



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

BERNARDO MIGUEL DE OLIVEIRA PASCARELLI

**O papel do receptor gama ativado por proliferador
de peroxissoma (PPAR γ) na silicose murina**

RIO DE JANEIRO
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Bernardo Miguel de Oliveira Pascarelli

**O papel do receptor gama ativado por proliferador
de peroxissoma (PPAR γ) na silicose murina**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfológicas.

Orientadores:

Profa. Dra. Christina Maeda Takiya
Laboratório de Patologia Celular
Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

Prof. Dr. Célio Geraldo Freire de Lima
Laboratório de Biologia Imunitária
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

Rio de Janeiro
2009

Pascarelli, Bernardo Miguel de Oliveira

O papel do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) / Bernardo Miguel de Oliveira Pascarelli. -- Rio de Janeiro: UFRJ/ICB/PCM, 2009.

xiv, 125 f.: il.;29,7cm

Orientadores: Christina Maeda Takiya e Célio Geraldo Freire de Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Ciências Biomédicas / Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, 2009.

Referências: f. 112 - 124.

1. Silicose. 2. PPAR gama. 3. Fibrose pulmonar. 4. Patologia - Tese. I. Takiya, Christina Maeda. II. Lima, Célio G. Freire de. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, PCM. IV. Título

Bernardo Miguel de Oliveira Pascarelli

**O papel do receptor gama ativado por proliferador
de peroxissoma (PPAR γ) na silicose murina**

Orientadores:

Profa. Dra. Christina Maeda Takiya

Prof. Dr. Célio Geraldo Freire de Lima

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfológicas.

Profa. Dra. Márcia Cury El Cheikh, ICB/UFRJ (examinador)

Prof. Dr. Robson Coutinho Silva, IBCCF/UFRJ (examinador)

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado, IOC/FIOCRUZ (examinador)

Profa. Dra. Maria Isabel Doria Rossi, ICB/UFRJ (revisora e membro suplente)

Prof. Dr. Sérgio Luiz Gomes Antunes, IOC/FIOCRUZ (membro suplente)

Profa. Dra. Christina Maeda Takiya, ICB/UFRJ (orientadora)

Prof. Dr. Célio Geraldo Freire de Lima, IBCCF/UFRJ (orientador)

Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto, ICB/UFRJ (Coordenador do curso)

Rio de Janeiro, _____, de _____ de 2009.

A minha família, com afeto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, ser supremo onisciente, onipresente e onipotente. Obrigado por ter revelado Sua face em cada mínima estrutura molecular que governa a vida. Quanto mais estudo, mais observo a orquestração perfeita dos eventos biológicos e mais minha fé se afirma em Sua existência. Sou grato por toda a graça que me tem ofertado em cada momento de minha vida e por todas as descobertas que me tem permitido.

A duas pessoas muito especiais em minha vida: meus pais, Dilson Miguel Araujo Pascarelli e Maria de Fátima de Oliveira Pascarelli. Sem vocês, não teria chegado até aqui. Obrigado, pai e mãe, por todo seu esforço em me propiciar uma criação primorosa no seio de uma família de professores. Suas preocupações, seus ensinamentos e seu amor, acima de tudo, foram essenciais para a formação da pessoa que sou hoje. A ajuda de vocês foi fundamental para que eu superasse mais essa etapa.

A minha irmã, Bárbara Maria de Oliveira Pascarelli, pessoa maravilhosa e solidária. Meu espelho de desenvolvimento profissional, me introduziu na área das Ciências Biológicas e sempre me ajudou, esclarecendo uma dúvida ou outra. Obrigado por seu carinho e seu amor, tão importantes para mim, e por ser essa “mana” incrível. Sei que você está muito feliz com mais esta vitória em minha vida.

A minha querida avó, Disa Araujo Pascarelli, a quem tanto admiro. Seus conselhos sábios, maduros e experientes me deram luz em momentos de verdadeira dúvida e angústia. Obrigado por ter-me feito enxergar os fatos da vida de uma forma mais serena. Não conseguiria chegar ao fim desse trabalho sem você.

A meus outros avós, que não estão mais aqui, por todos os ensinamentos passados através das histórias que ouvi e das lembranças que tenho recolhido aqui e ali... Sei que, onde quer que estejam, estão muito felizes e orgulhosos do seu neto.

A todos os meus familiares, por me fazerem entender o verdadeiro sentido da palavra família. Em especial, a minha tia Denise Pascarelli Hardoy, que sempre demonstrou seu amor, incentivando-me sonhos e pesquisas científicas e

minimizando minhas “desventuras” com a Língua Portuguesa; a meu tio Pedro Hardoy, pelas conversas sobre diferentes temas as quais nunca me deixaram ser superficial; a minha tia Felisbela de Oliveira Tavares, pelo estímulo, pela troca de histórias e companhia de viagens e a meu tio Homero Tavares (*in memoriam*), que contribuiu com suas idéias para minha formação como educador.

A minha namorada, amiga e companheira, Karina Mastropasqua Rebello, por todo o apoio e força para a conclusão desse trabalho, além da ajuda na revisão das referências. Obrigado também por todos os momentos bons que passamos e pelos que ainda passaremos juntos.

Aos amigos de faculdade, por todo tempo de convivência amistosa em aulas, festas e viagens de campo. Em particular, a Raphael Farache, amigo de todas as horas; a Diogo Santos Netto, por nossas discussões filosóficas infindáveis; e a Vinícius Peruzzi pelo companheirismo e torcida. Um muito obrigado também às amigas Amanda, Kelly, Luciana e aos casais de amigos Simone e Junior, Olívia e Eduardo.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Celular do ICB-UFRJ, André Barreira, Leandro Miranda, Luis, Daniel, Silvania e Priscila Frazão, obrigado pelo cotidiano agradável no laboratório.

Ao amigo e aluno de doutorado Leonardo Campos Monção e à amiga e aluna de iniciação Graziela, por toda a ajuda em várias técnicas que foram utilizadas neste trabalho.

À amiga Isabella Assis, por todo o carinho, preocupação e força nos “tropeços” desta caminhada.

Ao amigo Túlio Ventura, pela amizade fraternal, pelas proveitosas conversas, pelo incentivo e pelos momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Radovan Borojevic e a todos do Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular do ICB-UFRJ que viabilizaram toda a infra-estrutura necessária para este trabalho, especialmente Silvio, Roberto, Edna e Gorete.

Às componentes da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do ICB-UFRJ, Simone, Tânia e Graça, pela presteza em me ajudar, qualquer que fosse o problema.

Ao coordenador do PCM, Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto, por sua disponibilidade e atenção para solucionar todas as questões relacionadas ao curso.

Ao Prof. Dr. George dos Reis e a todos do Laboratório de Biologia Imunitária do IBCFF-UFRJ, principalmente Carla Pinheiro, por possibilitarem que parte do trabalho fosse realizado em suas instalações e por toda ajuda e empenho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado, por ceder os animais para nossos experimentos e também pelo estímulo e discernimento em momentos difíceis.

A todos os componentes do Laboratório de Patologia do IOC-FIOCRUZ, pela convivência harmoniosa e pela ajuda despendida. Em particular, aos alunos Arnon Jurberg, Tiana Gonçalves, Tatiane Costa e Flávia Lamarão, pela amizade, pelos conselhos científicos e pelas muitas tardes que passamos juntos, analisando material no microscópio confocal. A Luzia Caputo, Luciana Souza, Luzia Barros, Pedro Paulo Manso, Priscila Guedes, Bárbara Dias, Marcelo Barbosa, Ester Motta, Rafaela Rymer, Elizângela Monteiro, Andréa Natividade, Iolanda Deolinda, Juciara Souza, Filomena de Fátima Cruz, Alexandra Corrêa, Rosinei Miranda, Newton Junior e José Carvalho por terem cooperado com o projeto e contribuído para a alegria do dia-a-dia.

Ao Prof. Dr. Henrique Leonel Lenzi, uma pessoa tão extraordinária, sou profundamente grato pelos ensinamentos que me proporcionou e pelos vários momentos de alegria que compartilhamos.

À Profa. Dra. Maria Isabel Rossi, pela rápida e eficiente revisão deste trabalho e pelas excelentes sugestões para melhorá-lo.

A meu co-orientador, Prof. Dr. Célio Geraldo Freire de Lima, pela contribuição fundamental para a realização de nossa pesquisa e por ter me acolhido como um grande amigo.

A minha orientadora, Profa. Dra. Christina Maeda Takiya, por ter confiado em mim desde o início de meu curso de graduação; pelo carinho e preocupação; pelos “pitos” nas horas corretas e pelo sorriso nas vitórias; por todo o exemplo de ética e compromisso com o trabalho científico e pela ajuda incomensurável na elaboração desta dissertação. Obrigado por tudo.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo suporte financeiro ao projeto.

Enfim, o meu agradecimento a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação e para a realização deste estudo.

“Não posso ser dominado e nem comandado pelas pressões de uma sociedade de alta velocidade. Ainda sinto que sou um ser biológico.”

Dr. Henrique Lenzi

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”
Albert Einstein

RESUMO

PASCARELLI, Bernardo Miguel de Oliveira. **O papel do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) na silicose murina.** Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

A silicose é uma doença fibrótica pulmonar, potencialmente letal, ocasionada pela inalação e conseqüente deposição de poeira contendo sílica. Alguns estudos vêm demonstrando que a ativação de fatores de transcrição denominados PPARs (receptores ativados por proliferador de peroxissoma), principalmente da isoforma PPAR γ , leva a inibição da inflamação em modelos animais de doenças pulmonares. Visando estudar o papel do PPAR γ na silicose murina, utilizamos o modelo de instilação intratraqueal de partículas de sílica (20mg) em camundongos Balb/C e realizamos o tratamento dos animais por gavagem com rosiglitazona, agonista de PPAR γ (10mg/kg) em dois períodos de 7 dias: grupo 8 dias (1 a 7 dias após a instilação) e grupo 28 dias (21 a 27 dias após a instilação). A presença deste receptor na silicose murina foi verificada por imunomarcção. Através de histomorfometria, analisamos a celularidade, a quantidade de partículas de sílica no tecido, a preservação do espaço aéreo, o nível de fibrose e remodelamento de fibras colagênicas e do sistema elástico. Estudamos a população macrófaga através da imunomarcção de F4/80 e da lectina BSL I e verificamos a imunoexpressão de TGF- β e iNOS, bem como a quantidade de células apoptóticas por TUNEL. Neste estudo, demonstramos células do epitélio brônquico, macrófagos e células fibroblastóides positivas para PPAR γ no modelo de silicose e portanto potenciais alvos da ativação deste receptor. A observação histológica sugere uma atenuação do processo inflamatório nos animais tratados com rosiglitazona tanto no tempo de 8 dias quanto no de 28 dias. Os dados histomorfométricos demonstraram que nos pulmões dos animais tratados com rosiglitazona houve menor celularidade, maior área de espaço aéreo, diminuição do volume ocupado por fibras colagênicas e manutenção de fibras do sistema elástico ($p < 0,001$). Encontramos menor ($p < 0,01$) quantidade de sílica livre e as imunomarcações demonstraram diminuição da imunoexpressão de TGF- β e de iNOS ($p < 0,001$) e da quantidade de macrófagos (F4/80 $^+$) e de macrófagos ativados (BSL I $^+$) ($p < 0,01$). Verificamos também diminuição ($p < 0,001$) do número de células apoptóticas por TUNEL nos animais tratados. Nossos resultados sugerem que o tratamento com rosiglitazona está correlacionado a uma diminuição do processo patológico da silicose, evidenciando a ativação do PPAR γ como moduladora da inflamação e da fibrose nesta doença.

ABSTRACT

PASCARELLI, Bernardo Miguel de Oliveira. **O papel do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) na silicose murina.** Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Silicosis is a potentially lethal fibrotic lung disease caused by silica inhalation and its deposition. Some studies have reported that activation of transcription factors called PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), mainly PPAR γ , can inhibit inflammation in animal models of lung disorders. To study the role of PPAR γ in murine silicosis, we used intratracheal instillation of silica particles (20mg) in Balb/c mice and treated them with rosiglitazone, a PPAR γ agonist (10mg/kg) in two different times: 8 days (treatment from 1 to 7 days after instillation) and 28 days (treatment from 21 to 27 days after instillation). The presence of PPAR γ in our model was investigated with immunolabelling. By histomorfometry, we analysed cellularity, quantity of silica particles in the tissue, fibrosis level and remodelling of collagen and elastic system fibers. We studied the macrophage population by immunohistochemistry to F4/80 and by BSL I lectin labelling and verified the immunoexpression of TGF- β and iNOS, and also quantified the apoptotic cells by TUNEL. In this study, we show that bronchial epithelial cells, macrophages and fibroblastoid cells were positive for PPAR γ and are then potential target for this receptor activation. The histological observations suggested an attenuation of the inflammatory process in rosiglitazone treated animals at 8 and 28 days. The histomorfometric data demonstrated in treated animals a reduced cellularity, larger space air area, a decrease of the volume occupied by collagen fibers and preservation of the elastic fibers system ($p < 0,001$). We found less ($p < 0,01$) silica particles in the tissue and a reduction of TGF- β and iNOS immunoexpression ($p < 0,001$) and of the amount of macrophages (F4/80 $^+$) and activated macrophages (BSL I $^+$) ($p < 0,01$). We also verified a reduced number of TUNEL positive apoptotic cells ($p < 0,001$). Our results suggest that rosiglitazone treatment is correlated to a impairment of ongoing silicosis pathologic process, showing that PPAR γ can be a modulator of fibrosis and inflammation in this disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1: Esquemas e Fotomicrografias da Morfologia do Sistema Respiratório.** **A)** Esquema representativo da ramificação brônquica até os alvéolos (Adaptado de DIDON, 2008). **B)** Desenho esquemático representando a porção terminal da árvore brônquica (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). **C)** Corte histológico de pulmão mostrando um bronquíolo terminal e um respiratório contínuo com o saco alveolar e os alvéolos. Coloração com parrosanilina e azul-de-toluidina (adaptado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). **D)** Grande aumento, da estrutura alveolar. Note a presença de células endoteliais, dos pneumócitos do tipo I e II e de macrófagos alveolares. Observe, ainda, os septos interalveolares indicados pelas cabeças de setas brancas (adaptado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). 24
- FIGURA 2: Esquema ilustrativo dos pulmões de um camundongo.** Observe o pulmão direito com quatro lobos e o esquerdo com um lobo único. (COOK, M, disponível em <<http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure53.shtml>>, Acesso em: 05 jun. 2008, 21:50) 27
- FIGURA 3: Mecanismos envolvidos na patogênese da silicose.** Citotoxicidade direta provocada pelas propriedades químicas da sílica e geração de ROS devido à fagocitose de partículas de sílica pelos AMs. As ROS ativam fatores de transcrição que controlam a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas além de fatores fibrogênicos nos macrófagos. A apoptose de AMs leva ao recrutamento e ativação de neutrófilos que perpetuam o ciclo da lesão. (adaptado de CASTRANOVA, 2004) 37
- FIGURA 4: Representação esquemática dos domínios funcionais dos PPARs.** Os PPARs possuem uma estrutura em domínios funcionais que consiste de um domínio de ativação amino-terminal (AF1), um domínio central de ligação ao DNA (DBD), com a presença de dedos de zinco (Zn) e um domínio de interação com o ligante na porção carboxi-terminal (LBD). A região LBD define a especificidade da interação com o ligante; determina as interações com co-ativadores e co-repressores através de mudanças alostéricas na região AF2 e também contribui para a heterodimerização dos PPARs. (adaptado de GLASS & OGAWA, 2006) 39
- FIGURA 5: Ilustração da ligação do PPAR ao DNA na forma de heterodímero com o RXR.** O heterodímero se liga ao PPRE na região promotora do gene-alvo. Quando há presença do ligante, há a transcrição do gene-alvo (adaptado de GLASS & OGAWA, 2006)..... 40
- FIGURA 6: Esquema dos diferentes mecanismos de atividade de regulação transcricional dos PPARs.** **a)** Transativação dependente de ligante: Os PPARs ativam a transcrição de uma forma dependente de ligante pela interação direta com a região promotora do gene-alvo que contém o PPRE, na forma de heterodímero com RXR. A ligação de agonistas leva ao recrutamento de co-ativadores que modificam a estrutura da cromatina e facilitam a montagem da maquinaria de transcrição gênica na região promotora. **b)** Transrepressão dependente de ligante: Os PPARs reprimem a transcrição gênica, antagonizando a atividade de outros fatores de transcrição como o NF- κ B e o AP-1. **c)** Repressão independente de ligante: Os PPARs se ligam aos PPRES na ausência de ligantes e recrutam co-repressores que mediam a atividade de repressão. Este complexo de co-repressores antagoniza a ação de co-ativadores e mantém os genes em seu estado reprimido na ausência do ligante. (adaptado de RICOTE & GLASS, 2007)41
- FIGURA 7: PPARs como pontos nodais da transcrição no metabolismo.** Esquema de como os PPARs podem funcionar como pontos nodais integradores de várias redes do metabolismo. Controlando a expressão de vários conjuntos de genes, os PPARs podem coordenar diferentes respostas a estímulos específicos (adaptado de BROWN & PLUTZKY, 2007)..... 43
- FIGURA 8: Esquema ilustrativo da separação dos grupos experimentais.** Os animais foram instilados com salina ou com sílica e depois foram tratados com veículo ou com rosiglitazona. Eles ficaram divididos, portanto, em quatro grupos: SÍLICA VEÍCULO, SÍLICA TRATADO, SALINA VEÍCULO e SALINA TRATADO. 49

FIGURA 9: Linha temporal indicando a dinâmica do estudo. Os animais foram instilados com salina ou com sílica no dia 0. O tratamento do grupo 8 dias começou no dia 1 e terminou no dia 7, com eutanásia no dia 8. O tratamento do grupo 28 dias começou no dia 21 e terminou no dia 27, com eutanásia no dia 28. 50

FIGURA 10: Fotomicrografias de cortes histológicos marcados com a técnica de imunohistoquímica para PPAR γ . Células do epitélio brônquico (setas pretas), macrófagos (setas brancas) e células fibroblastóides (seta fina) positivos. **(A)** Sílica + Rosiglitazona, 8 dias; **(B)** Sílica + Rosiglitazona, 28 dias. Fotos pequenas em A e B são os controles negativos da técnica sem incubação do anticorpo primário. Barra de escala = 100 μ m. Barra de escala para os controles = 300 μ m. 65

FIGURA 11: Gráfico do peso dos camundongos ao final do tratamento de 8 dias. Não há diferença significativa entre os diferentes grupos ($p > 0,05$; $n = 6$). 66

FIGURA 12: Gráfico do peso dos camundongos ao final do tratamento de 28 dias. Há diferença estaticamente significativa (***) indica $p < 0,001$) entre os grupos salina e sílica. No entanto, não há diferença entre os grupos tratado e veículo, nas duas situações ($n = 6$). 67

FIGURA 13: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina dos animais instilados com salina. Observar os discretos edemas perivascularares (setas pretas) e os poucos macrófagos alveolares no espaço aéreo (seta branca e ampliação em C). **(A)** SALINA VEÍCULO, grupo de 8 dias; **(B)** SALINA TRATADO, grupo de 8 dias; **(C)** SALINA VEÍCULO, grupo de 28 dias. **(D)** SALINA TRATADO, grupo de 28 dias. Barra de Escala = 100 μ m (equivalente a 20 μ m na ampliação). 68

FIGURA 14: Fotomicrografias de corte histológico corado com Hematoxilina e Eosina de animal instilado com sílica e tratado com veículo, grupo 8 dias. **(A)** Extenso infiltrado inflamatório demonstrando área necrótica central (*), muitos macrófagos (ampliação lateral, setas pretas) e vários núcleos fragmentados e *debris* celulares (ampliação lateral, setas brancas). **(B)** Mesmo campo observado em luz polarizada, partículas de sílica evidentes. **(C)** Sobreposição das imagens com partículas de sílica em amarelo. Barra de escala = 100 μ m e barra de escala da ampliação = 50 μ m. 70

FIGURA 15: Fotomicrografias de corte histológico corado com Hematoxilina e Eosina de animal instilado com sílica e tratado com veículo, grupo 8 dias. **(A)** Macrófagos no espaço aéreo na luz de brônquio (ampliação) e epitélio brônquico hiperplásico (seta preta). **(B)** Mesmo campo observado em luz polarizada, partículas de sílica evidentes. **(C)** Sobreposição das imagens com partículas de sílica em amarelo. Barra de escala = 100 μ m e barra de escala da ampliação = 20 μ m. 71

FIGURA 16: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina de animais instilados com sílica e tratados com veículo, grupo 8 dias. **(A)** Tampão exsudativo-fibrótico na luz de um brônquio (*). **(B)** Área hiperinsuflada (+) ao lado da região de inflamação e septo alveolar espessado (seta preta). Barra de escala = 50 μ m (A) e 100 μ m (B). 72

FIGURA 17: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina de animais instilados com sílica e tratados com veículo, grupo 28 dias. **(A)** Tampão exsudativo-fibrótico na luz de um brônquio (*) e agregado linfocítico na parede de brônquio (seta branca). **(B)** Nódulos confluentes com área hiperinsuflada (+) ao lado, presença região central hialina (setas pretas). Barra de escala = 100 μ m (A e B). 74

FIGURA 18: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina de animais instilados com sílica e tratados com rosiglitazona. **(A)** Grupo 8 dias. **(B)** Grupo 28 dias. Notamos a área de inflamação (setas pretas) e septos alveolares espessados (seta branca). Barra de escala = 100 μ m (A e B). 76

FIGURA 19: Avaliação da Celularidade do grupo 8 dias — Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina e gráfico correspondente. (A) Salina + Veículo; (B) Salina + Rosiglitazona; (C) Sílica + Veículo; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação de celularidade (células x 10³/mm²). Barra de escala = 100µm. (p < 0,001; n = 6)** 78

FIGURA 20: Avaliação da Celularidade do grupo 28 dias — Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina e gráfico correspondente. (A) Salina + Veículo; (B) Salina + Rosiglitazona; (C) Sílica + Veículo; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação de celularidade (células x 10³/mm²). Barra de escala = 100µm. (p < 0,001; n = 6)** 79

FIGURA 21: Histomorfometria do espaço aéreo do grupo 8 dias — Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina e gráfico correspondente. (A) Salina + Veículo; (B) Salina + Rosiglitazona; (C) Sílica + Veículo; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação de percentual de área ocupada pelo espaço aéreo. Barra de escala = 100µm. (p < 0,001; n = 6)** 81

FIGURA 22: Histomorfometria do espaço aéreo do grupo 28 dias — Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina e gráfico correspondente. (A) Salina + Veículo; (B) Salina + Rosiglitazona; (C) Sílica + Veículo; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação de percentual de área ocupada pelo espaço aéreo. Barra de escala = 100µm. (p < 0,001; n = 6)** 82

FIGURA 23: Quantificação de sílica do grupo 8 dias — Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina visualizados em microscopia de polarização e campo claro. Gráfico correspondente à quantificação. (A) Sílica + Veículo em microscopia de polarização; (B) Sílica + Veículo; (C) Sílica + Rosiglitazona em microscopia de polarização; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação do percentual de área ocupada por partículas de sílica. Barra de escala = 100µm. (*p < 0,01; n = 6) 84

FIGURA 24: Quantificação de sílica do grupo 28 dias — Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina visualizados em microscopia de polarização e campo claro. Gráfico correspondente à quantificação. (A) Sílica + Veículo em microscopia de polarização; (B) Sílica + Veículo; (C) Sílica + Rosiglitazona em microscopia de polarização; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação do percentual de área ocupada por sílica livre. Barra de escala = 100µm. (*p < 0,05; n = 6) 85

FIGURA 25: Análise e quantificação do colágeno nos pulmões dos animais do grupo 8 dias por coloração de picosirius em microscopia confocal. (A) Sílica + Veículo, projeção de todos os planos focais de microscopia confocal; (B) Sílica + Veículo, código de profundidade por cor; (C) Sílica + Rosiglitazona, projeção de todos os planos focais de microscopia confocal; (D) Sílica + Rosiglitazona, código de profundidade por cor; (E) Gráfico da quantificação do percentual de volume ocupado por colágeno. Barra de escala = 100µm. (*p < 0,05; n = 6) 87

FIGURA 26: Análise e quantificação do colágeno nos pulmões dos animais do grupo 28 dias por coloração de picosirius em microscopia confocal. (A) Sílica + Veículo, projeção de todos os planos focais de microscopia confocal; (B) Sílica + Veículo, código de profundidade por cor; (C) Sílica + Rosiglitazona, projeção de todos os planos focais de microscopia confocal; (D) Sílica + Rosiglitazona, código de profundidade por cor; (E) Gráfico da quantificação do percentual de volume ocupado por colágeno. Barra de escala = 100µm. (p < 0,001; n = 6)** 88

FIGURA 27: Análise e quantificação das fibras elásticas nos pulmões dos animais do grupo 8 dias por coloração de orceína oxidada em microscopia de campo claro. (A) Salina + Veículo; (B) Salina + Rosiglitazona; (C) Sílica + Veículo; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação de percentual de área ocupada por fibras do sistema elástico. Barra de escala = 100µm. (p < 0,001; n = 6)** 90

FIGURA 28: Análise e quantificação das fibras elásticas nos pulmões dos animais do grupo 28 dias por coloração de orceína oxidada em microscopia de campo claro. (A) Salina + Veículo; (B) Salina + Rosiglitazona; (C) Sílica + Veículo; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação de percentual de área ocupada por fibras elásticas e oxitalânicas. Barra de escala = 100µm. (p < 0,001; n = 6)..... 91**

FIGURA 29: Análise e quantificação do marcador de macrófago F4/80 em microscopia de campo claro. (A) Sílica + Veículo 8 dias; (B) Sílica + Rosiglitazona 8 dias; (C) Sílica + Veículo 28 dias; (D) Sílica + Rosiglitazona 28 dias; (E) Gráfico da quantificação de células positivas para o marcador F4/80 por milímetro quadrado. Fotos pequenas em A, B, C e D representam os controles negativos da técnica sem a incubação do anticorpo primário. Barra de escala = 100µm. Barra de escala para os controles = 300µm. (p < 0,01; n = 6) 93**

FIGURA 30: Análise e quantificação de células positivas para a lectina BSL I em microscopia de campo claro. (A) Sílica + Veículo 8 dias; (B) Sílica + Rosiglitazona 8 dias; (C) Sílica + Veículo 28 dias; (D) Sílica + Rosiglitazona 28 dias; (E) Gráfico da quantificação de células positivas para a lectina BSL I por milímetro quadrado. Fotos pequenas em A, B, C e D representam os controles negativos da técnica sem a incubação da lectina. Barra de escala = 100µm. Barra de escala para os controles = 300µm. (p < 0,01; ***p < 0,001; n = 6)..... 95**

FIGURA 31: Análise e quantificação do percentual de área marcada para TGF-β em microscopia de campo claro. (A) Sílica + Veículo 8 dias; (B) Sílica + Rosiglitazona 8 dias; (C) Sílica + Veículo 28 dias; (D) Sílica + Rosiglitazona 28 dias; (E) Gráfico da quantificação do percentual de área marcada para TGF-β. Fotos pequenas em A, B, C e D representam os controles negativos da técnica sem a incubação do anticorpo primário. Barra de escala = 100µm. Barra de escala para os controles = 300µm. (p < 0,001; n = 6)..... 97**

FIGURA 32: Análise e quantificação do percentual de área marcada para iNOS em microscopia de campo claro. (A) Sílica + Veículo 8 dias, seta indicando células epiteliais brônquicas positivas; (B) Sílica + Rosiglitazona 8 dias; (C) Sílica + Veículo 28 dias; (D) Sílica + Rosiglitazona 28 dias; (E) Gráfico da quantificação do percentual de área marcada para iNOS. Fotos pequenas em A, B, C e D representam os controles negativos da técnica sem a incubação do anticorpo primário. Barra de escala = 100µm. Barra de escala para os controles = 300µm. (p < 0,001; n = 6)..... 99**

FIGURA 33: Análise e quantificação de células apoptóticas marcadas por TUNEL em microscopia de campo claro. (A) Sílica + Veículo 8 dias; (B) Sílica + Rosiglitazona 8 dias; (C) Sílica + Veículo 28 dias; (D) Sílica + Rosiglitazona 28 dias; (E) Gráfico da quantificação do número de células apoptóticas positivas para o TUNEL por mm². Fotos pequenas em A, B, C e D representam os controles negativos da técnica sem a incubação da enzima TdT. Barra de escala = 20µm. Barra de escala para os controles = 60µm. (p < 0,001; n = 6)..... 101**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

15dPGJ₂	15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ - prostaglandina J ₂
AF 1	Função de ativação 1 (<i>Activation Function 1</i>)
ALI	Lesão pulmonar aguda (<i>Acute Lung Injury</i>)
AMs	Macrófagos Alveolares (<i>Alveolar Macrophages</i>)
BADGE	Diglicil éter de bisfenol
BSL I	Lectina <i>Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia</i>
CDDO	Ácido triterpenóide 2-ciano-3, 12-dioxooleano-1,9-dien-28-óico
DBD	Domínio de ligação ao DNA (<i>DNA Binding Domain</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
G-CSF	Fator estimulante de colônia granulocítica (<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>)
HE	Hematoxilina-Eosina
HETE	Ácido hidroxieicosatetranóico
HODE	Ácido hidroxioctadecadienóico
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular (<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>)
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>)
IL-1	Interleucina-1
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-10	Interleucina-10
IL-16	Interleucina-16
IL-6	Interleucina-6

IL-8	Interleucina-8
iNOS	Sintase de óxido nítrico induzível (<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos (<i>Keratinocyte-derived chemokine</i>)
LBD	Domínio de interação com o ligante (<i>Ligand-Binding Domain</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
MARCO	Receptor de macrófago com estrutura colagenosa (<i>Macrophage Receptor with Collagenous Structure</i>)
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófago 1 (<i>Macrophage inflammatory protein 1</i>)
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófago 2 (<i>Macrophage inflammatory protein 2</i>)
MMP-9	Metaloproteinase 9
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (<i>Ribonucleic Acid Messenger</i>)
NCoR	Co-repressor de receptor nuclear (<i>Nuclear-receptor Corepressor</i>)
NO	Óxido Nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
OSHA	Administração de Saúde e Segurança Ocupacional dos Estados Unidos (<i>Occupational Safety & Health Administration</i>)
PAF	Fator ativador de plaqueta (<i>Platelet-Activating Factor</i>)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta (<i>Platelet-derived Growth Factor</i>)
PF	Paraformaldeído
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>)
PPARα	Receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alfa</i>)
PPARβ	Receptor beta ativado por proliferador de peroxissoma (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta</i>)

PPARδ	Receptor delta ativado por proliferador de peroxissoma (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta</i>)
PPARγ	Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>)
PPRE	Elemento responsivo a proliferador de peroxissoma (<i>Peroxisome Proliferator Response Element</i>)
PVPNO	N-óxido-polivinilpiridina (<i>Polyvinylpyridine-N-Oxide</i>)
RNS	Espécies reativas de nitrogênio (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RXR	Receptor de ácido 9- cis retinóico (<i>9-cis Retinoic Acid Receptor</i>)
SMRT	Mediador silenciador de receptores de ácido retinóico e hormônio da tireóide (<i>Silencing Mediator of Retinoid-Acid and Thyroid-Hormone Receptors</i>)
TGF-β	Fator Transformante de Crescimento β (<i>Transforming Growth Factor β</i>)
TNF-α	Fator alfa de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor - α</i>)
TZDs	Tiazolidinedionas
VCAM	Molécula de Adesão de Célula Vascular (<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 O SISTEMA RESPIRATÓRIO	23
2.2 A SILICOSE	28
2.2.1 Histórico e Epidemiologia	28
2.2.2 A Sílica e suas Propriedades Químicas	29
2.2.3 Formas de Manifestação	31
2.2.4 Patogênese	32
2.3 O RECEPTOR GAMA ATIVADO POR PROLIFERADOR DE PEROXISSOMA (PPAR γ)	38
2.3.1 Aspectos Gerais dos PPARs	38
2.3.3 PPAR γ e seu contexto biológico	43
2.3.4 PPAR γ e doenças pulmonares	46
3 OBJETIVOS	48
3.1 OBJETIVO GERAL	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4 MATERIAS E MÉTODOS	49
4.1 ANIMAIS UTILIZADOS	49
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL	49
4.3 INSTILAÇÃO DE SÍLICA OU SALINA	50
4.4 TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA OU VEÍCULO (GOMA)	51
4.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS, PESAGEM E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	51
4.6 IMUNODETECÇÃO PARA PPAR γ	52
4.7 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA	53
4.8 AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE	54
4.9 HISTOMORFOMETRIA DO ESPAÇO AÉREO	54
4.10 QUANTIFICAÇÃO DE SÍLICA	54
4.11 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO	55
4.12 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE FIBRAS ELÁSTICAS	56
4.13 IMUNODETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MACRÓFAGOS POSITIVOS PARA A GLICOPROTEÍNA F4/80	57
4.14 QUANTIFICAÇÃO DE MACRÓFAGOS ATIVADOS POSITIVOS PARA A LECTINA BSL I	59
4.15 IMUNODETECÇÃO E HISTOMORFOMETRIA DE TGF- β E INOS	60
4.16 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS POR TUNEL	62
4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
5 RESULTADOS	64
5.1 IMUNODETECÇÃO PARA PPAR γ	64
5.2 PESO DOS CAMUNDONGOS	66
5.3 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA	68
5.4 AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE	77
5.5 HISTOMORFOMETRIA DO ESPAÇO AÉREO	80
5.6 QUANTIFICAÇÃO DE SÍLICA	83
5.7 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO	86
5.8 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE FIBRAS ELÁSTICAS	89

5.9 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE F4/80	92
5.10 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO PARA A LECTINA BSL I.....	94
5.11 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE TGF- β	96
5.12 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE INOS	98
5.13 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS	100
6 DISCUSSÃO	102
7 SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	110
8 CONCLUSÃO	111
9 PERSPECTIVAS.....	111
REFERÊNCIAS.....	112

1 INTRODUÇÃO

A silicose é uma doença fibrótica pulmonar, potencialmente letal, ocasionada pela inalação e conseqüente deposição de poeira contendo sílica, composto químico denominado dióxido de silício (SiO_2), nos pulmões (GREENBERG, WAKSMAN & CURTIS, 2007; RIMAL, GREENBERG & ROM, 2005). Podemos classificá-la como uma pneumoconiose: doença pulmonar definida por Kobzik (2000), como reação pulmonar não-neoplásica à inalação de poeiras minerais.

