006). A forma crônica, que é a mais comum, costuma

aparecer depois de muitos anos de exposição de baixa intensidade a partículas de sílica cristalina (COWIE 1998, MEIRELLES e cols 2006).

Além da silicose, exposições crônicas à poeira de sílica cristalina podem aumentar o risco de doença pulmonar obstrutiva crônica (HNIZDO & VALLYATHAN 2003), enfisema (HNIZDO e cols 1991) e tuberculose pulmonar (HNIZDO & MURRAY 1998), independentemente da presença ou não de silicose.

### **I.2-1 – Fisiopatologia**

As alterações patológicas são representadas pela presença de granulomas (SCABILLONI e cols 2005) ou nódulos inflamatórios de células mononucleares nos locais onde as partículas se acumulam (BORGES e cols 2002, SRIVASTAVA e cols 2002, O'REILLY e cols 2005), e acometem inicialmente as regiões peribronquiolares (MEIRELLES e cols 2006), com infiltração de células no parênquima pulmonar, seguida de ativação e proliferação de células residentes. Com o tempo, ocorre proliferação localizada e progressiva de fibroblastos e deposição de grande quantidade de colágeno. O colágeno central torna-se concêntrico e as células inflamatórias periféricas diminuem (MOSSMAN & CHURG 1998). Com a evolução da doença, os nódulos coalescem e colapsam uns aos outros, destruindo progressivamente o tecido pulmonar adjacente (DAVIS e cols 1999).

O remodelamento é um evento no qual a matriz extracelular é reciclada (SCABILLONI e cols 2005). Diversas células pulmonares, em particular fibroblastos, produzem novos componentes da matriz extracelular para a sua reconstrução (SCABILLONI e cols 2005). Durante o processo fibrogênico ocorre perda do equilíbrio entre a síntese e degradação da matriz extracelular. Há um aumento na degradação da matriz extracelular danificada e síntese excessiva de colágeno para

o reparo do tecido (SCABILLONI e cols 2005). As metaloproteinases da matriz (MMPs) participam de forma significativa no remodelamento tecidual, sendo predominantemente expressas em macrófagos alveolares. As MMPs são enzimas zinco-dependentes, que degradam os maiores componentes da matriz extracelular. São responsáveis pela degradação do tecido conjuntivo em nódulos fibróticos e das paredes alveolares, e têm sua expressão aumentada durante as fases iniciais de exposição a partículas de sílica (SCABILLONI e cols 2005). As cisteíno-proteases lisossomais, conhecidas por sua atividade de degradação de colágeno, também parecem ter um papel no desenvolvimento da fibrose pulmonar (VAN DEN BRULE e cols 2005, PERDEREAU e cols 2006).

As partículas de sílica são fagocitadas por macrófagos alveolares, que são ativados e danificados (O'REILLY e cols 2005), causando uma resposta inflamatória local (RAO e cols 2004). A partícula de sílica é capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio pelo macrófago (HAMILTON e cols 2007) (Figura 1), podendo resultar na ativação de fatores de transcrição que levam à expressão de genes e proteínas específicas que podem levar a lesão celular (GREENBERG e cols 2007). Nesse contexto, o óxido nítrico (NO) participa da inflamação e fibrose pulmonar induzida por partículas de sílica, podendo estimular a oxidação de lipídios induzida por espécies reativas de oxigênio (PORTER e cols 2006). Os macrófagos alveolares não são as únicas fontes de óxido nítrico no pulmão, leucócitos polimorfonucleares também produzem óxido nítrico, e células epiteliais tipo II são positivas para a óxido nítrico-sintase induzível (iNOS) (PORTER e cols 2006).

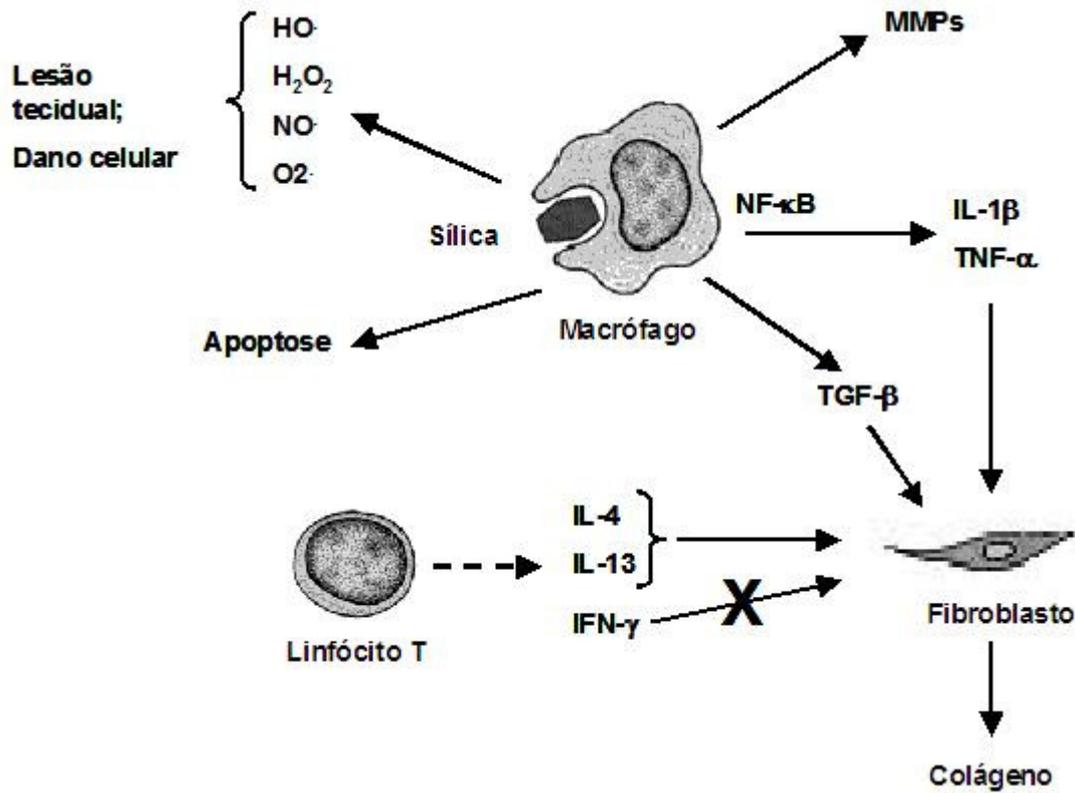


Figura 1 – Representação esquemática da fisiopatologia da silicose.

Note a endocitose da partícula de sílica pelo macrófago, com conseqüente liberação de metaloproteinases (MMPs), espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (HO.: hidroxila; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; NO.: óxido nítrico; O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>: superóxido), e fator transformador de crescimento (TGF)- β, interleucina (IL)-1β e fator de necrose tumoral (TNF)-α, que estão relacionados com a ativação do fator nuclear (NF)-κB. IL-1β, TNF-α e TGF-β estão envolvidos no processo de fibrose pulmonar. O macrófago também pode entrar em apoptose. Os linfócitos T podem liberar IL-4 e IL-13, que atuam na ativação e proliferação de fibroblastos, contribuindo também para a fibrose pulmonar. O interferon (IFN)-γ inibe a proliferação de fibroblastos e antagoniza a atividade fibrogênica (MARON-GUTIERREZ e cols 2008).

As células epiteliais tipo I podem sofrer lesão, ocorrendo aumento da ativação de macrófagos e indução de proliferação de células epiteliais tipo II (TERRA FILHO & SANTOS 2006). Eventos iniciais na silicose levam a liberação de citocinas (Figura 1). Os fatores de crescimento derivados de macrófagos, fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF)-1 e fator transformador de crescimento (TGF), são importantes nas doenças induzidas por partículas inorgânicas (SRIVASTAVA e cols 2002). Macrófagos ativados liberam citocinas pró-inflamatórias e mediadores citotóxicos como o peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e interleucina (IL)-1 $\beta$  (SRIVASTAVA e cols 2002) (Figura 1). O TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são mediadores envolvidos no início e progressão da inflamação pulmonar, assim como na subsequente fibrose pulmonar (BARBARIN e cols 2004). Nesse contexto, fibroblastos, especialmente miofibroblastos, quando em sua forma ativada, estão envolvidos na patogênese da fibrose (CHEN e cols 2005, O'REILLY e cols 2005), com proliferação e consequente acúmulo de colágeno (DAVIS e cols 2006).

Em adição à indução de liberação de citocinas, a sílica também induz apoptose nos macrófagos alveolares (SRIVASTAVA e cols 2002) (Figura 1). Os macrófagos alveolares participam da resposta celular inicial interagindo com partículas de sílica (MIGLIACCIO e cols 2007). Ademais, os macrófagos também estão relacionados à perpetuação do processo inflamatório em um ciclo vicioso: ao fagocitarem a partícula de sílica eles sofrem apoptose e liberam a sílica fagocitada no ambiente pulmonar, quando então outro macrófago pode fagocitar o mesmo grão de sílica e perpetuar o processo (SRIVASTAVA e cols 2002).

O processo fibrótico parece resultar de uma interação complexa entre fibroblastos e macrófagos. Os fibroblastos ao migrarem para a área de lesão são

estimulados a secretar colágeno e outras proteínas da matriz extracelular (MEC). Inicialmente, há deposição de colágeno tipo III, que é mais flexível e suscetível à quebra; porém, mais tardiamente, essas fibras são remodeladas, transformando-se em fibras de colágeno tipo I, tornando o pulmão mais rígido (ROCCO e cols 2004). Quando ativados, os fibroblastos são capazes de produzir diversos mediadores inflamatórios, incluindo IL- 8, IL-6, ciclooxigenase (COX) -2 e TGF- $\beta$  (O'REILLY e cols 2005).

Alguns mediadores, como citocinas e fatores de crescimento pró-inflamatórios produzidos em excesso (TNF- $\alpha$ , IL-1 e TGF- $\beta$  por exemplo), podem estimular a atividade de fibroblastos induzindo a fibrose pulmonar, podendo ser utilizados como alvos terapêuticos (FUJIMURA 2000, GREENBERG e cols 2007). No entanto, Chen e colaboradores descreveram que seria o desequilíbrio entre fatores inflamatórios e antiinflamatórios o responsável pelo reparo mal feito e danos teciduais crônicos (CHEN e cols 2005). Destarte, haveria recrutamento de leucócitos, ativação e proliferação de fibroblastos, assim como deposição de MEC durante o desenvolvimento e extensão da fibrose pulmonar (BARBARIN e cols 2005a).

O aumento da expressão de citocinas inflamatórias relacionadas ao fator nuclear (NF)- $\kappa$ B, como a IL-1 $\beta$ , participam da inflamação pulmonar estimulando a produção de outras citocinas bem como a expressão de moléculas de adesão. Trabalhos recentes sugerem que o número e o tamanho dos granulomas induzidos pela sílica estão muito diminuídos em animais knockout para IL-1 $\beta$  (SRIVASTAVA e cols 2002). Hubbard e colaboradores sugeriram que a modulação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, expresso em células epiteliais bronquiolares e em macrófagos alveolares, pode ser crítico no tratamento da fibrose pulmonar na silicose (HUBBARD e cols 2002).

O fator transformador de crescimento (TGF)- $\beta$  e a IL-4 estão envolvidos no remodelamento da MEC e acúmulo de colágeno (CHEN e cols 2005). A presença de TGF- $\beta$ , nos sítios onde ocorre uma alta produção de colágeno, poderia reprimir nos fibroblastos a expressão de catepsina K, uma cisteíno-protease lisossomal, limitando sua atividade antifibrótica (VAN DEN BRULE e cols 2005). Barbarin e colaboradores (BARBARIN e cols 2005b) constataram em modelo murino de silicose, que a superexpressão de IL-10 aumentou a expressão de IL-4 e IL-3, que são citocinas da resposta imunológica Th2; logo, os níveis elevados de IL-10 poderiam contribuir para a progressão da fibrose.

Ainda existem controvérsias acerca da atividade do interferon (IFN)- $\gamma$  no processo fisiopatológico da silicose. O IFN- $\gamma$  é uma citocina linfocitária com amplo efeito biológico e seu aumento em camundongos submetidos a silicose foi inicialmente visto por Davis e colaboradores (DAVIS e cols 1999). Entretanto, mais recentemente, Chen e colaboradores (CHEN e cols 2005) observaram ações potencialmente antifibróticas incluindo a inibição da proliferação de fibroblastos e da produção de colágeno. Segundo os autores (CHEN e cols 2005), animais com silicose que foram tratados com IFN- $\gamma$  apresentaram diminuição nos níveis de IL-4 e TGF- $\beta$ 1. Este fato pode ter acontecido porque o IFN- $\gamma$  estaria antagonizando a atividade fibrogênica de IL-4 e TGF- $\beta$ 1, ou estaria agindo diretamente nos fibroblastos diminuindo sua proliferação (CHEN e cols 2005).

A via de sinalização de FasL induz apoptose nas células epiteliais alveolares e macrófagos e sua desregulação parece estar relacionada com o desenvolvimento da silicose (BORGES e cols 2001, DOSREIS e cols 2004). Sendo assim, foi demonstrado que a apoptose induzida pela sílica tem efeito pró-inflamatório, uma vez que a utilização de um inibidor de caspase leva a diminuição no acúmulo de

neutrófilos, bem como a diminuição do conteúdo de colágeno (BORGES e cols 2002), sugerindo uma importante participação da apoptose na inflamação pulmonar. Além disso, também foi demonstrado que camundongos deficientes para Fas ligante (FasL) expostos à sílica não desenvolvem a doença e que os macrófagos pulmonares não entram em apoptose em resposta a silicose (BORGES e cols 2001). Os resultados sugeriram que na silicose a expressão de FasL é induzida após a lesão causada pela sílica, resultando na apoptose dos macrófagos (BORGES e cols 2001). Wang e colaboradores (WANG e cols 2005) observaram que a apoptose induzida por sílica ocorre através da via de sinalização da proteína p53, o que pode ser um importante dado para o entendimento dos mecanismos moleculares pelos quais a sílica atua.

### **I.2-2 – Formas de manifestação clínica e patologia**

Existem três formas de apresentação clínica da doença: a) aguda; b) acelerada e c) crônica. A aguda ocorre geralmente após (meses ou poucos anos) a exposição à grande quantidade de partículas de sílica onde as mais ativas são aquelas de menor tamanho e recém-quebradas, como ocorre no jateamento de areia e perfuração de rochas. Na reação aguda habitualmente, há rápida evolução para o óbito. É característica a inflamação intersticial com presença de fibrose. A presença de granulomas nem sempre é detectada nessa forma da doença. (ABU-SHAMS e cols 2005).

A forma acelerada da silicose geralmente se manifesta após cinco a dez anos da exposição inicial às partículas de sílica e compreende o período entre as manifestações aguda e crônica da doença. As alterações patológicas são

representadas pela presença de granulomas, semelhantes aos da forma crônica, porém em estágios mais iniciais de desenvolvimento (GREENBERG e cols 2007).

A forma de silicose crônica é a forma de apresentação mais diagnosticada e, geralmente, ocorre após dez anos de exposição, sendo inicialmente assintomática e podendo evoluir com sintomas de dispnéia progressiva (GREENBERG e cols 2007). A alteração patológica típica é o granuloma, caracterizado pela presença de fibras colágenas, com distribuição concêntrica envoltas por uma camada periférica formada por infiltrado linfocitário e por macrófagos (DAVIS e cols 1999). Com a progressão da doença, os nódulos podem coalescer formando conglomerados maiores e, eventualmente, substituindo parte do parênquima pulmonar por fibrose colágena.

### **I.2-3 – Diagnóstico**

O diagnóstico da silicose é usualmente baseado na radiografia de tórax, em conjunto com história clínica e ocupacional, coerentes (TERRA FILHO & SANTOS 2006). Um inquérito rigoroso sobre profissão, ramo industrial, atividades específicas detalhadas, é essencial para a caracterização da exposição às partículas de sílica. Uma história ocupacional de exposição à sílica livre, associada a anormalidades radiográficas compatíveis com a doença é suficiente para o diagnóstico (GREENBERG e cols 2007).

A silicose, em sua fase inicial é praticamente assintomática. Com a progressão da doença, os sintomas predominantes são a dispnéia de esforço e sensação de fraqueza. Nas fases mais avançadas da silicose pode ocorrer insuficiência respiratória, com dispnéia aos mínimos esforços e até em repouso. A presença de sintomas precoces pode ser devida ao tabagismo ou outras doenças

associadas, como silicotuberculose. A presença de tosse e expectoração é freqüente e diversos estudos epidemiológicos de grupos expostos a poeiras minerais mostram uma maior prevalência de bronquite crônica (TERRA FILHO & SANTOS 2006).

A radiografia de tórax é o exame mais importante, tanto para o diagnóstico quanto para o controle da evolução da doença. Deve obedecer às recomendações da Organização Internacional do Trabalho (OIT) no que se refere à técnica de realização do exame e à leitura radiológica de pneumoconioses. A silicose caracteriza-se pela presença de opacidades nodulares. As lesões tendem a serem difusas, simétricas, e com predomínio nos lobos superiores. Estes nódulos, com o passar dos anos, tendem a coalescência, com formação de grandes opacidades, podendo estar acompanhadas de fibrose pulmonar (fibrose maciça progressiva). Pode também ser evidenciada calcificação ganglionar, por vezes periférica, com padrão de "casca de ovo". Este padrão não é unicamente característico da silicose, podendo ser também observado em outras patologias (MEIRELLES e cols 2006). A identificação de micronódulos, a presença de coalescência de nódulos e a existência de enfisema, que habitualmente ocorrem nas regiões superiores e posteriores dos pulmões, são melhor visualizadas na tomografia computadorizada de tórax de alta resolução, quando comparada com a radiografia e a tomografia convencional. Entretanto, seu emprego deve ser reservado como método de diagnóstico complementar nos casos duvidosos (DE CAPITANI 2006).