Atualmente, ela é considerada uma doença ocupacional crônica de alta incidência no mundo, principalmente em países emergentes, como na China onde no período de 1991 a 1995, mais de 500.000 casos de silicose foram descritos, com aproximadamente 6.000 novos casos e 24.000 mortes a cada ano e no Brasil, onde só no estado de Minas Gerais, mais de 4500 trabalhadores já foram diagnosticados positivamente para a silicose (WHO, 2000)

A doença manifesta-se habitualmente após décadas de exposição (KOBZIK, 2000). Os indivíduos mais expostos ao risco de desenvolvê-la são os profissionais de fundição, de trabalhos que envolvem jateamento de areia, mineração de diamantes, lapidação de pedras e atividades afins (KOBZIK, 2000; REES & MURRAY, 2007; TERRA FILHO & SANTOS, 2006).

Esta doença pulmonar se apresenta em três formas clínicas básicas: a aguda, a acelerada e a crônica. A primeira ocorre geralmente após meses ou poucos anos de exposição a altos níveis de partículas de sílica em atividades como o jateamento de areia ou escavações. Envolve uma variedade muito grande de mecanismos de lesão ao pulmão, incluindo a presença de pneumócitos do tipo II hipertrofiados que produzem uma quantidade excessiva de substância surfactante, levando a um quadro de lipoproteinose alveolar (GREENBERG, WAKSMAN & CURTIS, 2007; KATZENSTEIN & ASKIN, 1982; RIMAL, GREENBERG & ROM, 2005; TERRA FILHO & SANTOS, 2006).

A silicose acelerada ocorre no período entre a forma aguda e crônica, sendo similar à forma aguda em muitos aspectos, porém associando a lipoproteinose alveolar exsudativa à presença de granulomas imaturos com grande número de células mononucleares. Já a terceira apresentação da doença é caracterizada por uma inflamação crônica granulomatosa. Ao microscópio, podemos notar lesões formadas por camadas concêntricas de colágeno circundadas por uma cápsula mais

densa também de colágeno, só que mais compactado. Estas são denominadas nódulos silicóticos e acarretam uma alteração permanente da arquitetura pulmonar, resultando em uma diminuição na capacidade respiratória do indivíduo (GREENBERG, WAKSMAN & CURTIS, 2007; KOBZIK, 2000; TERRA FILHO & SANTOS, 2006).

Apesar de alguns estudiosos defenderem a idéia de que a silicose não é mais um problema no século XXI, há estudos recentes que demonstram que o risco do desenvolvimento de algumas doenças auto-imunes, como artrite reumatóide ou esclerodermia, e do câncer pulmonar parecem estar relacionados com a silicose. (SHERSON, 2007; TERRA FILHO & SANTOS, 2006). Ratificando a relevância da silicose nos dias atuais, Mannelje et al. (2002) demonstraram que há uma clara e evidente correlação entre a silicose e a mortalidade, sendo esta observada até em casos onde os valores dos níveis de exposição à sílica eram menores ($0,05\text{mg}/\text{m}^3$) do que os regulamentados pela legislação dos Estados Unidos ($0,1\text{mg}/\text{m}^3$).

Segundo a Administração de Segurança e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos (OSHA) (2007), em 2004, o número de trabalhadores daquele país expostos cronicamente à sílica passava de dois milhões. Dentre eles, aproximadamente cem mil estavam empregados em ambientes de alto risco em atividades como jateamento de areia, perfuração de rochas e indústrias de fundição.

No Brasil, a situação é semelhante: no ano 2000, havia no mercado formal brasileiro, cerca de dois milhões de trabalhadores com exposição direta à sílica em mais de trinta por cento de sua jornada de trabalho e mais de quatro milhões, se considerarmos a exposição em mais de cinco por cento da jornada (RIBEIRO et al., 2003).

Na há nenhum tratamento eficaz para a doença, sendo a prevenção e o fim da exposição as únicas alternativas viáveis, em conjunto com medicamentos como corticosteróides que possam diminuir temporariamente os sintomas. Um dos grandes desapontamentos dos estudos relacionados à silicose, nos últimos anos, foi a tentativa fracassada de se estabelecer novos tratamentos com compostos promissores como: a tetrandrina, alcalóide derivado da planta *Stephania tetrandra* com propriedades antioxidantes, antifibrogênicas, antiinflamatórias e imunomoduladoras; e a N-óxido-polivinilpiridina (PVPNO), polímero de fórmula

(C₇H₇NO)_n capaz de mascarar os radicais silanol (SiOH) da sílica, diminuindo sua citotoxicidade (SHERSON, 2007; RIMAL, GREENBERG & ROM, 2005).

Desta forma, há necessidade evidente de estudos que demonstrem os mecanismos moleculares presentes no palco do processo inflamatório e fibrótico da doença, a fim de logarmos o desenvolvimento de novas terapias para a silicose.

Nessa conjuntura, os receptores nucleares do tipo ativados por proliferador de peroxissoma (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* — PPARs) se tornam grande alvo de estudos nos mais relevantes centros de pesquisas em todo mundo.

Esses receptores são fatores de transcrição que pertencem a uma superfamília de receptores nucleares hormonais e existem em três subtipos: o PPAR α (alfa); o PPAR β (beta) ou PPAR δ (delta) e o PPAR γ (gama) (BECKER et al., 2006).

Eles agem como fatores de transcrição ativados por ligante. Na ausência do ligante, os PPARs se ligam a seqüências específicas de ácido desoxirribonucléico (DNA), denominadas “elementos responsivos a proliferador de peroxissoma” (PPREs). Os PPARs, então, existem em heterodímeros compostos por eles e pelo receptor de ácido 9-*cis* retinóico (RXR), que ficam ligados a várias moléculas co-repressoras que silenciam a atividade transcrional. Com o acoplamento do ligante, a ativação dos PPARs induzem a dissociação das moléculas co-repressoras resultando na transcrição do gene-alvo. (BECKER et al., 2006).

Os PPARs foram primeiramente identificados por seu papel importante como reguladores do metabolismo de lipídios e glicose. Contudo, nos últimos dez anos, os PPARs, e em particular PPAR α e PPAR γ , vêm sendo descritos como reguladores também do processo inflamatório (BECKER et al., 2006; CUZZOCREA, 2006).

Alguns trabalhos ressaltam o papel anti-inflamatório da ativação de PPARs, principalmente de PPAR γ , em modelos de doenças pulmonares em camundongos e ratos, como a lesão pulmonar aguda por lipopolissacarídeo, a lesão por endotoxemia, a inflamação alérgica e a lesão por bleomicina (GENOVESE et al., 2005; INOUE et al., 2003; LIU et al., 2005b; WARD et al., 2006).

Na silicose, não há, até o momento, um entendimento sobre o efeito da ativação do PPAR γ . Nosso estudo, então, visa estudar este receptor na silicose murina, utilizando um tratamento por gavagem com rosiglitazona, um agonista sintético de alta afinidade para PPAR γ da classe das tiazolidinedionas (TZDs), usado

como hipoglicemiante oral em pacientes diabéticos (BECKER et al., 2006; CUZZOCREA, 2006).

Desta forma, através do modelo de fibrose pulmonar de silicose murina e do tratamento com rosiglitazona, almejamos chegar a uma melhor compreensão sobre qual o efeito da ativação do PPAR γ no processo inflamatório pulmonar provocado pela sílica, bem como a uma visão *lato sensu* de seu papel no processo de fibrose pulmonar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O SISTEMA RESPIRATÓRIO

O Sistema Respiratório consiste em uma porção condutora e uma porção respiratória. A primeira é composta por cavidades nasais e seios associados, nasofaringe, orofaringe, laringe, traquéia, brônquios e bronquíolos e possui a função de possibilitar a passagem do ar inalado e exalado para dentro e para fora da porção respiratória. A porção condutora também limpa, aquece e umedece o ar inalado (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; KIERSZENBAUM, 2008;).

A segunda porção, a respiratória, é composta em seqüência por bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos, sendo responsável pela troca de gases entre o ar e o sangue (KIERSZENBAUM, 2008).

Analisando a FIGURA 1A, observamos que a estrutura do Sistema Respiratório é baseada numa cadeia de tubos ramificados que fazem com que o ar possa chegar até a região onde ocorre a troca gasosa, também chamada de hematose.

A traquéia se bifurca em dois brônquios primários, o direito e o esquerdo, que entram nos pulmões através do hilo. Estes brônquios, por sua vez, se dividem em brônquios secundários que suprem os lobos pulmonares. Os brônquios secundários se ramificam dando origem aos brônquios segmentares também chamados de terciários que suprem os diversos segmentos broncopulmonares (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; MOORE & DALLEY, 2001).

Continuando o processo de ramificação, os brônquios terciários se subdividem várias vezes, dando origem aos bronquíolos que se dividem em

bronquíolos terminais. Cada bronquíolo terminal origina um ou mais bronquíolos respiratórios, os quais marcam a transição para a porção respiratória (KIERSZENBAUM, 2008; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Histologicamente, temos que a maior parte da porção condutora é revestida por um epitélio denominado epitélio respiratório, caracterizado por ser ciliado, pseudo-estratificado e colunar, apresentando muitas células caliciformes, responsáveis pela produção de muco (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

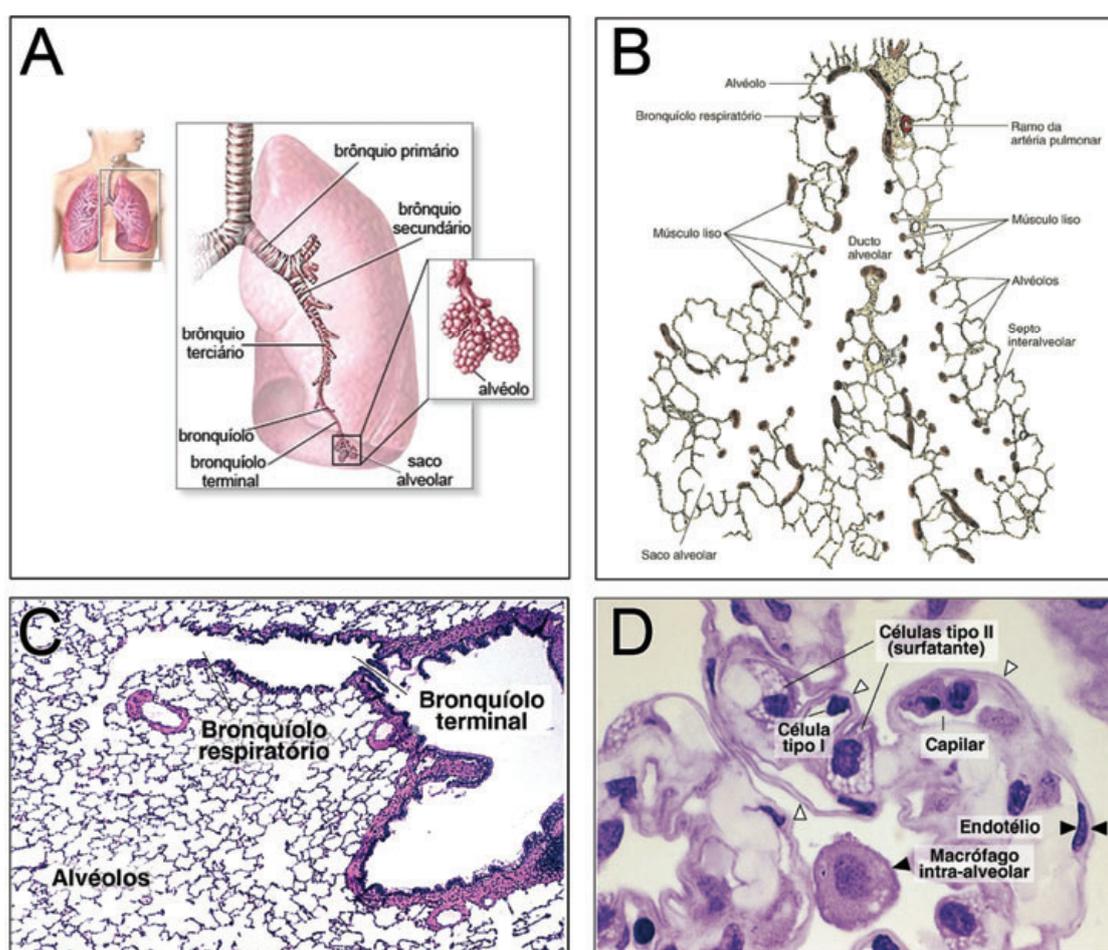


FIGURA 1: Esquemas e Fotomicrografias da Morfologia do Sistema Respiratório. A) Esquema representativo da ramificação brônquica até os alvéolos (Adaptado de DIDON, 2008). **B)** Desenho esquemático representando a porção terminal da árvore brônquica (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). **C)** Corte histológico de pulmão mostrando um bronquíolo terminal e um respiratório contínuo com o saco alveolar e os alvéolos. Coloração com parrosanilina e azul-de-toluidina (adaptado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). **D)** Grande aumento, da estrutura alveolar. Note a presença de células endoteliais, dos pneumócitos do tipo I e II e de macrófagos alveolares. Observe, ainda, os septos interalveolares indicados pelas cabeças de setas brancas (adaptado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Na traquéia, além da presença do epitélio respiratório, há presença de anéis cartilagosos em formato de “C” que não permitem que suas paredes colabem. À medida que ocorre a ramificação, há uma simplificação da estrutura do sistema condutor, com perda da estrutura cartilaginosa e diminuição da altura do epitélio (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Conforme evidenciado na FIGURA 1C, dando continuidade ao processo de ramificação, após os bronquíolos terminais, há os bronquíolos respiratórios. Estes possuem alvéolos associados em sua parede e por fim se abrem em ductos alveolares que dão origem aos sacos alveolares, formados por vários alvéolos, o que pode ser mais bem entendido através da observação da FIGURA 1B.

Todo esse processo de ramificação que termina nos alvéolos faz com que a área aproximada de troca gasosa em um ser humano seja de aproximadamente 75m^2 referente à cerca de 300 milhões de alvéolos (KIERSZENBAUM, 2008)

Os componentes celulares dos alvéolos estão representados na FIGURA 1D. São eles: a) Pneumócitos do tipo I, também chamados de células alveolares epiteliais do tipo I; b) Pneumócitos do tipo II, também chamados de célula alveolares epiteliais do tipo II; c) Células endoteliais; d) Macrófagos Alveolares (AMs).

Os pneumócitos do tipo I são células com citoplasma delgado, exceto na região perinuclear, responsáveis por estabelecer uma barreira de espessura mínima que possibilite as trocas gasosas e ao mesmo tempo impeça a passagem de líquido (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Já os pneumócitos do tipo II são células arredondadas, localizadas entre os pneumócitos do tipo I, geralmente nos pontos onde as paredes alveolares se tocam. Se comparadas com as outras células dos alvéolos, possuem um núcleo maior e a presença de muitas vesículas, onde são retidos fosfolipídios, proteínas e glicosaminoglicanos que são secretados, dando origem a uma camada extracelular na superfície dos alvéolos, denominada substância surfactante. Essa substância tem por função diminuir a tensão superficial dos alvéolos, o que facilita a respiração, pois reduz a força necessária para a inspiração e impede que os alvéolos entrem em colapso durante a expiração (KIERSZENBAUM, 2008; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

As células endoteliais são as mais numerosas e têm o núcleo mais alongado que o dos pneumócitos. O endotélio é do tipo contínuo e não fenestrado. Os

citoplasmas delgados da célula endotelial e do pneumócito do tipo I, junto com uma membrana basal central formam uma estrutura trilaminar, o septo interalveolar, que pode ser observado na FIGURA 1D (KIERSZENBAUM, 2008; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Os AMs são encontrados na superfície dos alvéolos e no Sistema Respiratório, são as primeiras células fagocíticas do sistema imune inato. São responsáveis por limpar o espaço aéreo de partículas tóxicas, alérgicas ou infecciosas que tenham chegado até o espaço alveolar, após passarem pelas barreiras mecânicas do trato respiratório (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; RUBINS, 2003)

Por meio da secreção de metabólitos de oxigênio, lisozima, peptídeos e proteases microbidas e pelo processo de fagocitose e de morte intracelular, os AMs eliminam a maioria dos microorganismos que são aspirados normalmente (RUBINS, 2003). Além disto, através da liberação de algumas citocinas, como as interleucinas -1 β e -6 (IL-1 β e IL-6) e o fator alfa de necrose tumoral (TNF- α); de quimiocinas, como interleucina-8 (IL-8); e de metabólitos do ácido araquidônico, os AMs iniciam a resposta inflamatória e recrutam outras células do sistema imune para o espaço alveolar (REDDY et al., 2004; RUBINS, 2003;).

A origem dos AMs foi debatida por algum tempo, mas Fels & Cohn (1986) consideram que há um consenso com relação a este tópico: os AMs são oriundos de monócitos do sangue periférico que migram para dentro do pulmão e/ou são oriundos de células mononucleares fagocíticas que se replicam dentro do alvéolo ou no interstício.

Como o modelo de nosso trabalho se utiliza de camundongos, vale ainda ressaltar as diferenças marcantes entre o sistema respiratório humano e murino.

Os pulmões humanos e murinos diferem não somente e obviamente, pelo tamanho, mas também pela ramificação da árvore brônquica e pelo número dos lobos do pulmão esquerdo e direito. O camundongo possui quatro lobos no pulmão direito e um único no pulmão esquerdo (FIGURA 2), enquanto os humanos possuem três lobos no pulmão direito e dois no pulmão esquerdo e a ramificação brônquica é muito maior em humanos do que em camundongos (TYLER, 1992).

A diferença no tamanho entre os pulmões das duas espécies também pode ser observada quando comparamos o diâmetro das vias aéreas. Um bronquíolo

humano, cujo diâmetro varia de 5 a 0,3mm, seria considerado uma grande via aérea em um camundongo. Histologicamente, há grande semelhança, sendo a maior diferença entre os pulmões de humanos e de camundongos, a ausência de bronquíolos respiratórios nos últimos. (TYLER, 1992).

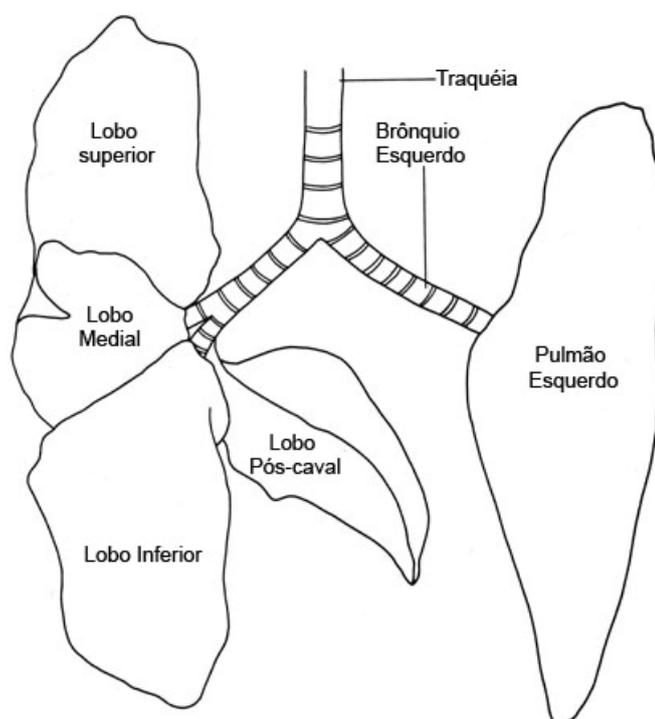


FIGURA 2: Esquema ilustrativo dos pulmões de um camundongo. Observe o pulmão direito com quatro lobos e o esquerdo com um lobo único. (COOK, M, disponível em <<http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure53.shtml>>, Acesso em: 05 jun. 2008, 21:50)

2.2 A SILICOSE

2.2.1 Histórico e Epidemiologia

O emprego e o risco de exposição à sílica são conhecidos desde a Antigüidade, no Egito, Grécia e Roma, em atividades de mineração, de construção e na produção de peças decorativas. Ao longo da história, vários são os casos relatados a respeito de doenças pulmonares em indivíduos que exerciam atividades com exposição à sílica (revisado em TERRA FILHO & SANTOS, 2006).

Hipócrates (460 a.C. – 377a.C.) já havia descrito uma condição de “pouca respiração” em mineradores. Depois de longo período, em 1690, Lohneiss descreveu que a poeira ia para os pulmões, e os pacientes tinham doença pulmonar e respiravam com dificuldade. Bernardo Ramazzini, logo após, estudou a então chamada doença “tísica” dos mineradores. Além desse nome, as doenças relacionadas à poeira foram conhecidas como: “Consumpção da Poeira”, “Doença de Pedreiro”, “Asma de Amoladores” e “Doença de Lapidadores”. Todas essas doenças são hoje referidas como Silicose. (revisado em GREENBERG, WAKSMAN & CURTIS, 2007).

O primeiro trabalho conhecido descrevendo a poeira de sílica no pulmão é o trabalho de Peacock e Greenhow em 1860. Dez anos depois, Visconti foi o primeiro a usar o termo “Silicose” para descrever a doença causada pela exposição inalante ao sílex, um tipo de rocha constituída por sílica (revisado em GREENBERG, WAKSMAN, & CURTIS, 2007).

A exposição à sílica cristalina, atualmente, ocorre em uma grande variedade de atividades industriais, como mineração de metais, minérios e carvão; a manufatura de produtos derivados de pedras, argila e vidro; além da fundição com ferro, aço e materiais não-ferrosos (RIMAL, GREENBERG & ROM, 2005).

Nos Estados Unidos, em 2004, o número de trabalhadores expostos à sílica passam dos dois milhões segundo a OSHA (2007) e no Brasil, a situação é parecida com o mesmo número de trabalhadores expostos, se considerarmos mais de trinta por cento da jornada de trabalho e o dobro, levando-se em consideração mais de cinco por cento (RIBEIRO et al., 2003).

Segundo o Ministério do Trabalho e Emprego (2008):

“O número estimado de trabalhadores potencialmente expostos a poeiras contendo sílica no Brasil é superior a 6 milhões, sendo cerca de 4 milhões na construção civil, 500.000 em mineração e garimpo e acima de 2 milhões em indústrias de transformação de minerais, metalurgia, indústria química, de borracha, cerâmicas e vidros .”

Muitas medidas de segurança de trabalho, como normas para o uso de máscaras ou respiradores, vêm sendo utilizadas como método de prevenção e proteção do trabalhador. Ainda assim, a silicose é atualmente a principal causa de invalidez entre as doenças respiratórias ocupacionais (TERRA FILHO & SANTOS, 2006).

Nos Estados Unidos, foram registrados 14.824 óbitos entre 1968 e 1994 (CDC, 1998) e no Brasil, em um estudo realizado no Ceará de 1988 a 1989 com 366 cavadores de poços, a incidência de pacientes com silicose foi de 33% e desses, 35% vieram a óbito por conta da doença (HOLANDA et al., 1995)

Conseguimos, assim, entender o quão letal pode ser a doença bem como a magnitude de sua incidência na população.

2.2.2 A Sílica e suas Propriedades Químicas

O agente responsável pelo início da reação da silicose é a sílica ou dióxido de silício, um composto formado por silício e oxigênio, dois dos mais abundantes elementos terrestres (TERRA FILHO & SANTOS, 2006).

A sílica pode ser encontrada na natureza em duas formas principais: a cristalina e a amorfa. Na forma amorfa, a sílica é menos tóxica, embora não inerte, e é encontrada, por exemplo, em rochas vulcânicas vitrificadas e sílica gel (TERRA FILHO & SANTOS, 2006). Já em sua forma cristalina, mais comumente quartzo, a sílica é mais tóxica e quando inalada, pode provocar a silicose (KATZENSTEIN & ASKIN, 1982).

A palavra “cristalina” se refere a uma configuração fixa em que os átomos de silício e oxigênio estão orientados e relacionados no composto, diferentemente da forma amorfa, onde estes estão organizados de forma randômica (GREENBERG, WAKSMAN & CURTIS, 2007).

A sílica cristalina existe naturalmente em uma forma tetraédrica, produzindo alguns polimorfismos, que ocorrem em função da temperatura e da pressão: quartzo

alfa, ou simplesmente quartzo, é o polimorfismo mais comum encontrado e é estável na maioria das temperaturas e pressões existentes na superfície terrestre; já o quartzo beta é estável somente em altas temperaturas, enquanto tridimita e cristobalita são estáveis somente em altas temperaturas e baixas pressões (GREENBERG, WAKSMAN & CURTIS, 2007).

As formas mais comuns de sílica encontradas em ambientes de trabalho são o quartzo, a tridimita e a cristobalita. Todos esses polimorfismos apresentam uma propriedade denominada piezoelectricidade. Esta é uma propriedade dos cristais de sílica que lhe confere cargas opostas em diferentes lados de sua estrutura, quando pressão é aplicada diretamente sobre o cristal (GREENBERG, WAKSMAN & CURTIS, 2007).

Essas características piezoelectricas parecem, então, exercer um papel central na fisiopatologia da silicose através de geração de radicais livres de oxigênio produzidas nas superfícies de clivagem das moléculas de sílica (CASTRANOVA, 2004; WILLIAMSON, PASTIROFF & CRESSEY, 2001). Nesse sentido, a superfície química do composto é um dos principais fatores que influenciam na patogenicidade da poeira contendo sílica.

A sílica recém fraturada, gerada durante o uso de abrasivos é mais tóxica aos AMs do que a sílica envelhecida. Isto se dá presumivelmente por conta do potencial redox maior, já que a superfície da sílica recém fraturada possui uma elevada capacidade de reagir com hidrogênio, carbono e algumas vezes com nitrogênio (VALLYATHAN et al., 1988).

Wiessner e colaboradores (1988) demonstraram que, em camundongos, as injeções intratraqueais de quartzo, cristobalita ou tridimita apresentaram maior toxicidade, inflamação e fibrogenicidade do que as feitas com coesita, outro polimorfismo da sílica cristalina. Essa diferença, segundo os autores, se deve aos diferentes arranjos e empacotamentos atômicos, já que esta era a única variável existente entre os diferentes compostos. Desta forma, concluem que a patogenicidade da sílica aumenta à medida que a densidade de empacotamento atômico da estrutura de superfície diminui, uma vez que a coesita apresenta um altíssimo grau de empacotamento dos átomos e é o composto de menor toxicidade.

Uma vez inaladas, as partículas de sílica, se depositam em diferentes partes do sistema respiratório, conforme o tamanho e iniciam o processo patológico. De

acordo com seu diâmetro, as partículas variam sua toxicidade. Para os seres humanos, as consideradas mais patogênicas possuem diâmetro aerodinâmico menor que 10 μ m, o que possibilita que estas alcancem os alvéolos pulmonares. Para ratos e camundongos, esse valor fica em torno de 2 μ m. (TAKAYOSHI et al., 2007).

2.2.3 Formas de Manifestação

A silicose pode ser classificada em três formas: a) silicose aguda; b) silicose acelerada; e c) silicose crônica. Alguns autores consideram ainda a silicose conglomerada como uma quarta classificação da doença e outros como uma complicação advinda da forma crônica. (CRAIGHEAD et al., 1988)

A silicose aguda resulta de uma exposição a altos níveis de sílica e já foi descrita em atividades como o jateamento de areia, escavações e manufatura de cerâmicas. Morfologicamente, a doença se caracteriza por edema pulmonar, inflamação intersticial, com presença de macrófagos e neutrófilos com corpos lamelares e acúmulo de um fluido protéico rico em surfactante junto com eosinófilos no espaço alveolar. Os pacientes podem apresentar tosse, perda de peso, função pulmonar diminuída e troca gasosa comprometida. Podem desenvolver cianose e insuficiência respiratória, geralmente agravadas por infecções bacterianas (CASTRANOVA & VALLYATHAN, 2000; DING et al., 2002; GREENBERG, WAKSMAN & CURTIS, 2007; KOBZIK, 2000; TERRA FILHO & SANTOS, 2006).

A silicose acelerada é a forma que ocorre no período entre a manifestação da forma aguda e da forma crônica. Essa apresentação da doença é similar em muitos aspectos à silicose aguda, exibindo uma lipoproteinose alveolar exsudativa, só que neste caso associada a um processo inflamatório crônico. Há presença de granulomas fibróticos com um grande número de células mononucleares, fibroblastos e fibras colágenas dispostas em orientação circular, demonstrando características de nódulos silicóticos imaturos. Os septos alveolares estão espessados com pneumócitos do tipo II hipertrofiados, hiperplásicos e com aumento de seus corpos lamelares (CASTRANOVA & VALLYATHAN, 2000; DING et al., 2002; TERRA FILHO & SANTOS, 2006).

A silicose crônica é resultante de inalação de sílica cristalina por períodos prolongados, onde há a formação de nódulos fibróticos clássicos com a aparência histológica típica de fibras colágenas alinhadas concentricamente e apresentando

uma zona central hialina. Estes nódulos podem exibir diferentes níveis de calcificação e necrose. Quando esta forma não está associada a outras doenças, os nódulos não apresentam pigmentação e em sua região central, com auxílio da microscopia de polarização, podemos observar partículas birrefringentes, que são oriundas da formação de silicatos a partir das partículas de sílica inaladas (CASTRANOVA & VALLYATHAN, 2000; DING et al., 2002; RIMAL, GREENBERG & ROM, 2005).

A silicose conglomerada é resultante da coalescência e aglomeração de alguns nódulos silicóticos pequenos. Além do aumento dos nódulos, a profusão das lesões pode resultar na fibrose maciça progressiva. Nesse estágio, a doença pode evoluir mesmo que o paciente não esteja mais exposto a novas inalações. A doença evolui lentamente para a morte e o comprometimento da função pulmonar limita gravemente as atividades do paciente (CASTRANOVA & VALLYATHAN, 2000; KOBZIK, 2000).

2.2.4 Patogênese

A doença intersticial pulmonar causada pela exposição à sílica é consequência da lesão às células do pulmão e a decorrente cicatrização com ativação do processo fibrótico. As interações entre os AMs e a sílica parecem ser os eventos principais e determinantes na patogênese da doença (DAVIS, 1986). De forma geral, podemos descrever cinco mecanismos essenciais para o ciclo de lesão e cicatrização provocados pela sílica: a) Citotoxicidade direta; b) Ativação de geração de oxidantes pelos AMs; c) Estimulação da secreção de citocinas e quimiocinas pelos AMs e/ou pelos pneumócitos; d) Estimulação da secreção de fatores fibrogênicos pelos AMs e/ou pelos pneumócitos; e) Morte celular por apoptose (CASTRANOVA, 2004; CASTRANOVA & VALLYATHAN, 2000; DOSREIS, BORGES & ZIN, 2004; FUBINI & HUBBARD, 2003).

A citotoxicidade direta das partículas de sílica no pulmão ocorre, como já vimos, por suas propriedades químicas específicas que lhes conferem a capacidade de reagir diretamente com as células pulmonares, através da peroxidação de lipídios da membrana, causando dano à membrana celular. As células lesadas, por sua vez, liberam enzimas intracelulares, as quais causam lesão tecidual com cicatrização ou destruição do septos alveolares (CASTRANOVA & VALLYATHAN, 2000).

No segundo mecanismo, a sílica provoca, nos AMs, a ativação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como superóxidos e peróxido de hidrogênio, e espécies reativas de nitrogênio (RNS), como o óxido nítrico (NO). A explicação para isso se dá pela capacidade das partículas de sílica provocarem uma explosão respiratória, com aumento do consumo de oxigênio (BLACKFORD et al., 1994; FUBINI & HUBBARD, 2003; MOSSMAN & CHURG, 1998). A quantidade dos metabólitos descritos sobrepuja as defesas anti-oxidantes do pulmão, causando peroxidação lipídica e lesão celular (CASTRANOVA & VALLYATHAN, 2000).

A instilação de quartzo em pulmões de ratos leva a um aumento da expressão de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) da enzima sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) (BLACKFORD et al., 1994). O conseqüente aumento de NO dependente de iNOS também está envolvido na lesão pulmonar, já que a reação de NO com o ânion de superóxido leva a formação de peroxinitrito, capaz de causar lesão celular e contribuir para a formação de granulomas (SETOGUCHI et al., 1996).

O estresse oxidativo gerado pela sílica cristalina também é evidenciado pelo aumento da expressão de algumas enzimas antioxidantes. Ratos expostos à inalação de cristobalita apresentaram aumento da expressão de superóxido-dismutase dependente de manganês e da glutathione peroxidase (JANSSEN et al., 1992).

Outros tipos celulares também podem ter a produção de ROS ativada pela sílica. Os pneumócitos do tipo II *in vitro* apresentam uma explosão respiratória com a indução de sinalização celular e síntese de DNA via estresse oxidativo (SHUKLA, 2001); e neutrófilos podem ser recrutados por fatores quimiotáticos secretados pelos AMs para o espaço aéreo, onde ocorre ativação da produção de ROS dessas células (DING et al., 2002).

O estresse oxidativo provocado pela sílica leva, então, ao terceiro mecanismo envolvido na patogênese da silicose, a estimulação da secreção de citocinas e quimiocinas pelos AMs e/ou pelos pneumócitos. Esta ativação ocorre através da ativação de fatores de transcrição específicos como o NF- κ B (CHEN & SHI, 2002) e o AP-1 (DING et al., 1999).

Uma vez ativados, estes fatores de transcrição regulam positivamente a secreção de citocinas como o fator ativador de plaqueta (PAF), o TNF- α , a IL-1 β , a proteína inflamatória de macrófago 1 (MIP-1) e a proteína inflamatória de macrófago

2 (MIP-2) e derivados do ácido araquidônico como o leucotrieno B4 (CASTRANOVA & VALLYATHAN, 2000).

A interleucina 1 β (IL-1 β) está envolvida na deposição de colágeno e antagonistas de receptor de IL-1 reduzem a fibrose pulmonar induzida por sílica e por bleomicina. O TNF- α também parece ser essencial para o desenvolvimento da fibrose induzida por sílica, uma vez que anticorpos anti-TNF- α previnem a doença e esta é ausente em camundongos transgênicos que não expressavam TNF- α (RIMAL, CREENBERG & ROM, 2005). Desta forma, compreendemos essas duas citocinas como centrais no desenvolvimento do processo patológico da pneumoconiose provocada pela sílica.

Já PAF, MIP-1, MIP-2 e Leucotrieno B4 agem na reação inflamatória da silicose como quimiocinas para outros tipos celulares como os neutrófilos que, como já vimos, são recrutados para o espaço alveolar onde são ativados para a produção de ROS (RIMAL, CREENBERG & ROM, 2005; VANHÉE et al., 1995).

O quarto mecanismo envolvido no ciclo de lesão e cicatrização ocorre com a secreção de fatores fibrogênicos pelos AMs e/ou pelos pneumócitos, também influenciada pela ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B e o AP-1. Nesse ponto, entra em pauta uma importante citocina, o fator transformante de crescimento β (TGF- β). Jagirdar e colaboradores (1996) mostraram em seu trabalho que o TGF- β está aumentado em granulomas em pacientes com silicose. Este fator de crescimento pode ter múltiplos papéis na fibrogênese, já que exerce quimiotaxia sobre monócitos e neutrófilos, além de regular positivamente genes envolvidos na biossíntese de colágeno e fibronectina e negativamente genes de proteases como a catepsina K. Produzido pelo macrófago alveolar, esta citocina pode ainda servir como um estímulo mitógeno para os fibroblastos (MOSSMAN & CHURG, 1998; VAN DEN BRÛLE et al., 2005).

Outros mediadores como o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) estão envolvidos no processo fibrótico. Além de ativarem a proliferação fibroblastóide, esses mediadores controlam também a proliferação de pneumócitos do tipo II, uma vez que anticorpos contra essas moléculas são capazes de inibir o efeito do sobrenadante de AMs expostos à sílica

sobre crescimento e proliferação de pneumócitos do tipo II (MELLONI et al., 1994; MELLONI et al., 1996).

A interleucina 10 (IL-10) também se apresenta como uma citocina reguladora da fibrose pulmonar (HUAUX et al., 1998). Ela é anti-inflamatória pois limita o recrutamento de células inflamatórias e a atividade de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α . No entanto, um estudo recente, se utilizando de animais transgênicos sem expressão de IL-10, demonstrou que na silicose esta molécula tem efeito pró-fibrótico mediado por sua capacidade de controlar a atividade de AMs, aumentando a produção de TGF- β e suprimindo a do eicosanóide anti-fibrótico prostaglandina E₂ (PGE₂) (BARBARIN et al., 2004).

O quinto mecanismo envolvido no ciclo de lesão e cicatrização da silicose é a morte celular por apoptose. Esta é resultado do aumento da produção de ROS, o que leva a uma disfunção mitocondrial, aumento da expressão gênica de receptores de morte e/ou de seu ligantes, como o TNF- α e o ligante de Fas (FasL), com posterior ativação das caspases 3 e 9 e fragmentação de DNA (FUBINI & HUBBARD, 2003; SHEN et al. 2001).

A morte celular por apoptose tem sido descrita com um tipo de morte celular importante para a eliminação de células lesadas e como mecanismo homeostático para manter as populações celulares nos tecidos (COTRAN, KUMAR & COLLINS, 2000). Por exemplo, a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos, faz com que os últimos secretem PGE₂ e TGF- β , e que haja conseqüente supressão da produção de NO, diminuindo a inflamação (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000).

Em estudo de apoptose induzida por sílica em AMs e células granulomatosas *in vivo*, Leigh e colaboradores (1997) demonstraram que este processo de morte pode ter um papel central como regulador do processo de inflamação no tecido pulmonar por duas vias: atraindo mais AMs para o espaço alveolar para fagocitar as células apoptóticas e mantendo os níveis estáveis de neutrófilos nos locais da inflamação.

A apoptose também pode apresentar um papel pró-inflamatório na silicose. Em camundongos sem expressão de FasL e portanto com células incapazes de realizar apoptose mediada por Fas-FasL, não houve desenvolvimento da doença após 15 dias da instilação intratraqueal de partículas de sílica. Nestes animais, não foi observado recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar, embora muitos

macrófagos fossem encontrados no pulmão. Estes dados nos levam a inferir que a atividade neutrofílica junto com a de AMs é responsável também pelo processo inflamatório da silicose (BORGES et al., 2001; BORGES et al., 2002; DOSREIS, BORGES & ZIN, 2004).

Desta forma, podemos descrever um mecanismo onde os macrófagos marcados para apoptose pelo aumento de receptores de morte liberam fatores quimiotáteis para neutrófilos. Esses por sua vez fagocitam as células que estão morrendo e lesam as células do parênquima pulmonar adjacente, e então perpetuam o processo apoptótico através da liberação de ROS, enzimas hidrolíticas e citocinas (FUBINI & HUBBARD, 2003).

Dois tipos de receptores parecem estar envolvidos na toxicidade e ativação de apoptose da sílica nos AMs: o receptor *Scavenger* de classe A do tipo I/II (CD204) e o receptor *Scavenger* do tipo MARCO (receptor de macrófago com estrutura colagenosa) (BEAMER & HOLIAN, 2005; HAMILTON et al., 2006).

Os macrófagos alveolares de camundongos 129/SvJ transgênicos que não expressam CD204 têm sua capacidade de fagocitar a sílica diminuída. Nesses animais, a morte celular induzida pela sílica também é atenuada e há um excesso de células inflamatórias no pulmão após a inalação de sílica, principalmente neutrófilos. Apesar desse acúmulo de células inflamatórias, não há o desenvolvimento de fibrose. Todos esses dados demonstram em conjunto uma ação do receptor *Scavenger* de classe A do tipo I/II na regulação e na eficiência da resposta inflamatória a partículas de sílica (BEAMER & HOLIAN, 2005).

Em camundongos C57/BL/6, o CD204 não é expresso constitutivamente e o receptor *Scavenger* do tipo MARCO é o maior responsável pela fagocitose de sílica pelo AMs. Como acabamos de mencionar, o CD204 é crucial para a fagocitose de sílica em outra linhagem de camundongos, a 129/SvJ. Este cenário com diferentes receptores agindo na fagocitose da sílica pode ser um exemplo de conversão evolutiva, onde diferentes proteínas de genes diferentes desenvolvem o mesmo padrão de resposta e função. A variedade de receptores envolvidos na fagocitose da sílica e sua importância para o processo patológico podem explicar a variância na suscetibilidade ao desenvolvimento da doença em humanos quando há exposição à sílica (HAMILTON et al., 2006).

O resumo de todos os mecanismos de resposta descritos e suas correlações estão resumidos na FIGURA 3.

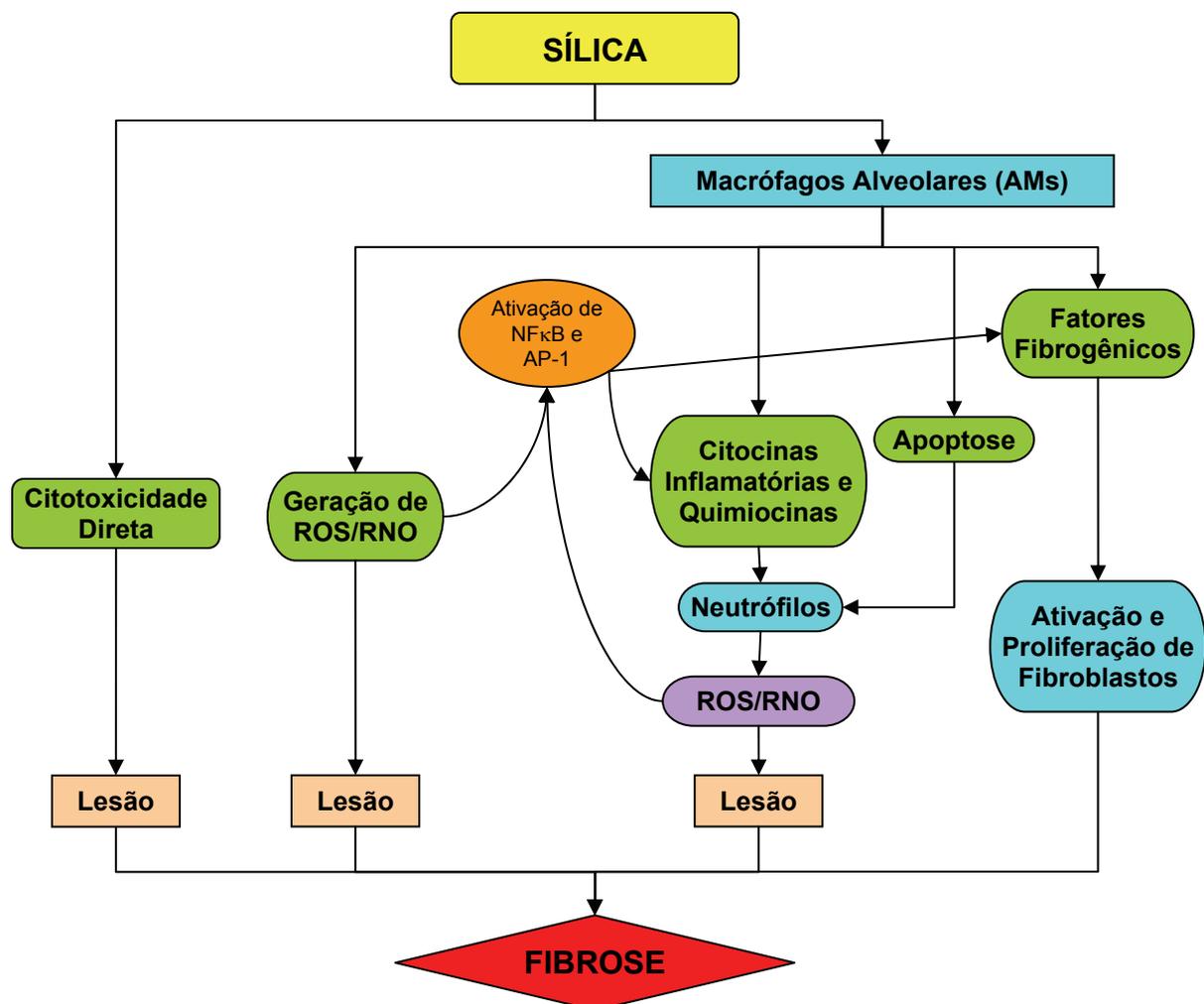


FIGURA 3: Mecanismos envolvidos na patogênese da silicose. Citotoxicidade direta provocada pelas propriedades químicas da sílica e geração de ROS devido à fagocitose de partículas de sílica pelos AMs. As ROS ativam fatores de transcrição que controlam a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas além de fatores fibrogênicos nos macrófagos. A apoptose de AMs leva ao recrutamento e ativação de neutrófilos que perpetuam o ciclo da lesão. (adaptado de CASTRANOVA, 2004)

2.3 O RECEPTOR GAMA ATIVADO POR PROLIFERADOR DE PEROXISSOMA (PPAR γ)

2.3.1 Aspectos Gerais dos PPARs

Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) são membros da superfamília de receptores nucleares que incluem os receptores para hormônios esteróides, o hormônio da tireóide e o ácido retinóico. Eles são fatores de transcrição ativados por ligantes e são responsáveis pelo controle de uma grande variedade de genes em vias do metabolismo de lipídios, como no transporte de ácidos graxos e na captura desses pelas células (CUZZOCREA, 2006; DESVERGENE & WAHLI, 1999).

Três isotipos de PPAR foram identificados até o momento em vertebrados, incluindo *Xenopus*, camundongo, rato, hamster e seres humanos (DESVERGENE & WAHLI, 1999). Eles foram nomeados de PPAR α , PPAR β e PPAR γ quando foram descritos pela primeira vez em *Xenopus* (DREYER et al., 1992), pouco tempo depois da caracterização do primeiro PPAR em camundongo (ISSEMAN & GREEN, 1990).

A respeito dessa nomenclatura dos isotipos estabelecida para os PPARs de *Xenopus*, em mamíferos, as formas α e γ foram facilmente encontradas enquanto o terceiro isotipo não tinha uma homologia muito clara. Assim, criou-se a nomenclatura alternativa de PPAR- δ para esse terceiro tipo em mamíferos. No entanto, algumas evidências de padrão de expressão e de atividade de ligantes sugerem que o PPAR β e o PPAR δ são homólogos (DESVERGENE & WAHLI, 1999). Para facilitar nosso entendimento, neste trabalho, essa isoforma do PPAR terá a notação de PPAR β/δ .

O nome PPAR é oriundo do fato de que a ativação do PPAR α por xenobióticos resulta na proliferação de peroxissomas em hepatócitos de roedores. Contudo, a ativação das formas β/δ e γ não levam a esse efeito e agonistas de PPAR parecem não induzir a proliferação de peroxissomas em primatas e seres humanos, o que torna o termo PPAR um pouco arcaico (BROWN & PLUTZKY, 2007; CUZZOCREA, 2006).

Ao analisarmos a estrutura molecular dos três isotipos de PPAR, notamos características similares. Mormente, identificamos a presença de domínios funcionais modulares: um domínio de ativação amino(N)-terminal variável, conhecido como função de ativação 1 (AF1); um domínio altamente conservado de ligação ao

DNA (DBD); e um domínio conservado carboxi(C)-terminal de interação com o ligante (LBD) (GLASS & OGAWA, 2006; KOTA, HUANG & ROUFOGALIS, 2005).

A porção AF1 é responsável pela fosforilação do PPAR. O DBD medeia a ligação com o DNA, promovendo a interação do PPAR com o elemento responsivo a proliferador de peroxissoma (PPRE) na região promotora dos genes-alvo (KOTA, HUANG & ROUFOGALIS, 2005).

O LBD é responsável pela especificidade da interação com o ligante e conseqüente ativação da ligação do PPAR ao PPRE, o que leva ao aumento da expressão dos genes-alvo. Além disto, esse domínio também está envolvido na heterodimerização (GLASS & OGAWA, 2006).

Dentro do núcleo, o papel principal do LBD é mediar as interações dependentes de ligante com proteínas co-ativadoras ou co-repressoras. Estas interações são reguladas principalmente por mudanças conformacionais na região de α -hélice na porção C-terminal, conhecida como AF2 (GLASS & OGAWA, 2006).

Análises da estrutura do LBD indicam que a interação com o ligante faz com que a região de α -hélice do AF2 mude de uma posição relativamente móvel para uma posição mais estável, na qual está mais intimamente ligada ao LBD e em alguns casos interagindo diretamente com o ligante (RENAUD et al., 1995).

Essa mudança conformacional cria uma região de alta afinidade para ligação de proteínas co-ativadoras de receptores nucleares que possuem uma seqüência LXXLL de aminoácidos (onde X é qualquer aminoácido) (NOLTE et al., 1998).

Um esquema ilustrando os domínios presentes nas moléculas de PPAR pode ser encontrado na FIGURA 4.

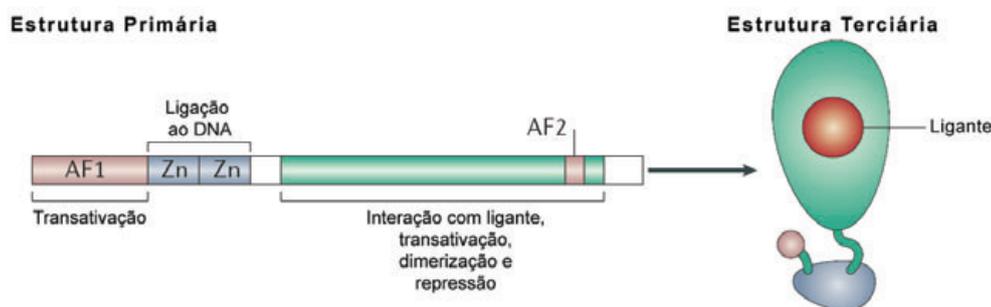


FIGURA 4: Representação esquemática dos domínios funcionais dos PPARs. Os PPARs possuem uma estrutura em domínios funcionais que consiste de um domínio de ativação amino-terminal (AF1), um domínio central de ligação ao DNA (DBD), com a presença de dedos de zinco (Zn) e um domínio de interação com o ligante na porção carboxi-terminal (LBD). A região LBD define a especificidade da interação com o ligante; determina as interações com co-ativadores e co-repressores através de mudanças alostéricas na região AF2 e também contribui para a heterodimerização dos PPARs. (adaptado de GLASS & OGAWA, 2006)

Os PPARs se ligam ao DNA como heterodímeros formados pela molécula de PPAR e a molécula do receptor de ácido 9-*cis* retinóico (RXR). Esses heterodímeros podem se ligar aos elementos responsivos a proliferador de peroxissoma (PPREs) nas regiões promotoras de genes alvo independente do ligante e quando da presença do ligante podem promover a transcrição do gene-alvo, conforme mostra a FIGURA 5 (GLASS & OGAWA, 2006).

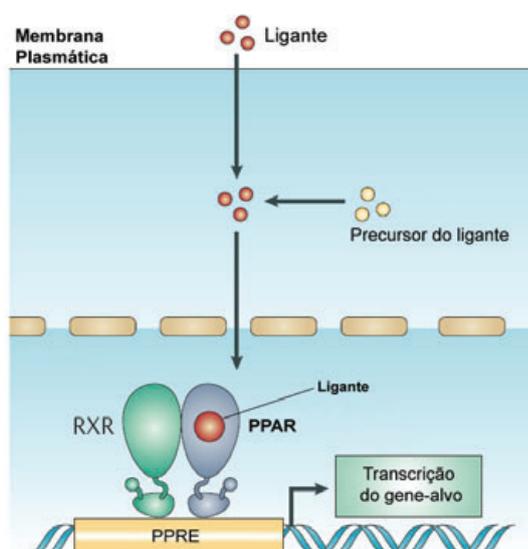


FIGURA 5: Ilustração da ligação do PPAR ao DNA na forma de heterodímero com o RXR. O heterodímero se liga ao PPRE na região promotora do gene-alvo. Quando há presença do ligante, há a transcrição do gene-alvo (adaptado de GLASS & OGAWA, 2006).

Na ausência de ligantes, os heterodímeros de PPAR e RXR podem ainda interagir com co-repressores, funcionando assim como repressores ativos da transcrição do gene-alvo (GLASS & OGAWA, 2006).

Os PPARs são principalmente regulados por ligantes produzidos de forma parácrina ou autócrina. Apesar dos ligantes endógenos *in vivo* não serem muito bem caracterizados, todos os três isotipos de PPAR podem ser ativados por ácidos graxos, o que é coerente com o fato de possuírem o papel de sensores e reguladores transcricionais do metabolismo de lipídios. Além disto, os PPARs podem ser ativados por inúmeros metabólitos de ácidos graxos que são produzidos durante o processo inflamatório. Por exemplo, os ligantes endógenos de PPAR α incluem o leucotrieno B $_4$ e o ácido 8S-hidroxi-eicosatetranóico (HETE), enquanto os de PPAR γ

incluem o 15-HETE, 13-hidroxiocetadecadienóico (HODE) e a 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (15dPGJ₂) (KOTA, HUANG & ROUFOGALIS, 2005).

De forma geral, a atividade de regulação transcricional dos PPARs pode ocorrer por via de três mecanismos: a) transativação dependente de ligante; b) transrepressão dependente de ligante; e c) repressão independente de ligante (FIGURA 6).

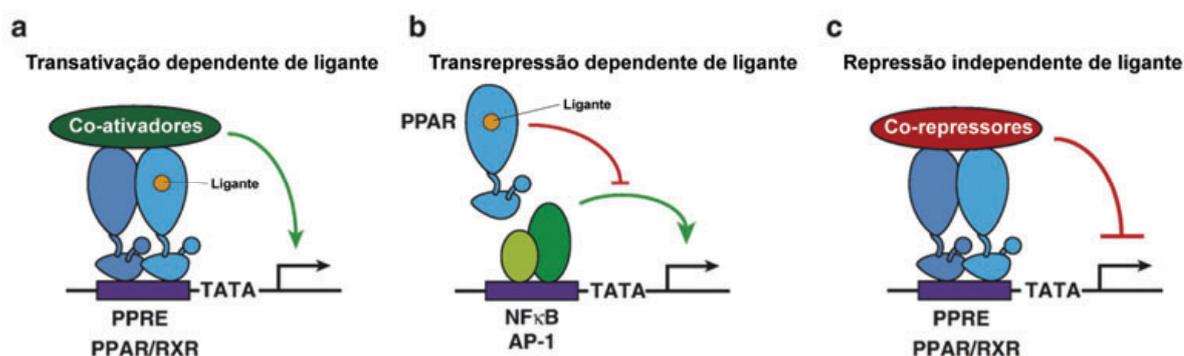


FIGURA 6: Esquema dos diferentes mecanismos de atividade de regulação transcricional dos PPARs. **a)** Transativação dependente de ligante: Os PPARs ativam a transcrição de uma forma dependente de ligante pela interação direta com a região promotora do gene-alvo que contém o PPRE, na forma de heterodímero com RXR. A ligação de agonistas leva ao recrutamento de co-ativadores que modificam a estrutura da cromatina e facilitam a montagem da maquinaria de transcrição gênica na região promotora. **b)** Transrepressão dependente de ligante: Os PPARs reprimem a transcrição gênica, antagonizando a atividade de outros fatores de transcrição como o NF- κ B e o AP-1. **c)** Repressão independente de ligante: Os PPARs se ligam aos PPRES na ausência de ligantes e recrutam co-repressores que mediam a atividade de repressão. Este complexo de co-repressores antagoniza a ação de co-ativadores e mantém os genes em seu estado reprimido na ausência do ligante. (adaptado de RICOTE & GLASS, 2007)

A atividade primordial do PPAR é ativar a transcrição de genes de uma forma dependente de ligante, com ligação do heterodímero de PPAR e RXR ao PPRE na região promotora dos genes-alvo, conforme já visto anteriormente. A transativação dependente de ligante (FIGURA 6a) está ligada ao recrutamento de proteínas co-ativadoras para a formação de um complexo que modifica a estrutura da cromatina e facilita a estruturação do maquinário de transcrição na região promotora (RICOTE & GLASS, 2007).

Um grande número de co-ativadores já foram identificados e supõe-se que o uso diferente destes pode promover respostas transcricionais específicas para cada tipo celular, envolvendo diferentes genes e sinais (GLASS & OGAWA, 2006).

Os PPARs também podem regular negativamente a expressão gênica através de um mecanismo dependente de ligante (FIGURA 6b). Há uma atividade de

inibição de outros fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1. Diferente da ativação e repressão transcricional que envolve geralmente a ligação do PPAR ao DNA em um PPRE na região promotora do gene alvo, a transrepressão não requer essa interação típica de receptor nuclear com o DNA e ainda não está claro se, nesse caso, é necessária a heterodimerização do PPAR com RXR (RICOTE & GLASS, 2007).

Os mecanismos envolvidos nesse tipo de regulação negativa são pouco entendidos e ainda são necessários muitos estudos para elucidá-los. Contudo, há uma explicação descrita por Pascual e colaboradores (2005) que representa um dos possíveis mecanismos envolvidos nessa regulação. Eles descreveram um modelo no qual o PPAR γ após a interação com o ligante sofre um processo de modificação denominado sumoilação, com uma mudança na região LBD. Essa modificação faz com que o PPAR γ interaja com co-repressores que estão ligados à região promotora do gene-alvo, formando um complexo estável e assim impedindo a atividade de complexos enzimáticos necessários para ativação da transcrição.

O terceiro mecanismo de atividade de regulação transcricional dos PPARs é a repressão da ativação de transcrição dos genes-alvo na ausência de ligantes. Esta atividade está relacionada ao recrutamento de complexos co-repressores que antagonizam a ação dos complexos co-ativadores (RICOTE & GLASS, 2007).

Dentre os co-repressores, os mais bem caracterizados são o co-repressor de receptor nuclear (NCoR) e o mediador silenciador de receptores de ácido retinóico e hormônio da tireóide (SMRT). Estes, junto a outros elementos, são componentes de grande complexos co-repressores. A mudança do estado de repressão para a ativação da transcrição envolve a indução de uma mudança alostérica na região AF2, já citada anteriormente (GLASS & OGAWA, 2006).

Até aqui, identificamos múltiplos níveis de controle da ação do PPAR como por exemplo os ligantes, as moléculas acessórias, mudanças conformacionais na molécula e as regiões promotoras dos genes-alvo. Todos esses níveis contribuem para a especificidade dos papéis biológicos de cada isotipo de PPAR e são através destes complexos mecanismos coordenados, que a ativação do PPAR resulta na regulação da transcrição (BROWN & PLUTZKY, 2007).

Como vimos, a ativação de PPAR se dá por sinais extracelulares (ligantes) e pode regular negativa- ou positivamente conjuntos de genes. Por conta disso, se

encaixam perfeitamente na definição clássica de ponto nodal de rede, controlando respostas de células, de tecidos, de órgãos e do organismo como um todo (FIGURA 7). Nesse sentido, a atividade dos PPARs se torna um grande atrator — da definição de física moderna, ponto para onde evolui um sistema dinâmico independentemente do ponto de partida (CÂMARA, 2007) — por onde várias respostas metabólicas se entrecruzam.

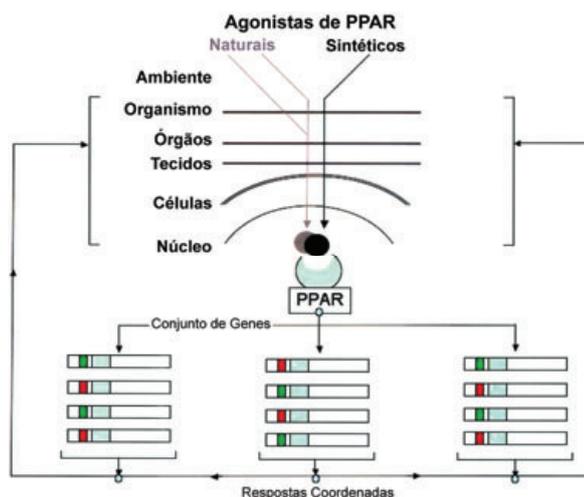


FIGURA 7: PPARs como pontos nodais da transcrição no metabolismo. Esquema de como os PPARs podem funcionar como pontos nodais integradores de várias redes do metabolismo. Controlando a expressão de vários conjuntos de genes, os PPARs podem coordenar diferentes respostas a estímulos específicos (adaptado de BROWN & PLUTZKY, 2007)

2.3.3 PPAR γ e seu contexto biológico

O gene do PPAR γ foi mapeado em humanos, no cromossomo 3, região 3p25. Ele dá origem a três diferentes mRNA (ácido ribonucléico mensageiro), chamados de PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3. Os transcritos 1 e 3 dão origem a mesma isoforma da proteína, enquanto o transcrito 2 dá origem a uma outra isoforma. O tipo 1 é encontrado em uma variedade muito grande de tecidos, enquanto o tipo 2 é restrito ao tecido adiposo e o tipo 3 é abundante em macrófagos, intestino grosso e tecido adiposo amarelo (KOTA, HUANG & ROUFOGALIS, 2005; TAVARES, HIRATA & HIRATA, 2007).

Os principais candidatos a ligantes endógenos de PPAR γ são ácidos graxos como o ácido linoléico, o ácido aracdônico e ácidos eicosapentaenóicos; compostos derivados de prostaglandinas como a 15d-PGJ $_2$; e lipídeos oxidados como 9-HODE, 13-HODE e 15-HETE (KOTA, HUANG & ROUFOGALIS, 2005).

As tiazolidinedionas (TZDs) são os compostos sintéticos mais conhecidos com propriedades de ativação de PPAR γ que aumentam a sensibilidade a insulina e baixam os níveis glicêmicos em pacientes com diabetes do tipo 2. Elas são seletivas para PPAR γ e apresentam baixa atividade em PPAR α e PPAR β/δ (WILSON et al., 1996). Fazem parte dessa classe de drogas, a troglitazona, a ciglitazona, a pioglitazona e a rosiglitazona, sendo a última o agonista mais potente e seletivo para PPAR γ (MURPHY & HOLDER, 2000).

Outras drogas como a isoxazolidinediona JTT-501 e a GW7845 também possuem propriedades de ativação de PPAR γ , no entanto em altas concentrações agem nas outras isoformas de PPAR. Recentemente, outras drogas têm sido identificadas como potenciais agonistas de PPAR γ , com é o caso do ácido triterpenóide 2-ciano-3, 12-dioxooleano-1,9-dien-28-óico (CDDO) (KOTA, HUANG & ROUFOGALIS, 2005).

Como antagonistas de PPAR γ citamos principalmente o diglicil éter de bisfenol (BADGE), o LG-100641 e o GW9662 (KOTA, HUANG & ROUFOGALIS, 2005). Embora de pouca relevância clínica, esses compostos podem servir para se entender melhor o papel fisiológico do PPAR γ .

Além desses compostos sintéticos, tem-se tentando obter compostos naturais oriundos de plantas medicinais que sejam agonistas de PPAR γ . Neste caminho, foram encontrados o Saurufuran A e flavonóides como crisina, apigenina e campferol (KOTA, HUANG & ROUFOGALIS, 2005).

As principais funções biológicas já demonstradas para o PPAR γ são basicamente: diferenciação adipocítica, sensibilização à insulina, ação quimioterápica em tratamentos de tumores e ação anti-inflamatória em arteriosclerose (BROWN & PLUTZKY, 2007).

O termo adipogênese refere-se ao processo de diferenciação de células precursoras em adipócitos capazes de acumular lipídios e também de expressar hormônios e citocinas específicos. O PPAR γ junto com outro fator de transcrição, o C/EBP α , são os dois principais fatores de transcrição envolvidos no processo de crescimento celular, seguido de uma diferenciação completa para o fenótipo adipocítico (WU et al., 1999).