As provas de função pulmonar são indispensáveis no estabelecimento de disfunção/incapacidade de pacientes com silicose, com o objetivo de identificar trabalhadores que demonstrem perda de função excessiva apresentando sintomas respiratórios. Por outro lado, não têm aplicação no diagnóstico de silicose ou de estádios precoces da silicose, uma vez que em sua fase inicial é praticamente

assintomática (GREENBERG e cols 2007). A espirometria, a difusão do CO e o teste de exercício são os exames mais recomendados. Devido à grande variedade de manifestações clínicas e patológicas da silicose e à coexistência de diversos fatores, é difícil estabelecer um padrão funcional que a caracterize. A função pulmonar pode estar dentro dos limites normais, ou apresentar um padrão de obstrução associado ou não à restrição, ou de restrição pura. Os estudos não demonstram correlação entre os achados radiológicos e as alterações da função pulmonar. Na silicose nodular simples, geralmente a função pulmonar é normal. Já nas fases mais avançadas da doença pode existir alguma correlação entre esses dados (GREENBERG e cols 2007).

A biópsia pulmonar na silicose, excepcionalmente, poderá ser indicada nos casos em que a história ocupacional e a radiografia de tórax não sejam capazes de confirmar o diagnóstico, ou tenham resultados divergentes (MEIRELLES e cols 2006).

#### **I.2-4 – Tratamento**

A silicose não dispõe de um tratamento eficaz (BROWN e cols 2007). Dentre os medicamentos utilizados na terapia da silicose podemos citar: a) glicocorticóides e citrato de alumínio (KENNEDY 1956, SHARMA e cols 1991, GOODMAN e cols 1992, ABU-SHAMS e cols 2005), e b) técnicas de lavado broncoalveolar, a fim de retirar as partículas de sílica (BANKS e cols 1993). Outras terapias vêm utilizando inibidores de macrófagos e anticorpos monoclonais contra a interleucina (IL)-1 (CASTRANOVA e cols 1991, GREENBERG e cols 2007). O transplante pulmonar também deve ser lembrado como um possível tratamento em determinados casos (TERRA FILHO & SANTOS 2006). Infelizmente, nenhuma das terapias propostas

reduziu significativamente a mortalidade associada à silicose (GREENBERG e cols 2007).

Como acontece em outros tipos de pneumoconioses, ainda não se dispõe de um tratamento eficaz. Entretanto, se o paciente apresentar, além da silicose, outras doenças respiratórias, o tratamento é direcionado a estas (ABU-SHAMS e cols 2005).

### **I.2-5 – Estudos Experimentais**

Um possível tratamento para a silicose seria utilizar os mastócitos como alvo terapêutico. Ao longo do processo de fibrose pulmonar induzida por partículas de sílica, os mastócitos parecem ter um papel importante no recrutamento de células inflamatórias e conseqüente desenvolvimento da fibrose. Brown e colaboradores demonstraram que partículas de sílica ativam mastócitos e levam a produção de mediadores inflamatórios e pró-fibróticos (BROWN e cols 2007).

Não existe nenhuma terapia efetiva para reverter ou retardar o curso da doença fibrótica (RAYMOND & WINTERMEYER 2006). Entretanto, estudos têm demonstrado que células-tronco derivadas de medula óssea podem modular a inflamação pulmonar e participar do processo de reparo do tecido pulmonar (KRAUSE e cols 2001, ORTIZ e cols 2003, ISHIZAWA e cols 2004, ORTIZ e cols 2007), levantando a possibilidade de que terapias celulares possam ser desenvolvidas para uma efetiva intervenção nas doenças pulmonares, inclusive no caso da silicose (LASSANCE e cols 2006).

### **I.2-6 – Estudos Clínicos**

Vários estudos descreveram o papel do corticosteróide na terapia da silicose (SHARMA e cols 1991, GOODMAN e cols 1992). Nesse contexto, Hoshi e colaboradores (HOSHI e cols 2006) trataram um paciente portador de silicoabestose com esteróide [metilprednisolona, (250 mg/dia durante três dias), seguida da manutenção com prednisolona] e constataram melhora nas opacidades na radiografia de tórax.

O efeito terapêutico da tetrandrina, um alcalóide derivado da planta *Stephania tetrandra* com propriedades antioxidantes, antifibrogênicas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras (LAI 2002, XIE e cols 2002), na silicose foi primeiramente relatado em 1977 e, nas últimas décadas, vem sendo utilizado amplamente na China. A associação da tetrandrina a drogas anti-fibróticas mostrou inibição do processo de formação de fibrose e melhora dos sintomas clínicos (XIE e cols 2002). A tetrandrina parece atuar das seguintes formas: 1) prevenindo a ativação de macrófagos alveolares induzido pela instilação intratraqueal de sílica, 2) inibindo a capacidade das partículas de estimularem a liberação de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos e 3) bloqueando a ativação de NF-κB e sua consequente expressão gênica (XIE e cols 2002).

Similarmente ao observado em estudos experimentais, os níveis séricos de FasL em pacientes silicóticos eram mais elevados do que em pacientes hígidos (TOMOKUNI e cols 1999, YAMAZAKI e cols 2007), sugerindo que a modulação dessa via de sinalização poderia ser utilizada como um possível alvo terapêutico.

Análises imunológicas podem levar ao desenvolvimento de novas terapias. Nesse contexto, alguns marcadores biológicos têm sido identificados (GULUMIAN e cols 2006): 1) proteínas de células de Clara (CC16) (WANG e cols 2007), 2) fator de

necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , 3) interleucinas, 4) espécies reativas de oxigênio, dentre outros. Mais estudos são necessários para validar o uso de substâncias que interferem na modulação dos alvos acima relacionados.

Estudos demonstraram que nem todos os indivíduos expostos às partículas de sílica desenvolvem a doença da mesma maneira, sugerindo uma predisposição genética (STANILOVA e cols 2007, 2008). Um entendimento da variabilidade genética e da interação entre genética e fatores ambientais é crucial na identificação de indivíduos com alto risco e na prevenção e tratamento.

Ainda não existe uma forma de tratamento eficaz para a silicose que, ao longo do tempo, mostra altas taxas de mortalidade e/ou incapacitação para o trabalho. No atual contexto, é fundamental que mais estudos experimentais e clínicos sejam realizados com o intuito de entender melhor a fisiopatologia da silicose, bem como programar um novo e efetivo tratamento no combate dessa doença.

### **I.3 – Células-Tronco**

As células-tronco são células indiferenciadas com capacidade de se auto-replicar (gerar cópias idênticas de si mesma) e se diferenciar em diversas células do organismo (WEISSMAN 2000, WEISS e cols 2008). Quanto ao potencial de diferenciação celular, podem ser classificadas como: 1) totipotentes, 2) pluripotentes, 3) multipotentes e 4) unipotentes (MAJKA e cols 2005, VAN HAAFTEN & THEBAUD 2006) (Tabela 1).

As células totipotentes e pluripotentes são aquelas capazes de se diferenciar em todos os tecidos que formam o corpo humano. Elas apresentam alta capacidade de proliferação e são encontradas essencialmente no embrião. As células totipotentes são encontradas nas primeiras fases de divisão embrionária (3 ou 4 dias

de vida), quando o embrião possui de 16 a 32 células, enquanto as pluripotentes são encontradas após essa fase. Outra diferença entre as células totipotentes e pluripotentes reside na capacidade das totipotentes em dar origem também a placenta e anexos embrionários.

Tabela 1 – Classificação em relação ao potencial de diferenciação celular.

Termo	Definição	Exemplo
Totipotente	Capaz de gerar todos os tipos de células diferenciadas do organismo e as células da placenta.	Ovócito fertilizado, zigoto.
Pluripotente	Capaz de dar origem a células provenientes dos três folhetos embrionários: endoderma, mesoderma e ectoderma.	Células-tronco embrionárias.
Multipotente	Capaz de dar origem apenas aos tipos celulares do próprio tecido onde residem	Células-tronco mesenquimais, células-tronco hematopoiéticas.
Unipotente	Capaz de gerar apenas um tipo celular.	Pneumócitos tipo II que podem gerar pneumócitos tipo I.

Neste contexto, alguns estudos (KOTTON e cols 2001, KRAUSE e cols 2001, BONNET 2003, ORTIZ e cols 2003, ANJOS-AFONSO e cols 2004, HASHIMOTO e cols 2004, ISHIZAWA e cols 2004, YAMADA e cols 2004, MACPHERSON e cols 2005, ROJAS e cols 2005) têm demonstrado certo grau de plasticidade das células-tronco adultas derivadas de medula óssea, com uma aparente capacidade de diferenciação, adotando fenótipos funcionais de outros tecidos.

### **I.3-1 – Células-Tronco Embrionárias**

Quatro a cinco dias após a fecundação forma-se o blastocisto, que é composto pelo trofoblasto e pelas células da massa interna, as chamadas células-tronco embrionárias. Tais células são pluripotentes e apresentam alta capacidade de proliferação (WEISS e cols 2008). As células embrionárias são capazes de dar origem a células provenientes dos três folhetos embrionários: endoderma, mesoderma e ectoderma (GRIFFITHS e cols 2005). As células-tronco embrionárias têm sido descritas como uma potencial terapia para algumas doenças incuráveis, tais como: doenças de Parkinson, doenças neurodegenerativas, e infarto do miocárdio (WU e cols 2007).

Nesse contexto, Rippon e colaboradores (RIPPON e cols 2006) demonstraram que as células-tronco embrionárias em meio específico de cultura podem dar origem a células progenitoras pulmonares e relataram inúmeras vantagens: (1) melhor integração das células com o tecido do receptor, (2) capacidade de divisão após a implantação, minimizando o número de células que precisam ser transplantadas, e (3) capacidade de gerar um ou mais tipos de células somáticas adultas, podendo dar origem a pneumócitos tipo I, II e células de Clara (RIPPON e cols 2006). Apesar de seu enorme potencial terapêutico, questões de

segurança relacionadas à possibilidade das células-tronco embrionárias formarem tumores *in vivo*, e a ocorrência de instabilidades cromossômicas limitam o seu uso (CARPENTER e cols 2004). Além disso, atualmente, as células-tronco embrionárias são alvos de controvérsias em relação às questões éticas. Outra importante limitação está relacionada ao risco de rejeição após transplante alogênico de células-tronco embrionárias (FAIRCHILD e cols 2007, ROBERTSON e cols 2007), sendo necessário o uso de terapia imunossupressora (SWIJNENBURG e cols 2008).

### **I.3-2 – Células-Tronco Adultas**

As células-tronco adultas são aquelas isoladas de tecidos adultos, incluindo medula óssea, tecido adiposo, tecido nervoso, cordão umbilical e placenta, que possuem capacidade de auto-renovação (ALIOTTA e cols 2005). Em geral, as células-tronco adultas são multipotentes, isto é, capazes de dar origem a uma pequena quantidade de linhagens celulares específicas de acordo com o sítio tecidual onde se encontram. Algumas populações de células-tronco adultas, como as células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea, possuem um maior potencial de diferenciação que não se limita a apenas ao tecido de onde é originada (WEISS e cols 2008). As células-tronco adultas também podem ser unipotentes, gerando apenas um tipo celular no tecido onde residem.

### **I.3-3 – Células-Tronco de Medula Óssea**

A medula óssea é fonte de duas populações distintas de células-tronco: as células-tronco hematopoiéticas (HSC), responsáveis pelo desenvolvimento de linhagens de células sanguíneas, incluindo leucócitos, hemácias e plaquetas (GROVE e cols 2004) e as células-tronco mesenquimais (MSC) que podem dar

origem a osteoblastos, condrócitos, adipócitos (PROCKOP 1997, PITTENGER e cols 1999), músculo esquelético (FERRARI e cols 1998), músculo cardíaco, células endoteliais, hepatócitos, neurônios, oligodendrócitos e astrócitos (PROCKOP 1997, PITTENGER e cols 1999, JIANG e cols 2002).

As células-tronco hematopoiéticas (HSC) são as células-tronco adultas melhor caracterizadas e descritas na literatura. As HSC são células multipotentes, com capacidade de proliferação, auto-renovação e diferenciação em uma variedade de linhagens mielóide e linfóide, especializadas, sendo responsáveis pela manutenção da hematopoiese (GRIFFITHS e cols 2005). As HSC apresentam proteínas de membranas específicas, tornando sua seleção facilitada; no entanto, estas proteínas se diferem de acordo com a espécie utilizada, ou seja, existem diferenças entre espécies como camundongos, ratos e humanos. Marcadores de membrana como conjunto de diferenciação (CD): CD34 e CD45 são freqüentemente utilizados para selecionar células-tronco hematopoiéticas. Por outro lado, a falta de tais marcadores é um dos critérios necessários para a seleção de células-tronco mesenquimais. Além disso, as HSC normalmente não apresentam capacidade de aderência em plástico de cultura (DOMINICI e cols 2006).

As células-tronco mesenquimais ou células-tronco estromais auxiliam as HSC e sua progênie, ou seja, elas influenciam na modulação da quiescência, na auto-renovação e no comprometimento das células-tronco hematopoiéticas com determinada linhagem celular. Ademais, influenciam a proliferação, maturação e apoptose de tais células maduras (DENNIS & CHARBORD 2002). As MSC também contribuem para a regeneração de tecidos mesenquimais como osso, músculo, tendão, ligamento, adipócitos e estroma (PITTENGER e cols 1999, DEANS & MOSELEY 2000). As MSC foram isoladas, inicialmente, por Friedenstein e

colaboradores (FRIEDENSTEIN e cols 1974) e, subseqüentemente, por outros investigadores, entre eles Pittinger e colaboradores (PITTENGER e cols 1999), que se basearam na capacidade dessas células em aderir à superfície de cultivo (plástico) e em seu grande potencial de diferenciação. As MSC são capazes de se diferenciarem *in vitro* em diversas linhagens celulares, incluindo osteoblastos, condrócitos, adipócitos (PROCKOP 1997, PITTENGER e cols 1999), músculo esquelético, músculo cardíaco, células endoteliais (ORLIC e cols 2003), hepatócitos (CHEN e cols 2007). A caracterização das células-tronco mesenquimais de medula óssea, ainda vem sendo bastante discutida. A mesma nomenclatura, células-tronco mesenquimais, vem sendo utilizada para diferentes populações celulares, levando a controvérsias no meio científico (HORWITZ e cols 2005). Nesse contexto, a Sociedade Internacional de Terapia Celular, relatou a necessidade do estabelecimento de determinados critérios, para que tais células aderentes de medula óssea possam ser consideradas “células multipotentes mesenquimais de estroma”, onde também estariam contidas, as células-tronco mesenquimais (DOMINICI e cols 2006). Sendo assim, para se considerar células mesenquimais são necessários os seguintes critérios: (1) capacidade de aderência ao plástico em cultura, (2) presença de marcadores ditos mesenquimais (CD73, CD90, CD105), (3) ausência de marcadores hematopoiéticos (CD34, CD 45) e de macrófagos (CD11b), e (4) realização de ensaio de diferenciação destas células (DOMINICI e cols 2006).

### **I.3-4 – Mecanismos de Ação**

Os mecanismos pelos quais as células-tronco assumem fenótipos pulmonares permanecem incertos (PROCKOP 2007). Acredita-se que a transdiferenciação, que é definida como a capacidade de uma célula diferenciada assumir o fenótipo de um

outro tipo celular completamente diferenciado, pode ser um dos mecanismos. Entretanto, nos últimos anos, a transdiferenciação tem sido questionada (KRAUSE 2008), sendo outros fenômenos considerados responsáveis pela maior capacidade proliferativa das células-tronco adultas como, por exemplo, a fusão celular. A fusão das células-tronco adultas derivadas da medula óssea com células epiteliais pulmonares pode ocorrer sob várias circunstâncias *in vitro*, mas esse fenômeno parece não ocorrer com tanta frequência em pulmões *in vivo* (NEURINGER & RANDELL 2004, WEISS e cols 2006). Acredita-se que as células-tronco adultas sejam recrutadas para o local de lesão através da liberação de sinais quimiotáticos e/ou aumento da expressão de moléculas de adesão específicas (PITTENGER e cols 1999, LOI e cols 2006, TAKAHASHI e cols 2006, WEISS e cols 2006, WEISS 2007, KRAUSE 2008). Outro fato que permanece sem resposta é o mecanismo pelo qual as células-tronco adultas conseguem atravessar a membrana basal do tecido lesado e alcançar as áreas lesadas. Considera-se que tal fenômeno ocorra pelos mesmos mecanismos através dos quais as células de defesa conseguem atingir seu alvo, ou seja, acredita-se que a permeabilidade de tais membranas seja regulada pela produção de proteínas sintetizadas pelo próprio tecido, controlando o influxo das células-tronco para a área lesada (KOTTON e cols 2001, ROJAS e cols 2005, WEISS e cols 2008).

### **I.3-5 – Terapia Celular em Doenças Respiratórias**

A terapia celular vem sendo estudada nos últimos anos em doenças respiratórias, mostrando, em alguns casos, resultados controversos que merecem reflexão (KOTTON e cols 2001, ORTIZ e cols 2003, HASHIMOTO e cols 2004, KOTTON e cols 2005, ROJAS e cols 2005, ZHAO e cols 2008). Kotton e

colaboradores (2001) avaliaram os efeitos de células derivadas de medula óssea em modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Observou-se migração de tais células para os pulmões lesados, sendo suas características morfológicas se assemelhavam aquelas do pneumócitos do tipo I (KOTTON e cols 2001). Ortiz e colaboradores (2003) demonstraram que o trasplante de células mesenquimais teve um efeito protetor ao diminuir os níveis de hidroxoprolina e a inflamação pulmonar, sugerindo a possibilidade do uso de células exógenas para o reparo pulmonar (ORTIZ e cols 2003). Hashimoto e colaboradores (2004) utilizaram células provenientes de animais transgênicos que expressavam GFP (*green fluorescent protein*) para avaliar a hipótese de que a origem dos fibroblastos durante a fibrose pulmonar, possa vir a ser extrapulmonar, derivada principalmente a partir de células progenitoras da medula óssea. A análise por citometria de fluxo das células pulmonares confirmou um aumento de células GFP positivas nos animais com fibrose pulmonar, e revelou aumento significativo de células que além de serem GFP positivas, expressavam colágeno tipo I. Os autores concluíram que os fibroblastos pulmonares, em uma situação de fibrose pulmonar, também podem ser derivados de células progenitoras da medula óssea (HASHIMOTO e cols 2004). Kotton e colaboradores, que anteriormente haviam demonstrado a presença de células no pulmão de animais lesados (KOTTON e cols 2001), concluíram em um estudo mais recente que as células derivadas da medula óssea não foram capazes de reconstituir o parênquima pulmonar. Rojas e colaboradores (2005) observaram que as células derivadas de medula óssea além de promover o reparo pulmonar, diminuíram a expressão gênica de algumas citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4). *In vitro*, células de camundongos lesados, produziram fatores solúveis que levaram a proliferação e migração das células derivadas de medula óssea. Os

autores concluíram que as células derivadas da medula óssea são importantes no reparo pulmonar após a lesão induzida por bleomicina (ROJAS e cols 2005). Zhao e colaboradores (2008) também constataram diminuição de citocinas inflamatórias (PDGF, IGF e TGF- $\beta$ ) em modelo murino de fibrose pulmonar induzido por bleomicina (ZHAO e cols 2008).