Além da estimulação direta da diferenciação adipocítica, a ativação de PPAR γ também promove a apoptose de adipócitos maduros, com acúmulo de

lipídios. Este fato leva a uma estimulação secundária de adipogênese a partir de precursores, o que resulta em um número maior de pequenos adipócitos sensíveis à insulina (OKUNO, TAMEMOTO & TOBE, 1998).

O PPAR γ está associado com alguns genes que afetam diretamente a ação da insulina e por isso é hoje utilizado como alvo terapêutico de pacientes diabéticos. Alguns estudos *in vivo* demonstraram que agonistas de PPAR γ são capazes de melhorar a resistência à insulina, inibindo o efeito de TNF- α nos adipócitos (SHIBASAKI et al., 2003). Além disto, TZDs são capazes de inibir o efeito de resistina, um hormônio secretado por adipócitos capaz de aumentar os níveis de glicose no sangue (SHOJIMA et al., 2002).

Ainda nesta função biológica, a ativação de PPAR γ por TZDs influencia na deposição de glicose estimulada por insulina em músculos esqueléticos, pelo aumento da atividade da fosfatidilinositol-3 quinase e da fosforilação da proteína quinase membranosa B/Akt (KAUSCH et al., 2001). Esta ação do PPAR γ é intrigante uma vez que sua expressão em músculos esqueléticos é baixa e supõe-se que seja possível que esse efeito seja oriundo da alteração da expressão gênica de adipócitos que enviariam sinais para as fibras musculares esqueléticas (KOTA, HUANG & ROUFOGALIS, 2005).

As propriedades de apoptose e diferenciação do PPAR γ demonstraram ser de grande valia no tratamento quimioterápico de diferentes tipos de tumores humanos, incluindo mama, colón, próstata e pâncreas em estudos *in vitro* e em modelos animais (KOTA, HUANG & ROUFOGALIS, 2005). Em particular, pacientes tratados com troglitazona apresentaram um indução significativa de diferenciação adipocítica terminal e redução nos níveis do marcador de proliferação celular Ki-67 em células tumorais de liposarcoma (DEMETRI et al., 1999).

A ação biológica do PPAR γ mais estudada e demonstrada ultimamente é seu efeito anti-inflamatório na arteriosclerose. Corroborando com essa ação, em células endoteliais, TZDs inibem a expressão da molécula de adesão de célula vascular (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular (ICAM-1), resultando numa redução da deposição monocítica na túnica íntima arterial (PASCERI et al., 2000).

Há ainda a necessidade de salientar que em macrófagos derivados de monócitos humanos, agonistas de PPAR γ são capazes de inibir a expressão e conseqüente ação da metaloproteinase 9 (MMP-9), enzima responsável pela ruptura

do ateroma (MARX et al., 1998). Em células de músculo liso vasculares, TZDs inibem sua proliferação pela diminuição da fosforilação da proteína de retinoblastoma e pelo aumento dos níveis do inibidor p27 dependente de ciclina (WAKINO et al., 2000). Além disto, nestas células, agonistas de PPAR γ inibem a expressão do receptor de angiotensina II do tipo 1, sendo este efeito benéfico na arteriosclerose e na hipertensão (TAKEDA et al., 2000).

Assim, modulando a transcrição de diferentes genes tanto em macrófagos, quanto em células endoteliais e células de músculo liso vasculares, a ativação de PPAR γ por agonistas demonstra efeitos benéficos promissores no controle da arteriosclerose.

2.3.4 PPAR γ e doenças pulmonares

Durante os últimos anos, alguns estudos *in vivo* em modelos animais de doenças pulmonares inflamatórias vêm demonstrando evidências de efeitos benéficos do PPAR γ na lesão pulmonar aguda (ALI), em asma e na fibrose pulmonar (BEKCER et al., 2006).

A inflamação pulmonar associada à ALI é caracterizada por grande influxo de neutrófilos no pulmão, produção de mediadores pró-inflamatórios incluindo TNF- α , IL-8 e ROS e também por lesão no epitélio pulmonar e no endotélio. A ALI é geralmente um sintoma precoce da falência múltipla de órgãos, particularmente durante a sepse associada a altos níveis de endotoxinas ou lipopolissacarídeo (LPS) (BEKCER et al., 2006).

Os agonistas de PPAR γ inibem a inflamação das vias aéreas provocada por LPS em roedores. Os tratamentos com rosiglitazona ou com o composto SB 219994 foram capazes de inibir a neutrofilia e quimiocinas associadas como a quimiocina derivada de queratinócitos (KC) e o fator estimulante de colônia granulocítica (G-CSF) (BIRRELL et al., 2004).

De uma forma dependente de PPAR γ , a rosiglitazona também é capaz de inibir o aumento da razão peso molhado/ peso seco do pulmão; a produção de TNF- α , a expressão de ICAM-1 e a ativação de NF κ B (LIU et al., 2005b), além da expressão de iNOS e a liberação de NO induzidas por LPS em ratos (LIU et al., 2005 a).

Outro modelo que demonstrou o papel do PPAR γ na inflamação pulmonar associada à ALI foi o de lesão pulmonar induzida por isotiocianato de fluoresceína (FITC). Neste modelo, a pioglitazona foi capaz de diminuir o infiltrado neutrofílico (STANDIFORD, KESHAMOUNI & REDDY, 2005).

Outra doença pulmonar já demonstrada como possível alvo terapêutico para os agonistas de PPAR γ é a asma, uma doença pulmonar crônica caracterizada pela hiper-responsividade das vias aéreas, recrutamento de eosinófilos e remodelamento das vias aéreas. A administração de ligantes de PPAR γ como ciglitazona, rosiglitazona e pioglitazona diminuiu significativamente a eosinofilia no fluido do lavado broncoalveolar e do tecido pulmonar, bem como a expressão de IL-16, uma citocina pró-inflamatória e a migração de linfócitos e neutrófilos para o pulmão de camundongos sensibilizados a alérgenos e desafiados (BEKCER et al., 2006).

Por fim, temos a fibrose pulmonar como um processo patológico também interessante para o estudo do PPAR γ . Ela é resultado final de diferentes desordens pulmonares que levam a uma lesão progressiva e grave caracterizada pela proliferação de fibroblastos/miofibroblastos e deposição excessiva de proteínas de matriz extracelular como colágeno no parênquima pulmonar (BECKER et al., 2006).

Para analisar esse tipo de lesão, Genovese et al. (2005) utilizaram o modelo de lesão por bleomicina em camundongos. Neste estudo, os autores analisaram grupos de animais tratados com rosiglitazona e 15dPGJ₂ e verificaram haver uma diminuição na perda de peso corporal, da mortalidade, do infiltrado de neutrófilos, da formação do edema e da fibrose pulmonar. Além disto, os animais tratados apresentaram uma redução na expressão de iNOS.

Ainda dentro deste aspecto, a rosiglitazona, agonista sintético de alta afinidade, bem como a 15dPGJ₂ e a ciglitazona foram capazes de inibir *in vitro* em fibroblasto pulmonares humanos a expressão do fenótipo de miofibroblasto induzida por TGF- β , inibindo a expressão de alfa-actina de músculo liso. Além disto, os agonistas de PPAR γ também foram capazes de reduzir a produção de colágeno do tipo I induzida por TGF- β nestas células, o que demonstra os efeitos anti-fibróticos dos ligantes de PPAR γ , reiterando o potencial terapêutico dessa drogas na fibrose pulmonar (BURGESS et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é verificar o papel do receptor PPAR γ no modelo experimental de silicose murina, em duas fases: uma mais aguda (8 dias após a instilação intratraqueal) e em uma mais crônica (28 dias após a instilação intratraqueal).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Verificar a localização da expressão de PPAR γ nos pulmões dos animais silicóticos utilizados em nosso experimento.

b) Analisar o efeito da ativação do PPAR γ na variação de peso corporal total dos animais silicóticos tratados com rosiglitazona e com veículo.

c) Estudar o efeito da ativação do PPAR γ no progresso do processo patológico e de fibrose da silicose murina através de análises histológicas e histomorfométricas de pulmões dos animais silicóticos tratados com rosiglitazona e com veículo.

d) Avaliar o efeito da ativação do PPAR γ na população macrófaga de pulmões dos animais silicóticos tratados com rosiglitazona e com veículo através do marcador F4/80 (marcador de macrófago de camundongos) e da lectina *Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia* – BSL I (marcador de macrófago ativado).

e) Analisar o efeito da ativação do PPAR γ na imunoexpressão de TGF- β e iNOS nos pulmões dos animais silicóticos tratados com rosiglitazona e com veículo.

f) Analisar o efeito da ativação do PPAR γ na indução de apoptose nos pulmões dos animais silicóticos tratados com rosiglitazona e com veículo através da técnica de TUNEL.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Os animais utilizados para o estudo foram camundongos da linhagem Balb/c, machos, com idade de 8 semanas e peso aproximado de 20 gramas. Os animais foram cedidos gentilmente pelo laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, localizado no Rio de Janeiro - RJ, Brasil. O uso dos animais no projeto foi aprovado pela comissão de ética de uso de animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA número 0250-05).

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram separados randomicamente em dois grupos: os que foram instilados com sílica e os que foram instilados com salina. Cada um desses dois grupos foi então subdividido em outros dois grupos: os tratados com veículo (goma) e os tratados com rosiglitazona. Os grupos foram assim denominados: Sílica Veículo, Sílica Tratado, Salina Veículo e Salina Tratado, conforme mostra a FIGURA 8.

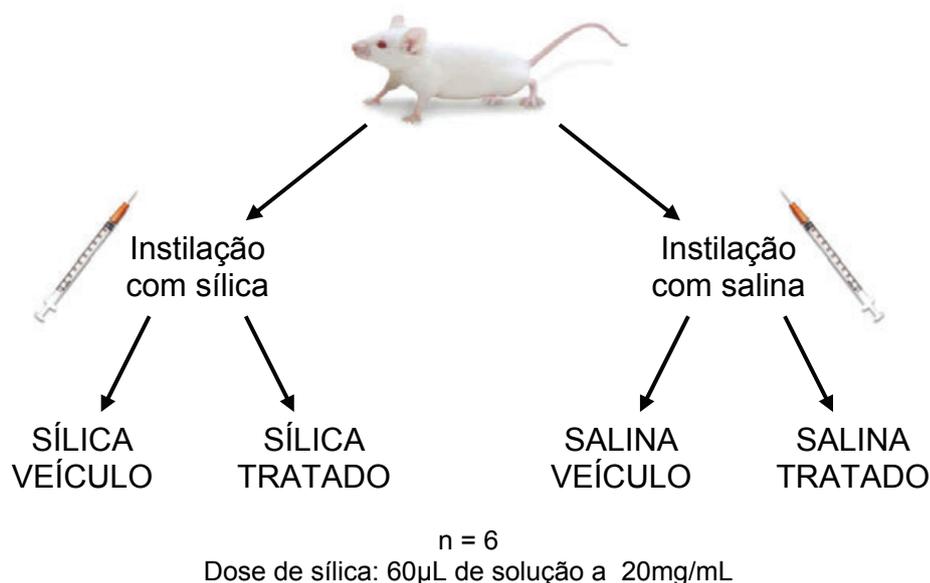


FIGURA 8: Esquema ilustrativo da separação dos grupos experimentais. Os animais foram instilados com salina ou com sílica e depois foram tratados com veículo ou com rosiglitazona. Eles ficaram divididos, portanto, em quatro grupos: SÍLICA VEÍCULO, SÍLICA TRATADO, SALINA VEÍCULO e SALINA TRATADO.

Para cada tempo estudado foram utilizados 6 animais em cada um dos quatro grupos (n = 6).

A dinâmica do estudo ocorreu da seguinte forma: no dia 0, houve a instilação dos animais com sílica ou salina; a partir do dia 1 até o dia 7, os animais do grupo de 8 dias foram tratados com rosiglitazona ou com o veículo e eutanasiados no dia 8; no dia 21 começou o tratamento do grupo de 28 dias, com término no dia 27, e eutanásia sendo feita no dia 28, conforme mostra a linha temporal da FIGURA 9.

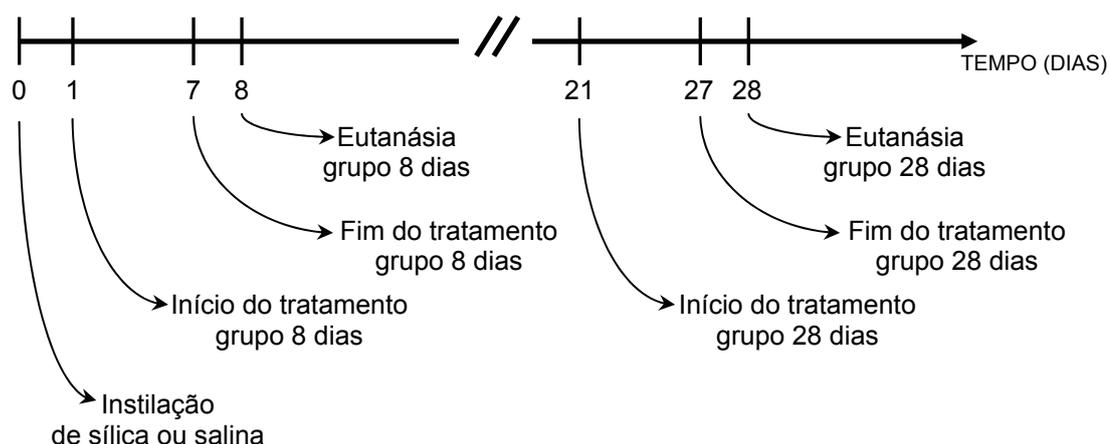


FIGURA 9: Linha temporal indicando a dinâmica do estudo. Os animais foram instilados com salina ou com sílica no dia 0. O tratamento do grupo 8 dias começou no dia 1 e terminou no dia 7, com eutanásia no dia 8. O tratamento do grupo 28 dias começou no dia 21 e terminou no dia 27, com eutanásia no dia 28.

4.3 INSTILAÇÃO DE SÍLICA OU SALINA

As partículas de sílica (dióxido de silício, SiO_2) foram adquiridas junto à SIGMA, código de catálogo S-5631. A empresa garante 99% de pureza e partículas variando de 0,5 a $10\mu\text{m}$ de diâmetro, sendo que 80% delas de 1 a $5\mu\text{m}$. Antes da instilação, as partículas foram deixadas por uma noite em estufa a 100°C para remoção de qualquer contaminante biológico.

Os camundongos foram anestesiados com vapor de isoflurano (Isoforine - Cristália) à concentração de 5%. Os animais foram colocados em posição de decúbito dorsal e após uma única incisão superficial, a traquéia foi exposta, com o auxílio de duas pinças curvas para divulsionar a musculatura, sem haver rompimentos da mesma ou de vasos adjacentes.

Assim que a traquéia foi exposta, houve a instilação, em dose única, por meio de uma seringa de insulina estéril, contendo $60\mu\text{L}$ de uma suspensão de 20mg de partículas de sílica em solução salina estéril (NaCl a 0,9%). Houve cuidado para que

a concentração da suspensão das partículas fosse a mesma para as instilações de todos os animais, com constante homogeneização e agitação da suspensão.

Após a instilação, a incisão foi suturada com 2 a 3 pontos simples, usando fio de nylon 4-0.

Os animais instilados com salina passaram por todo o processo descrito acima, sendo que a seringa utilizada, continha somente a solução salina estéril sem as partículas de sílica.

4.4 TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA OU VEÍCULO (GOMA)

Maleato de rosiglitazona (Avandia – GlaxoSmithKline – GSK) foi diluído na concentração de 2mg/mL em solução aquosa de goma arábica (SIGMA, G9752) a 10%. De acordo com o grupo, os animais receberam por gavagem, com auxílio de uma agulha própria para o procedimento, uma dose diária de 10mg de rosiglitazona/kg de peso corporal total. Para os animais que receberam somente o veículo (solução aquosa de goma arábica a 10%), o volume administrado foi calculado da mesma forma que para os tratados com rosiglitazona.

4.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS, PESAGEM E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Na data especificada para a eutanásia dos animais de cada grupo, estes foram pesados (Balança modelo A5000, MARTE) e depois anestesiados com isoflurano. A traquéia foi exposta, como descrito anteriormente e ocluída, com o auxílio de um fio de sutura ao final da expiração. Essa manobra visou evitar o colapso ou a hiperinsuflação dos alvéolos pulmonares.

Os animais foram, então, dissecados, com a retirada da traquéia, dos pulmões e do coração em uma única peça. Esta foi lavada em PBS e clivada de forma a deixar os pulmões íntegros, sem artefatos morfológicos causados por pinças. O pulmão esquerdo foi fixado em solução de formol 10% tamponado (CARSON, MARTIN & LYNN, 1973) por 16 horas. Foi, então, processado em processador automático (SHANDON, modelo Citadel 2000), com 5 banhos de 1 hora e meia de álcool etílico em concentrações crescentes, 3 banhos de xilol (VETEC) de 1 hora e 2 banhos de parafina (ISOFAR, cod. 740) de 1 hora e meia; para inclusão em blocos de parafina (ISOFAR, cod. 740) com o uso de um aparelho específico para este fim (SHANDON, modelo Histocentre 2) e posterior corte em micrótomo (LEICA, modelo RM2125RT).

4.6 IMUNODETECÇÃO PARA PPAR γ

As células positivas para PPAR γ foram detectadas a partir de cortes histológicos de 5 μ m de espessura submetidos à técnica de imunohistoquímica utilizando um anticorpo feito em coelho dirigido para o receptor humano e de camundongo (anti-PPAR γ , 2435S, clone: C26H12, Cell Signaling, USA). A técnica foi realizada da seguinte forma:

Primeiramente, ocorreu a desparafinização do material com três banhos de xilol e hidratação em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95%, 70%). Então, os cortes sofreram dois banhos de água destilada e os resíduos aldeídicos foram inibidos com solução de Bórax (Tetraborato de sódio, Reagen) a 5% em dois banhos de 15 minutos. Após duas lavagens em água destilada, a peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% (Reagen) diluído em metanol por 20 minutos. O material foi então lavado em água destilada, seguindo-se dois banhos de tampão PBS (fosfato salina) pH 7,4 por cinco minutos cada.

Para recuperação antigênica, as lâminas foram colocadas por 20 minutos em uma solução de Tampão Citrato 0,1M, pH 6,0 em panela a vapor na temperatura de 96°C. Os cortes foram então retirados do vapor, esperando-se chegar à temperatura ambiente.

Após o procedimento de recuperação antigênica, o material passou por três lavagens em PBS de cinco minutos cada e posterior bloqueio das ligações inespecíficas com PBS-BSA10%, Tween 20 0,05%, Triton X-100 0,1%, Gelatina 0,01% / Leite Mólico 8% (1:1) por uma hora.

Para a etapa de bloqueio da biotina endógena, os cortes foram lavados em um banho de PBS por 10 segundos, e incubados com a solução de estreptavidina do kit de bloqueio (SP-2002, Vector Labs, USA) por 15 minutos, lavados em PBS por 10 segundos e incubados com a solução de biotina do mesmo kit por 15 minutos. Os cortes foram então lavados em um banho de PBS por 5 minutos e posteriormente incubados com o anticorpo anti-PPAR γ em câmara úmida na concentração de 1:100 em PBS/BSA 3% - Triton X-100 0,1% - Tween 20 0,05%, permanecendo à temperatura de 4°C durante a noite até o próximo dia.

No dia seguinte, após alcançar a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas 2 vezes em Tampão PBS pH 7.4 e 1 vez em PBS – Tween 20 0,25%, por

cinco minutos cada e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG biotinilado (A0545, Sigma, USA) na concentração de 1:50 por uma hora. Ao final desse período e após duas lavagens com PBS – Tween 20 0,25%, foi incubada a Estreptavidina - Peroxidase (E8386, Sigma, USA) diluída 1:50 em PBS por 1 hora e as lâminas foram reveladas com DAB (K-3468, DAB líquida, DAKO, Carpinteria, CA, USA) por 10 minutos. Após 2 lavagens com tampão PBS pH 7.4 - Tween 20 0,25% por cinco minutos e uma lavagem em água destilada por 10 minutos, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina diluída de Harris e montadas em Entellan® (Merck). Como controles negativos, utilizamos cortes onde não houve a incubação com o anticorpo primário (anti-PPAR γ).

Os cortes foram fotografados em microscopia de campo claro, com o aumento da objetiva AxioPLAN - 25x (Zeiss), utilizando a câmera AxioCam HRc (Zeiss), no microscópio Axiovert 200M (Zeiss) e o programa de computador AxioVision (Zeiss).

4.7 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA

Lâminas com cortes de espessura de 5 μ m do pulmão esquerdo de cada animal foram coradas segundo o protocolo de Hematoxilina-Eosina (HE). Brevemente, o material passou por 7 banhos de 5 minutos cada: 3 banhos em xilol (VETEC), 3 banhos de álcool etílico em concentrações decrescentes (100%, 95%, 70%), e 1 banho em água destilada. O material foi corado por Hematoxilina de Harris por 10 minutos, deixado em água corrente por 5 minutos, diferenciado em solução álcool-ácida 1%, deixado em água corrente por 5 minutos novamente. Os cortes foram então para um banho de 5 minutos de água destilada e corados então, com um banho de 2 minutos na solução de Eosina Y 1% (MERCK), passados em água corrente rapidamente e desidratados em 3 banhos de 5 minutos em concentrações crescentes de álcool etílico (95%, 100%, 100%). Depois, os cortes foram diafanizados em 3 banhos de xilol (VETEC) e as lâminas foram montadas com a superposição de lamínulas de vidro com o meio Entellan (MERCK).

Após esse procedimento, as lâminas foram levadas ao microscópio de campo claro (Eclipse E800, Nikon) para análise morfológica do material e captura de imagens (câmera CoolSNAP, Nikon).

4.8 AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE

Para avaliar a celularidade, 15 campos das lâminas coradas com HE, foram fotografados em campo claro, com o aumento da objetiva AxioPLAN - 20x (Zeiss), utilizando a câmera AxioCam HRc (Zeiss), no microscópio Axiovert 200M (Zeiss) e o programa de computador AxioVision (Zeiss).

Os campos foram fotografados aleatoriamente, evitando-se grandes brônquios e vasos.

As fotos foram processadas para aumento de contraste e brilho através da automatização do programa Adobe Photoshop (Adobe), versão CS2.

A área total ocupada pela coloração da hematoxilina, que cora núcleos, foi quantificada no programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics), com a seleção de cor específica.

Calculamos o número de células por animal, dividindo a área total marcada pela área média do núcleo das células ($28,48\mu\text{m}^2$), calculada anteriormente, baseada na média de três fotos. Para se obter o índice de celularidade por mm^2 , o número total de células obtidas foi dividido pela área total fotografada por animal ($5,6379516\text{mm}^2$).

4.9 HISTOMORFOMETRIA DO ESPAÇO AÉREO

O espaço aéreo dos cortes histológicos de pulmão foi quantificado, conforme descrito por SIMON et al., 2006, em fotos de 15 campos de campo claro das lâminas coradas com HE, com o mesmo equipamento descrito anteriormente. Os campos foram fotografados aleatoriamente, evitando-se grandes brônquios e vasos.

A área total ocupada pelo espaço aéreo foi quantificada no programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics), com a seleção de cor específica.

O percentual de área ocupada pelo espaço aéreo foi obtido através da divisão da área contada pela área total fotografada ($5,6379516\text{mm}^2$).

4.10 QUANTIFICAÇÃO DE SÍLICA

Na microscopia de polarização, as partículas de sílica formam silicatos e ficam birrefringentes sendo identificadas facilmente. Utilizando essa propriedade, quantificamos a sílica nos tecidos pulmonares estudados. Para tal, os cortes histológicos foram fotografados em microscopia de polarização sendo capturados 15 campos das lâminas coradas com HE, com o auxílio da objetiva AxioPLAN - 20x

(Zeiss), da câmera AxioCam HRc (Zeiss), do microscópio Axiovert 200M(Zeiss) e do programa de computador AxioVision (Zeiss).

A área total ocupada pela sílica foi quantificada no programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics), com a seleção de cor específica.

Calculamos o percentual de área ocupada pela sílica, dividindo a área contada pela área total fotografada ($5,6379516\text{mm}^2$). Assim, obtivemos um dado numérico expressando a quantidade de sílica presente no tecido.

4.11 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO

Para corar as fibras colágenas, utilizamos a coloração de picosirius modificada para microscopia confocal descrita por Dolber & Spach (1993).

Cortes histológicos de $15\ \mu\text{m}$ de espessura foram desparafinizados em três banhos de xilol e depois hidratados em banhos com concentrações decrescentes de álcool etílico, e banhados por fim em água destilada. Logo após, os cortes foram tratados com uma solução aquosa de ácido fosfomolibdico a 0,2%. Esta solução foi desprezada após decorrido o tempo de 1 minuto e os cortes foram imersos na solução de picosirius, contendo 0,1% de Sirius Red F3BA, também chamado de Direct Red 80 (SIGMA, cod. 365548) em solução aquosa saturada de ácido pícrico durante 90 minutos. Os cortes foram então diferenciados em ácido clorídrico 0,01N durante 2 minutos e álcool etílico 70% durante 45 segundos. Seguiu-se com a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico e com posterior diafanização em xilol e conseguinte montagem das lâminas com Entellan® (MERCK).

A quantificação foi realizada de forma semelhante ao trabalho de Taylor (2002). Foram capturadas imagens de 10 campos dos preparados histológicos com o aumento da objetiva AxioPLAN-NEOFLUAR 25x (Zeiss), no microscópio confocal a laser LSM 510 META (Zeiss). O material foi lido com a excitação do laser HeNe de 543nm, com a seguinte configuração de filtros: HFT405/488/543/633, DBS1: Mirror, DBS2: NFT 545, NDD MBS: None e com o filtro LP560 no fotomultiplicador Channel 3.

Para se obter a imagem tridimensional do material, foi utilizada a tomografia óptica possível no equipamento referido. Assim, de cada campo foram escaneados 19 planos focais com espessura óptica de $0,86\ \mu\text{m}$ o que totaliza o total de $16,34\ \mu\text{m}$ de espessura.

O volume de marcação de colágeno foi obtido através da mensuração da área de cada plano focal multiplicada por sua espessura. O volume foi então obtido a partir da soma do volume de cada plano focal. Levando-se em consideração que houve sobreposição dos planos em sua espessura de 50%, o volume de cada plano foi dividido pela metade para a soma total do volume.

O percentual de volume do pulmão ocupado por fibras colágenas foi obtido através da divisão do volume mensurado pelo volume total de pulmão analisado de cada animal ($21600130,81 \mu\text{m}^3$).

4.12 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE FIBRAS ELÁSTICAS

Para corar as fibras do sistema elástico, tanto as elásticas quanto as oxitalânicas, utilizamos a coloração de orceína oxidada (COTTA-PEREIRA, RODRIGO & BITTENCOURT-SAMPAIO, 1976), conforme descrita abaixo:

Cortes histológicos de $5 \mu\text{m}$ de espessura foram desparafinizados em três banhos de xilol e depois hidratados em banhos com concentrações decrescentes de álcool etílico, e banhados por fim em água destilada. Os cortes foram então imersos em uma solução de oxona (peroximonosulfato de potássio - MERCK, código 818401) a 10% durante 20 minutos. Após, esse tratamento, as lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos. Então, os cortes histológicos foram corados com a solução de orceína alcoólica (1g de orceína, SIGMA, código O7505, em 100 mL de etanol e 0,7 mL de ácido clorídrico concentrado) por 45 minutos. Após esse processo, os cortes foram diferenciados em solução de álcool-clorídrico (99 mL de etanol 70%, com 1mL de ácido clorídrico concentrado), durante 1 segundo e lavados em seguida com água corrente. Por fim, os cortes foram contra-corados com solução aquosa concentrada de ácido pícrico, durante 1 minuto e depois lavados rapidamente em água corrente para remover o excesso de ácido pícrico. Seguiu-se com a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico e com posterior diafanização em xilol e conseguinte montagem das lâminas com Entellan® (MERCK).

Foram capturadas imagens de 15 campos dos preparados histológicos com o aumento da objetiva AxioPLAN-NEOFLUAR 25x (Zeiss), utilizando a câmera AxioCam HRc (Zeiss), no microscópio Axiovert 200M (Zeiss) e o programa de computador AxioVision (Zeiss).

Os campos foram fotografados aleatoriamente, evitando-se grandes brônquios e vasos.

As fotos foram processadas para aumento de contraste e brilho através da automatização do programa Adobe Photoshop (Adobe), versão CS2.

A área total ocupada pelas fibras do sistema elástico foi quantificada no programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics), com a seleção de cor específica.

O percentual de área do pulmão ocupada por fibras do sistema elástico foi obtido através da divisão da área quantificada pela área total analisada do pulmão de cada animal (3,20184915 mm²).

4.13 IMUNODETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MACRÓFAGOS POSITIVOS PARA A GLICOPROTEÍNA F4/80

Os macrófagos positivos para a glicoproteína F4/80 puderam ser detectados a partir de cortes histológicos de 5 µm de espessura que foram submetidos à técnica imunohistoquímica utilizando um anticorpo dirigido contra esse receptor de superfície celular (F4/80, MCA497, Clone A3-1, Serotec, USA). A técnica foi realizada da seguinte forma:

Primeiramente, os cortes histológicos foram desparafinizados com três banhos de xilol, a concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95% e 70%) e hidratados. Os resíduos aldeídicos foram inibidos com solução de Borax (Tetraborato de sódio, Reagen) a 5% em dois banhos de 15 minutos. Após duas lavagens em água destilada, a peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% (Reagen) diluído em metanol por 20 minutos. O material foi então lavado em água destilada, seguindo-se de dois banhos de tampão PBS (fosfato salina) pH 7,4 por cinco minutos cada.

Para recuperação antigênica, as lâminas foram colocadas por 15 minutos em PBS pH 7,4 previamente aquecido na estufa a 40°. 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 em PBS de cinco minutos cada, seguiu-se o bloqueio das ligações inespecíficas com PBS-BSA10%, Tween 20 0,05%, Triton X-100 0,1%, Gelatina 0,01% / Leite Mólico 8% (1:1) por uma hora. Após este procedimento, os cortes foram lavados em um banho de PBS por 10 segundos, e incubados com a

solução de estreptavidina do kit de bloqueio de biotina endógena (SP-2002, Vector Labs, USA) por 15 minutos, lavados em PBS por 10 segundos e incubado com a solução de biotina do mesmo kit por 15 minutos. Os cortes foram então lavados em um banho de PBS por 5 minutos e posteriormente incubados com o anticorpo anti-F4/80 em câmara úmida na concentração de 1:50 em PBS/BSA 3% - Triton X-100 0,1% - Tween 20 0,05%, permanecendo à temperatura de 4°C durante a noite até o próximo dia.

No dia seguinte, após alcançar a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas 2 vezes em Tampão PBS pH 7.4 e 1 vez em PBS – Tween 20 0,25%, por cinco minutos cada e incubadas com o anticorpo secundário anti-rat IgG biotilado (BA-1000, Vector, USA) na concentração de 1:30 por uma hora. Ao final desse período e após duas lavagens com PBS - Tween 20 0,25%, foi incubada a Estreptavidina - Peroxidase (E-8386, Sigma, USA) diluída 1:50 em PBS por 1 hora e as lâminas foram reveladas com DAB (K-3468, DAB líquida, DAKO, Carpinteria, CA, USA) por 10 minutos. Após 2 lavagens com tampão PBS pH 7.4 - Tween 20 0,25% por cinco minutos e uma lavagem em água destilada por 10 minutos, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina diluída de Harris e montadas em Entellan® (Merck). Como controles negativos, utilizamos cortes onde não houve a incubação com o anticorpo primário (anti-F4/80).

Para a quantificação da marcação, adotamos critérios estabelecidos para este fim por literatura específica (TAYLOR & LEVENSON, 2006; WALKER, 2006).

Foram capturadas imagens de 15 campos dos preparados histológicos com o aumento da objetiva AxioPLAN-NEOFLUAR 25x (Zeiss), utilizando a câmera AxioCam HRc (Zeiss), no microscópio Axiovert 200M (Zeiss) e o programa de computador AxioVision (Zeiss).

Os campos foram fotografados aleatoriamente, evitando-se grandes brônquios e vasos.

A área total ocupada pela positividade da DAB foi quantificada no programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics), com a seleção de cor específica.

Calculamos o número de células positivas, dividindo a área total marcada pela área média das células positivas ($73,73\mu\text{m}^2$), calculada baseada na média de três fotos. Para se obter o número de células positivas por mm^2 , o número total de células obtidas foi dividido pela área total fotografada por animal ($3,20184915\text{ mm}^2$).

4.14 QUANTIFICAÇÃO DE MACRÓFAGOS ATIVADOS POSITIVOS PARA A LECTINA BSL I

Com a finalidade de analisar e quantificar os macrófagos pulmonares ativados, utilizamos a técnica histoquímica para a detecção da lectina *Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia*, que é um marcador de macrófago estimulado e ativado, ligando-se a resíduos de acetilgalactosamina e galactose (MADDOX & COLS., 1982 a e b).