A terapia celular quando utilizada em modelo de lesão pulmonar induzido por lipopolissacarídeo (LPS) demonstrou resultados satisfatórios (YAMADA e cols 2004, GUPTA e cols 2007, XU e cols 2007). Yamada e colaboradores (2004) observaram uma rápida mobilização das células derivadas de medula óssea e acúmulo nos sítios de lesão. As células se diferenciaram em células endoteliais e epiteliais, sugerindo que a terapia celular foi importante no reparo pulmonar após a lesão induzida por LPS (YAMADA e cols 2004). Gupta e colaboradores (2007) constataram a diminuição de mediadores inflamatórios [proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-2 e TNF- $\alpha$ ]. *In vivo*, os efeitos benéficos foram independentes da presença das células no parênquima pulmonar. *In vitro*, foi observado que a ação anti-inflamatória foi devido ao efeito parácrino e também não dependia de contato celular. Neste contexto, Xu e colaboradores (2007) demonstraram que as células derivadas de medula óssea diminuíram a resposta inflamatória induzida por LPS, e que os efeitos benéficos observados também foram independentes da presença das células no parênquima pulmonar (XU e cols 2007).

A participação das células derivadas de medula óssea também foi analisada em modelo de fibrose pulmonar induzida por asbesto (SPEES e cols 2007). Os autores observaram a migração de tais células para o parênquima pulmonar e sua diferenciação em monócitos e macrófagos, fibroblastos e miofibroblastos. No entanto, ainda não existem na literatura estudos demonstrando a participação das

células derivadas de medula óssea em modelo de fibrose pulmonar induzida por partículas de sílica.

Nesse contexto, o presente estudo tem como principal meta testar a ação das células mononucleares derivadas de medula óssea (CMMO) na prevenção do processo inflamatório e de fibrose pulmonar em modelo murino de silicose.

## **II. OBJETIVOS**

### **II.1 – Objetivo Geral**

Analisar os efeitos da terapia celular em modelo murino de silicose.

### **II.2 – Objetivos Específicos**

Analisar a mecânica respiratória (elastância estática, pressões resistivas e viscoelásticas e/ou inhomogêneas do pulmão);

1. Verificar as alterações morfológicas induzidas no parênquima pulmonar;
2. Quantificar a fração de área dos granulomas;
3. Quantificar a celularidade total e diferencial nos granulomas;
4. Quantificar os macrófagos pulmonares presentes nos granulomas e septos alveolares;
5. Quantificar fibras colágenas nos granulomas e nos septos alveolares;
6. Analisar a presença de células dos animais doadores no tecido pulmonar através da detecção do gene SRY, presente no cromossomo Y.

### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **III.1 – Animais Utilizados**

Neste estudo foram utilizados 60 camundongos C57BL/6. Os animais selvagens foram obtidos na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e na Universidade Federal Fluminense (UFF). Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética com Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde, UFRJ (CEUA-CCS, IBCCF-019).

Como doadores foram utilizados camundongos machos C57BL/6, enquanto os animais tratados, identificados como receptores, foram fêmeas C57BL/6. Todos os animais utilizados tinham dois meses de idade e pesavam entre 15 e 20 gramas.

A importância da diferença de sexo entre os camundongos doadores e receptores serviu como forma de identificação das células doadoras através do estudo do gene do cromossomo Y. Logo, se os tecidos dos animais receptores (fêmeas) apresentarem o gene do cromossomo Y, comprova-se a existência de células de animais doadores (machos) nos pulmões dos animais receptores.

#### **III.2 – Grupos Experimentais**

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais:

1. Controle (C): Animais instilados com solução salina no dia zero; e submetidos ao estudo morfofuncional no 15º dia.
2. Controle - célula (C-Cell): Animais instilados com solução salina no dia zero, submetidos à injeção de células de medula óssea uma hora após a instilação de salina; e ao estudo morfofuncional no 15º dia.

3. Sílica (SIL): Animais instilados com sílica no dia zero; e submetidos ao estudo morfofuncional no 15º dia.
4. Sílica - célula (SIL-Cell): Animais instilados com sílica no dia zero, submetidos à injeção de células de medula óssea uma hora após a instilação de sílica; e ao estudo morfofuncional no 15º dia.

### **III.3 – Protocolo experimental**

#### **III.3-1 – Instilação dos animais**

Os animais tratados com salina e sílica foram instilados no dia zero com solução salina (50 µl) ou sílica (20 mg sílica/50 µl) intratraquealmente (*it*). A concentração de sílica utilizada para o desenvolvimento do modelo de silicose foi estabelecida pelo nosso laboratório e pelos Laboratórios de Investigação Pulmonar e de Fisiologia da Respiração (IBCCF-UFRJ) (BORGES e cols 2001, FAFPE e cols 2001, BORGES e cols 2002).

Para a instilação, os animais foram anestesiados com Sevoflurano e, a partir de um corte vertical na direção da traquéia, a musculatura foi divulsionada, sendo exposta a traquéia, seguida de injeção de solução salina ou sílica. Os animais foram colocados na posição ortostática para que a solução pudesse alcançar de forma homogênea ambos os pulmões, sem retenção na traquéia. Após a instilação, o corte foi fechado com fio de sutura (nylon 5-0). Em seguida, os animais foram alojados em gaiolas micro-isoladoras até o 15º dia.

#### **III.3-2 – Extração de Células Mononucleares de Medula Óssea (CMMO)**

Os animais doadores foram anestesiados com éter etílico PA (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e submetidos a deslocamento cervical. Com o auxílio de pinça e

tesoura estéreis retirou-se a pele e os músculos adjacentes ao fêmur e à tíbia, evitando o rompimento da artéria femoral. As epífises ósseas foram cortadas, e a cavidade medular foi lavada com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies<sup>®</sup>, Grand Island, NY, EUA) utilizando uma seringa com agulha de 18 G colocada sobre um tubo estéril de poliestireno cônico de 15 ml (Falcon<sup>®</sup>). As células foram homogeneizadas com auxílio de pipeta Pasteur, e em seguida, centrifugadas a 450 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento de células foi ressuspensão em DMEM sem soro, e em seguida adicionado cuidadosamente sobre o Ficoll-Paque<sup>™</sup> Plus (Amersham – GE Healthcare/17-1440-03) (CONGET & MINGUELL 1999). A seguir, as células foram centrifugadas a 450 x g durante 30 minutos, à temperatura ambiente. O anel de células, formado após a centrifugação, na interface Ficoll-meio de cultura foi coletado e colocado em um tubo de poliestireno cônico de 15 ml (Falcon<sup>®</sup>). Este anel de células contém células mononucleares dentre as quais estão linfócitos e monócitos, e células-tronco de medula óssea. As células foram ressuspensas em solução salina balanceada (BSS) e centrifugadas a 450 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi, então, desprezado, e esse processo repetido mais duas vezes para retirar o excesso de reagente Ficoll que possa ter sido coletado junto com o anel de células. As células não foram colocadas em cultura, sendo injetadas nos animais receptores no mesmo dia da coleta.

### **III.3-3 – Contagem de Células**

Uma alíquota de 10 µl de células foi retirada e diluída com 10 µl de Azul de Trypan, a fim de avaliar a viabilidade das células. Desta diluição, 10 µl de suspensão

de células foi retirado e adicionado na câmara de Neubauer (Hausser Scientific) para a contagem de células.

### **III.3-4 – Injeção de Células Mononucleares de Medula Óssea**

Uma hora após a instilação de solução salina ou sílica, as fêmeas foram anestesiadas com Sevoflurano e receberam, através da veia jugular direita, a injeção das células de medula óssea, em uma concentração de  $2 \times 10^6$  células em 50  $\mu$ l de solução salina.

### **III.4 - Mecânica Respiratória**

No 15º dia de tratamento, os animais foram sedados com diazepam (1 mg intraperitoneal - *ip*), em seguida pesados (balança Filizola, modelo BR, Indústrias Filizola SA, SP, Brasil) e, então, anestesiados com tiopental sódico (20 mg/kg *ip*).

Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados por esparadrapo. Realizou-se traqueotomia com introdução de jelco 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, sendo a cânula fixada à traquéia por meio de fios de algodão. Os animais foram paralisados com brometo de pancurônio [Pavulon®, Organon International Incorporation, Nova Jersey, EUA, 2 mg/kg, intravenosamente (*iv*)].

Os camundongos foram, então, ventilados mecanicamente (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguai) com frequência respiratória de 100 incursões por minuto, volume corrente ( $V_T$ ) de 0,2 ml e fração inspirada de oxigênio ( $FiO_2$ ) de 0,2%.

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos à incisão cirúrgica por tesoura na linha média do abdômen justo abaixo do apêndice xifóide. A incisão foi estendida, superficialmente, ao longo da parede torácica sobre o esterno, sendo, então, a pele do animal retirada por tração lateral. A seguir, a incisão abdominal foi estendida lateralmente, para esquerda e para direita, seguindo o bordo inferior das costelas até atingir a linha axilar anterior, bilateralmente. Com a cavidade abdominal aberta, foi possível visualizar o diafragma, que foi perfurado e seccionado segundo a mesma orientação da abertura da parede abdominal. Imediatamente antes da perfuração do diafragma foi instalada pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH<sub>2</sub>O (SALDIVA e cols 1992). Após a retirada do diafragma, a parede torácica foi removida.

O ventilador foi ajustado previamente para gerar, quando desejado, uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração. Foram tomados cuidados especiais na manutenção do volume ( $V_T = 0,2$  mL) e fluxo ( $V' = 1$  mL/s) constantes em todos os animais, a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e duração da inspiração nas variáveis mecânicas (KOCHI e cols 1988a, b).

A cânula traqueal do animal foi conectada a um pneumotacógrafo para pequenos animais (MORTOLA & NOWORAJ 1983), para medida de fluxo aéreo ( $V'$ ). O pneumotacógrafo que foi utilizado consiste de uma cânula metálica com duas saídas laterais com as seguintes características: diâmetro interno = 1,5 mm, comprimento = 4,2 cm e distância entre as saídas laterais = 2,1 cm. O gradiente de pressão através do pneumotacógrafo foi determinado utilizando-se um transdutor diferencial de pressão [©SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc. (SC-24), Montreal, Canadá]. Essa forma de medir fluxo aéreo, além de bem simples, é adequada, visto que, em animais de pequeno porte, os fluxos baixos e as dimensões

traqueais reduzidas são responsáveis pela existência de fluxo laminar e, portanto, o fluxo aéreo pode ser medido de acordo com a lei de Poiseuille, onde a diferença de pressão entre as saídas laterais do pneumotacógrafo é proporcional ao  $V'$ . Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a outro transdutor diferencial de pressão para medida da pressão traqueal ( $P_{tr}$ ). A inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traquéia até a extremidade da tubulação) evitou erros de medida de resistência ao fluxo (CHANG & MORTOLA 1981, LORING & MEAD 1982). O volume ( $V_T$ ) mobilizado foi obtido por integração digital do sinal de fluxo.

A calibração dos transdutores de pressão foi realizada com o auxílio de um tubo em "U" contendo água destilada. A aferição foi realizada antes de cada experimento para assegurar a confiabilidade do registro.

O espaço morto da montagem foi de 0,2 ml. Para computá-lo, pesou-se o conjunto de equipamentos utilizados entre a via aérea do animal e o ventilador (cânula traqueal, tubo em "T", pneumotacógrafo e conexões de borracha) vazio e cheio de água. A diferença de peso permitiu saber o volume de água e, portanto, o volume do espaço morto do sistema. Para fechar as saídas do conjunto e enchê-lo de água foi usada massa de modelar, que foi também pesada, junto com os demais equipamentos. Durante os experimentos evitou-se ao máximo a manipulação da cânula traqueal com aspirações e insuflações, para eliminar possíveis interferências sobre os parâmetros medidos.

A mecânica pulmonar foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração, que permite analisar os componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inomogêneo, separadamente (BATES e cols 1985a, BATES e cols 1985b, BATES e cols 1988, KOCHI e cols 1988a, b).

No animal com o tórax aberto, a pressão traqueal ( $P_{tr}$ ) é, na realidade, a pressão transpulmonar ( $P_L$ ). Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da  $P_L$  até um ponto de inflexão ( $P_i$ ) a partir do qual o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão ( $P_{el}$ ). A diferença de pressão ( $\Delta P_{1,L}$ ), que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ( $P_{m\acute{a}x}$ ) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta ( $P_i$ ), corresponde ao componente viscoso pulmonar, ou seja, reflete a pressão necessária para vencer a resistência do pulmão (BATES e cols 1985a, BATES e cols 1985b, BATES e cols 1988, KOCHI e cols 1988a, b). A segunda variação de pressão ( $\Delta P_{2,L}$ ), representada pela queda lenta, do  $P_i$  ao platô ( $P_{el}$ ), reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico (*stress relaxation*) e/ou inhomogêneo (*pendelluft*) do tecido pulmonar (Figura 2). A variação de pressão total ( $\Delta P_{tot,L}$ ) foi obtida pela soma de  $\Delta P_1$  e  $\Delta P_2$ . A elastância estática do pulmão ( $Est,L$ ) (inverso da complacência pulmonar) foi calculada dividindo-se  $P_{el}$  pelo  $V_T$ . As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

$$\Delta P_{1,L} = P_{max} - P_i;$$

$$\Delta P_{2,L} = P_i - P_{el} ;$$

$$\Delta P_{tot,L} = \Delta P_1 + \Delta P_2;$$

$$Est,L = P_{el}/V_T$$

Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o volume nunca cai à zero imediatamente após a oclusão, propiciando,

assim, a existência de um pequeno fluxo. Este fluxo é responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, da  $P_i$  e da  $P_{el}$  (Figura 2).

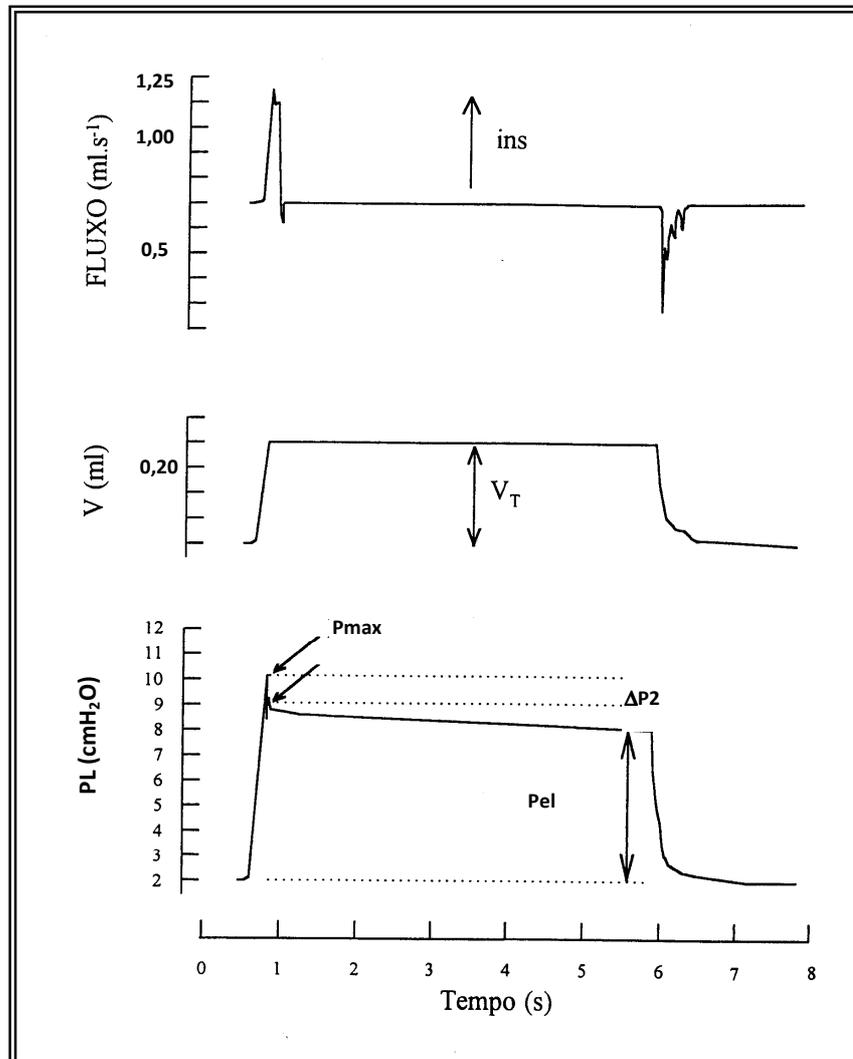


Figura 2 – Representação esquemática do método de oclusão ao final da inspiração. Registros dos sinais de fluxo aéreo ( $V'$ ), volume ( $V_T$ ) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo aéreo de 1 mL/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na PL ( $\Delta P_1$ ) que corresponde a  $P_{max} - P_i$ , pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta ( $\Delta P_2$ ), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representada pela pressão de retração elástica pulmonar ( $P_{el}$ ). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH<sub>2</sub>O.