A primeira etapa foi a desparafinização do material com três banhos de xilol e hidratação em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95%, 70%). Então, os cortes sofreram dois banhos de água destilada e os resíduos aldeídicos foram inibidos com solução de Boráx (Tetraborato de sódio, Reagen) a 5% em dois banhos de 15 minutos. Após duas lavagens em água destilada, a peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% (Reagen) diluído em metanol por 20 minutos.

Realizamos, então, o bloqueio das ligações inespecíficas com PBS - BSA 5% por uma hora. Após este procedimento, as lâminas foram incubadas com a lectina *Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia* conjugada à biotina (B-1105, Vector Laboratories, USA) em câmara úmida durante uma noite à 4°C, na concentração de 1:100 em PBS-BSA 1% + Solução traço de metais, contendo 1mM de cada um dos seguintes sais: Cloreto de Cálcio, Cloreto de Magnésio, Cloreto de Manganês e Azida de Sódio. 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 (E-8386, Sigma, USA) diluída 1:50 em PBS por 1 hora e revelada pela DAB (K-3468, DAB Líquida, DAKO, Carpinteria, CA, USA) por 10 a 15 minutos. Após duas lavagens com água destilada por cinco minutos, as lâminas foram contracoloradas com Hematoxilina de Harris (diluída 1:3) e montadas em Entellan® (Merck).

Os controles negativos foram realizados com a supressão da incubação com a lectina.

Para a quantificação da marcação, adotamos critérios estabelecidos para este fim por literatura específica (TAYLOR & LEVENSON, 2006; WALKER, 2006).

Foram capturadas imagens de 10 campos dos preparados histológicos com o aumento da objetiva AxioPLAN-NEOFLUAR 40x (Zeiss), utilizando a câmera AxioCam HRc (Zeiss), no microscópio Axiovert 200M (Zeiss) e o programa de computador AxioVision (Zeiss).

Os campos foram fotografados aleatoriamente, evitando-se grandes brônquios e vasos.

A área total ocupada pela positividade da DAB foi quantificada no programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics), com a seleção de cor específica.

Calculamos o número de células positivas, dividindo a área total marcada pela área média das células positivas ($247,3\mu\text{m}^2$), calculada baseada na média de três fotos. Para se obter o número de células positivas por mm^2 , o número total de células obtidas foi dividido pela área total fotografada por animal ($3,20184915\text{ mm}^2$).

4.15 IMUNODETECÇÃO E HISTOMORFOMETRIA DE TGF- β E iNOS

Para a detecção e histomorfometria de TGF- β e iNOS utilizamos a técnica de imunohistoquímica com anticorpos definidos: anti-pan TGF- β e anti-iNOS. O anti-pan TGF β utilizado foi feito em coelho e reage com humano, porco e anfíbios (R&D Systems, AB-100NA, USA) e o anti-iNOS também era feito em coelho e reage com rato, humano e camundongo (Thermo Scientific, #RB-1605, USA). A técnica foi realizada da seguinte forma:

A primeira etapa foi a desparafinização do material com três banhos de xilol e hidratação em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95% e 70%). Então, os cortes sofreram dois banhos de água destilada e os resíduos aldeídicos foram inibidos com solução de Boráx (Tetraborato de sódio, Reagen) a 5% em dois banhos de 15 minutos. Após duas lavagens em água destilada, a peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% (Reagen) diluído em metanol por 20 minutos. O material foi então lavado em água destilada, seguindo-se de dois banhos de tampão PBS (fosfato salina) pH 7,4 por cinco minutos cada.

Para recuperação antigênica, as lâminas foram colocadas por 15 minutos em PBS pH 7,4 previamente aquecido na estufa a 40° . 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 em PBS de cinco minutos cada, seguiu-se o bloqueio das ligações inespecíficas com PBS-BSA10%, Tween 20 0,05%, Triton X-100 0,1%, Gelatina 0,01% / Leite Mólico 8% (1:1) por uma hora. Após este procedimento, os cortes foram lavados em um banho de PBS por 10 segundos, e incubados com a

solução de estreptavidina do kit de bloqueio de biotina endógena (SP-2002, Vector Labs, USA) por 15 minutos, lavados em PBS por 10 segundos e incubado com a solução de biotina do mesmo kit por 15 minutos. Os cortes foram então lavados em um banho de PBS por 5 minutos e posteriormente incubados em câmara úmida com os respectivos anticorpos primários, ambos na concentração 1:100 em PBS/BSA 3% - Triton X-100 0,1% - Tween 20 0,05%, permanecendo à temperatura de 4°C durante a noite até o próximo dia.

No dia seguinte, após alcançar a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas 2 vezes em Tampão PBS pH 7.4 e 1 vez em PBS – Tween 20 0,25%, por cinco minutos cada e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG biotilado (A0545, Sigma, USA) na concentração de 1:50 por uma hora. Ao final desse período e após duas lavagens com PBS – Tween 20 0,25%, foi incubada a Estreptavidina - Peroxidase (E8386, Sigma, USA) diluída 1:50 em PBS por 1 hora e as lâminas foram reveladas com DAB (K-3468, DAB líquida, DAKO, Carpinteria, CA, USA) por 10 minutos. Após 2 lavagens com tampão PBS pH 7.4 - Tween 20 0,25% por cinco minutos e uma lavagem em água destilada por 10 minutos, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina diluída de Harris e montadas em Entellan® (Merck). Como controles negativos, utilizamos cortes onde não houve a incubação com o anticorpo primário.

Para a quantificação da marcação, adotamos critérios estabelecidos para este fim por literatura específica (TAYLOR & LEVENSON, 2006; WALKER, 2006).

Foram capturadas imagens de 15 campos dos preparados histológicos com o aumento da objetiva AxioPLAN-NEOFLUAR 25x (Zeiss), utilizando a câmera AxioCam HRc (Zeiss), no microscópio Axiovert 200M (Zeiss) e o programa de computador AxioVision (Zeiss).

Os campos foram fotografados aleatoriamente, evitando-se grandes brônquios e vasos.

A área total ocupada pela positividade da DAB foi quantificada no programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics), com a seleção de cor específica.

O percentual de área do pulmão ocupada pela marcação específica foi obtido através da divisão da área quantificada pela área total analisada do pulmão de cada animal (3,20184915 mm²).

4.16 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS POR TUNEL

Para a detecção e quantificação de células apoptóticas utilizamos o kit ApopTag da Chemicon- Millipore USA, S7100. O protocolo utilizado seguiu estritamente as normas do fabricante.

Em um primeiro momento, desparafinamos os cortes histológicos em três banhos de xilol e os hidratamos com três banhos de álcool etílico em concentrações decrescentes. Os cortes histológicos foram banhados em água destilada e tratados com Proteinase K (20 μ g/mL) por 15 minutos à temperatura ambiente.

Lavamos os cortes com água destilada (dois banhos de 2 minutos) e inibimos a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% (Reagen) diluído em metanol por 20 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS, duas vezes por 5 minutos.

Aplicamos o tampão de equilíbrio do kit por 1 minuto e logo após a enzima TdT durante 1 hora à temperatura de 37°C. Utilizamos o tampão de lavagem do kit para banhar os cortes por 10 minutos.

Lavamos os cortes em três banhos de PBS de 5 minutos cada e incubamos os cortes com o anticorpo anti-digoxigenina por 30 minutos. As lâminas foram lavadas em quatro banhos de PBS de 2 minutos cada e revelada com a solução de substrato de peroxidase por 10 minutos.

Após 2 lavagens com tampão PBS pH 7.4 Tween 20 0,25% por cinco minutos e uma lavagem em água destilada por 10 minutos, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina diluída de Harris e montadas em Entellan® (Merck). Como controles negativos, utilizamos cortes onde não houve a incubação com a enzima TdT.

Foram capturadas imagens de 10 campos dos preparados histológicos com o aumento da objetiva AxioPLAN-NEOFLUAR 40x (Zeiss), utilizando a câmera AxioCam HRc (Zeiss), no microscópio Axiovert 200M (Zeiss) e o programa de computador AxioVision (Zeiss).

Os campos foram fotografados aleatoriamente, evitando-se grandes brônquios e vasos. O número de células positivas foi obtido através de contagem manual no programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

Para se obter o número de células positivas por mm², o número total de células obtidas foi dividido pela área total fotografada por animal (0,9382032 mm²).

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram analisadas descritivamente, sendo submetidas a um teste de normalidade. As variáveis que apresentaram distribuição normal foram analisadas pelos testes paramétricos *T DE STUDENT*, para amostras independentes (*two tailed*). Para a comparação de mais de dois grupos, foi utilizado o teste *ONE WAY ANOVA* e quando obtido o efeito principal foi empregado pós-teste de Hom-Sidak como procedimento de comparação múltipla. Para a análise de variáveis que não apresentaram distribuição normal, foram utilizados os testes não paramétricos *KRUSKAL-WALLIS* e *MANN-WHITNEY* para análise de dois grupos e análise de mais de dois grupos, respectivamente.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa de computador SigmaStat versão 3.0.1, foi admitido $p < 0,05$ (5%) como significativo e as barras utilizadas nos gráficos representam o desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 IMUNODETECÇÃO PARA $PPAR\gamma$

Inicialmente, houve necessidade de validar o modelo utilizado em nosso estudo, demonstrando a presença, nos pulmões dos animais dos grupos experimentais, de células positivas para $PPAR\gamma$ que seriam possíveis alvos da ativação do tratamento com rosiglitazona (agonista de $PPAR\gamma$).

Para isso, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica com o anticorpo anti- $PPAR\gamma$ e nossos achados revelaram que as principais células expressando o $PPAR\gamma$ nos pulmões dos animais silicóticos tratados com rosiglitazona, tanto em 8 dias quanto em 28 dias, foram identificadas morfológicamente principalmente como células do epitélio brônquico e macrófagos alveolares e intersticiais, conforme demonstra a figura 10A e B.

Vale ressaltar também que dentro dos nódulos silicóticos, células fibroblastóides com núcleo alongado também apresentaram expressão de $PPAR\gamma$ (FIGURA 10B).

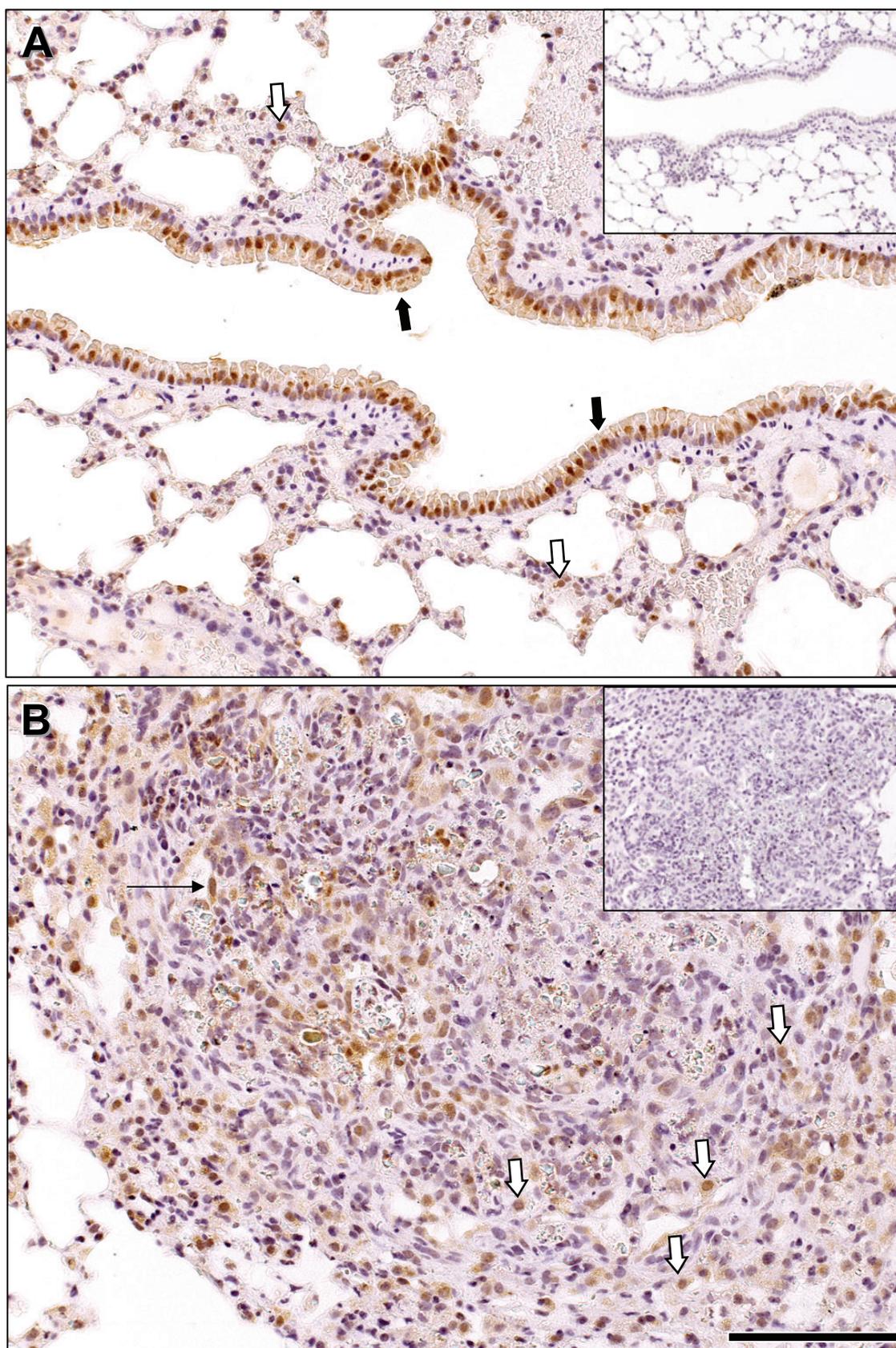


FIGURA 10: Fotomicrografias de cortes histológicos marcados com a técnica de imunohistoquímica para PPAR γ . Células do epitélio brônquico (setas pretas), macrófagos (setas brancas) e células fibroblastóides (seta fina) positivos. **(A)** Sílica + Rosiglitazona, 8 dias; **(B)** Sílica + Rosiglitazona, 28 dias. Fotos pequenas em A e B são os controles negativos da técnica sem incubação do anticorpo primário. Barra de escala = 100 μ m. Barra de escala para os controles = 300 μ m.

5.2 PESO DOS CAMUNDONGOS

Os animais dos diferentes grupos não demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) com relação à variação de seu peso corporal ao longo do período de tratamento de 8 dias (FIGURA 11).

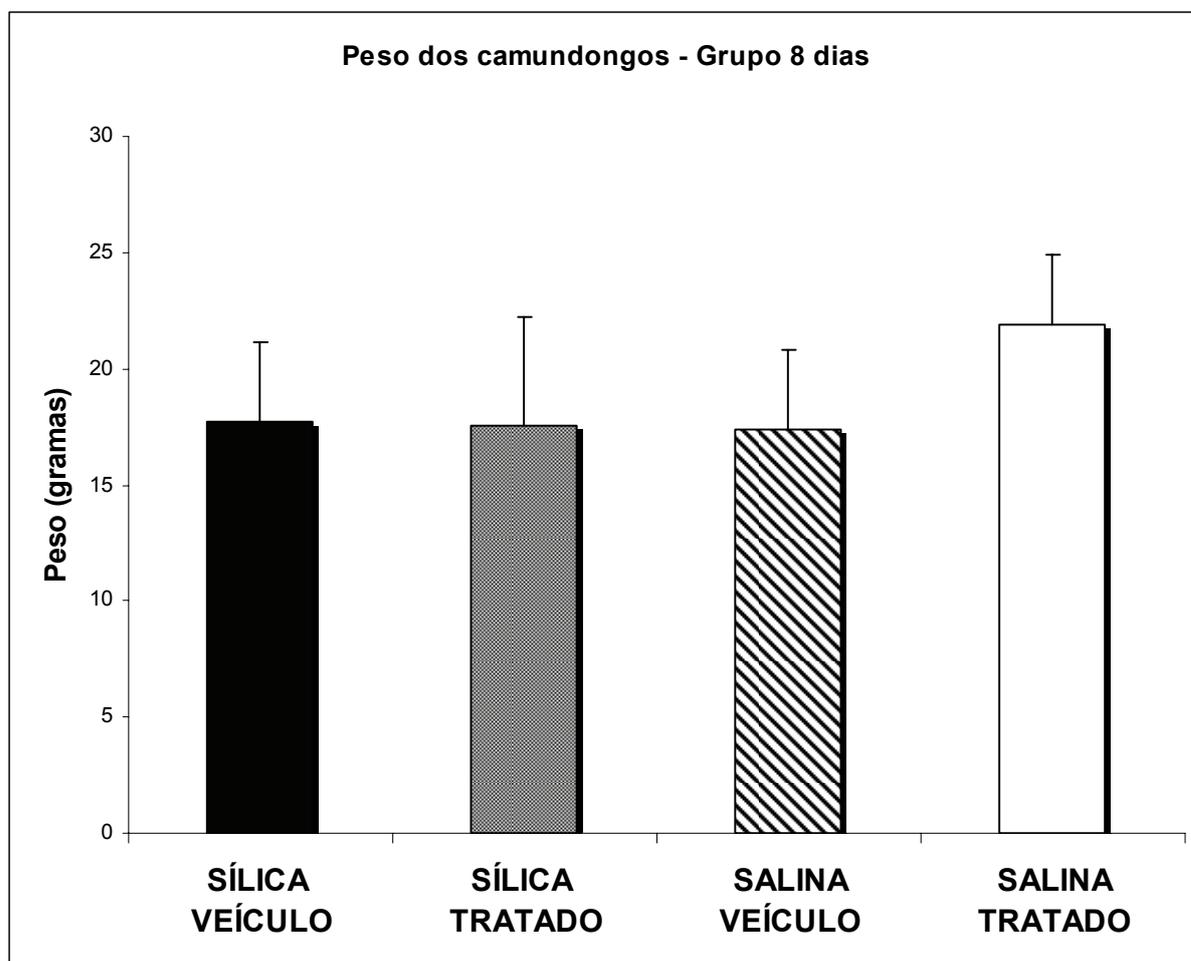


FIGURA 11: Gráfico do peso dos camundongos ao final do tratamento de 8 dias. Não há diferença significativa entre os diferentes grupos ($p > 0,05$; $n = 6$).

No grupo de 28 dias, houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre o peso dos camundongos que haviam sido instilados com sílica e o dos que foram instilados com salina. Contudo, a variável do tratamento com rosiglitazona ou com veículo (goma) não ($p > 0,05$) influenciou no peso dos camundongos ao final do tratamento (FIGURA 12).

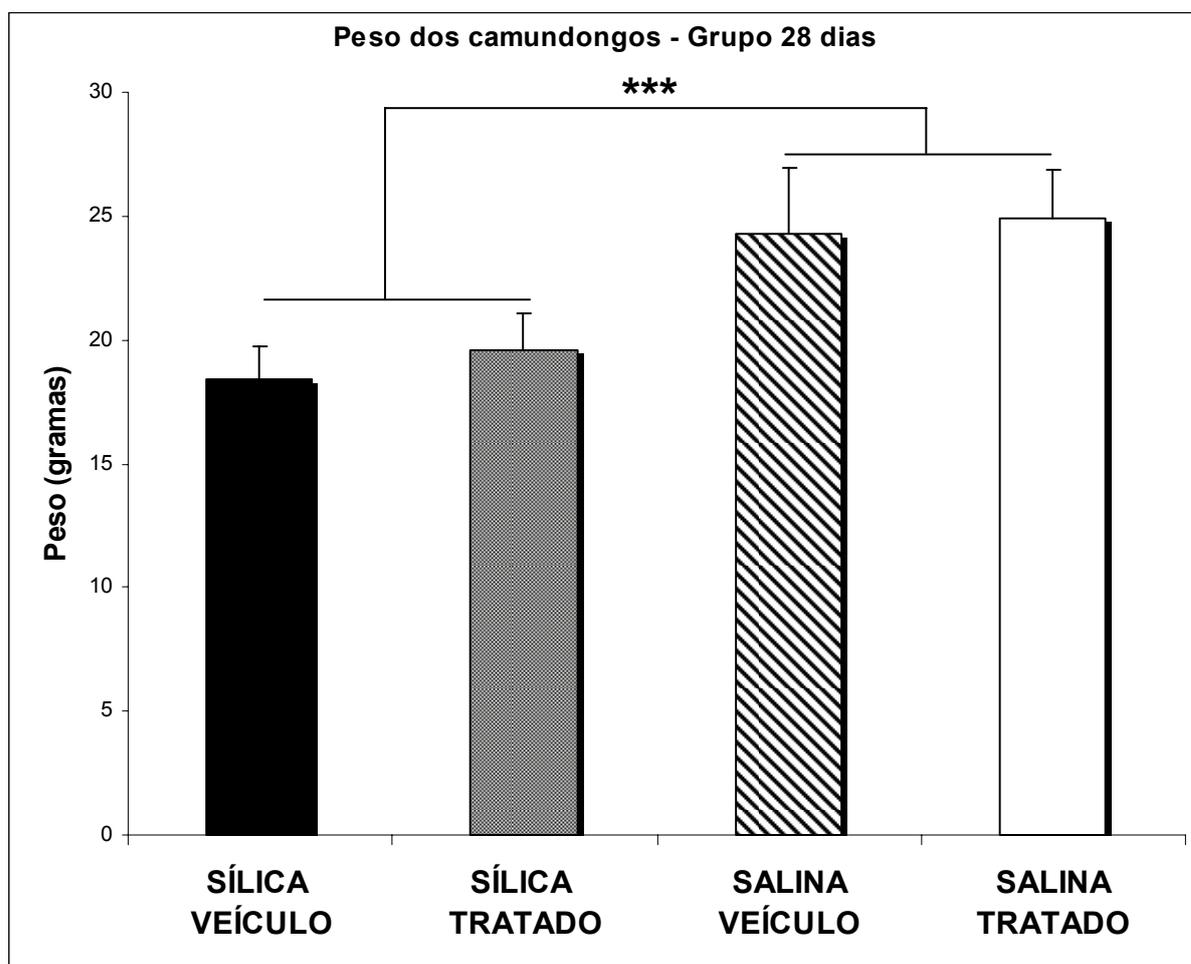


FIGURA 12: Gráfico do peso dos camundongos ao final do tratamento de 28 dias. Há diferença estatisticamente significativa (***) indica $p < 0,001$) entre os grupos salina e sílica. No entanto, não há diferença entre os grupos tratado e veículo, nas duas situações ($n = 6$).

5.3 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA

Nos animais submetidos à instilação de salina tratados ou não tratados com rosiglitazona, tanto do grupo de 8 dias quanto de 28 dias, a arquitetura pulmonar se manteve preservada, exibindo um discreto edema perivascular e raros macrófagos alveolares situados no espaço aéreo. (FIGURA 13 A, B, C e D)

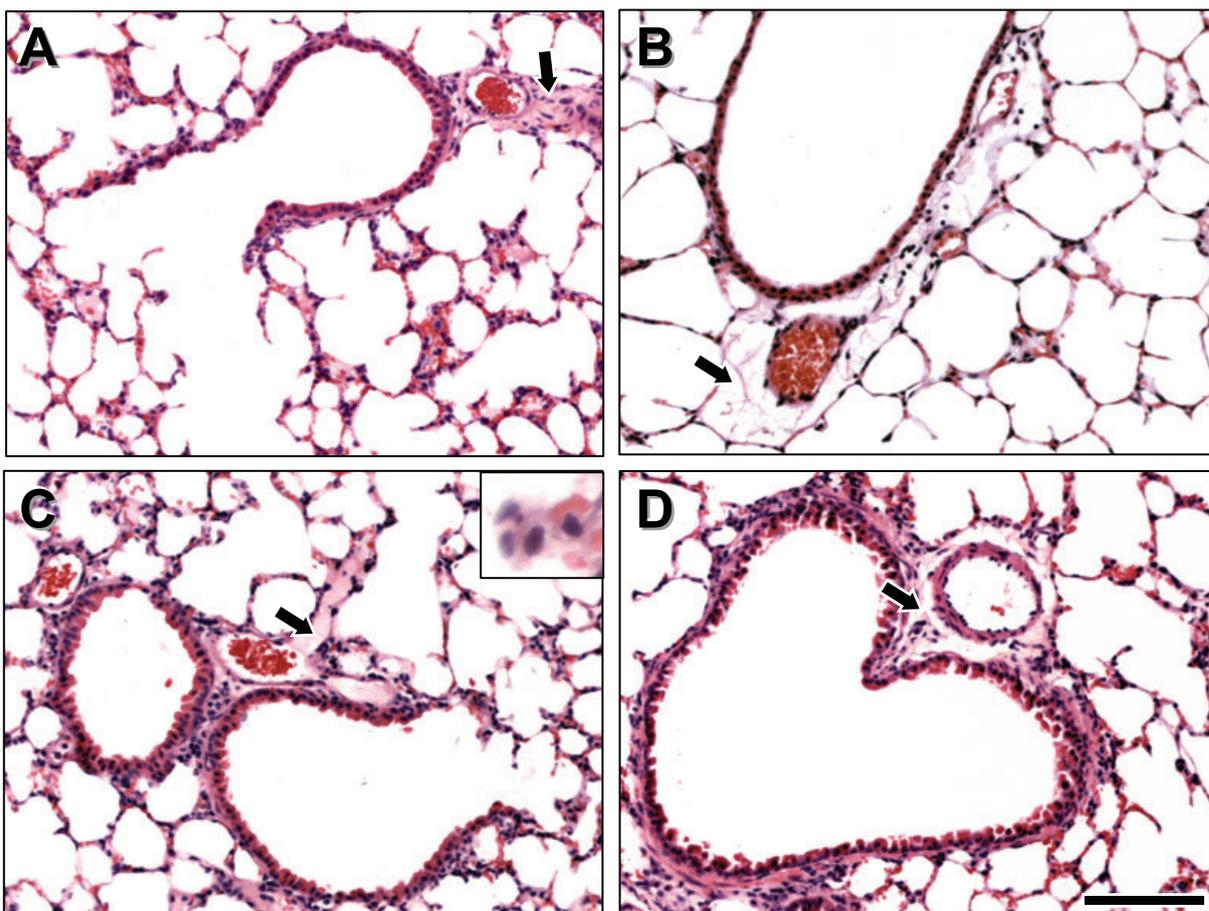


FIGURA 13: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina dos animais instilados com salina. Observar os discretos edemas perivascularares (setas pretas) e os poucos macrófagos alveolares no espaço aéreo (seta branca e ampliação em C). **(A)** SALINA VEÍCULO, grupo de 8 dias; **(B)** SALINA TRATADO, grupo de 8 dias; **(C)** SALINA VEÍCULO, grupo de 28 dias. **(D)** SALINA TRATADO, grupo de 28 dias. Barra de Escala = 100 μm (equivalente a 20 μm na ampliação).

Nos animais do grupo de 8 dias instilados com sílica e tratados com veículo (goma), observamos a presença de extensos infiltrados inflamatórios, constituídos principalmente por células mononucleares (macrófagos) com perda considerável da estrutura do parênquima pulmonar (FIGURA 14 A, B e C). Há muitos macrófagos repletos de partículas de sílica que estão presentes no espaço aéreo, inclusive na luz de brônquios (FIGURA 15 A, B e C). Encontramos com freqüência uma estrutura de tampão exsudativo-fibrótico também dentro da luz de brônquios (FIGURA 16A). Observamos a presença de regiões que indicam o início da formação dos nódulos silicóticos com áreas de necrose e partículas de sílica não fagocitadas em sua região central (FIGURA 14C). Há também *debris* celulares e muitos núcleos fragmentados, evidenciando células apoptóticas (FIGURA 14 – ampliação em A). A região de inflamação é, por vezes, circundada por zonas de colapso ou hiperinsuflação dos alvéolos (FIGURA 16B). Os septos alveolares encontram-se levemente espessados (FIGURA 16B) e o epitélio brônquico se apresenta hiperplásico (FIGURA 15A).

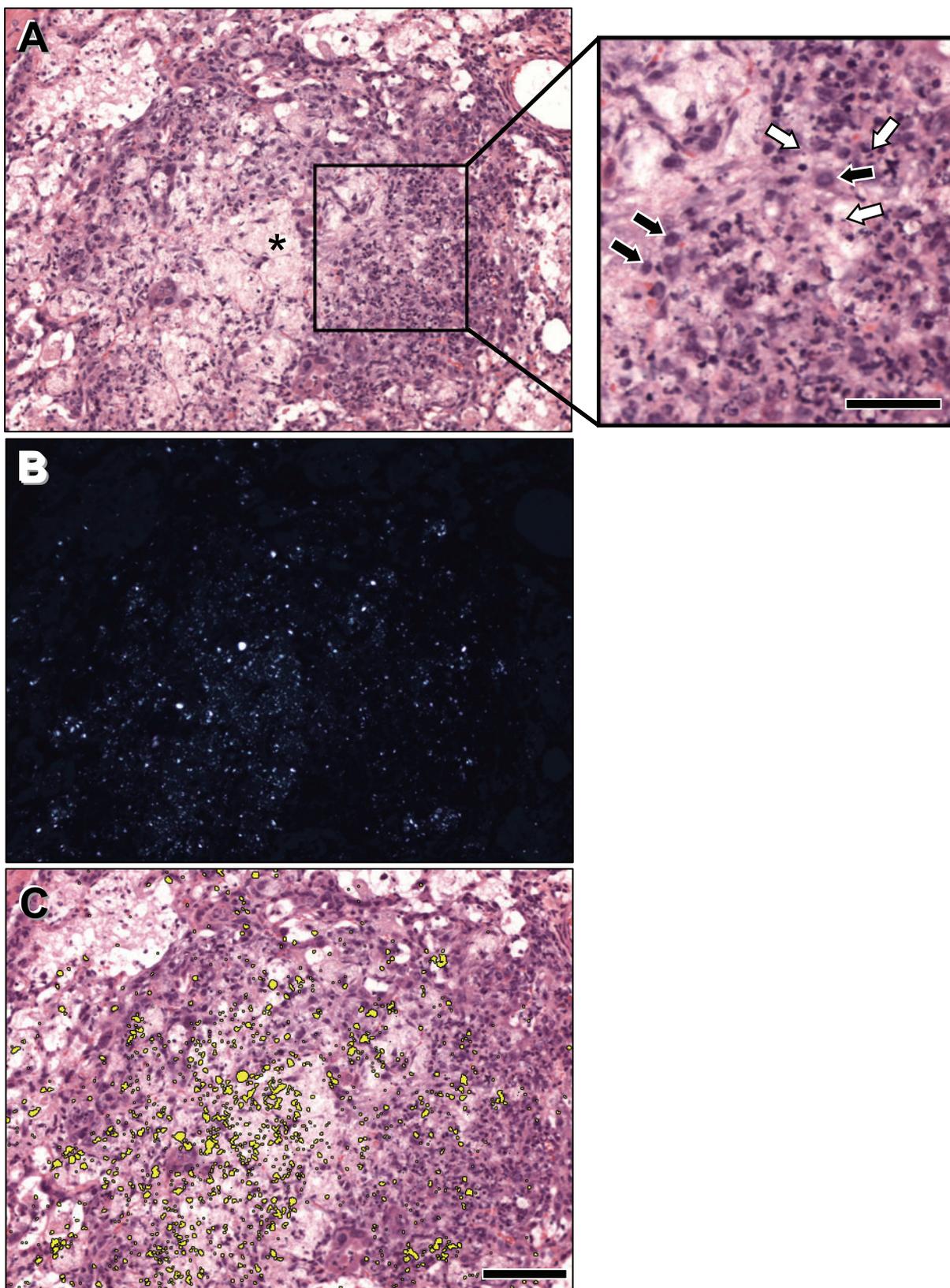


FIGURA 14: Fotomicrografias de corte histológico corado com Hematoxilina e Eosina de animal instilado com sílica e tratado com veículo, grupo 8 dias. **(A)** Extenso infiltrado inflamatório demonstrando área necrótica central (*), muitos macrófagos (ampliação lateral, setas pretas) e vários núcleos fragmentados e *debris* celulares (ampliação lateral, setas brancas). **(B)** Mesmo campo observado em luz polarizada, partículas de sílica evidentes. **(C)** Sobreposição das imagens com partículas de sílica em amarelo. Barra de escala = 100 μ m e barra de escala da ampliação = 50 μ m.

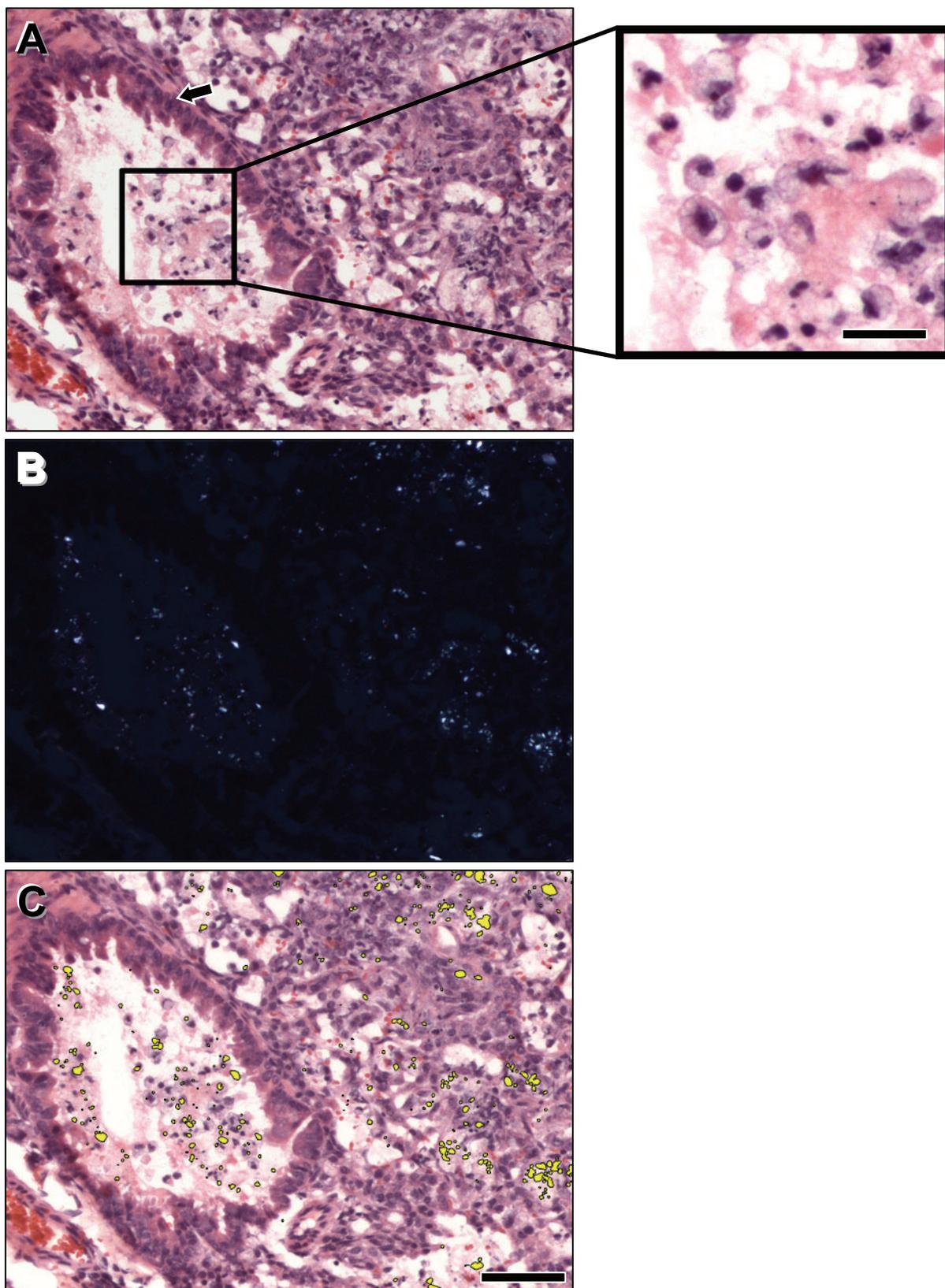


FIGURA 15: Fotomicrografias de corte histológico corado com Hematoxilina e Eosina de animal instilado com sílica e tratado com veiculo, grupo 8 dias. **(A)** Macrófagos no espaço aéreo na luz de brônquio (ampliação) e epitélio brônquico hiperplásico (seta preta). **(B)** Mesmo campo observado em luz polarizada, partículas de sílica evidentes. **(C)** Sobreposição das imagens com partículas de sílica em amarelo. Barra de escala = 100 μ m e barra de escala da ampliação = 20 μ m.

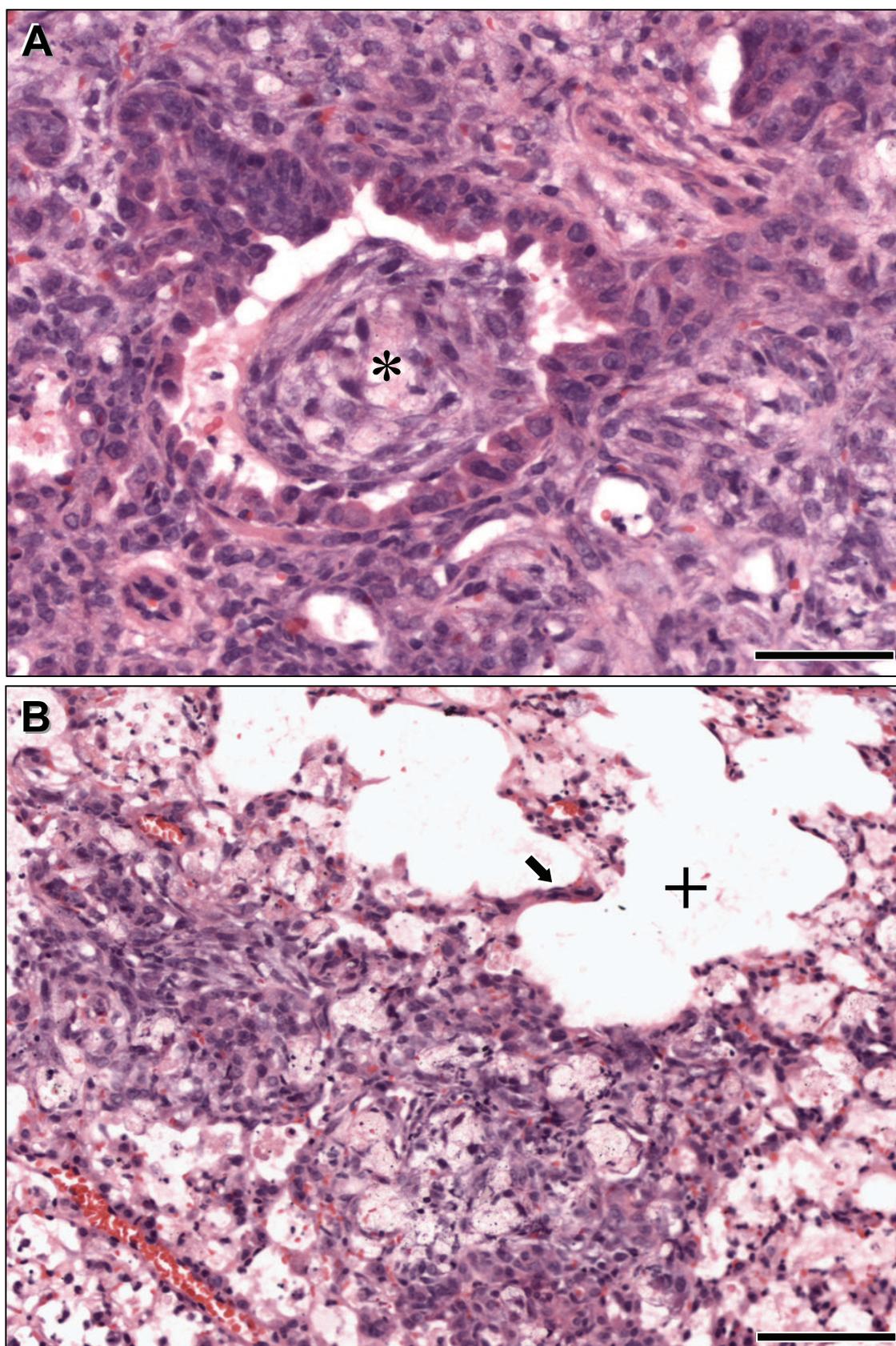


FIGURA 16: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina de animais instilados com sílica e tratados com veículo, grupo 8 dias. (A) Tampão exsudativo-fibrótico na luz de um brônquio (*). (B) Área hiperinsuflada (+) ao lado da região de inflamação e septo alveolar espessado (seta preta). Barra de escala = 50 μ m (A) e 100 μ m (B).

Nos animais de 28 dias, os nódulos silicóticos se apresentaram mais maduros, ocupando extensas áreas, por vezes, todo o campo no aumento da objetiva de 20x (FIGURA 17 A e B). Na periferia dos nódulos, eram evidentes agregados linfocíticos, eventualmente localizados na parede dos brônquios. Em sua grande parte, os nódulos eram confluentes, o que os distinguiu dos nódulos de 8 dias (FIGURA 17 B). Os nódulos eram constituídos por macrófagos e linfócitos (dados não mostrados), sendo evidenciadas algumas áreas centrais hialinas devido a presença de *debris* celulares e partículas de sílica não fagocitadas, assim como ocorria no grupo de 8 dias (FIGURA 17 B). Encontramos, também, com frequência estruturas de tampão exsudativo-fibrótico dentro da luz de brônquios (FIGURA 17 A). Nos espaços aéreos vizinhos, notavam-se também zonas de colapso ou hiperinsuflação e presença de grandes macrófagos alveolares principalmente nos alvéolos vizinhos aos nódulos (FIGURA 17 B). Os septos alveolares se apresentaram discretamente espessados pela presença de células inflamatórias com hiperplasia do epitélio brônquico (FIGURA 17 A e B).

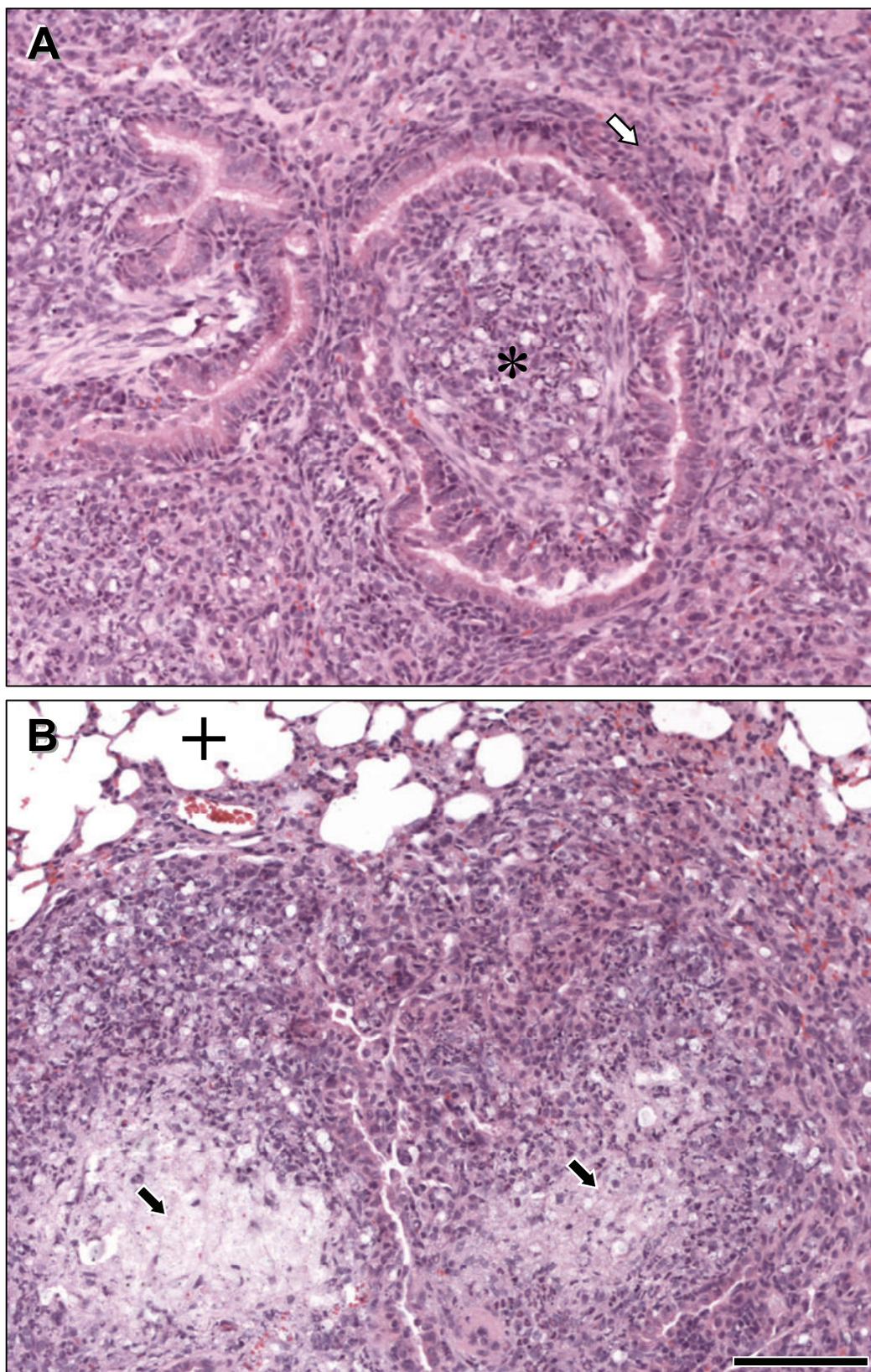


FIGURA 17: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina de animais instilados com sílica e tratados com veículo, grupo 28 dias. **(A)** Tampão exsudativo-fibrótico na luz de um brônquio (*) e agregado linfocítico na parede de brônquio (seta branca). **(B)** Nódulos confluentes com área hiperinsuflada (+) ao lado, presença região central hialina (setas pretas). Barra de escala = 100µm (A e B).

Nos animais tratados com rosiglitazona tanto de 8 dias, quanto de 28 dias, encontramos freqüentemente pequenos infiltrados inflamatórios peribrônquicos (FIGURA 18 A e B). Há também espessamento de septos alveolares com congestão de capilares (FIGURA 18 B). Quando comparados morfológicamente com os tratados com goma, notamos uma diminuição das áreas de inflamação (FIGURAS 14, 15, 16, 17 e 18A e B). Verificamos também que a maioria das estruturas e células observadas nos animais tratados com veículo também foi encontrada nos animais tratados com rosiglitazona, no entanto com menor freqüência e por vezes com tamanho aparentemente menor. Estes achados foram confirmados *a posteriori* pelos procedimentos de histomorfometria.

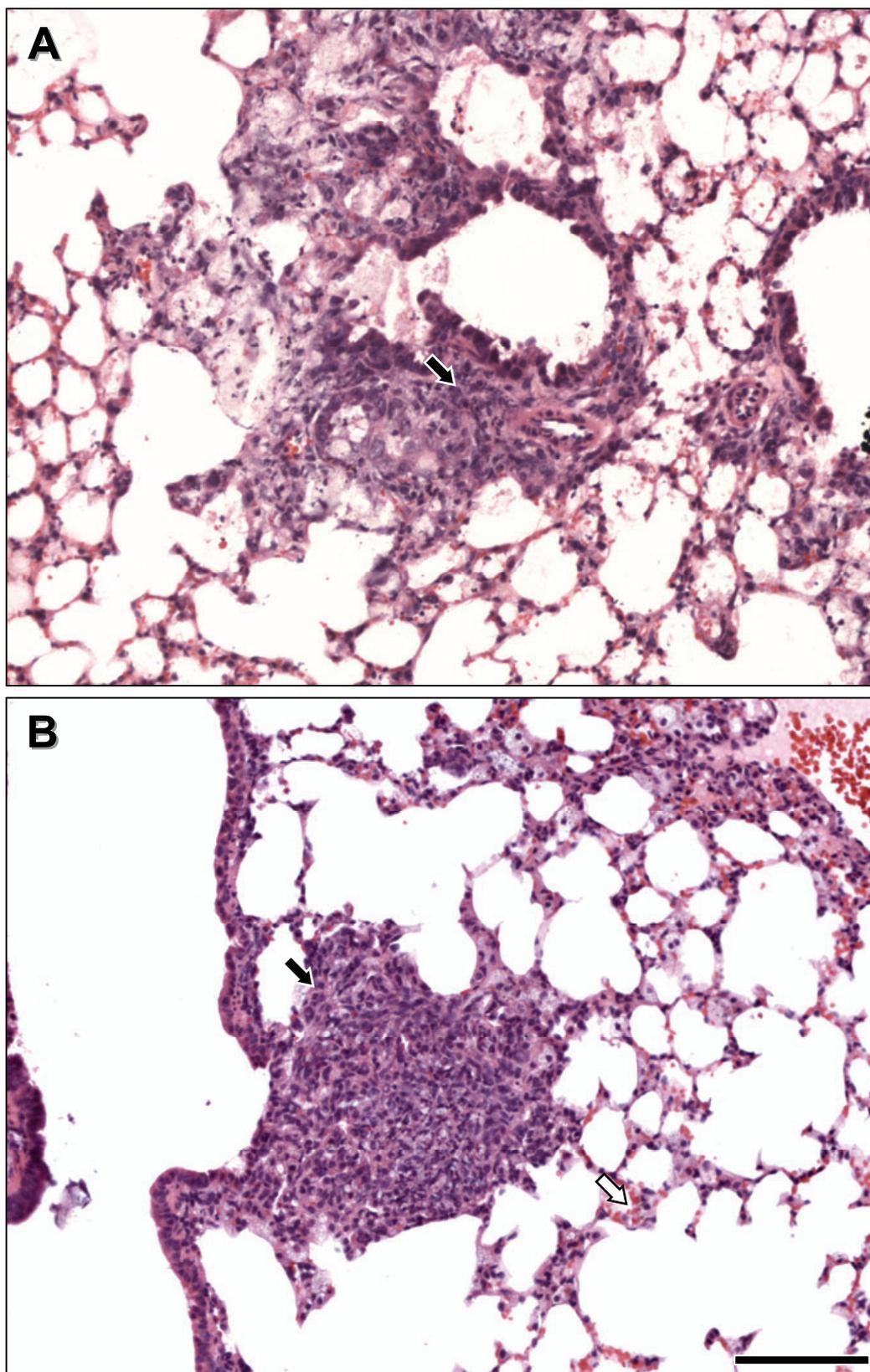


FIGURA 18: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina de animais instilados com sílica e tratados com rosiglitazona. (A) Grupo 8 dias. (B) Grupo 28 dias. Notamos a área de inflamação (setas pretas) e septos alveolares espessados (seta branca). Barra de escala = 100 μ m (A e B).

5.4 AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE

No intuito de verificar e demonstrar numericamente nossas observações morfológicas, foram utilizadas quantificações histomorfométricas. A primeira análise realizada foi a de celularidade.

No grupo de 8 dias, o número de células por micrômetro quadrado nos grupos salina tratados com veículo (goma) e rosiglitazona não ($p > 0,05$) se modificou, apresentando valores de $5,1 \pm 2,4$ e $5,4 \pm 2,1 \times 10^3$ células/mm², respectivamente (FIGURA 19 A, B e E).

Quando comparamos os grupos dos animais silicóticos tratados com veículo e com rosiglitazona, encontramos diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Os animais tratados com veículo apresentaram um número maior de células por milímetro quadrado ($21,6 \pm 3,7 \times 10^3$ células/mm²), enquanto os tratados com rosiglitazona apresentaram uma menor celularidade, $13,7 \pm 2,7 \times 10^3$ células por milímetro quadrado (FIGURA 19 C, D e E).

No grupo de 28 dias, a celularidade também foi significativamente diferente ($p < 0,001$). Os animais instilados com salina, independente da variável do tratamento com rosiglitazona ou com o veículo, apresentaram de $7,1 \pm 1,0$ e $7,6 \pm 1,8 \times 10^3$ células/mm² ($p > 0,05$) (FIGURA 20 A, B e E). No entanto, nos animais instilados com sílica e tratados com veículo, esse número foi de $27,6 \pm 2,7 \times 10^3$ células/mm² e nos tratados com rosiglitazona $21,4 \pm 5,2 \times 10^3$ células/mm² ($p < 0,001$) (FIGURA 20 C e D). Desta forma, tanto no grupo de 8 dias quanto no de 28 dias, os animais tratados com rosiglitazona apresentaram menor celularidade do que os tratados com veículo. Contrapondo os tempos, os animais silicóticos tratados com rosiglitazona de 28 dias apresentaram maior ($p < 0,001$) celularidade ($21,4 \pm 5,2 \times 10^3$ células/mm²) do que os de 8 dias ($13,7 \pm 2,7 \times 10^3$ células/mm²) (FIGURAS 19 D e E; 20 D e E).

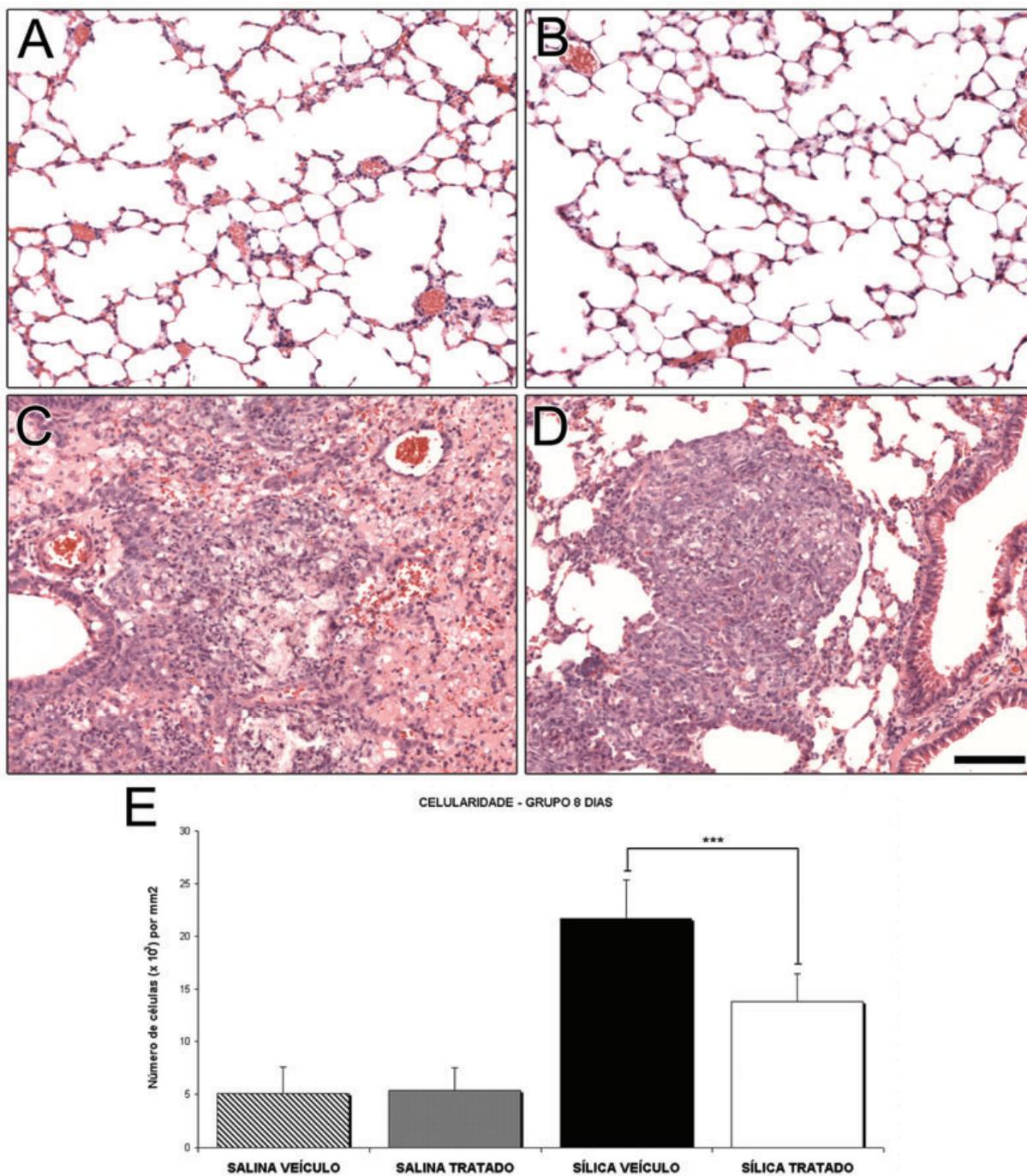


FIGURA 19: Avaliação da Celularidade do grupo 8 dias — Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina e gráfico correspondente. (A) Salina + Veículo; (B) Salina + Rosiglitazona; (C) Sílica + Veículo; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação de celularidade (células $\times 10^3/\text{mm}^2$). Barra de escala = $100\mu\text{m}$. (***) $p < 0,001$; $n = 6$

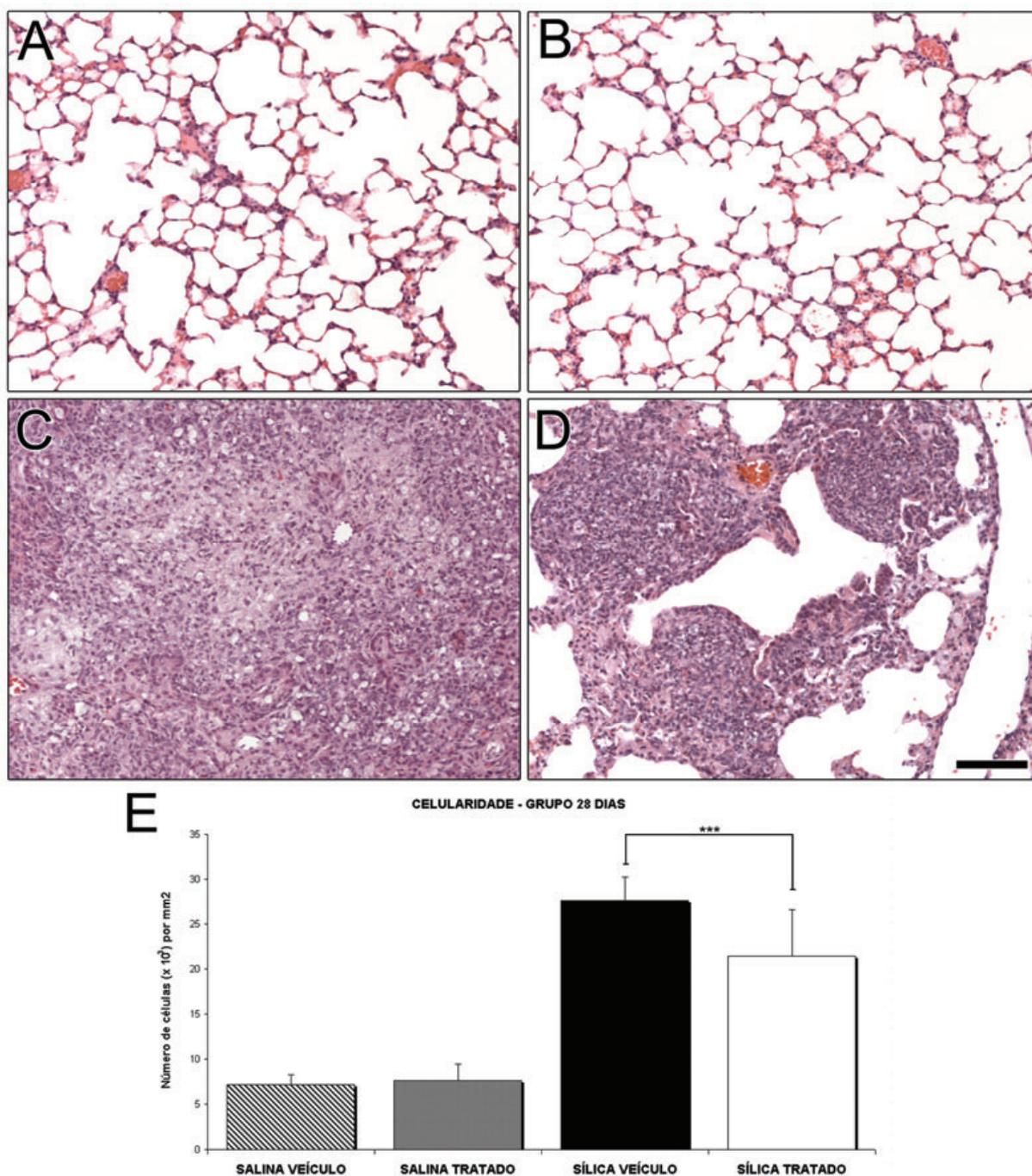


FIGURA 20: Avaliação da Celularidade do grupo 28 dias — Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina e gráfico correspondente. (A) Salina + Veículo; (B) Salina + Rosiglitazona; (C) Sílica + Veículo; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação de celularidade (células $\times 10^3/\text{mm}^2$). Barra de escala = 100 μm . (***)p < 0,001; n = 6)

5.5 HISTOMORFOMETRIA DO ESPAÇO AÉREO

Um dos fatores que influencia na perda de área para troca gasosa nos pulmões é a perda do espaço aéreo por conta do processo inflamatório. Para verificar se houve diferença na perda de espaço aéreo no animais silicóticos tratados com veículo e com rosiglitazona, utilizamos a histomorfometria do percentual de área ocupada pelo espaço aéreo nos cortes histológicos de pulmão analisados.

Com 8 dias e 28 dias, as áreas ocupada pelo espaço aéreo nos grupos salina tratados com veículo (goma) e rosiglitazona não apresentaram nenhuma diferença, ocupando $72,15 \pm 10,1\%$ e $71,6 \pm 7,53\%$ da área analisada, respectivamente para o grupo de 8 dias ($p > 0,05$). E para o grupo de 28 dias, os valores foram de $71,95 \pm 3,5 \%$ e $69,04 \pm 8,45\%$, também respectivamente ($p > 0,05$). (FIGURA 21 A, B e E e FIGURA 22 A, B e E).

Quando comparamos os grupos dos animais silicóticos tratados com veículo e com rosiglitazona (grupo 8 dias), encontramos diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Os animais tratados com veículo apresentaram um percentual menor de área ocupada pelo espaço aéreo ($19,4 \pm 2,18 \%$), enquanto os tratados com rosiglitazona apresentaram um percentual maior, $37,1 \pm 7,7 \%$ (FIGURA 21 C, D e E).

No grupo de 28 dias, o percentual de espaço aéreo também foi diferente de forma estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Nos animais instilados com sílica e tratados com veículo, o percentual de espaço aéreo foi mensurado em $9,55 \pm 2,07\%$ e nos tratados com rosiglitazona $40,85 \pm 7,35\%$ (FIGURA 22 C, D e E).

Assim, tanto no grupo de 8 dias quanto no de 28 dias, os animais tratados com rosiglitazona apresentaram maior percentual de área ocupada pelo espaço aéreo do que os tratados com veículo.