Foram registrados 10-15 ciclos pelo método de oclusão ao final da inspiração (BATES e cols 1985a, BATES e cols 1985b, BATES e cols 1988, KOCHI e cols 1988a, b) em cada animal. Os transdutores conectados ao pneumotacógrafo e ao tubo traqueal registraram os sinais de  $V'$  e PL, respectivamente. As respostas de freqüências dos sistemas de registro da PL foram estáveis até 20 Hz. Em seguida, os sinais foram condicionados, filtrados [©SCIREQ *Scientific Respiratory Equipment Inc.* (SC-24), Montreal, Canadá], convertidos em sinais digitais por um conversor analógico-digital de 12-bitz (DT-2801A, *Data Translation*, Malboro, MA, EUA) e amostrados a uma freqüência de 200 Hz. Os sinais foram armazenados em microcomputador para posterior análise, através do programa ANADAT (*RHT-InfoData*, Montreal, Canadá).

A resistência total do equipamento ( $Req$ ), incluindo a cânula traqueal, foi aferida previamente através da aplicação de diferentes fluxos de ar ao sistema (até fluxos de 26 ml/s, bem acima da faixa de fluxo utilizada no presente experimento), com concomitante registro das variações de pressão ( $\Delta P$ ). Uma vez que  $Req = \Delta P/V'$ , a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva  $\Delta P \times V'$ . A pressão resistiva do equipamento ( $= Req.V'$ ) foi subtraída da pressão resistiva dos pulmões de tal forma que os resultados representassem as propriedades mecânicas intrínsecas. A inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traquéia até a extremidade do pneumotacógrafo) evitou erros de medida de resistência ao fluxo (CHANG & MORTOLA 1981, LORING & MEAD 1982).

### **III.5 – Remoção dos Pulmões**

Ao término do experimento, o animal foi imediatamente sacrificado por seção da aorta abdominal e veia cava inferior e a traquéia foi ocluída ao final da expiração com um fio de algodão. A porção abdominal do esôfago foi identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática. As estruturas do pescoço foram dissecadas com liberação das vias aéreas. A pinça que prende o esôfago foi suavemente tracionada para cima, permitindo separá-lo das estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traquéia foi seccionada acima do local ligado pelo fio e, posteriormente, o esôfago separado do conjunto por leve tração.

### **III.6 - Análise Histológica**

#### **III.6-1 – Histopatologia**

Os pulmões direitos foram retirados e mantidos em formol 10% tamponado, a temperatura ambiente, e processado em séries crescentes de etanol e banhos de xileno. Após a fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 5 µm de espessura.

As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e analisadas por microscopia óptica (Eclipse E800, Nikon), segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos.

#### **III.6-2 – Análise morfométrica no granuloma**

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (*point-counting*) (WEIBEL 1990), utilizando-se um retículo

acoplado a ocular do microscópio, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo (Figura 3).

Para a quantificação da fração de área de granuloma, foram analisados vinte campos aleatórios e não coincidentes, em um aumento de 200x. Para tal, o número de pontos que caíram nos granulomas foi dividido pelo número total de pontos [número correspondente ao total de pontos (100) subtraído pelos 14 pontos da extremidade do retículo] (GUNDERSEN e cols 1988).

A porcentagem de células mononucleares e polimorfonucleares nos granulomas foi quantificada, em dez campos aleatórios e não coincidentes, em um aumento de 1000x. O número de pontos que caíram em células mononucleares e polimorfonucleares foi dividido pelo total de pontos contados que caíram no granuloma em cada campo analisado e expresso sob a forma de percentual.

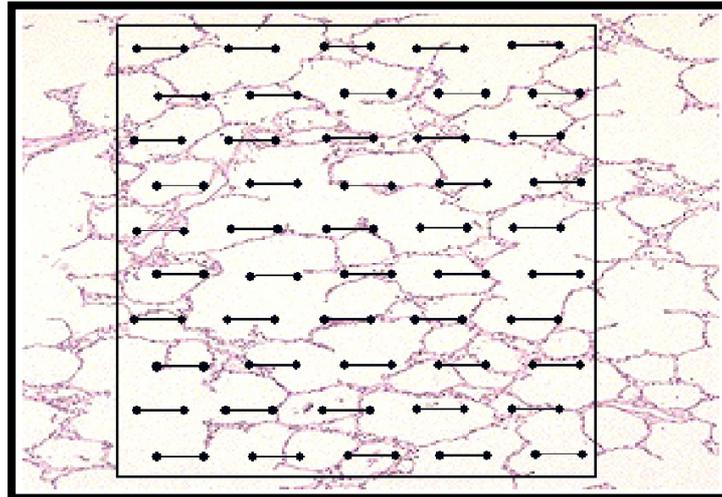


Figura 3 – Representação esquemática do retículo utilizado para a técnica de contagem de pontos. Retículo de 100 pontos e 50 retas utilizado para o cálculo da fração de área de granuloma.

### **III.6-3 – Detecção e quantificação dos macrófagos pulmonares através de imunomarcação para a glicoproteína F4/80**

F4/80 é uma glicoproteína encontrada na superfície de macrófagos murinos, sendo considerado um dos marcadores mais específicos para esse tipo celular (AUSTYN & GORDON 1981, MORRIS e cols 1991). Os macrófagos positivos para a glicoproteína F4/80 puderam ser detectados a partir de cortes parafinados de 5 µm submetidos à técnica imunohistoquímica utilizando um anticorpo dirigido contra esse receptor de superfície celular. Após a desparafinização e hidratação do material com três banhos de xilol e álcoois decrescentes (100 / 95 / 70%), respectivamente, os resíduos aldeídicos foram inibidas pelo Cloreto de amônio 50mM em PBS pH 8,0 em dois banhos de 15 minutos. Após duas lavagens em PBS pH 7,4 a peroxidase endógena foi inibida com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (Reagen) em metanol por 20 minutos, seguindo-se de dois banhos de tampão PBS pH 7.4 por 5 minutos cada. As lâminas foram colocadas por 15 minutos em PBS pH 7,4 previamente aquecido na estufa a 40°C. Após esse período, os cortes histológicos foram incubados com solução de tripsina a 0,2% em PBS (Tripsina tablets, Sigma, USA), em câmara úmida, ambos previamente aquecidos, permanecendo na estufa por 20 minutos. Depois de três lavagens de 5 minutos cada em PBS, seguiu-se o bloqueio das ligações inespecíficas com PBS-BSA10% / Leite mólico 8% (1:1) por uma hora. Após este procedimento, as lâminas foram incubadas com o anticorpo F4/80 (rat / anti-mouse MCA497 Serotec, USA) em câmara úmida na concentração de 1:50 em PBS/BSA 3% - Triton 0,1% - Tween 0,05%, permanecendo até o próximo dia.

No dia seguinte, após alcançar a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas duas vezes em Tampão PBS pH 7.4 e 1 vez em PBS - Tween 0,25%, por 5 minutos cada e incubadas com o anticorpo secundário anti-rat IgG (Vector) na

concentração de 1:30 por uma hora. Ao final desse período e após duas lavagens com PBS - Tween 0,25%, foi incubada a estreptavidina - Peroxidase (Sigma) diluída 1:30 em PBS por 1 hora e as lâminas foram reveladas com DAB (DAB líquida, DAKO, Carpinteria, CA, USA) por 10 a 15 minutos. Após duas lavagens com tampão PBS pH 7.4 - Tween 20 0,25% por 5 minutos e 1 lavagem em água destilada por 10 minutos, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina diluída de Harris e montadas em Entellan® (Merck). Como controles negativos cortes histológicos foram incubados com soro não imune de rato.

Foram analisados vinte campos por animal em microscópio de campo claro (Nikon Eclipse E800) com a objetiva de 40X acoplado a camera digital (Evolution VF - MediaCybernetics). As imagens foram analisadas utilizando-se o programa Image - Pro® Plus (Versão 4.5.1 – Media Cybernetics, USA).

#### **III.6-4 – Detecção e quantificação dos macrófagos pulmonares através da marcação de radicais carboidráticos**

A fim de quantificar os macrófagos pulmonares ativados, foi utilizada a técnica histoquímica para a detecção da lectina *Bandeiracea Griffonia Simplicifolia isoagglutin*. A lectina *Griffonia* é específica para radicais carboidráticos de superfície macrofágica (resíduos  $\alpha$ -D galactose) que estão associados de maneira mais específica com macrófagos ativados (MADDOX e cols 1982). Após a desparafinização e hidratação do material com três banhos de xilol e álcoois decrescentes (100 / 95 / 70%) e banhos em água destilada respectivamente, os resíduos aldeídicos foram inibidas pelo bórax 5 % por 20 minutos, seguindo-se a inibição da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (Reagen) em metanol por 20 minutos e banhos seguidos de tampão PBS pH 7.4 por 5 minutos cada. Realizou-se

o bloqueio das ligações inespecíficas com PBS - BSA 3% por uma hora. Após este procedimento, as lâminas foram incubadas com a lectina *Bandeiracea Griffonia Simplicifolia* conjugada à biotina (Vector Laboratories, EUA) em câmara úmida na concentração de 1:100 em PBS-BSA 1% + Solução traço de metais, contendo Cloreto de Cálcio, Cloreto de Magnésio, Cloreto de Manganês + Azida de Sódio durante a noite a 4°C. No dia seguinte, após alcançar a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7.4 - Tween 20 0,25%, incubadas com a estreptavidina - Peroxidase (Sigma) diluída 1:30 em PBS por 40 minutos e revelada pela AEC (DAKO). Após duas lavagens com água destilada por 5 minutos, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Mayer (diluída 1:3) e montadas em meio aquoso (Aquatex, Merck).

Foram analisados quinze campos utilizando a objetiva de 40X e ocular de 10X, por animal, dentro e fora dos nódulos silicóticos em microscópio de campo claro (Nikon Eclipse E800) acoplado à camera digital (Evolution VF - MediaCybernetics). As imagens foram analisadas utilizando-se o programa Image - Pro® Plus (Versão 4.5.1 – Media Cybernetics, USA).

### **III.6-5 – Histoquímica para quantificação de fibras colágenas**

A trama colagênica do septo alveolar e dos granulomas foi observada através da coloração pelo Sirius red (DOLBER & SPACH 1993). Após a desparafinização e hidratação do material com três banhos de xilol e álcoois decrescentes (100 / 95 / 70%), as lâminas foram lavadas em água destilada por 10 minutos e colocadas na solução de ácido fosfomolibdico por 1 minuto. Depois, o ácido fosfomolibdico foi desprezado e as lâminas permaneceram imersas em solução de picrosirius por 90 minutos. Após esse período as lâminas foram retiradas do corante, lavadas em ácido

clorídrico 0,01N durante 2 minutos e posteriormente em álcool a 70% por 45 segundos. Seguiu-se a desidratação e a clarificação dos cortes histológicos em banhos de álcoois e xilol, respectivamente, e posteriormente as lâminas foram montadas em Entellan® (Merck).

Foram analisados quinze campos nos septos alveolares e 15 campos nos nódulos silicóticos por animal em microscópio de campo claro (Nikon Eclipse E800) com a objetiva de 40X acoplado a camera digital (Evolution VF - MediaCybernetics). As imagens foram analisadas utilizando-se o programa Image - Pro® Plus (Versão 4.5.1 – Media Cybernetics, USA).

### **III.7 – Extração de DNA**

Para a extração de DNA, os pulmões foram retirados, congelados em nitrogênio líquido, (aproximadamente 3 min) e mantidos a -70° C (STEFANI e cols 2003). Os pulmões congelados foram macerados por pistilo e os fragmentos resultantes foram colocados em um tubo eppendorf. Os fragmentos foram digeridos com 300 µg/mL de proteinase K® (Invitrogen – EUA) por 18 horas, a 56°C em solução (600µL) contendo Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, SDS a 2% e EDTA 10 mM (pH 8,0). O DNA foi extraído do homogeneizado com igual volume (600µL) de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente (TA). Após a centrifugação, a fase aquosa (sobrenadante) é separada de uma fase orgânica (inferior). A fase aquosa, onde estão os ácidos nucleicos, foi coletada e o DNA foi precipitado com 600 µl de isopropanol centrifugando a 14000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. O DNA precipitado foi então lavado com 500 µl de etanol 70%, centrifugando a 7500 rpm por 8 minutos a temperatura ambiente. O precipitado de

DNA após secar à temperatura ambiente, foi ressuspenso em 500  $\mu$ L de TE (5 mM Tris-HCL, pH 7,4; 0,1 mM EDTA). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (Uniscience) no comprimento de onda de 260 nm.

### **III.8 – PCR em tempo real – SYBR Green I®**

O sistema de aquisição do PCR em tempo real utilizou um fluoróforo intercalante de DNA dupla fita, denominado SYBR Green I (Applied Biosystems) cuja fluorescência é diretamente proporcional à formação do produto. Uma curva de diluição foi realizada utilizando-se DNA extraído do tecido pulmonar de um camundongo macho, para saber quão sensível o sistema de detecção era para detectar o gene SRY (*Sex determining region on Y*). Após a realização da curva de diluição, observou-se uma faixa ótima de concentração próxima de cinco nanogramas de DNA amplificado. Acima dessas concentrações, inibição total da reação foi constatada. A realização da curva também nos demonstrou que o sistema tinha a capacidade de amplificar o gene alvo a uma concentração de até dez picogramas, ou seja, o equivalente à quantidade do DNA genômico de duas células diplóides (KUDDUS e cols 2004, PIRKER e cols 2004) (Figura 4).

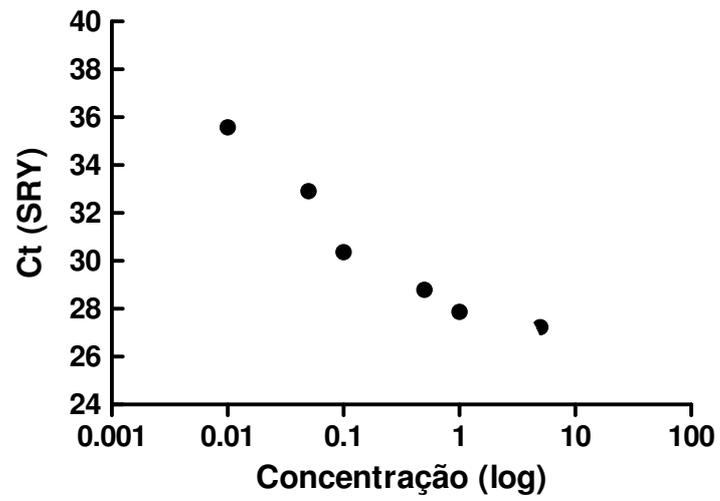


Figura 4 – Curva de diluição do DNA extraído de pulmão de camundongo macho. Os números indicam os Ct (início a ascensão exponencial) do gene SRY nas diferentes concentrações.

Conhecida a sensibilidade de detecção do sistema, foi realizado o PCR em tempo real das amostras experimentais. Como controles positivos foram utilizados amostras de DNA extraído de pulmões de camundongos fêmeas nos quais foram injetados (injeção dentro do parenquima pulmonar)  $2 \times 10^5$ ,  $10^6$  e  $2 \times 10^6$  CMMO, provenientes de camundongos machos (descrito acima). As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 20  $\mu\text{L}$  contendo 10  $\mu\text{L}$  de SYBR Green I Mastermix 2X (Applied Biosystems), 0,5  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo (senso e antisenso) e 2  $\mu\text{L}$  de DNA da amostra processada (5 ng). Para a amplificação utilizou-se uma máquina de PCR em tempo real da marca Applied Biosystems modelo 7000 que executou a seguinte programação: 95°C por 10 minutos para a ativação da enzima Taq polimerase, seguida de 40 ciclos de amplificação (95°C por 15 segundos, 60°C por 75 segundos). Uma curva padrão foi gerada utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes correspondentes ao SRY, assim como para o gene correspondente a GAPDH (Tabela 2). O número de células nos animais experimentais foi calculado comparando o valor de CT (*crosspoint threshold*) de amplificação em relação à curva padrão.

Molécula	Seqüência do oligonucleotídeo	Posição	Tamanho
<b>SRY</b>			
Sense	5'-TCATCGGAGGGCTAAAGTG-3'	228 – 246	88 pb
Antisense	5'-GTCCCACTGCAGAAGGTTG-3'	297 – 315	
NM_011564.1			
<b>GAPDH</b>			
Sense	5'-CCACCAACTGCTTAGCCC-3'	2674 – 2691	145 pb
Antisense	5'-GACACCTACAAAGAAGGGTCCA-3'	2797 – 2818	
NC_000072			

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados para o PCR em tempo real. Observam-se, as seqüências e localizações dos oligonucleotídeos utilizados, as espécies de origem da qual a seqüência foi gerada, seu número de acesso no pubmed, e o tamanho dos produtos de amplificação obtidos a partir da reação de PCR em tempo real.

### **III.9 – Análise Estatística**

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada no programa Sigma Stat para Windows (V.3.0). Diferenças entre os grupos foram comparadas através da análise de variância de dupla entrada (*Two-way ANOVA*) seguida do teste de *Tukey* [Fatores: (1) salina x sílica; (2) tratamento ou não com células]. Para a comparação entre os grupos SIL e SIL-Cell foram utilizados os testes *t Student* (dados paramétricos) e Mann-Whitney (dados não-paramétricos). Os valores correspondem à média + erro padrão da média (EPM) para dados paramétricos. Para dados não-paramétricos os valores são expressos como mediana e percentis 25-75%. O grau de significância considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **IV. RESULTADOS**

### **IV.1 – Mecânica Respiratória**

A taxa de mortalidade dos animais instilados com sílica foi de 47,4% e reduziu após terapia com células mononucleares derivadas de medula óssea (SIL-Cell: 21,4%). Não houve óbito em nenhum animal do grupo controle.

Houve aumento estatisticamente significativo da elastância estática do pulmão (Est,L) (Figura 5A) e das pressões necessárias para vencer os componentes resistivos ( $\Delta P1,L$ ) e viscoelásticos ( $\Delta P2,L$ ) do pulmão (Figura 5B) no grupo SIL em relação ao grupo C (Est,L=177%,  $\Delta P1,L=177\%$ ;  $\Delta P2,L=150\%$ ). A terapia com CMMO evitou tais modificações funcionais (Figuras 5A e 5B).

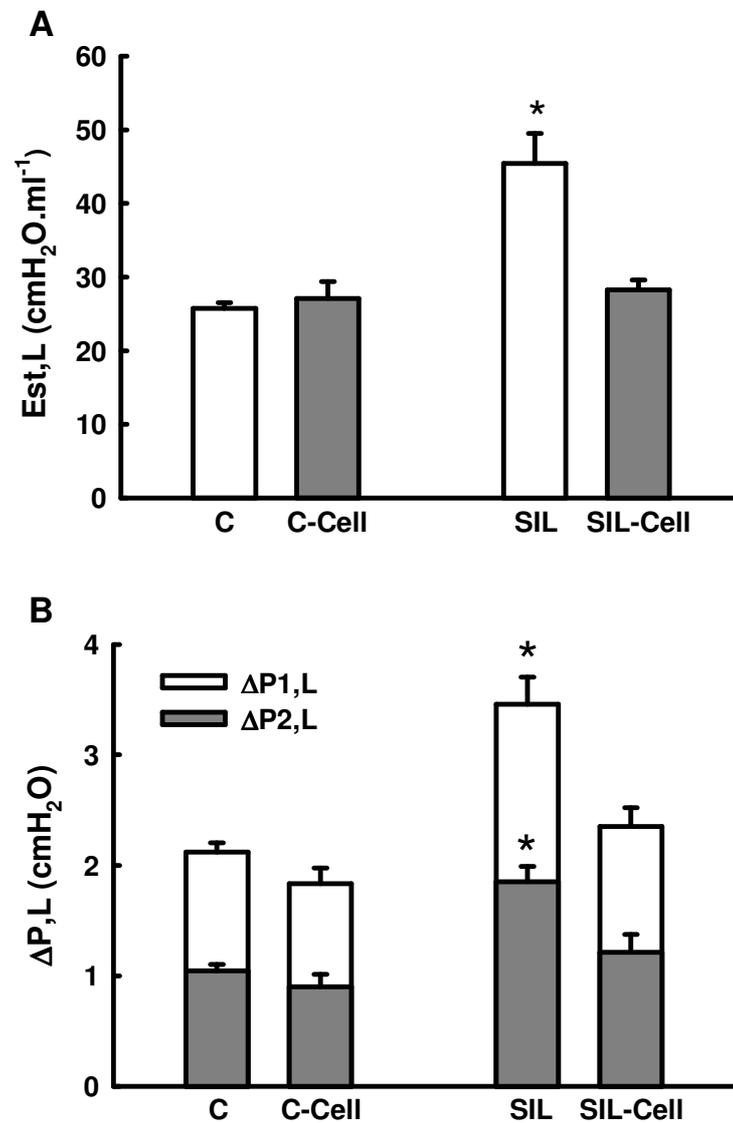


Figura 5 – Elastância estática e variações das pressões pulmonares. Os grupos C e SIL (camundongos instilados com salina 50  $\mu$ l ou sílica, 20 mg/50  $\mu$ l salina, respectivamente) foram tratados com CMMO ( $2 \times 10^6$ , *iv* – C-Cell and SIL-Cell, respectivamente). A: Elastância estática do pulmão (Est,L). B: Variação de pressão necessária para vencer os componentes resistivos do pulmão ( $\Delta P_{1,L}$ )(barra branca) e variação de pressão necessária para vencer os componentes viscoelásticos/inomogêneos do pulmão ( $\Delta P_{2,L}$ )(barra cinza). Variação de pressão total do pulmão ( $\Delta P_{tot,L}$ ) corresponde a barra inteira. Os valores correspondem à média + erro padrão da média (EPM) de 8 camundongos/grupo com 12 determinações por animal. \*Significativamente diferente de C ( $p < 0,05$ ).

## **IV.2 – Análise Histológica**

### **IV.2-1 – Histopatologia**

Os animais do grupo C apresentavam estrutura pulmonar preservada (Figura 6A). A terapia celular ( $2 \times 10^6$ , *iv*) nos animais C-Cell não levou a alterações no parênquima pulmonar (Figura 6B). O grupo SIL apresentou granulomas de tamanhos variados no parênquima. Os septos alveolares se apresentavam por vezes discretamente espessados pela presença de células inflamatórias (alveolite) (Figura 6C). Após a terapia celular, notou-se que os nódulos ainda exibiam uma heterogeneidade no tamanho, no entanto, tinham sua área diminuída (Figura 6D). Ademais, o parênquima pulmonar apresentava-se com menor área de colapso e edema intersticial.

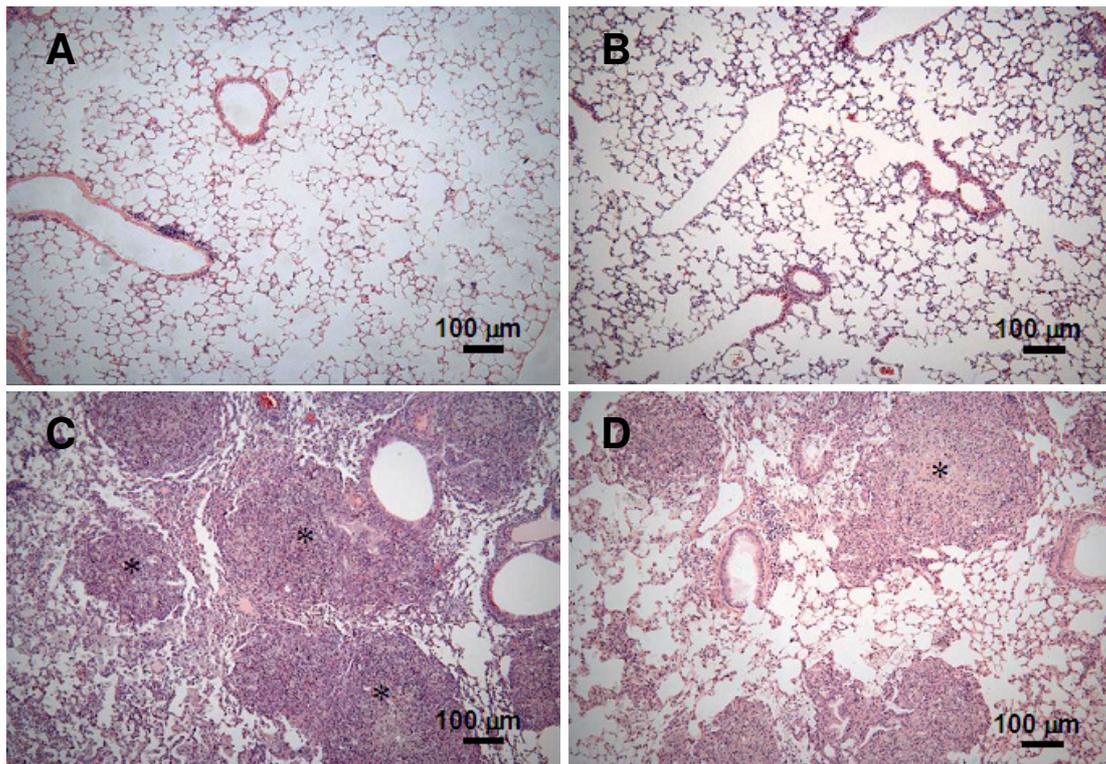


Figura 6 – Fotomicrografias do parênquima pulmonar corado com hematoxilina-eosina. [Grupos C (A), C-Cell (B), SIL (C) e SIL-Cell (D)]. Os grupos C e SIL (camundongos instilados com salina 50 µl ou sílica, 20 mg/50 µl salina, respectivamente) foram tratados com CMMO [ $2 \times 10^6$ , *iv* – C-Cell and SIL-Cell, respectivamente]. Nos grupos SIL e SIL-Cell evidencia-se a presença de granulomas dispersos no parênquima pulmonar (asteriscos).

#### IV.2-2 – Análise morfométrica no granuloma

A terapia celular reduziu significativamente a área de fração do granuloma (SIL: 93.3%  $\pm$  1.3; SIL-Cell: 38.0%  $\pm$  5.7) (Figura 7). No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada no número de células polimorfonucleares e células mononucleares no granuloma entre os grupos SIL e SIL-Cell (Tabela 3).

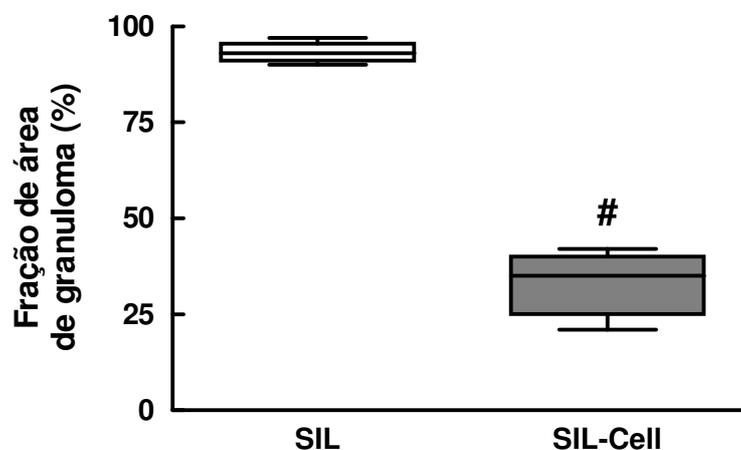


Figura 7 – *Box plot* da quantificação da fração de área de granulomas. A linha horizontal no interior da caixa representa a mediana; os limites inferior e superior da caixa indicam, respectivamente, o primeiro e o terceiro quartil, correspondendo aos elementos de posição 25% e 75% da amostra. Os segmentos de reta externos delimitam os valores mínimos e máximos das variáveis. O grupo SIL foi instilado com sílica (20 mg/50  $\mu$ l). SIL-Cell recebeu tratamento com CMMO ( $2 \times 10^6$ , iv). #Significativamente diferente do grupo SIL ( $p < 0,05$ ).

	PMN (%)	MN (%)	TOTAL (%)
<b>SIL</b>	8,35 $\pm$ 0,81	28,36 $\pm$ 0,65	36,71 $\pm$ 0,72
<b>SIL-Cell</b>	7,57 $\pm$ 1,05	27,91 $\pm$ 2,14	35,48 $\pm$ 1,71

Tabela 3 – Quantificação da celularidade no granuloma. SIL (camundongos instilados com sílica, 20 mg/50  $\mu$ l) SIL-Cell recebeu tratamento com CMMO ( $2 \times 10^6$ , iv). %MN = percentual de células mononucleares, %PMN = percentual de células polimorfonucleares, %TOTAL = percentual de células totais. Os valores correspondem à média + erro padrão da média (EPM) de 5-8 camundongos/grupo.

### **IV.2-3 – Detecção e quantificação dos macrófagos pulmonares através de imunomarcacão para a glicoproteína F4/80**

O número de macrófagos foi quantificado somente no septo alveolar, uma vez que, os macrófagos não apresentaram positividade para este antígeno no interior dos granulomas. No septo alveolar observou-se maior número de macrófagos no grupo SIL em relação ao grupo C (148%). Não se observou diferença significativa entre os grupos C e SIL-Cell (Figuras 8A, 8B, 8C, 8D e 8E).

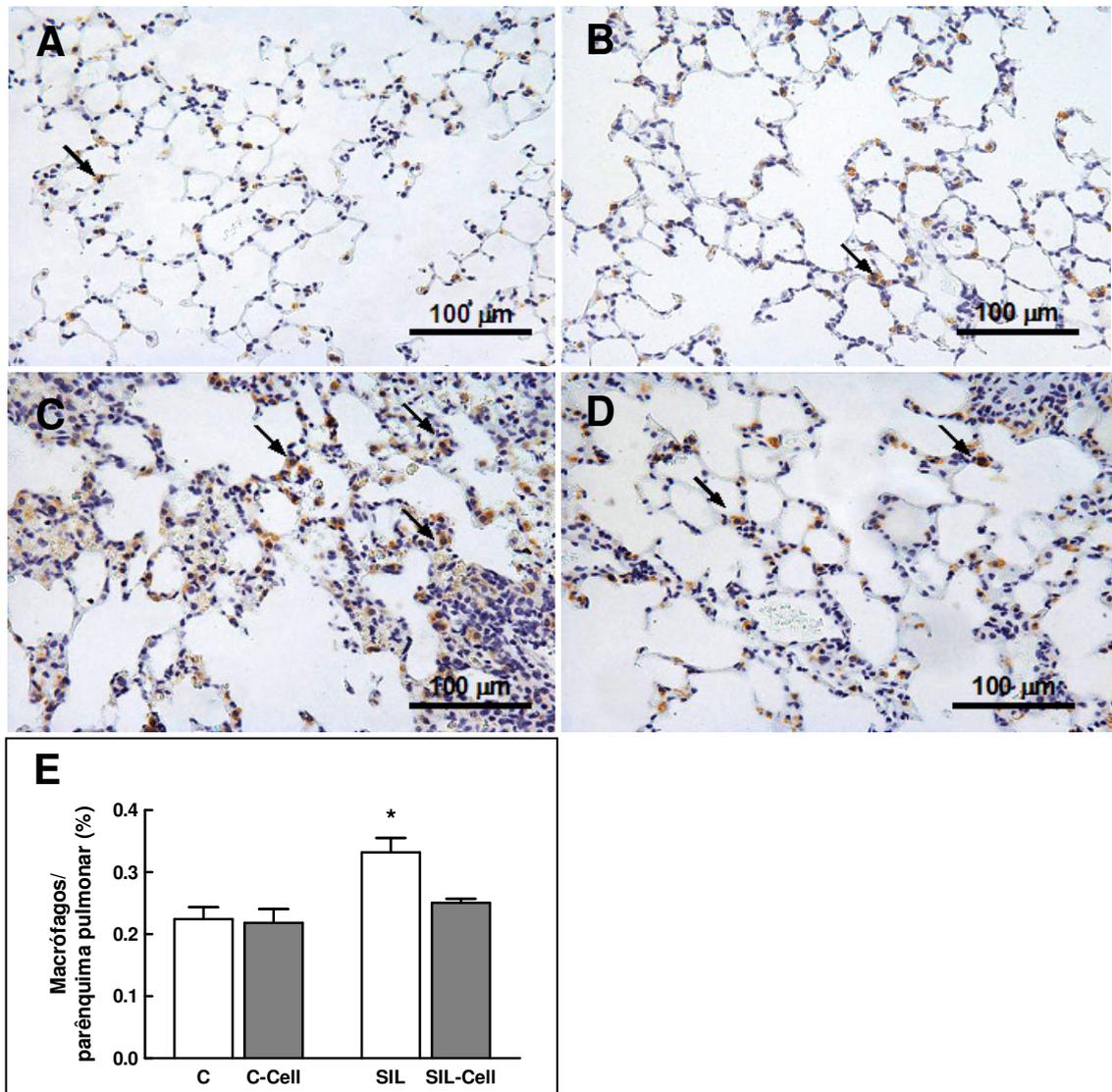


Figura 8 – Detecção e quantificação dos macrófagos pulmonares através de imunomarcagem para a glicoproteína F4/80. Os grupos C e SIL (camundongos instilados com salina 50 μl ou sílica, 20 mg/50 μl salina, respectivamente) foram tratados com CMMO ( $2 \times 10^6$ , *iv* – C-Cell and SIL-Cell, respectivamente). Fotomicrografias do parênquima pulmonar [Grupos C (A), C-Cell (B), SIL (C) e SIL-Cell (D)]. Setas: macrófagos marcados para a glicoproteína F4/80. Representação gráfica da quantificação de macrófagos no septo alveolar (E). Os valores correspondem à média + erro padrão da média (EPM) de 5-8 camundongos/grupo com 15 determinações por animal. \*Significativamente diferente de C ( $p < 0,05$ ).

#### **IV.2-4 – Detecção e quantificação dos macrófagos pulmonares através da marcação de radicais carboidráticos**

Os macrófagos ativados foram quantificados no septo alveolar e no interior do granuloma (Figuras 9A, 9B, 9C e 9D). Observou-se maior número de macrófagos ativados no grupo SIL em relação ao grupo C (141%). Não foram observadas diferenças significativas entre os demais grupos em relação ao grupo C. Incluindo o grupo que recebeu o tratamento com CMMO (SIL-Cell) (Figura 9E). No entanto, quando quantificado o número de macrófagos ativados no interior do granuloma, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos SIL e SIL-Cell (Figura 9F).