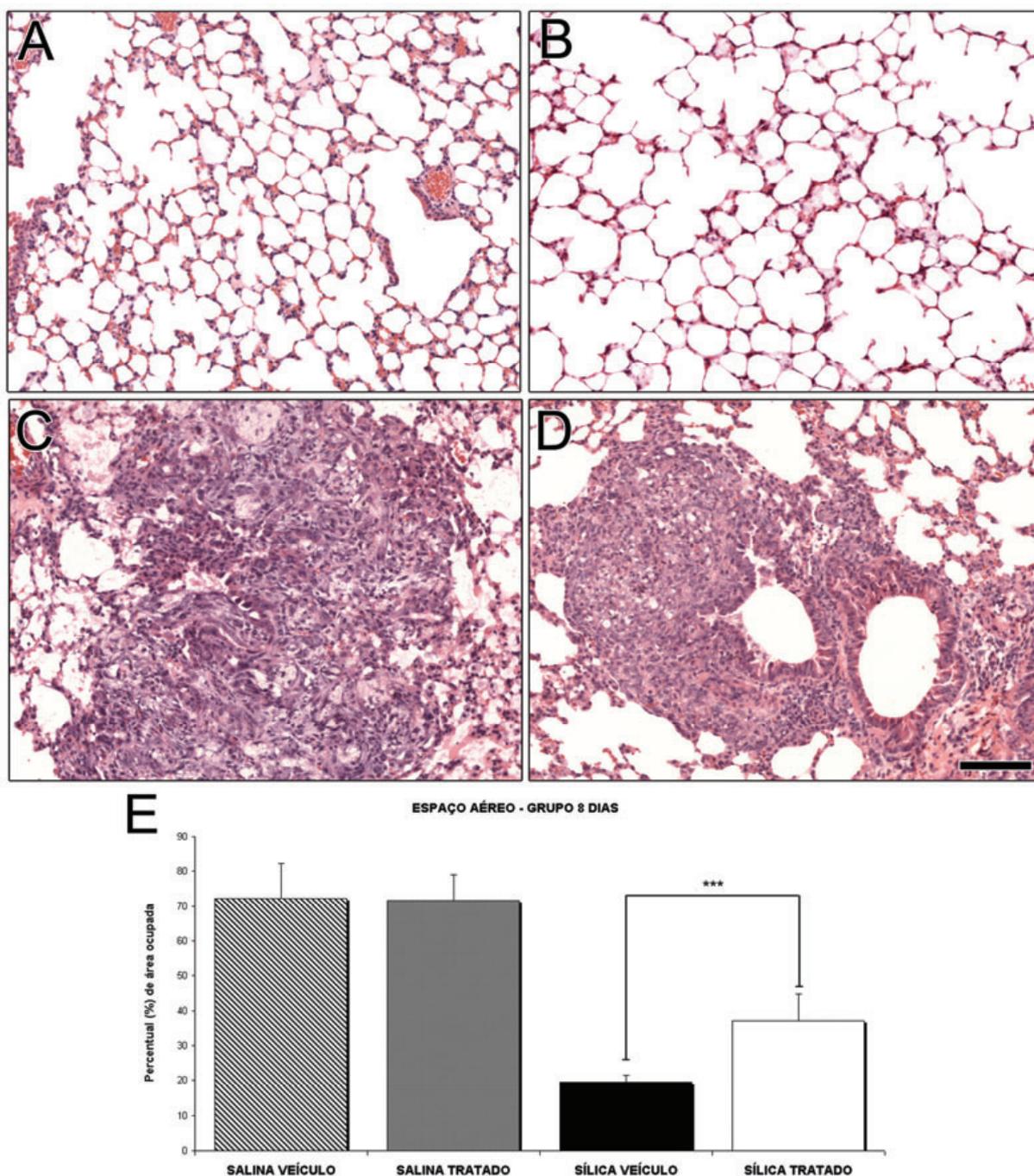


FIGURA 21: Histomorfometria do espaço aéreo do grupo 8 dias — Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina e gráfico correspondente. (A) Salina + Veículo; (B) Salina + Rosiglitazona; (C) Sílica + Veículo; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação de percentual de área ocupada pelo espaço aéreo. Barra de escala = 100µm. (p < 0,001; n = 6)**

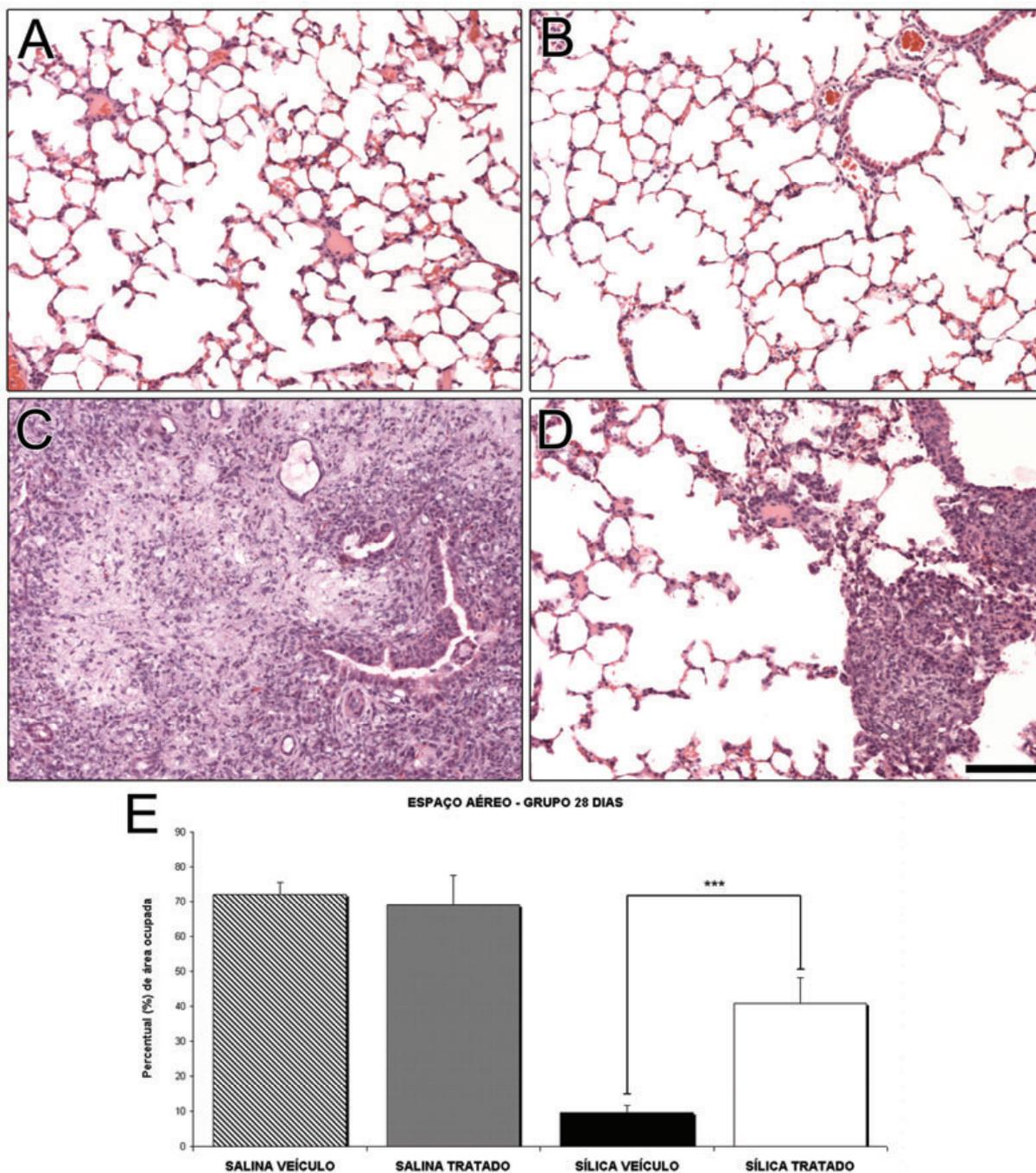


FIGURA 22: Histomorfometria do espaço aéreo do grupo 28 dias — Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina e gráfico correspondente. (A) Salina + Veículo; (B) Salina + Rosiglitazona; (C) Sílica + Veículo; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação de percentual de área ocupada pelo espaço aéreo. Barra de escala = 100µm. (p < 0,001; n = 6)**

5.6 QUANTIFICAÇÃO DE SÍLICA

A sílica é um material birrefringente e por isso suas partículas podem ser visualizadas com microscopia de polarização (FIGURA 23 A e C e FIGURA 24 A e C). Assim, é possível quantificá-las nos nódulos silicóticos, utilizando uma coloração computacional em amarelo demonstrada na figura 23 B e D e na figura 24 B e D.

Nossos resultados demonstram que houve uma diminuição significativa para o grupo 8 dias ($p < 0,01$) e para o grupo de 28 dias ($p < 0,05$) na quantidade de sílica livre (percentual de área ocupada pelas partículas de sílica) em pulmões dos animais tratados com rosiglitazona quando comparados com os animais tratados com veículo (FIGURA 23E e FIGURA 24E).

Para o grupo de 8 dias, os valores encontrados foram de $1,96 \pm 0,6\%$ para o grupo tratado com veículo e de $1,05 \pm 0,38\%$ para o grupo tratado com rosiglitazona.

Para o grupo de 28 dias, os valores encontrados foram de $2,25 \pm 0,67\%$ para o grupo tratado com veículo e de $1,16 \pm 0,4\%$ para o grupo tratado com rosiglitazona.

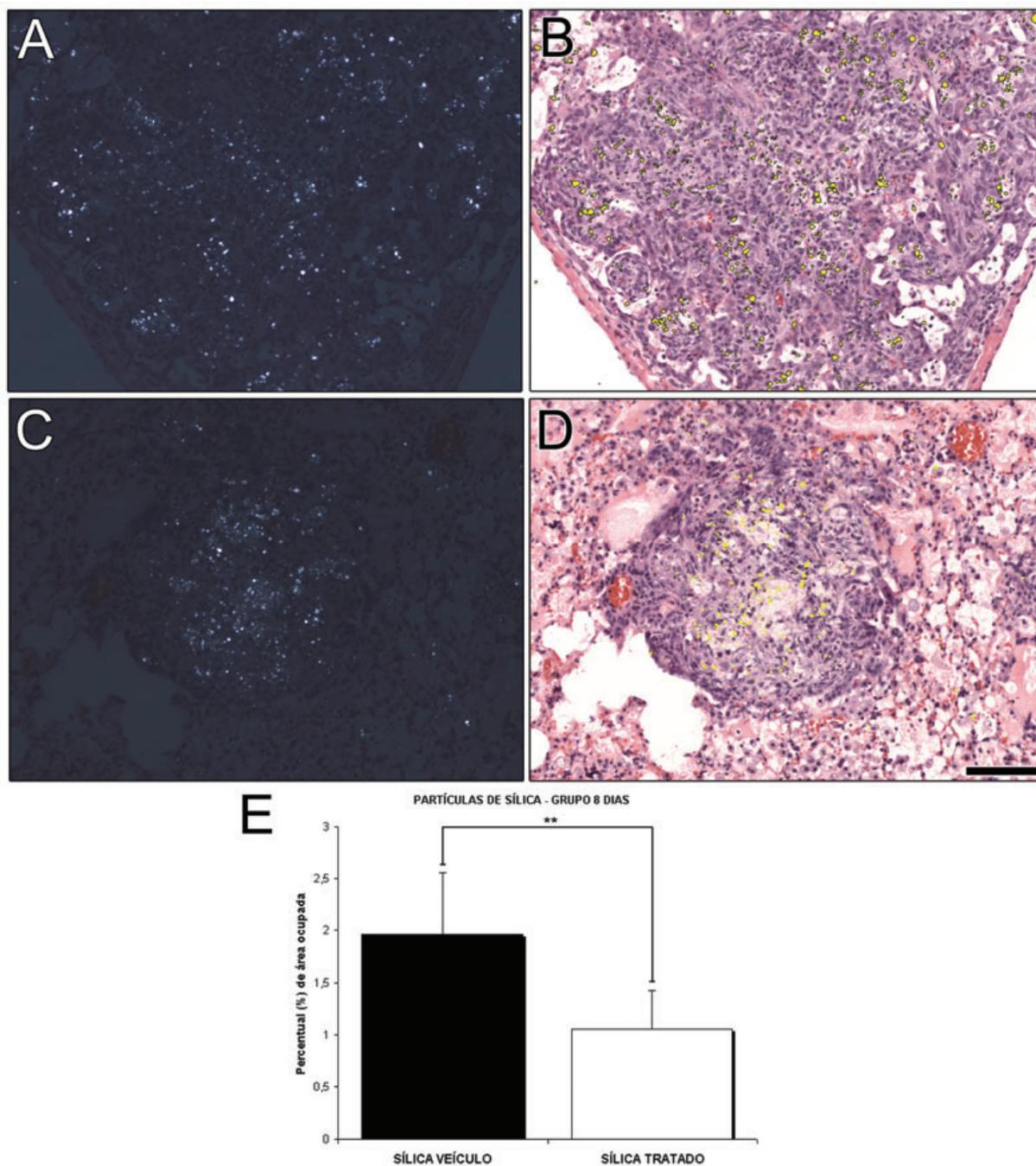


FIGURA 23: Quantificação de sílica do grupo 8 dias — Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina visualizados em microscopia de polarização e campo claro. Gráfico correspondente à quantificação. (A) Sílica + Veículo em microscopia de polarização; (B) Sílica + Veículo; (C) Sílica + Rosiglitazona em microscopia de polarização; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação do percentual de área ocupada por partículas de sílica. Barra de escala = 100µm. (p < 0,01; n = 6)**

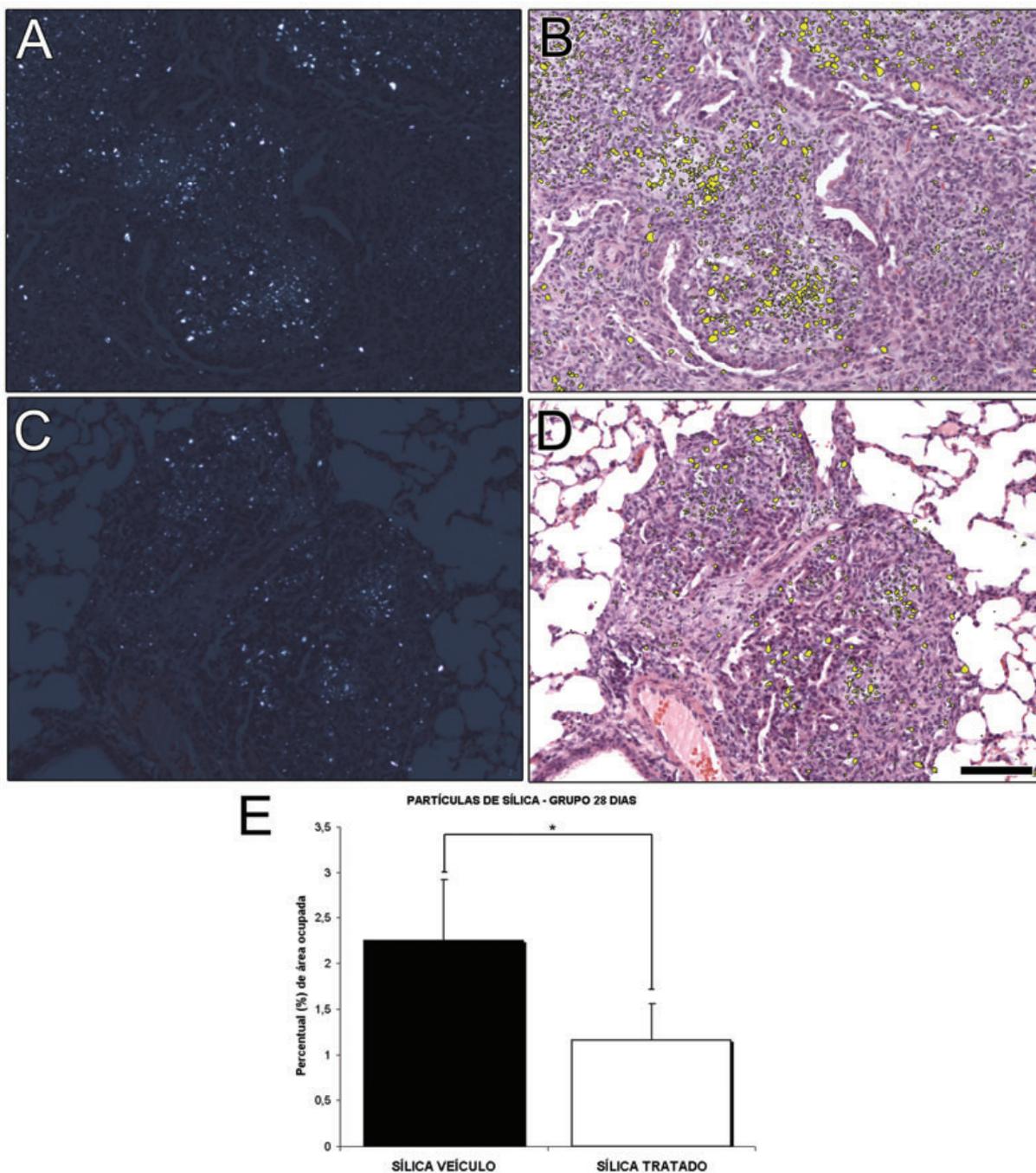


FIGURA 24: Quantificação de sílica do grupo 28 dias — Fotomicrografias de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina visualizados em microscopia de polarização e campo claro. Gráfico correspondente à quantificação. (A) Sílica + Veículo em microscopia de polarização; (B) Sílica + Veículo; (C) Sílica + Rosiglitazona em microscopia de polarização; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação do percentual de área ocupada por sílica livre. Barra de escala = 100 μ m. (* $p < 0,05$; $n = 6$)

5.7 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO

Com a utilização da técnica de picrossirius modificada para microscopia confocal (DOLBER & SPACH, 1993), quantificamos o volume ocupado pela trama de fibras colágenas dos pulmões dos animais silicóticos.

No grupo de 8 dias, os animais silicóticos tratados com veículo apresentaram maior percentual de volume ocupado por colágeno ($7,63 \pm 2,37\%$) do que os tratados com rosiglitazona ($3,8 \pm 1,96\%$) ($p < 0,05$) (FIGURA 25 E).

No grupo de 28 dias, os animais silicóticos tratados com veículo apresentaram maior percentual de volume ocupado por colágeno ($18,3 \pm 4\%$) do que os tratados com rosiglitazona ($9,23 \pm 2,45\%$) ($p < 0,001$) (FIGURA 26E).

Os resultados estão ilustrados nas imagens da figura 25 (A e C) e 26 (A e C), onde observamos projeções de todos os planos focais escaneados de um determinado campo e nas imagens da figura 25 (B e D) e 26 (B e D), onde observamos o código de profundidade por cor dos respectivos campos.

Desta forma, tanto no grupo de 8 dias quanto no grupo de 28 dias, há menor volume de fibrose ocupada pelo colágeno detectado pela coloração de picrossirius nos animais tratados com rosiglitazona do que nos tratados com veículo.

Quando comparamos os tempos, encontramos que os animais tratados com veículo de 28 dias apresentaram um percentual de volume ocupado por colágeno ($18,3 \pm 4\%$) maior ($p < 0,001$) do que os de 8 dias ($7,63 \pm 2,37\%$). Nos grupos dos animais tratados com rosiglitazona, foi verificado que os de 28 dias possuíam um percentual de volume ocupado por colágeno ($9,23 \pm 2,45\%$) maior ($p < 0,001$) do que os de 8 dias ($3,8 \pm 1,96\%$) (FIGURAS 25 C, D e E; 26 C, D e E).

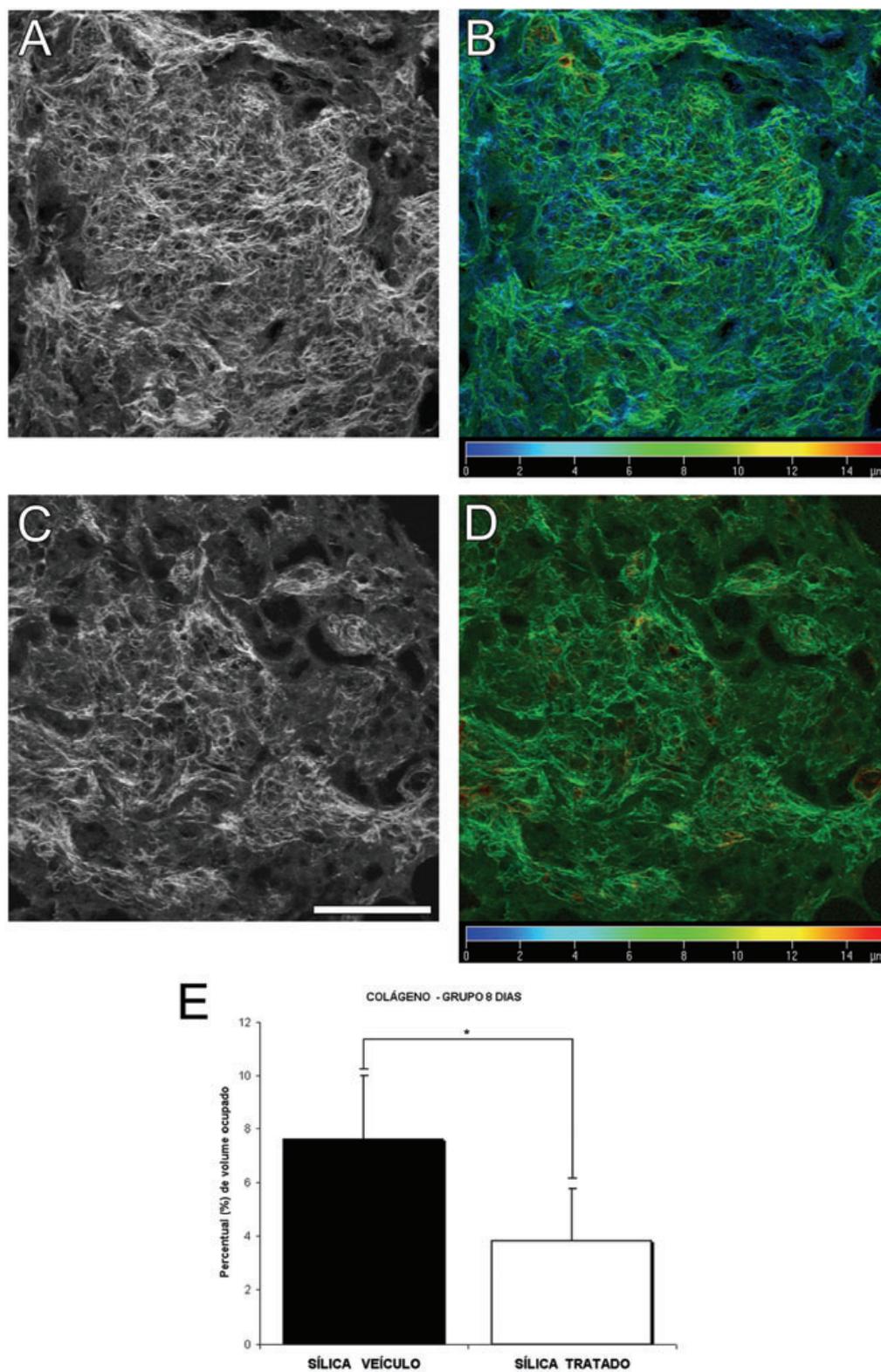


FIGURA 25: Análise e quantificação do colágeno nos pulmões dos animais do grupo 8 dias por coloração de picrosirius em microscopia confocal. (A) Sílica + Veículo, projeção de todos os planos focais de microscopia confocal; **(B)** Sílica + Veículo, código de profundidade por cor; **(C)** Sílica + Rosiglitazona, projeção de todos os planos focais de microscopia confocal; **(D)** Sílica + Rosiglitazona, código de profundidade por cor; **(E)** Gráfico da quantificação do percentual de volume ocupado por colágeno. Barra de escala = 100 μ m. (* $p < 0,05$; $n = 6$)

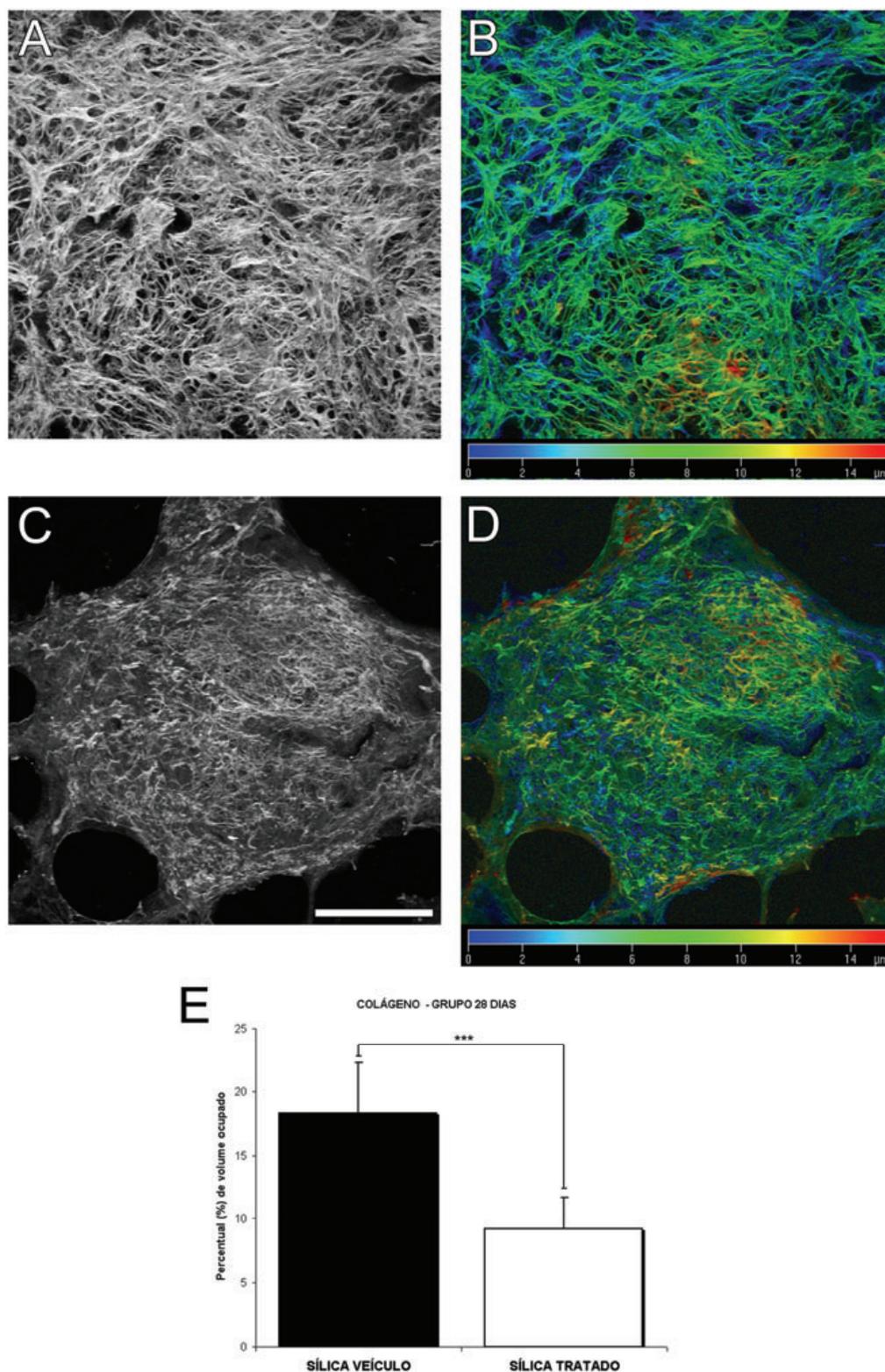


FIGURA 26: Análise e quantificação do colágeno nos pulmões dos animais do grupo 28 dias por coloração de picrosirius em microscopia confocal. (A) Sílica + Veículo, projeção de todos os planos focais de microscopia confocal; **(B)** Sílica + Veículo, código de profundidade por cor; **(C)** Sílica + Rosiglitazona, projeção de todos os planos focais de microscopia confocal; **(D)** Sílica + Rosiglitazona, código de profundidade por cor; **(E)** Gráfico da quantificação do percentual de volume ocupado por colágeno. Barra de escala = 100µm. (***)p < 0,001; n = 6

5.8 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE FIBRAS ELÁSTICAS

Para uma análise detalhada da trama de fibras do sistema elástico, empregamos a técnica de coloração pela orceína com tratamento prévio de oxidação com oxona (COTTA-PEREIRA, RODRIGO & BITTENCOURT-SAMPAIO, 1976). Através da análise quantitativa dos campos fotografados, chegamos a um resultado percentual de área total ocupada pela reatividade ao corante.

Nos animais instilados com salina e tratados tanto com veículo (goma) quanto com rosiglitazona nos grupos de 8 dias e de 28 dias, não houve diferença entre o percentual de área ocupada pelas fibras do sistema elástico ($p > 0,05$). Os valores desse percentual foram de $5,9 \pm 0,27\%$ para o grupo SALINA VEÍCULO 8 dias; de $6,03\% \pm 0,47\%$ para o grupo SALINA TRATADO 8 dias; de $5,78 \pm 0,39\%$ para o grupo SALINA VEÍCULO 28 dias; e de $5,89 \pm 0,35\%$ para o grupo SALINA TRATADO 28 dias (FIGURA 27 A, B e E e FIGURA 28 A, B e E).

No grupo de 8 dias, os animais silicóticos tratados com rosiglitazona apresentaram maior ($p < 0,001$) percentual de área ocupada por fibras do sistema elástico ($2,5 \pm 0,24\%$) do que os tratados com veículo ($1,1 \pm 0,17\%$) (FIGURA 27 C, D e E). Também no grupo de 28 dias, os animais silicóticos tratados com rosiglitazona apresentaram maior ($p < 0,001$) percentual de área ocupada por fibras elásticas e oxitalânicas ($1,21 \pm 0,1\%$) do que os tratados com veículo ($0,54 \pm 0,2\%$) (FIGURA 28 C, D e E). Assim, nos tempos de 8 dias quanto de 28 dias, há maior percentual de área ocupada pelo sistema elástico (fibras elásticas e oxitalânicas) nos animais tratados com rosiglitazona do que com veículo.

Contraopondo os tempos, os animais silicóticos tratados com rosiglitazona de 28 dias apresentaram um valor percentual ($1,21 \pm 0,1\%$) menor ($p < 0,001$) do que os de 8 dias ($2,5 \pm 0,24\%$) (FIGURAS 27 D e E; 28 D e E).

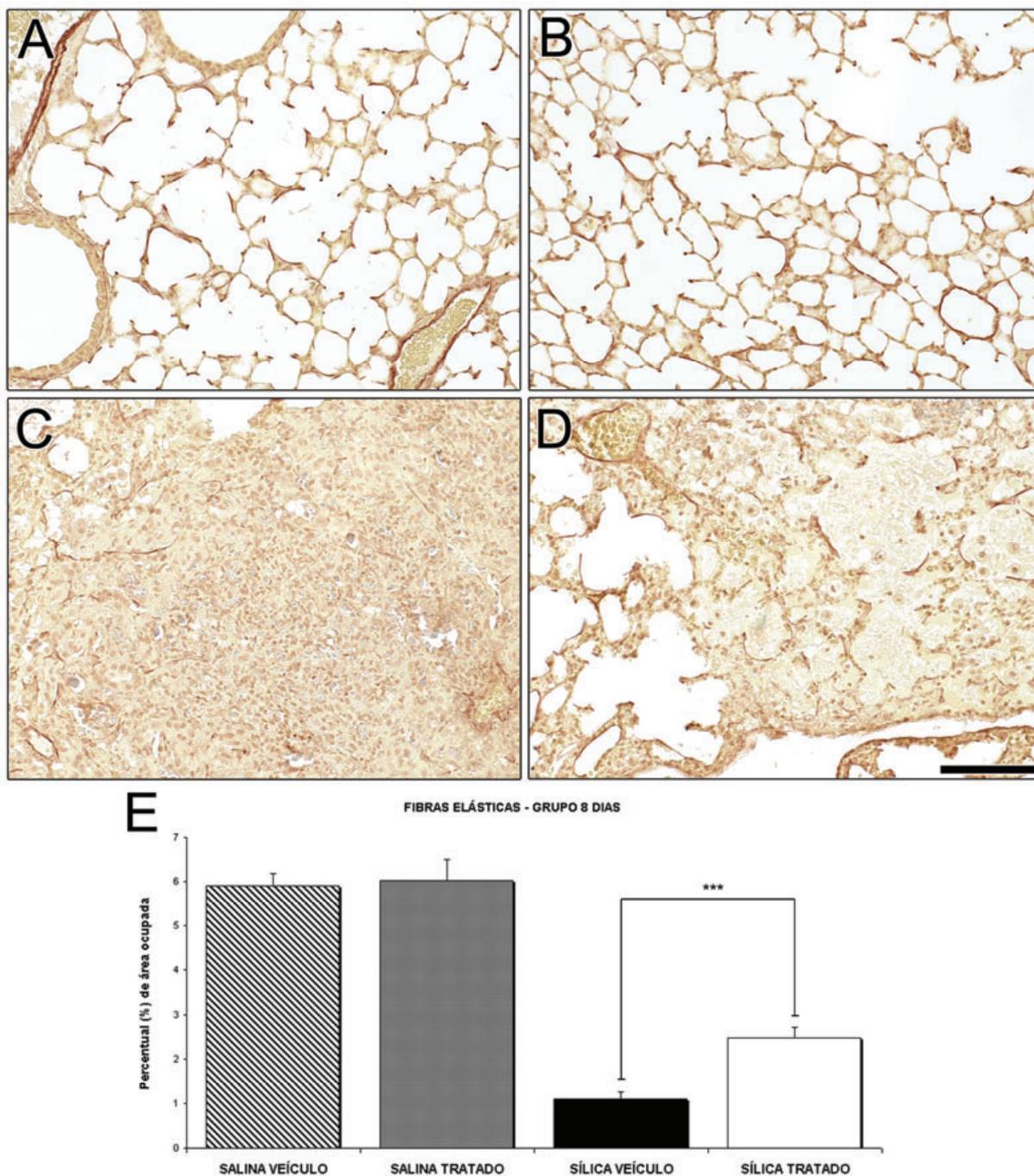


FIGURA 27: Análise e quantificação das fibras elásticas nos pulmões dos animais do grupo 8 dias por coloração de orceína oxidada em microscopia de campo claro. (A) Salina + Veículo; (B) Salina + Rosiglitazona; (C) Sílica + Veículo; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação de percentual de área ocupada por fibras do sistema elástico. Barra de escala = 100µm. (**p < 0,001; n = 6)

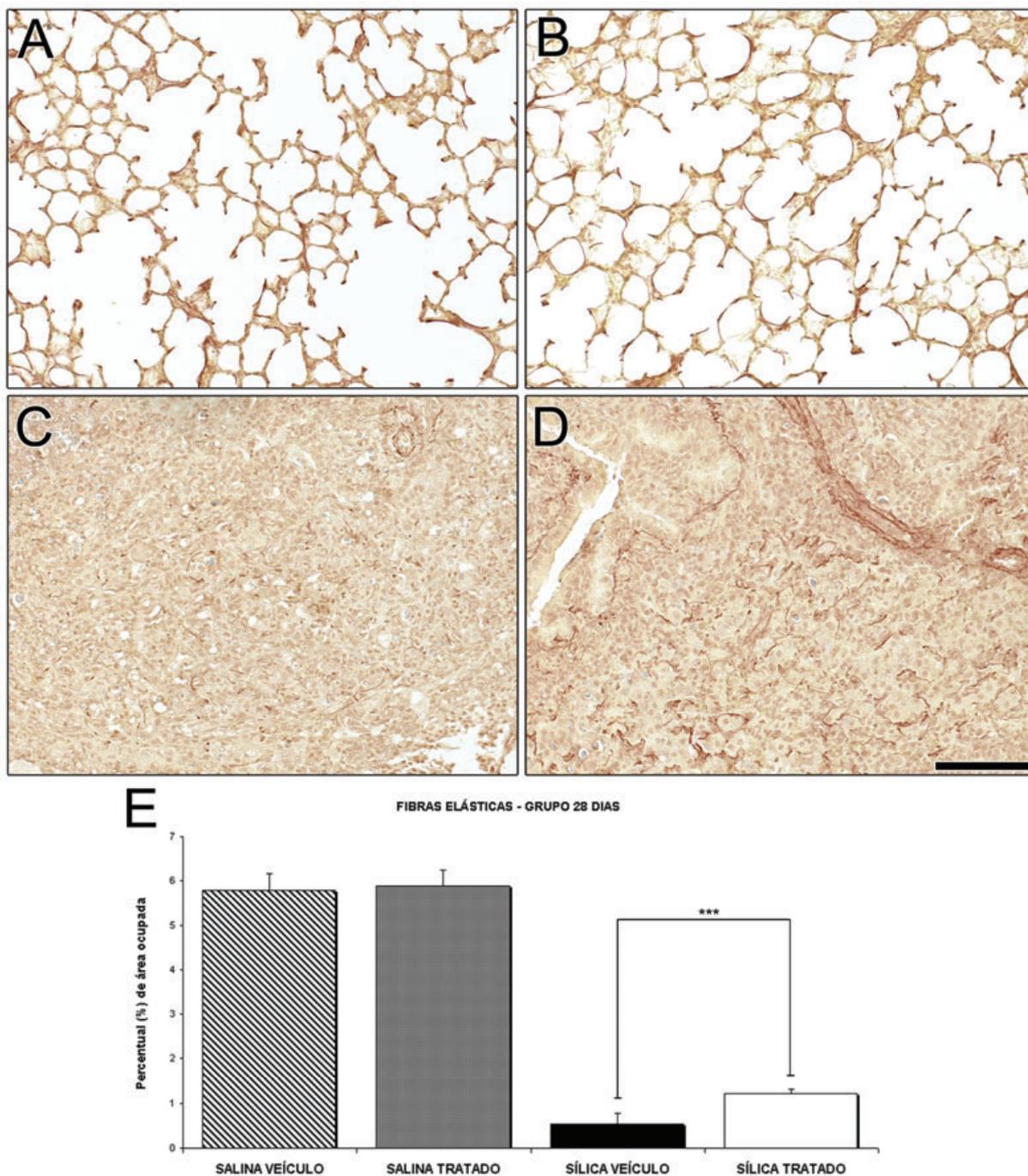


FIGURA 28: Análise e quantificação das fibras elásticas nos pulmões dos animais do grupo 28 dias por coloração de orceína oxidada em microscopia de campo claro. (A) Salina + Veículo; (B) Salina + Rosiglitazona; (C) Sílica + Veículo; (D) Sílica + Rosiglitazona; (E) Gráfico da quantificação de percentual de área ocupada por fibras elásticas e oxitalânicas. Barra de escala = 100µm. (**p < 0,001; n = 6)

5.9 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE F4/80

Com o objetivo de estudar e quantificar a população macrofágica em nosso modelo experimental, utilizamos o anticorpo anti-F4/80 dirigido contra uma glicoproteína presente na superfície de macrófagos murinos.