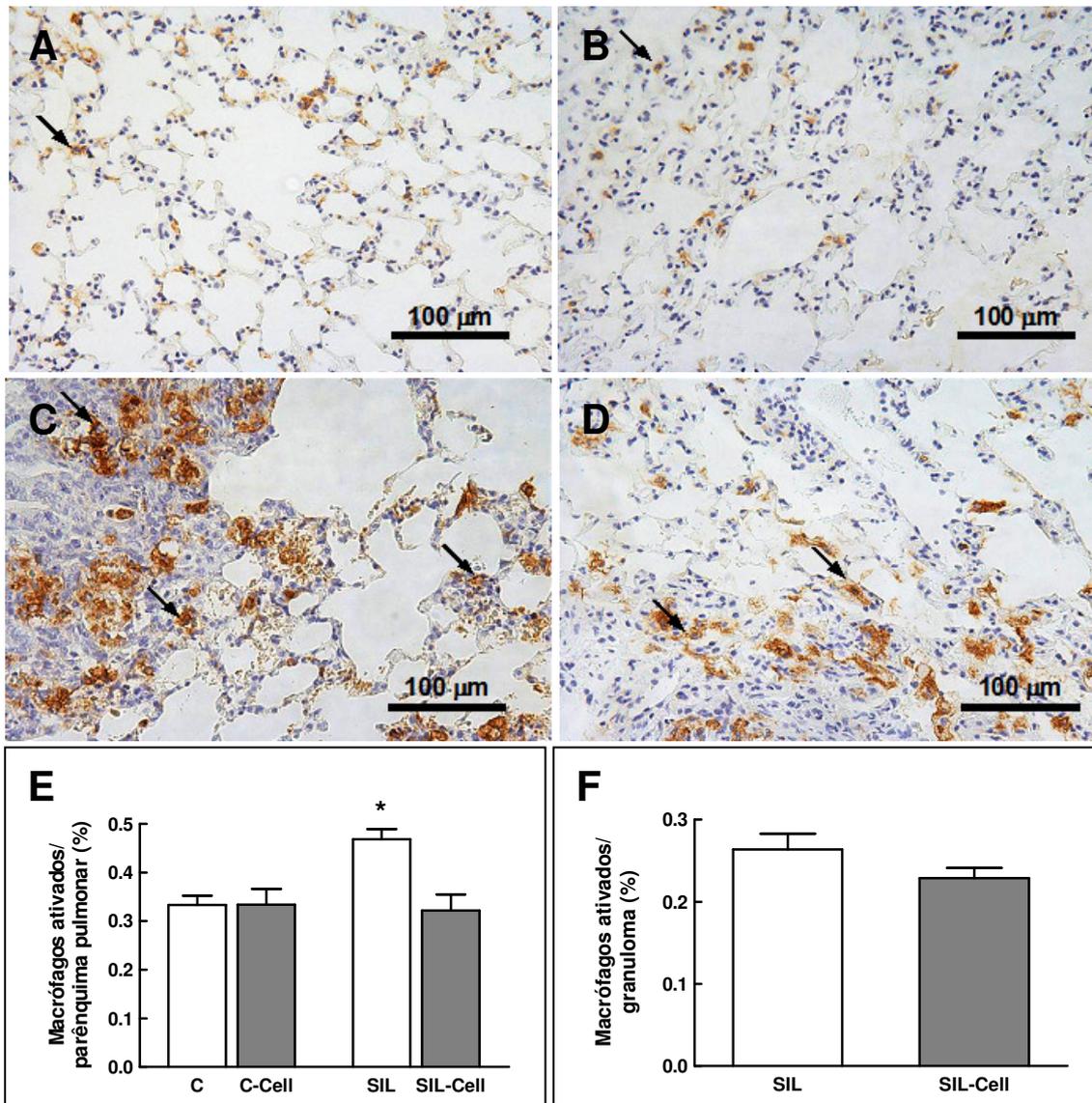


Figura 9 – Detecção histoquímica da lectina *Griffonia* e quantificação de macrófagos ativados. Os grupos C e SIL (camundongos instilados com salina 50  $\mu$ l ou sílica, 20 mg/50  $\mu$ l salina, respectivamente) foram tratados com CMMO ( $2 \times 10^6$ , *iv* – C-Cell and SIL-Cell, respectivamente). Fotomicrografias do parênquima pulmonar [Grupos C (A), C-Cell (B), SIL (C) e SIL-Cell (D)]. Macrófagos ativados marcados pela *Griffonia* (setas). Representação gráfica da quantificação de macrófagos ativados no septo alveolar (E) e no interior do granuloma (F). Os valores correspondem à média + erro padrão da média (EPM) de 5-8 camundongos/grupo com 15 determinações por animal. \*Significativamente diferente de C ( $p < 0,05$ ).

#### **IV.2-5 – Histoquímica para quantificação de fibras colágenas**

O conteúdo de fibras colágenas foi quantificado tanto no septo alveolar quanto no interior do granuloma (Figuras 10A, 10B, 10C e 10D). No septo alveolar a quantidade de fibras colágenas foi maior no grupo SIL em relação ao grupo C (152%), sendo que os animais tratados com CMMO apresentaram a mesma quantidade de fibras colágenas que o grupo C (Figura 10E). Quando quantificadas as fibras colágenas no interior do granuloma, houve uma redução significativa do número de fibras colágenas entre o grupo SIL-Cell em relação ao grupo SIL (65%) (Figura 10F).

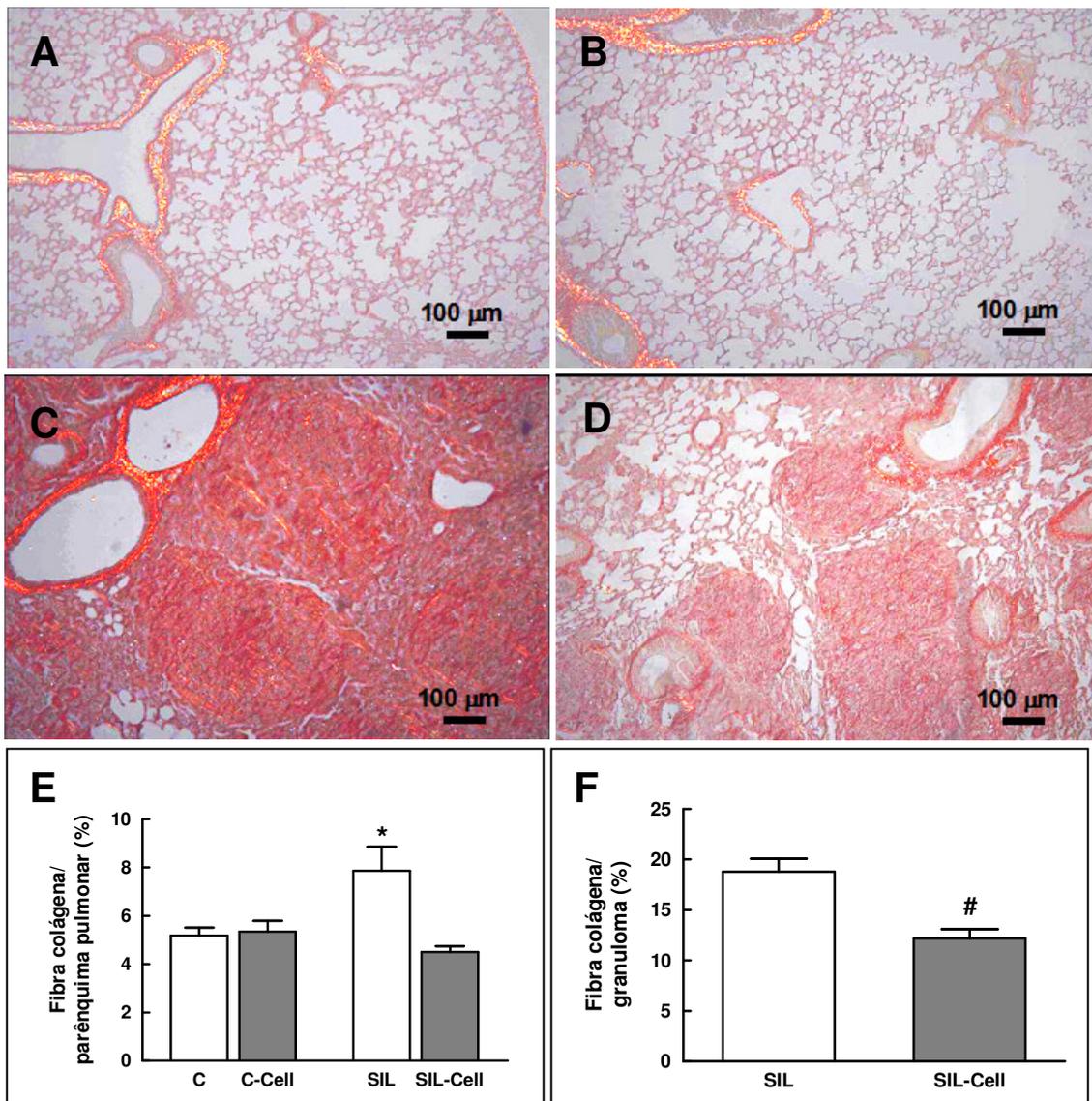


Figura 10 – Detecção de fibras colágenas e quantificação do conteúdo de colágeno. Os grupos C e SIL (camundongos instilados com salina 50  $\mu$ l ou sílica, 20 mg/50  $\mu$ l salina, respectivamente) foram tratados com CMMO ( $2 \times 10^6$ , *iv* – C-Cell and SIL-Cell, respectivamente). Fotomicrografias do parênquima pulmonar corados com Sirius Red [Grupos C (A), C-Cell (B), SIL (C) e SIL-Cell (D)]. Representação gráfica da quantificação do conteúdo de colágeno no septo alveolar (E) e no interior do granuloma (F). Os valores correspondem à média + erro padrão da média (EPM) de 5-8 camundongos/grupo com 15 determinações por animal. \*Significativamente diferente de C, #Significativamente diferente do grupo SIL ( $p < 0,05$ ).

### **IV.3 – Detecção do cromossomo Y**

Para garantir a integridade do DNA extraído, foi realizado o PCR em tempo real de um gene constitutivo - GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) das amostras, evidenciando a viabilidade do material (Figura 11). As curvas de amplificação do gene alvo (SRY) foram normalizadas pelo gene constitutivo (GAPDH), e foi usada a técnica de comparação por  $\Delta\Delta CT$  (LIVAK & SCHMITTGEN 2001). O PCR em tempo real detectou sinal do gene alvo nos controles positivos; no entanto, não foi capaz de detectar nenhum sinal específico do gene alvo nos grupos C-Cell e SIL-Cell (Figura 12).

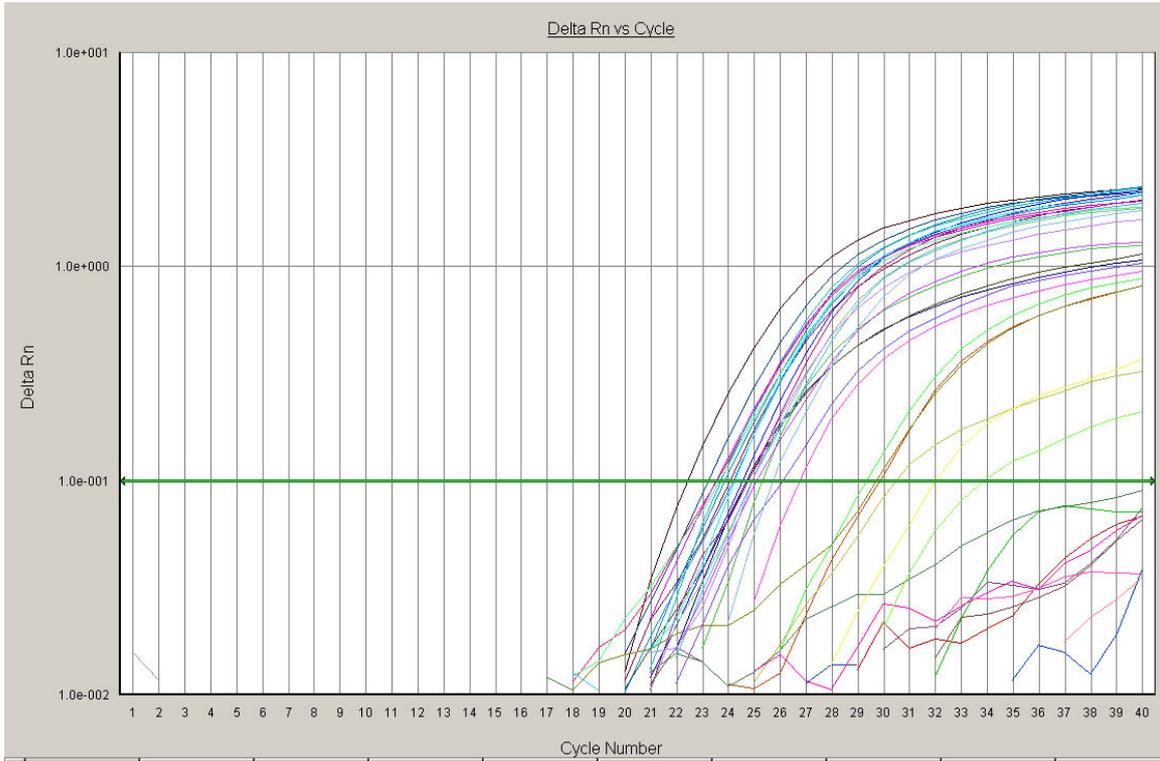


Figura 11 – Curva de amplificação do SRY e GAPDH.

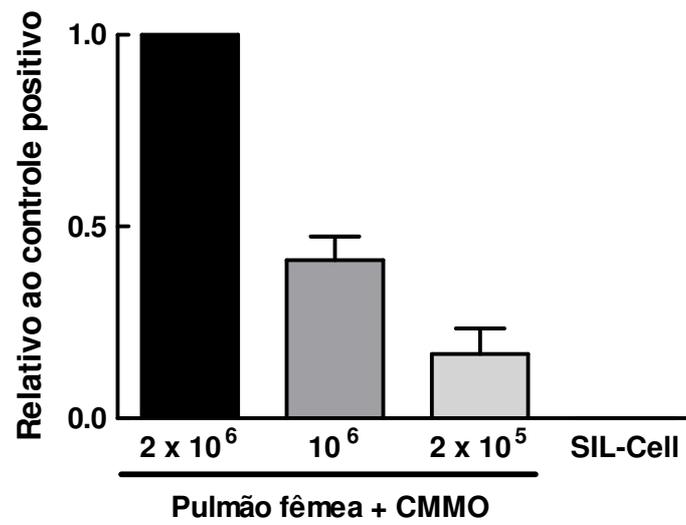


Figura 12 – Nível de detecção do gene SRY em relação aos controles positivos: pulmão de fêmea + CMMO ( $2 \times 10^6$ ,  $10^6$  e  $2 \times 10^5$ ). A normalização dos produtos é gerada pela diferença entre o número de ciclos dos dois produtos e pelo sinal gerado pelo DNA do controle positivo ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ). Não se observou sinal do gene no grupo SIL-Cell no 15º dia [tratamento com CMMO ( $2 \times 10^6$ ,  $iV$ )].

## **V. DISCUSSÃO**

No presente estudo, a terapia com células mononucleares derivadas de medula óssea atuou tanto na fibrogênese, diminuindo o conteúdo de fibras colágenas no parênquima pulmonar e no granuloma, como no processo inflamatório reduzindo o número de macrófagos ativados, levando a melhora morfo-funcional pulmonar.

Apesar da silicose em humanos se desenvolver ao longo dos anos, estudos experimentais demonstraram que mesmo uma exposição única a partículas de sílica leva a modificações funcionais e histológicas (BORGES e cols 2001, FAFPE e cols 2001, BORGES e cols 2002). Histologicamente, a silicose é caracterizada pela presença de granulomas, espessamento do septo alveolar e acúmulo de células inflamatórias, como por exemplo, macrófagos (DELGADO e cols 2006). Uma vez ativado, os macrófagos liberam citocinas e/ou fatores de crescimento que estimulam a produção de colágeno pelos fibroblastos (DELGADO e cols 2006). Para o desenvolvimento do modelo experimental de silicose, os animais foram instilados com 20 mg de sílica em 50 µl de solução salina, protocolo previamente desenvolvido e utilizado por Borges e colaboradores (2001, 2002) e Faffe e colaboradores (2001).

No presente estudo, a exposição a partículas de sílica resultou em inflamação e fibrose pulmonar, semelhantemente ao observado em estudos prévios (BORGES e cols 2001, FAFPE e cols 2001, BORGES e cols 2002). Tais modificações histológicas acarretaram alterações significativas dos parâmetros mecânicos, tais como: elastância estática do pulmão (Est,L) e pressões necessárias para vencer os componentes resistivos ( $\Delta P1$ ) e viscoelásticos ( $\Delta P2$ ) do pulmão em comparação ao grupo C (Est,L=177%,  $\Delta P1,L=177\%$ ;  $\Delta P2,L=150\%$ ). As modificações observadas em  $\Delta P1,L$  podem ser atribuídas a infiltração celular intrabronquial obstruindo o lúmen, e

as alterações em Est,L e  $\Delta P2,L$  podem estar associadas a presença de colapso alveolar, edema intersticial e presença de granulomas. O uso de células mononucleares derivadas de medula óssea evitou as alterações em Est,L,  $\Delta P1,L$  e  $\Delta P2,L$ . É interessante ressaltar que apesar da terapia com células mononucleares derivadas de medula óssea ter impedido as modificações nos parâmetros funcionais, apenas minimizou as alterações histológicas, onde observou-se menor número e tamanho de granulomas no tecido pulmonar. Similarmente, na prática clínica, na fase inicial da silicose, apesar da presença de granulomas pode não haver alterações funcionais (TERRA FILHO & SANTOS 2006), demonstrando que não necessariamente ocorre correlação entre achados histológicos e da mecânica pulmonar.

Os animais instilados com sílica (SIL) apresentaram aumento significativo do número de macrófagos F4/80 positivos e do número de macrófagos ativados no parênquima pulmonar, enquanto que a terapia com as células mononucleares derivadas de medula óssea evitou o aumento do número de macrófagos F4/80 positivos. Os macrófagos alveolares, na silicose, estão relacionados à manutenção do processo inflamatório em um ciclo vicioso: ao fagocitarem a partícula de sílica, estes são ativados e danificados, liberando a partícula de sílica fagocitada no ambiente pulmonar, para então outro macrófago fagocitar a mesma partícula de sílica e perpetuar o processo (GREENBERG e cols 2007, GILBERTI e cols 2008). O termo “macrófago ativado” indica uma maior capacidade de fagocitose do macrófago. Os sinais de ativação incluem citocinas, como por exemplo, IFN- $\gamma$ , GM-CSF e TNF- $\alpha$  (FUJIWARA & KOBAYASHI 2005). Após a ativação de macrófagos ocorre liberação de espécies reativas de oxigênio e fatores fibrogênicos, levando a ativação e proliferação de fibroblastos, com conseqüente deposição de fibras colágenas,

contribuindo para o processo de fibrose pulmonar. No entanto, a terapia com as células mononucleares derivadas de medula óssea, além de evitar o aumento do número de macrófagos, também evitou o aumento do número de macrófagos ativados no parênquima pulmonar, levando a uma redução do processo inflamatório. No granuloma, contudo, não houve diferenças no número de macrófagos ativados, assim como não houve diferenças no percentual de células mononucleares e polimorfonucleares por área de granuloma entre os animais com silicose tratados ou não com células mononucleares derivadas de medula óssea. Logo, a terapia celular reduziu o processo inflamatório no parênquima pulmonar, no entanto, quando observado o processo inflamatório no granuloma, não houve redução do mesmo. Sugerindo que uma vez formado o granuloma, o processo inflamatório não se encontra alterado naquele nicho.

Quando o processo de fibrose pulmonar foi analisado a partir da quantificação de fibras colágenas, observou-se aumento significativo do conteúdo de fibras colágenas no septo alveolar e no granuloma nos animais instilados com sílica (SIL). O tratamento com as células mononucleares derivadas de medula óssea diminuiu a fibrose pulmonar no parênquima pulmonar e granuloma. Em estudos anteriores, observou-se a migração de células-tronco derivadas de medula óssea para o pulmão, com conseqüente diferenciação das mesmas em fibroblastos e miofibroblastos, que são responsáveis pela secreção de componentes da matriz extracelular, como por exemplo, o colágeno, o que poderia contribuir ainda mais para a progressão da fibrose pulmonar (HASHIMOTO e cols 2004, SPEES e cols 2007). No entanto, no presente estudo não foram observados tais efeitos deletérios, sendo que o resultado benéfico observado no processo de fibrose pulmonar pode estar relacionado ao tempo curto entre a instilação de sílica e a injeção das células

mononucleares derivadas de medula óssea (uma hora após indução do modelo de silicose), não havendo tempo suficiente para a formação de um ambiente pulmonar propício para a diferenciação de tais células em fibroblastos e miofibroblastos, como descrito previamente (HASHIMOTO e cols 2004, SPEES e cols 2007).

Diversos trabalhos vêm demonstrando resultados satisfatórios em relação ao uso de células derivadas de medula óssea em doenças respiratórias (KOTTON e cols 2001, ORTIZ e cols 2003, ROJAS e cols 2005, ZHAO e cols 2008). No entanto, nenhum trabalho anterior ao nosso, demonstrou os efeitos da terapia com células mononucleares derivadas de medula óssea na mecânica pulmonar. As células mononucleares derivadas de medula óssea selecionadas em detrimento de outros tipos celulares, objetivando poder utilizar o mesmo protocolo de terapia celular para casos clínicos. Nesse contexto, uma vantagem do uso de células mononucleares derivadas de medula óssea na prática clínica é a facilidade de obtenção de tais células, acarretando menor manipulação, uma vez que não precisam ser cultivadas durante longos períodos e, com isso, reduzindo o risco de contaminação. Uma vez observada a melhora morfo-funcional pulmonar, resolvemos analisar a presença das células mononucleares derivadas de medula óssea no parênquima pulmonar. As CMMO foram obtidas de camundongos doadores machos e, em seguida, injetadas em camundongos receptores fêmeas. Primeiramente, foi realizada a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), no entanto, dado a birrefringência das partículas de sílica e sua conseqüente autofluorescência, não foi possível o uso de técnicas de microscopia confocal. Além disso, no presente estudo, diferentemente de estudos anteriores (BORGES e cols 2001, FAFPE e cols 2001, BORGES e cols 2002) foram utilizados camundongos C57BL/6, uma vez que nosso objetivo era utilizar camundongos doadores transgênicos, que expressavam a *Green*

*Fluorescence Protein* (GFP). A GFP é expressa em todas as células do camundongo, fato que proporciona a diferenciação entre as células do camundongo receptor e as células provenientes do camundongo doador, no entanto, devido a birrefringência das partículas de sílica, também foi inviável a caracterização das células dos doadores através da visualização de células GFP. A seguir, a presença das células mononucleares derivadas de medula óssea proveniente de doadores machos, que foram injetadas em animais receptores fêmeas, foi analisada através da técnica de PCR em tempo real para detecção do gene SRY, específico do cromossomo Y. A sensibilidade do nosso protocolo nos permitiu observar a amplificação do gene alvo até a concentração de dez picogramas, ou seja, o equivalente à quantidade de DNA genômico de duas células diplóides (KUDDUS e cols 2004, PIRKER e cols 2004). Com o método utilizado podemos observar a amplificação do gene alvo nos controles positivos, no entanto, não foi capaz de detectar o gene alvo no tecido pulmonar dos animais controle e dos animais instilados com sílica que receberam o tratamento com as células mononucleares derivadas de medula óssea (C-Cell e SIL-Cell, respectivamente). Logo, a melhora nos parâmetros morfo-funcionais parece não ter sido pela permanência das células mononucleares derivadas de medula óssea no tecido pulmonar. Contrariamente, diversos outros estudos constataram a presença das células derivadas de medula óssea no parênquima pulmonar, apesar destas se apresentarem em níveis tão baixos (ORTIZ e cols 2003) que não seriam capazes de induzir melhora do processo inflamatório (GUPTA e cols 2007, XU e cols 2007). Nesse contexto, Ohnishi e colaboradores observaram em modelo murino de hipóxia, que após a terapia com células mononucleares derivadas de medula óssea, houve um maior aumento da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, quando

comparada com a terapia celular utilizando-se outras células-tronco adultas, constatando-se um maior efeito parácrino das CMMO (OHNISHI e cols 2007). Logo, a melhora dos processos inflamatórios e de fibrose pulmonar poderia ser atribuída a um efeito parácrino, onde as CMMO, produzem e/ou induzem a secreção de citocinas e fatores de crescimento (CAPLAN & DENNIS 2006, GNECCHI e cols 2008).

O presente trabalho apresenta algumas limitações: 1) utilizou-se um modelo específico de fibrose pulmonar induzido pela sílica. Logo, não podemos extrapolar esses dados para outros modelos experimentais de fibrose e diferentes graus de lesão pulmonar; 2) a terapia na silicose foi realizada com células mononucleares derivadas de medula óssea. Dessa forma, não é possível atribuir a nenhuma célula em especial os resultados benéficos observados. No entanto, tais células foram escolhidas pela possibilidade da realização futura de estudos clínicos; 3) o momento da injeção das células mononucleares de medula óssea, logo após a indução do modelo de silicose. Como não existem dados na literatura sobre os efeitos da terapia com células derivadas de medula óssea em modelo de fibrose induzida por sílica, optou-se pelo tempo de uma hora para a injeção de células. Certamente, outros estudos deverão ser realizados utilizando-se diferentes momentos para a terapia celular; 4) análise do cromossomo Y somente no dia 15. Logo, caso tal estudo fosse realizado mais precocemente talvez fosse possível evidenciar a presença do cromossomo Y.

## **VI. CONCLUSÕES**

A terapia, com as células mononucleares derivadas de medula óssea, atuou no processo inflamatório inibindo o aumento do número de macrófagos, e na fibrogênese, diminuindo o conteúdo de fibras colágenas no septo alveolar e no granuloma, levando a melhora dos parâmetros morfo-funcionais. No entanto, tais modificações não foram determinadas pela permanência das células mononucleares derivadas de medula óssea no tecido pulmonar, sugerindo que a melhora observada pode ser atribuída a um possível efeito parácrino.

## **VII. REFERÊNCIAS**

ABU-SHAMS, K., FANLO, P., LORENTE, M.P. - [Silicosis]. **An Sist Sanit Navar**, 2005;28 Suppl 1:83-9.

ALIOTTA, J.M., PASSERO, M., MEHARG, J., KLINGER, J., DOONER, M.S., PIMENTEL, J., QUESENBERRY, P.J. - Stem cells and pulmonary metamorphosis: new concepts in repair and regeneration. **J Cell Physiol**, 2005;204(3):725-41.

ANJOS-AFONSO, F., SIAPATI, E.K., BONNET, D. - In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. **J Cell Sci**, 2004;117(Pt 23):5655-64.

AUSTYN, J.M., GORDON, S. - F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. **Eur J Immunol**, 1981;11(10):805-15.

BANKS, D.E., CHENG, Y.H., WEBER, S.L., MA, J.K. - Strategies for the treatment of pneumoconiosis. **Occup Med**, 1993;8(1):205-32.

BARBARIN, V., ARRAS, M., MISSON, P., DELOS, M., MCGARRY, B., PHAN, S.H., LISON, D., HUAUX, F. - Characterization of the effect of interleukin-10 on silica-induced lung fibrosis in mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 2004;31(1):78-85.

BARBARIN, V., NIHOUL, A., MISSON, P., ARRAS, M., DELOS, M., LECLERCQ, I., LISON, D., HUAUX, F. - The role of pro- and anti-inflammatory responses in silica-induced lung fibrosis. **Respir Res**, 2005a;6:112.

BARBARIN, V., XING, Z., DELOS, M., LISON, D., HUAUX, F. - Pulmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2005b;288(5):L841-8.

BATES, J.H., DECRAMER, M., CHARTRAND, D., ZIN, W.A., BODDENER, A., MILIC-EMILI, J. - Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. **J Appl Physiol**, 1985a;59(3):732-7.

BATES, J.H., LUDWIG, M.S., SLY, P.D., BROWN, K., MARTIN, J.G., FREDBERG, J.J. - Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. **J Appl Physiol**, 1988;65(1):408-14.

BATES, J.H., ROSSI, A., MILIC-EMILI, J. - Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. **J Appl Physiol**, 1985b;58(6):1840-8.

BONNET, D. - Biology of human bone marrow stem cells. **Clin Exp Med**, 2003;3(3):140-9.

BORGES, V.M., FALCAO, H., LEITE-JUNIOR, J.H., ALVIM, L., TEIXEIRA, G.P., RUSSO, M., NOBREGA, A.F., LOPES, M.F., ROCCO, P.M., DAVIDSON, W.F., LINDEN, R., YAGITA, H., ZIN, W.A., DOSREIS, G.A. - Fas ligand triggers pulmonary silicosis. **J Exp Med**, 2001;194(2):155-64.

BORGES, V.M., LOPES, M.F., FALCAO, H., LEITE-JUNIOR, J.H., ROCCO, P.R., DAVIDSON, W.F., LINDEN, R., ZIN, W.A., DOSREIS, G.A. - Apoptosis underlies immunopathogenic mechanisms in acute silicosis. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 2002;27(1):78-84.

BROWN, J.M., SWINDLE, E.J., KUSHNIR-SUKHOV, N.M., HOLIAN, A., METCALFE, D.D. - Silica-directed mast cell activation is enhanced by scavenger receptors. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 2007;36(1):43-52.

CAPLAN, A.I., DENNIS, J.E. - Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **J Cell Biochem**, 2006;98(5):1076-84.

CARDEN, D., XIAO, F., MOAK, C., WILLIS, B.H., ROBINSON-JACKSON, S., ALEXANDER, S. - Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. **Am J Physiol**, 1998;275(2 Pt 2):H385-92.

CARPENTER, M.K., ROSLER, E.S., FISK, G.J., BRANDENBERGER, R., ARES, X., MIURA, T., LUCERO, M., RAO, M.S. - Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. **Dev Dyn**, 2004;229(2):243-58.

CASTRANOVA, V., KANG, J.H., MA, J.K., MO, C.G., MALANGA, C.J., MOORE, M.D., SCHWEGLER-BERRY, D., MA, J.Y. - Effects of bisbenzylisoquinoline alkaloids on alveolar macrophages: correlation between binding affinity, inhibitory potency, and antifibrotic potential. **Toxicol Appl Pharmacol**, 1991;108(2):242-52.

CHANG, H.K., MORTOLA, J.P. - Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurement. **J Appl Physiol**, 1981;51(1):218-25.

CHEN, Y., CHEN, J., DONG, J., LIU, W. - Antifibrotic effect of interferon gamma in silicosis model of rat. **Toxicol Lett**, 2005;155(3):353-60.

CHEN, Y., DONG, X.J., ZHANG, G.R., SHAO, J.Z., XIANG, L.X. - In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes. **J Cell Biochem**, 2007;102(1):52-63.

CONGET, P.A., MINGUELL, J.J. - Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. **J Cell Physiol**, 1999;181(1):67-73.

COWIE, R.L. - The influence of silicosis on deteriorating lung function in gold miners. **Chest**, 1998;113(2):340-3.

DAVIS, G.S., PFEIFFER, L.M., HEMENWAY, D.R. - Expansion of interferon-gamma-producing lung lymphocytes in mouse silicosis. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 1999;20(4):813-24.

DAVIS, G.S., PFEIFFER, L.M., HEMENWAY, D.R., RINCON, M. - Interleukin-12 is not essential for silicosis in mice. **Part Fibre Toxicol**, 2006;3:2.

DE CAPITANI, E.M. - Silicosis (still) among us. **J Bras Pneumol**, 2006;32(6):xxxiii-xxxv.

DE MESQUITA JUNIOR, J.A., LOPES, A.J., JANSEN, J.M., DE MELO, P.L. - Using the forced oscillation technique to evaluate respiratory resistance in individuals with silicosis. **J Bras Pneumol**, 2006;32(3):213-20.

DEANS, R.J., MOSELEY, A.B. - Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Exp Hematol**, 2000;28(8):875-84.

DELGADO, L., PARRA, E.R., CAPELOZZI, V.L. - Apoptosis and extracellular matrix remodelling in human silicosis. **Histopathology**, 2006;49(3):283-9.

DENNIS, J.E., CHARBORD, P. - Origin and differentiation of human and murine stroma. **Stem Cells**, 2002;20(3):205-14.

DOLBER, P.C., SPACH, M.S. - Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. **J Histochem Cytochem**, 1993;41(3):465-9.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D., HORWITZ, E. - Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, 2006;8(4):315-7.

DOSREIS, G.A., BORGES, V.M., ZIN, W.A. - The central role of Fas-ligand cell signaling in inflammatory lung diseases. **J Cell Mol Med**, 2004;8(3):285-93.

FAFFE, D.S., SILVA, G.H., KURTZ, P.M., NEGRI, E.M., CAPELOZZI, V.L., ROCCO, P.R., ZIN, W.A. - Lung tissue mechanics and extracellular matrix composition in a murine model of silicosis. **J Appl Physiol**, 2001;90(4):1400-6.

FAIRCHILD, P.J., ROBERTSON, N.J., MINGER, S.L., WALDMANN, H. - Embryonic stem cells: protecting pluripotency from alloreactivity. **Curr Opin Immunol**, 2007;19(5):596-602.

FERRARI, G., CUSELLA-DE ANGELIS, G., COLETTA, M., PAOLUCCI, E., STORNAIUOLO, A., COSSU, G., MAVILIO, F. - Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, 1998;279(5356):1528-30.

FRIEDENSTEIN, A.J., CHAILAKHYAN, R.K., LATSINIK, N.V., PANASYUK, A.F., KEILISS-BOROK, I.V. - Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Transplantation**, 1974;17(4):331-40.

FUJIMURA, N. - Pathology and pathophysiology of pneumoconiosis. **Curr Opin Pulm Med**, 2000;6(2):140-4.

FUJIWARA, N., KOBAYASHI, K. - Macrophages in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, 2005;4(3):281-6.

GARN, H., FRIEDETZKY, A., KIRCHNER, A., JAGER, R., GEMSA, D. - Experimental silicosis: a shift to a preferential IFN-gamma-based Th1 response in thoracic lymph nodes. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2000;278(6):L1221-30.

GILBERTI, R.M., JOSHI, G.N., KNECHT, D.A. - The phagocytosis of crystalline silica particles by macrophages. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 2008;39(5):619-27.

GNECCHI, M., ZHANG, Z., NI, A., DZAU, V.J. - Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circ Res**, 2008;103(11):1204-19.

GOODMAN, G.B., KAPLAN, P.D., STACHURA, I., CASTRANOVA, V., PAILES, W.H., LAPP, N.L. - Acute silicosis responding to corticosteroid therapy. **Chest**, 1992;101(2):366-70.

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

GRIFFITHS, M.J., BONNET, D., JANES, S.M. - Stem cells of the alveolar epithelium. **Lancet**, 2005;366(9481):249-60.

GROVE, J.E., BRUSCIA, E., KRAUSE, D.S. - Plasticity of bone marrow-derived stem cells. **Stem Cells**, 2004;22(4):487-500.

GULUMIAN, M., BORM, P.J., VALLYATHAN, V., CASTRANOVA, V., DONALDSON, K., NELSON, G., MURRAY, J. - Mechanistically identified suitable biomarkers of exposure, effect, and susceptibility for silicosis and coal-worker's pneumoconiosis: a comprehensive review. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, 2006;9(5):357-95.

GUNDERSEN, H.J., BAGGER, P., BENDTSEN, T.F., EVANS, S.M., KORBO, L., MARCUSSEN, N., MOLLER, A., NIELSEN, K., NYENGAARD, J.R., PAKKENBERG, B., ET AL. - The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, 1988;96(10):857-81.

GUPTA, N., SU, X., POPOV, B., LEE, J.W., SERIKOV, V., MATTHAY, M.A. - Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. **J Immunol**, 2007;179(3):1855-63.

HAMILTON, R.F., JR., THAKUR, S.A., HOLIAN, A. - Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. **Free Radic Biol Med**, 2007.

HASHIMOTO, N., JIN, H., LIU, T., CHENSUE, S.W., PHAN, S.H. - Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. **J Clin Invest**, 2004;113(2):243-52.

HNIZDO, E., MURRAY, J. - Risk of pulmonary tuberculosis relative to silicosis and exposure to silica dust in South African gold miners. **Occup Environ Med**, 1998;55(7):496-502.

HNIZDO, E., SLUIS-CREMER, G.K., ABRAMOWITZ, J.A. - Emphysema type in relation to silica dust exposure in South African gold miners. **Am Rev Respir Dis**, 1991;143(6):1241-7.

HNIZDO, E., VALLYATHAN, V. - Chronic obstructive pulmonary disease due to occupational exposure to silica dust: a review of epidemiological and pathological evidence. **Occup Environ Med**, 2003;60(4):237-43.

HOLANDA, M.A., HOLANDA, M.A., MARTINS, M.P., FELISMINO, P.H., PINHEIRO, V.G. - Silicosis in Brazilian pit diggers: relationship between dust exposure and radiologic findings. **Am J Ind Med**, 1995;27(3):367-78.

HORWITZ, E.M., LE BLANC, K., DOMINICI, M., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F.C., DEANS, R.J., KRAUSE, D.S., KEATING, A. - Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, 2005;7(5):393-5.

HOSHI, S., TAMAI, Y., TAMURA, A., ISHIDA, H., YOSHIDA, N., OGAWA, C., SUZUKI, N., SANO, Y., KAWABATA, Y. - Silico-asbestosis that responded to steroid therapy. **Intern Med**, 2006;45(15):917-21.

HUBBARD, A.K., TIMBLIN, C.R., SHUKLA, A., RINCON, M., MOSSMAN, B.T. - Activation of NF-kappaB-dependent gene expression by silica in lungs of luciferase reporter mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2002;282(5):L968-75.

ISHIZAWA, K., KUBO, H., YAMADA, M., KOBAYASHI, S., NUMASAKI, M., UEDA, S., SUZUKI, T., SASAKI, H. - Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. **FEBS Lett**, 2004;556(1-3):249-52.

JIANG, Y., JAHAGIRDAR, B.N., REINHARDT, R.L., SCHWARTZ, R.E., KEENE, C.D., ORTIZ-GONZALEZ, X.R., REYES, M., LENVIK, T., LUND, T., BLACKSTAD, M., DU, J., ALDRICH, S., LISBERG, A., LOW, W.C., LARGAESPADA, D.A., VERFAILLIE, C.M. - Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, 2002;418(6893):41-9.

KENNEDY, M.C. - Aluminium powder inhalations in the treatment of silicosis of pottery workers and pneumoconiosis of coal-miners. **Br J Ind Med**, 1956;13(2):85-101.

KNIGHT, D.A., HOLGATE, S.T. - The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. **Respirology**, 2003;8(4):432-46.

KOCHI, T., OKUBO, S., ZIN, W.A., MILIC-EMILI, J. - Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects of flow and volume. **J Appl Physiol**, 1988a;64(6):2636-46.

KOCHI, T., OKUBO, S., ZIN, W.A., MILIC-EMILI, J. - Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. **J Appl Physiol**, 1988b;64(1):441-50.

KOTTON, D.N., FABIAN, A.J., MULLIGAN, R.C. - Failure of bone marrow to reconstitute lung epithelium. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 2005;33(4):328-34.

KOTTON, D.N., MA, B.Y., CARDOSO, W.V., SANDERSON, E.A., SUMMER, R.S., WILLIAMS, M.C., FINE, A. - Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. **Development**, 2001;128(24):5181-8.

KRAUSE, D.S. - Bone marrow-derived cells and stem cells in lung repair. **Proc Am Thorac Soc**, 2008;5(3):323-7.

KRAUSE, D.S., THEISE, N.D., COLLECTOR, M.I., HENEGARIU, O., HWANG, S., GARDNER, R., NEUTZEL, S., SHARKIS, S.J. - Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell**, 2001;105(3):369-77.

KUDDUS, R.H., LEE, Y.H., VALDIVIA, L.A. - A semiquantitative PCR technique for detecting chimerism in hamster-to-rat bone marrow xenotransplantation. **J Immunol Methods**, 2004;285(2):245-51.

LAI, J.H. - Immunomodulatory effects and mechanisms of plant alkaloid tetrandrine in autoimmune diseases. **Acta Pharmacol Sin**, 2002;23(12):1093-101.

LASSANCE, R.M., PASSARO, C.P., ABREU, S., PROTA, L.F., XISTO, D.G., NEGRI, E.M., CALDINI, E., ZIN, W.A., MORALES, M.M., ROCCO, P.R.M., SILVA, P.R.M. Potential therapy for silicosis with bone marrow derived mesenchymal stem cells. American Thoracic Society; 2006; San Diego: Proceedings of the American Thoracic Society; 2006. p. 252-.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. - Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. **Methods**, 2001;25(4):402-8.

LOI, R., BECKETT, T., GONCZ, K.K., SURATT, B.T., WEISS, D.J. - Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells. **Am J Respir Crit Care Med**, 2006;173(2):171-9.

LORING, S.H., MEAD, J. - Action of the diaphragm on the rib cage inferred from a force-balance analysis. **J Appl Physiol**, 1982;53(3):756-60.

MACPHERSON, H., KEIR, P., WEBB, S., SAMUEL, K., BOYLE, S., BICKMORE, W., FORRESTER, L., DORIN, J. - Bone marrow-derived SP cells can contribute to the respiratory tract of mice in vivo. **J Cell Sci**, 2005;118(Pt 11):2441-50.

MADDOX, D.E., SHIBATA, S., GOLDSTEIN, I.J. - Stimulated macrophages express a new glycoprotein receptor reactive with Griffonia simplicifolia I-B4 isolectin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1982;79(1):166-70.

MAJKA, M., KUCIA, M., RATAJCZAK, M.Z. - Stem cell biology - a never ending quest for understanding. **Acta Biochim Pol**, 2005;52(2):353-8.

MARON-GUTIERREZ, T., NASCIMENTO, C.S., MORALES, M.M., ROCCO, P.R.M. - Entendendo a fisiopatologia da silicose. **Pulmão RJ**, 2008;17:33-7.

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

MIGLIACCIO, C.T., BUFORD, M.C., JESSOP, F., HOLIAN, A. - The IL-4R $\alpha$  pathway in macrophages and its potential role in silica-induced pulmonary fibrosis. **J Leukoc Biol**, 2007.

MORRIS, L., GRAHAM, C.F., GORDON, S. - Macrophages in haemopoietic and other tissues of the developing mouse detected by the monoclonal antibody F4/80. **Development**, 1991;112(2):517-26.

MORTOLA, J.P., NOWORAJ, A. - Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. **J Appl Physiol**, 1983;55(1 Pt 1):250-3.

MOSSMAN, B.T., CHURG, A. - Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. **Am J Respir Crit Care Med**, 1998;157(5 Pt 1):1666-80.

NEURINGER, I.P., RANDELL, S.H. - Stem cells and repair of lung injuries. **Respir Res**, 2004;5:6.

O'REILLY, K.M., PHIPPS, R.P., THATCHER, T.H., GRAF, B.A., VAN KIRK, J., SIME, P.J. - Crystalline and amorphous silica differentially regulate the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in pulmonary fibroblasts: implications for pulmonary fibrosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2005;288(6):L1010-6.

OHNISHI, S., YASUDA, T., KITAMURA, S., NAGAYA, N. - Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. **Stem Cells**, 2007;25(5):1166-77.

ORLIC, D., KAJSTURA, J., CHIMENTI, S., BODINE, D.M., LERI, A., ANVERSA, P. - Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. **Pediatr Transplant**, 2003;7 Suppl 3:86-8.

ORTIZ, L.A., DUTREIL, M., FATTMAN, C., PANDEY, A.C., TORRES, G., GO, K., PHINNEY, D.G. - Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2007;104(26):11002-7.

ORTIZ, L.A., GAMBELLI, F., MCBRIDE, C., GAUPP, D., BADDOO, M., KAMINSKI, N., PHINNEY, D.G. - Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2003;100(14):8407-11.

PARKS, W.C. - Matrix metalloproteinases in lung repair. **Eur Respir J Suppl**, 2003;44:36s-8s.

PELOSI, P., ROCCO, P.R., NEGRINI, D., PASSI, A. - The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation. **An Acad Bras Cienc**, 2007;79(2):285-97.

PERDEREAU, C., GODAT, E., MAUREL, M.C., HAZOUARD, E., DIOT, E., LALMANACH, G. - Cysteine cathepsins in human silicotic bronchoalveolar lavage fluids. **Biochim Biophys Acta**, 2006;1762(3):351-6.

PIRKER, C., RAIDL, M., STEINER, E., ELBLING, L., HOLZMANN, K., SPIEGL-KREINECKER, S., AUBELE, M., GRASL-KRAUPP, B., MAROSI, C., MICKSCHE, M., BERGER, W. - Whole genome amplification for CGH analysis: Linker-adaptor PCR as the method of choice for difficult and limited samples. **Cytometry A**, 2004;61(1):26-34.

PITTENGER, M.F., MACKAY, A.M., BECK, S.C., JAISWAL, R.K., DOUGLAS, R., MOSCA, J.D., MOORMAN, M.A., SIMONETTI, D.W., CRAIG, S., MARSHAK, D.R. - Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 1999;284(5411):143-7.

PORTER, D.W., MILLECCHIA, L.L., WILLARD, P., ROBINSON, V.A., RAMSEY, D., MCLAURIN, J., KHAN, A., BRUMBAUGH, K., BEIGHLEY, C.M., TEASS, A., CASTRANOVA, V. - Nitric oxide and reactive oxygen species production causes progressive damage in rats after cessation of silica inhalation. **Toxicol Sci**, 2006;90(1):188-97.

PROCKOP, D.J. - Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, 1997;276(5309):71-4.

PROCKOP, D.J. - "Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). **Clin Pharmacol Ther**, 2007;82(3):241-3.

RAGHOW, R. - The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. **FASEB J**, 1994;8(11):823-31.

RAO, K.M., PORTER, D.W., MEIGHAN, T., CASTRANOVA, V. - The sources of inflammatory mediators in the lung after silica exposure. **Environ Health Perspect**, 2004;112(17):1679-86.

RAYMOND, L.W., WINTERMEYER, S. - Medical surveillance of workers exposed to crystalline silica. **J Occup Environ Med**, 2006;48(1):95-101.

RIPPON, H.J., POLAK, J.M., QIN, M., BISHOP, A.E. - Derivation of distal lung epithelial progenitors from murine embryonic stem cells using a novel three-step differentiation protocol. **Stem Cells**, 2006;24(5):1389-98.

ROBERTSON, N.J., BROOK, F.A., GARDNER, R.L., COBBOLD, S.P., WALDMANN, H., FAIRCHILD, P.J. - Embryonic stem cell-derived tissues are immunogenic but their inherent immune privilege promotes the induction of tolerance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2007;104(52):20920-5.

ROCCO, P.R., FACCHINETTI, L.D., FERREIRA, H.C., NEGRI, E.M., CAPELOZZI, V.L., FAFTE, D.S., ZIN, W.A. - Time course of respiratory mechanics and pulmonary structural remodelling in acute lung injury. **Respir Physiol Neurobiol**, 2004;143(1):49-61.

ROJAS, M., XU, J., WOODS, C.R., MORA, A.L., SPEARS, W., ROMAN, J., BRIGHAM, K.L. - Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 2005;33(2):145-52.

SALDIVA, P.H., ZIN, W.A., SANTOS, R.L., EIDELMAN, D.H., MILIC-EMILI, J. - Alveolar pressure measurement in open-chest rats. **J Appl Physiol**, 1992;72(1):302-6.

SANDERSON, W.T., STEENLAND, K., DEDDENS, J.A. - Historical respirable quartz exposures of industrial sand workers: 1946-1996. **Am J Ind Med**, 2000;38(4):389-98.

SANTOS, F.B., NAGATO, L.K., BOECHEM, N.M., NEGRI, E.M., GUIMARAES, A., CAPELOZZI, V.L., FAFTE, D.S., ZIN, W.A., ROCCO, P.R. - Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. **J Appl Physiol**, 2006;100(1):98-106.

SCABILLONI, J.F., WANG, L., ANTONINI, J.M., ROBERTS, J.R., CASTRANOVA, V., MERCER, R.R. - Matrix metalloproteinase induction in fibrosis and fibrotic nodule formation due to silica inhalation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2005;288(4):L709-17.

SHAPIRO, S.D., SENIOR, R.M. - Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 1999;20(6):1100-2.

SHARMA, S.K., PANDE, J.N., VERMA, K. - Effect of prednisolone treatment in chronic silicosis. **Am Rev Respir Dis**, 1991;143(4 Pt 1):814-21.

SPEES, J.L., POCIASK, D.A., SULLIVAN, D.E., WHITNEY, M.J., LASKY, J.A., PROCKOP, D.J., BRODY, A.R. - Engraftment of bone marrow progenitor cells in a rat model of asbestos-induced pulmonary fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**, 2007;176(4):385-94.

SRIVASTAVA, K.D., ROM, W.N., JAGIRDAR, J., YIE, T.A., GORDON, T., TCHOU-WONG, K.M. - Crucial role of interleukin-1beta and nitric oxide synthase in silica-induced inflammation and apoptosis in mice. **Am J Respir Crit Care Med**, 2002;165(4):527-33.

STANILOVA, S., MITEVA, L., PRAKOVA, G. - Interleukin-12B-3'UTR polymorphism in association with IL-12p40 and IL-12p70 serum levels and silicosis severity. **Int J Immunogenet**, 2007;34(3):193-9.

STANILOVA, S., MITEVA, L., PRAKOVA, G. - IL-12Bpro and GSTP1 polymorphisms in association with silicosis. **Tissue Antigens**, 2008;71(2):169-74.

STEFANI, M.M., MARTELLI, C.M., GILLIS, T.P., KRAHENBUHL, J.L. - In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. **J Infect Dis**, 2003;188(7):1024-31.

SWIJNENBURG, R.J., SCHREPFER, S., GOVAERT, J.A., CAO, F., RANSOHOFF, K., SHEIKH, A.Y., HADDAD, M., CONNOLLY, A.J., DAVIS, M.M., ROBBINS, R.C., WU, J.C. - Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2008;105(35):12991-6.

TAKAHASHI, M., LI, T.S., SUZUKI, R., KOBAYASHI, T., ITO, H., IKEDA, Y., MATSUZAKI, M., HAMANO, K. - Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2006;291(2):H886-93.

TERRA FILHO, M., SANTOS, P. - Silicosis. **J Bras Pneumol**, 2006;32 Suppl 2:S41-7.

TOMOKUNI, A., OTSUKI, T., ISOZAKI, Y., KITA, S., UEKI, H., KUSAKA, M., KISHIMOTO, T., UEKI, A. - Serum levels of soluble Fas ligand in patients with silicosis. **Clin Exp Immunol**, 1999;118(3):441-4.

VALLYATHAN, V., SHI, X.L., DALAL, N.S., IRR, W., CASTRANOVA, V. - Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. Potential role in acute silica-induced lung injury. **Am Rev Respir Dis**, 1988;138(5):1213-9.

VAN DEN BRULE, S., MISSON, P., BUHLING, F., LISON, D., HUAUX, F. - Overexpression of cathepsin K during silica-induced lung fibrosis and control by TGF-beta. **Respir Res**, 2005;6:84.

VAN HAAFTEN, T., THEBAUD, B. - Adult bone marrow-derived stem cells for the lung: implications for pediatric lung diseases. **Pediatr Res**, 2006;59(4 Pt 2):94R-9R.

WANG, L., BOWMAN, L., LU, Y., ROJANASAKUL, Y., MERCER, R.R., CASTRANOVA, V., DING, M. - Essential role of p53 in silica-induced apoptosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2005;288(3):L488-96.

WANG, S.X., LIU, P., WEI, M.T., CHEN, L., GUO, Y., WANG, R.Y., TU, Z.G., LIANG, X.C. - Roles of Serum Clara Cell Protein 16 and Surfactant Protein-D in the Early Diagnosis and Progression of Silicosis. **J Occup Environ Med**, 2007;49(8):834-9.

WARE, L.B., MATTHAY, M.A. - The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, 2000;342(18):1334-49.

WEIBEL, E.R. Morphometry: stereological theory and practical methods. In: Dekker GJNY, ed. **Models of Lung Disease-Microscopy and Structural Methods** 1990:199-247.

WEISS, D.J. - Stem cells and cell therapies for cystic fibrosis and other lung diseases. **Pulm Pharmacol Ther**, 2007.

WEISS, D.J., BERBERICH, M.A., BOROK, Z., GAIL, D.B., KOLLS, J.K., PENLAND, C., PROCKOP, D.J. - Adult stem cells, lung biology, and lung disease. NHLBI/Cystic Fibrosis Foundation Workshop. **Proc Am Thorac Soc**, 2006;3(3):193-207.

WEISS, D.J., KOLLS, J.K., ORTIZ, L.A., PANOSKALTSIS-MORTARI, A., PROCKOP, D.J. - Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. **Proc Am Thorac Soc**, 2008;5(5):637-67.

WEISSMAN, I.L. - Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, 2000;100(1):157-68.

WEST, J.B. Estrutura e Função. **Respiratory Physiology, The essentials**. Baltimore: Williams and Wilkins 1995:1-10.

WEST, J.B., MATHIEU-COSTELLO, O. - Structure, strength, failure, and remodeling of the pulmonary blood-gas barrier. **Annu Rev Physiol**, 1999;61:543-72.

WU, D.C., BOYD, A.S., WOOD, K.J. - Embryonic stem cell transplantation: potential applicability in cell replacement therapy and regenerative medicine. **Front Biosci**, 2007;12:4525-35.

XIE, Q.M., TANG, H.F., CHEN, J.Q., BIAN, R.L. - Pharmacological actions of tetrandrine in inflammatory pulmonary diseases. **Acta Pharmacol Sin**, 2002;23(12):1107-13.

XU, J., WOODS, C.R., MORA, A.L., JOODI, R., BRIGHAM, K.L., IYER, S., ROJAS, M. - Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 2007;293(1):L131-41.

YAMADA, M., KUBO, H., KOBAYASHI, S., ISHIZAWA, K., NUMASAKI, M., UEDA, S., SUZUKI, T., SASAKI, H. - Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. **J Immunol**, 2004;172(2):1266-72.

YAMAZAKI, S., YOSHIKE, F., HIRAI, K., KAKEGAWA, T., IKEDA, M., NAGATA, A., SAITO, G., NISHIMURA, H., HOSAKA, N., EHARA, T. - Silica-associated systemic lupus erythematosus in an elderly man. **Intern Med**, 2007;46(22):1867-71.

ZHAO, F., ZHANG, Y.F., LIU, Y.G., ZHOU, J.J., LI, Z.K., WU, C.G., QI, H.W. - Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraftment on bleomycin-induced lung injury in rats. **Transplant Proc**, 2008;40(5):1700-5.

ZIN, W.A., ROCCO, P.R.M. Organização morfofuncional do sistema respiratório. In: Aires MdM, ed. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1999:499-502.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)