No grupo de 8 dias, os animais tratados com veículo apresentaram um número maior de células positivas por milímetro quadrado ($1222,78 \pm 352,374$ células/mm²) do que os tratados com rosiglitazona ($385,37 \pm 130,53$ células/mm²); diferença esta estatisticamente significativa ($p < 0,01$) (FIGURA 29 A, B e E).

No grupo de 28 dias, a diferença entre os animais tratados com veículo e os tratados com rosiglitazona também foi diferente de forma estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Para os animais instilados com sílica e tratados com veículo, o valor encontrado foi de $1285,55 \pm 474,85$ células/mm² e para os tratados com rosiglitazona, o valor foi de $700,38 \pm 86,99$ células/mm² (FIGURA 29 C, D e E).

Contraoando os ponto de tempos estudados, os animais tratados com rosiglitazona de 28 dias apresentaram maior ($p < 0,01$) número células positivas por milímetro quadrado ($700,38 \pm 86,99$ células/mm²) do que os de 8 dias ($385,37 \pm 130,53$ células/mm²) (FIGURA 29 B, D e E).

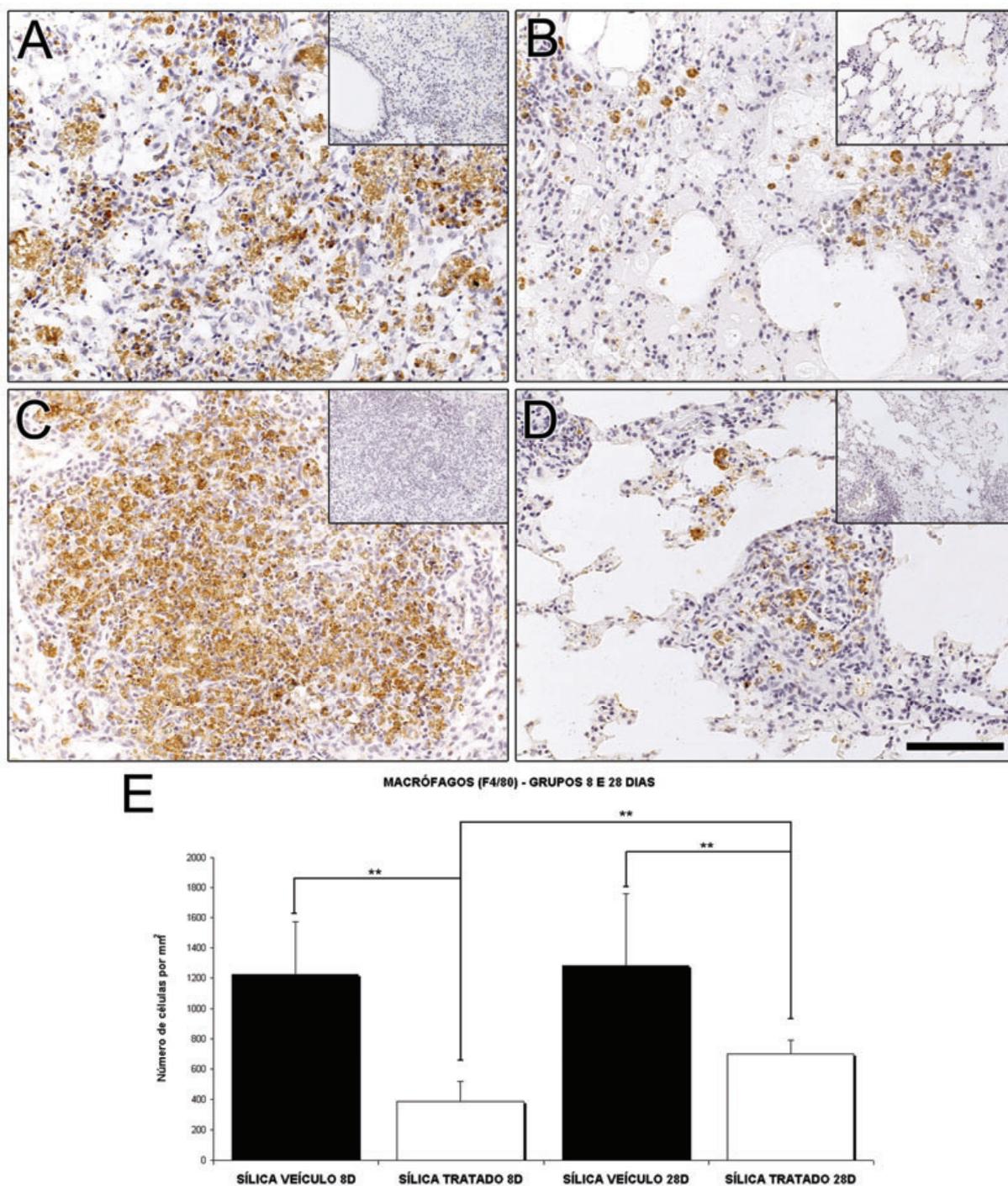


FIGURA 29: Análise e quantificação do marcador de macrófago F4/80 em microscopia de campo claro. (A) Sílica + Veículo 8 dias; **(B)** Sílica + Rosiglitazona 8 dias; **(C)** Sílica + Veículo 28 dias; **(D)** Sílica + Rosiglitazona 28 dias; **(E)** Gráfico da quantificação de células positivas para o marcador F4/80 por milímetro quadrado. Fotos pequenas em A, B, C e D representam os controles negativos da técnica sem a incubação do anticorpo primário. Barra de escala = 100 μ m. Barra de escala para os controles = 300 μ m. (**p < 0,01; n = 6)

5.10 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO PARA A LECTINA BSL I

A histoquímica para a lectina BSL I demonstrou que os pulmões de animais silicóticos de 8 e 28 dias tratados com veículo apresentaram maior número de macrófagos ativados, marcados positivamente, por milímetro quadrado do que os tratados com rosiglitazona ($p < 0,001$) (FIGURA 30 A, B, C, D e E).

Os valores encontrados foram: para o grupo Sílica + Veículo 8 dias, $378,44 \pm 60,53$ células positivas por milímetro quadrado; para o grupo Sílica + Rosiglitazona 8 dias, $118,99 \pm 23,78$ células positivas por milímetro quadrado; para o grupo Sílica + Veículo 28 dias, $433,82 \pm 81,03$ células positivas por milímetro quadrado e para o grupo Sílica + Rosiglitazona 28 dias, $267,46 \pm 85,52$ células positivas por milímetro quadrado (FIGURA 30 A, B, C, D e E).

Na análise comparativa dos pontos de tempo estudados, os animais tratados com rosiglitazona de 28 dias apresentaram maior ($p < 0,01$) número células positivas por milímetro quadrado ($433,82 \pm 81,03$ células/mm²) do que os de 8 dias ($118,99 \pm 23,78 \pm 85,52$ células/mm²) (FIGURA 30 B, D e E).

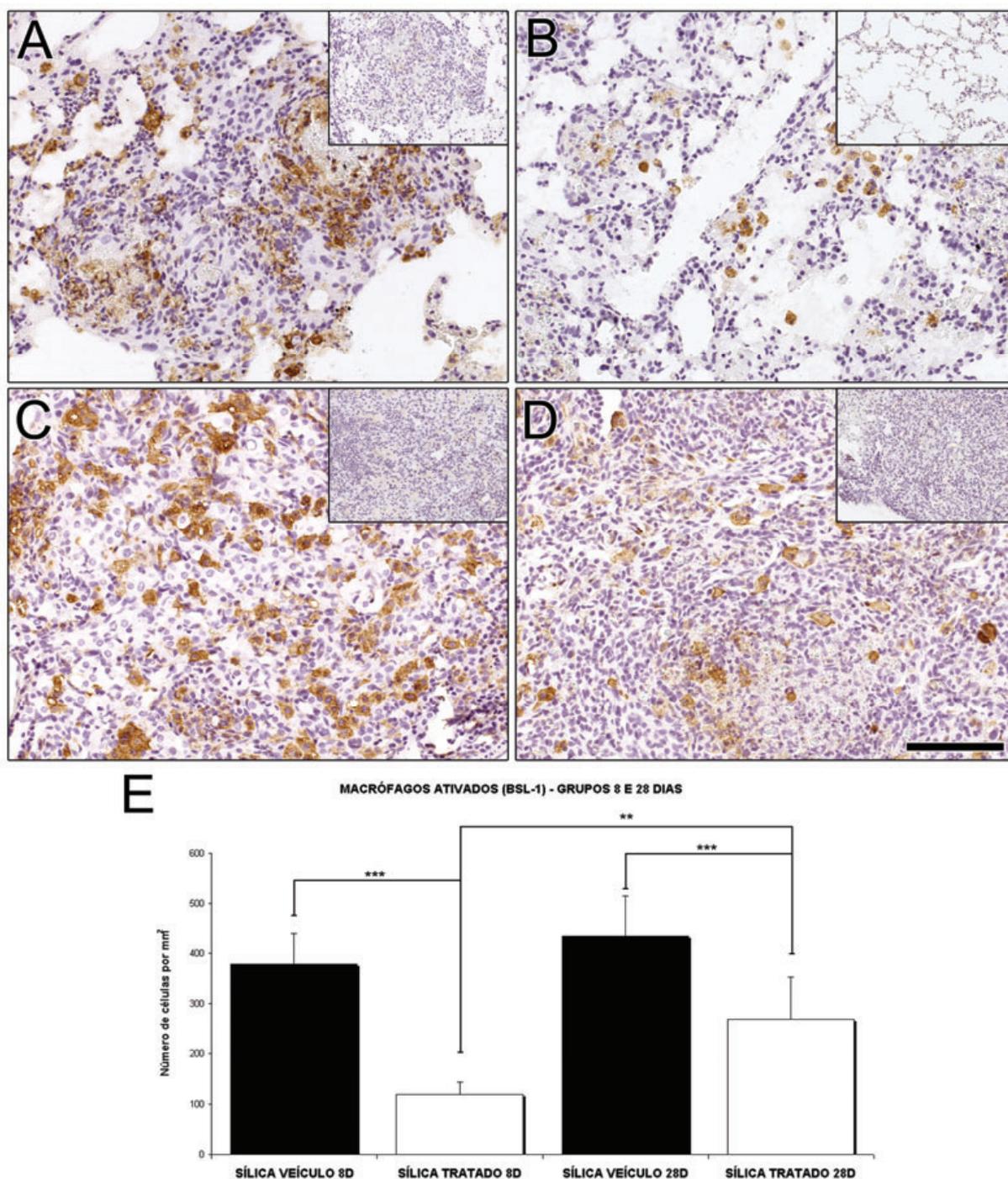


FIGURA 30: Análise e quantificação de células positivas para a lectina BSL I em microscopia de campo claro. (A) Sílica + Veículo 8 dias; (B) Sílica + Rosiglitazona 8 dias; (C) Sílica + Veículo 28 dias; (D) Sílica + Rosiglitazona 28 dias; (E) Gráfico da quantificação de células positivas para a lectina BSL I por milímetro quadrado. Fotos pequenas em A, B, C e D representam os controles negativos da técnica sem a incubação da lectina. Barra de escala = 100µm. Barra de escala para os controles = 300µm. (p < 0,01; ***p < 0,001; n = 6)**

5.11 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE TGF- β

Para analisarmos a imunexpressão da citocina TGF- β presente nos pulmões dos animais de nosso estudo foi realizada técnica de imunohistoquímica com o anticorpo anti- pan TGF- β .

Nos pulmões dos animais instilados com sílica e tratados com veículo no grupo de 8 dias, a imunomarcação ocupou $9,5 \pm 2,51\%$ da área tecidual total, enquanto que nos tratados com rosiglitazona ocupou $1,81 \pm 1,62\%$. Houve diferença estatisticamente significativa entre esses valores ($p < 0,001$) (FIGURA 31 A, B e E).

No grupo de 28 dias, os pulmões dos animais silicóticos tratados com veículo também apresentaram maior ($p < 0,001$) percentual de área marcada ($12,6 \pm 1,65\%$) do que os tratados com veículo ($2,26 \pm 0,79\%$) (FIGURA 31 C, D e E).

Contraopondo os pontos de tempo estudados, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os valores obtidos para os animais tratados com rosiglitazona de 28 dias ($2,26 \pm 0,79\%$) e de 8 dias ($1,81 \pm 1,62\%$) (FIGURA 31 B, D e E).

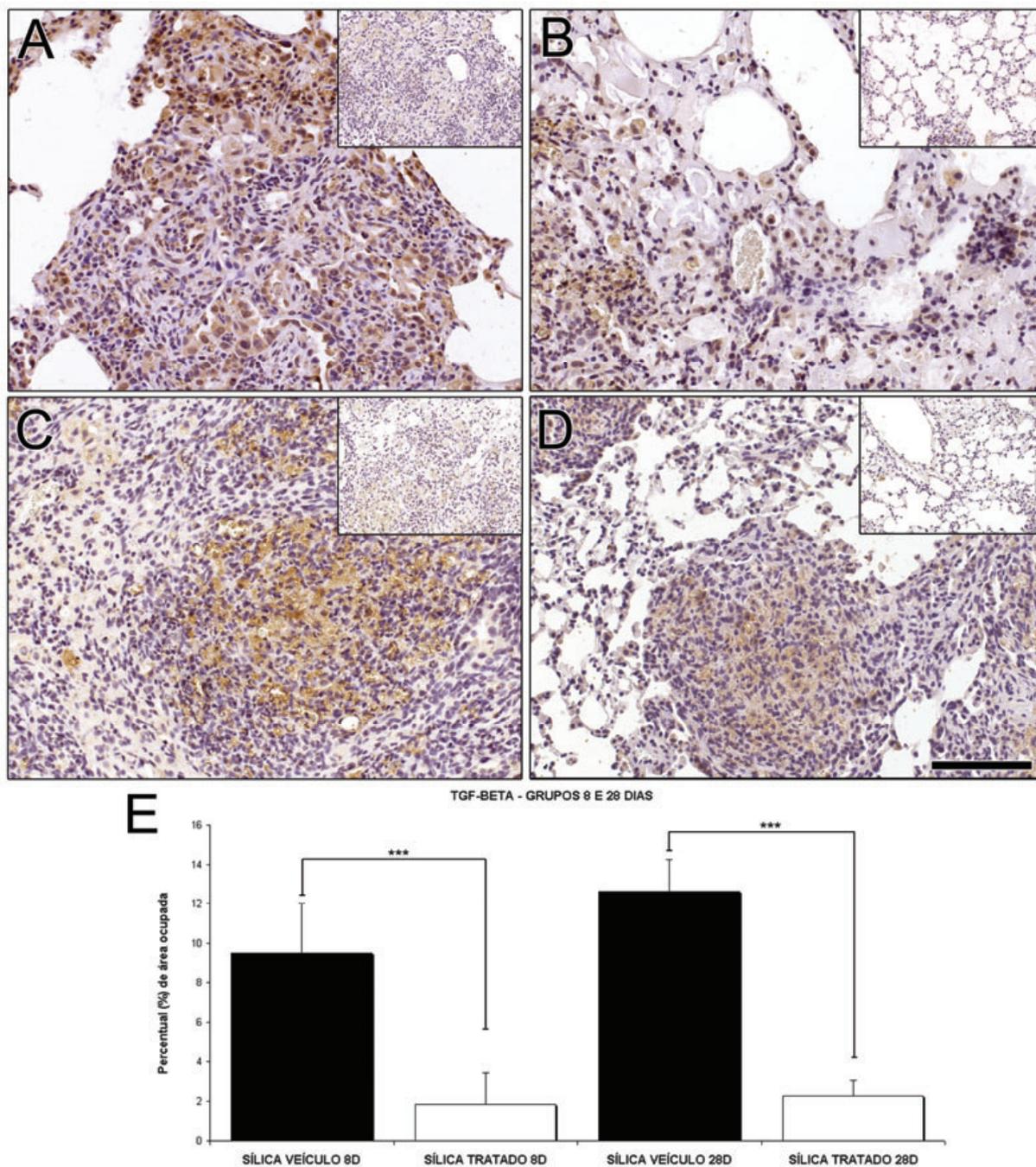


FIGURA 31: Análise e quantificação do percentual de área marcada para TGF- β em microscopia de campo claro. (A) Sílica + Veículo 8 dias; (B) Sílica + Rosiglitazona 8 dias; (C) Sílica + Veículo 28 dias; (D) Sílica + Rosiglitazona 28 dias; (E) Gráfico da quantificação do percentual de área marcada para TGF- β . Fotos pequenas em A, B, C e D representam os controles negativos da técnica sem a incubação do anticorpo primário. Barra de escala = 100 μ m. Barra de escala para os controles = 300 μ m. (p < 0,001; n = 6)**

5.12 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE iNOS

A imunohistoquímica para a sintase do óxido nítrico induzível demonstrou reatividade citoplasmática tanto em células inflamatórias quanto em células epiteliais brônquicas (FIGURA 32 A). Em relação a sua quantificação, obtivemos os seguintes resultados:

No grupo de 8 dias, os animais tratados com veículo apresentaram maior ($p < 0,001$) percentual de área marcada ($8,00 \pm 1,63\%$) do que os tratados com rosiglitazona ($3,22 \pm 2,09\%$) (FIGURA 32 A, B e E).

Quadro semelhante foi encontrado no grupo de 28 dias: nos animais tratados com veículo o percentual de área marcada foi de $11,2 \pm 4,73\%$, enquanto nos tratados com rosiglitazona este valor foi de $3,26 \pm 1,78\%$ (FIGURA 32 C, D e E). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

Assim, em ambos os grupos, quando os animais eram tratados com rosiglitazona, houve diminuição ($p < 0,001$) do percentual de área marcada para iNOS.

Na análise comparativa dos pontos de tempos estudados, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os valores obtidos para os animais tratados com rosiglitazona de 28 dias ($3,26 \pm 1,78\%$) e de 8 dias ($3,22 \pm 2,09\%$) (FIGURA 32 B, D e E).

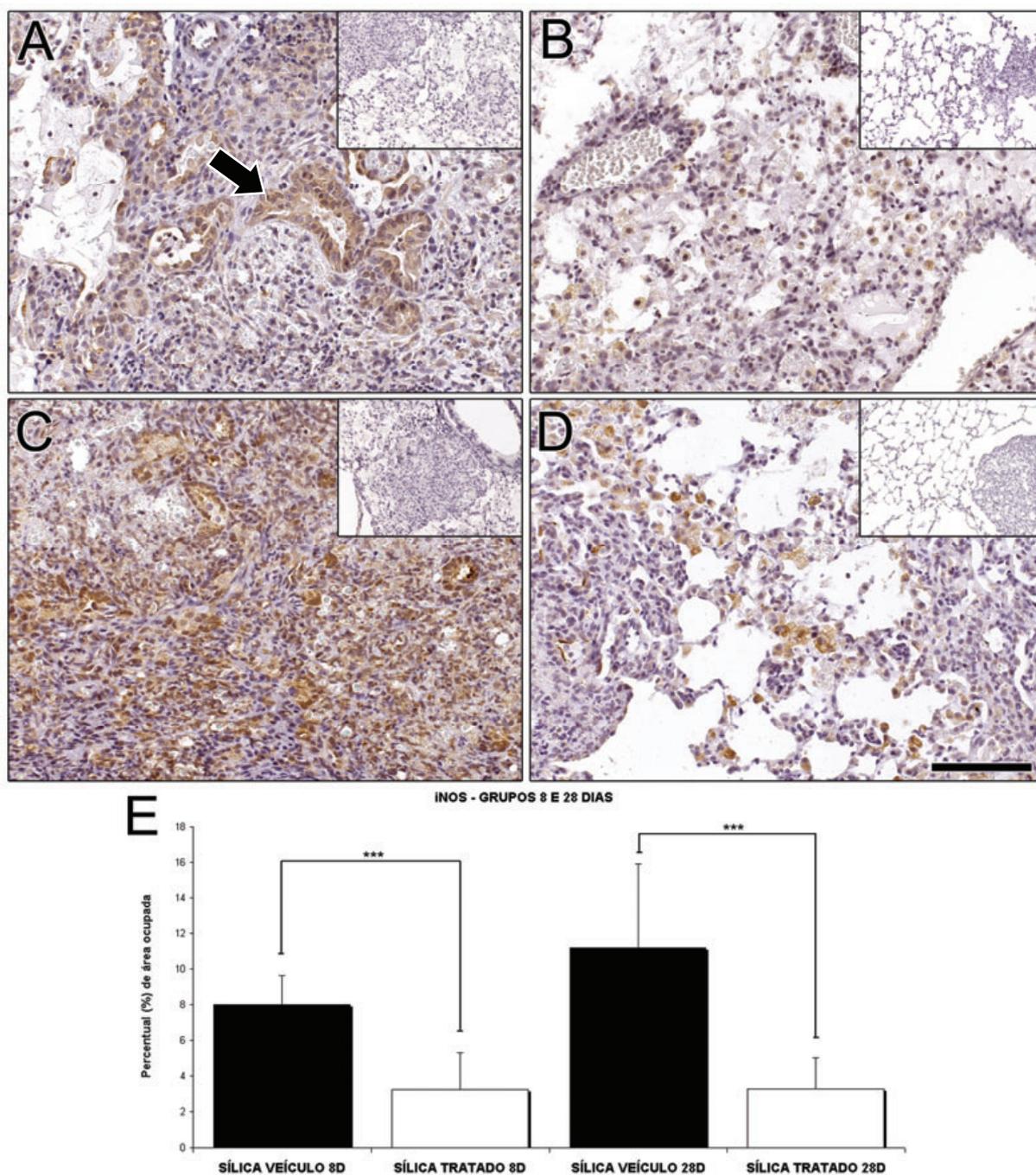


FIGURA 32: Análise e quantificação do percentual de área marcada para iNOS em microscopia de campo claro. (A) Sílica + Veículo 8 dias, seta indicando células epiteliais brônquicas positivas; **(B)** Sílica + Rosiglitazona 8 dias; **(C)** Sílica + Veículo 28 dias; **(D)** Sílica + Rosiglitazona 28 dias; **(E)** Gráfico da quantificação do percentual de área marcada para iNOS. Fotos pequenas em A, B, C e D representam os controles negativos da técnica sem a incubação do anticorpo primário. Barra de escala = 100µm. Barra de escala para os controles = 300µm. (***) $p < 0,001$; $n = 6$)

5.13 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

Para detectar e quantificar as células apoptóticas, utilizamos a técnica de TUNEL, que identifica DNA fragmentado. Os resultados encontrados demonstraram que no grupo de 8 dias, os animais tratados com veículo apresentaram maior ($p < 0,001$) número de células apoptóticas por mm^2 ($132,17 \pm 16,9$) do que os tratados com rosiglitazona ($49,74 \pm 13,15$) (FIGURA 33 A, B e E).

No grupo de 28 dias, os animais tratados com veículo também apresentaram maior ($p < 0,001$) número de células apoptóticas por mm^2 ($155,97 \pm 37,49$) do que os tratados com rosiglitazona ($39,79 \pm 13,9$) (FIGURA 33 C, D e E).

Ao compararmos os pontos de tempo estudados, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre o número de células apoptóticas por mm^2 observado nos animais tratados com rosiglitazona de 28 dias ($49,74 \pm 13,15$) e o observado nos animais tratados com rosiglitazona de 8 dias ($39,79 \pm 13,9$) (FIGURA 33 B, D e E).

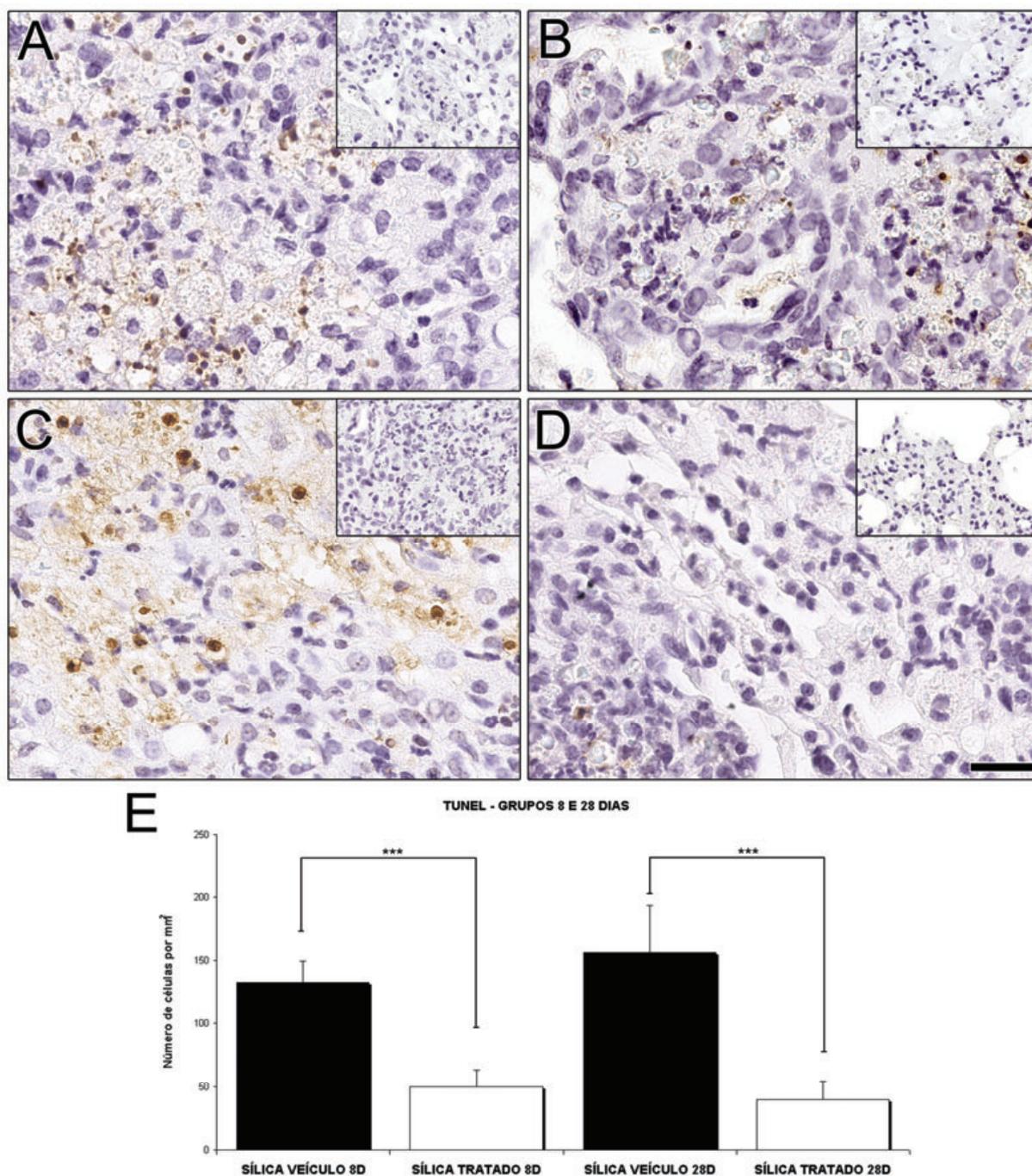


FIGURA 33: Análise e quantificação de células apoptóticas marcadas por TUNEL em microscopia de campo claro. (A) Sílica + Veículo 8 dias; (B) Sílica + Rosiglitazona 8 dias; (C) Sílica + Veículo 28 dias; (D) Sílica + Rosiglitazona 28 dias; (E) Gráfico da quantificação do número de células apoptóticas positivas para o TUNEL por mm². Fotos pequenas em A, B, C e D representam os controles negativos da técnica sem a incubação da enzima TdT. Barra de escala = 20µm. Barra de escala para os controles = 60µm. (*)p < 0,001; n = 6)**

6 DISCUSSÃO

A silicose é uma doença pulmonar induzida pela inalação de partículas de sílica e caracterizada principalmente pela presença de fibrose (GRRENBORG, WAKSMAN & CURTIS, 2007; RIMAL, GREENBERG & ROM, 2005). Em algumas doenças pulmonares, os tratamentos com TZDs e com outros agonistas do receptor nuclear PPAR γ foram descritos como anti-inflamatórios com redução no quadro de fibrose na lesão pulmonar por bleomicina (GENOVESE et al., 2005; MILAM et al., 2008) e supressão da inflamação em estudos de lesões pulmonares por LPS, por isotiocianato de fluoresceína ou na pleurisia por carragenana (CUZZOCREA et al., 2004; INOUE et al., 2003; PAOLA & CUZZOCREA, 2007; STANDIFORD, KESAMOUNI & REDDY, 2005).

Nesse contexto, o presente trabalho visou o estudo do papel do receptor PPAR γ no processo patológico da silicose através de um modelo experimental com instilação intratraqueal única de 20 mg de partículas de sílica. Este modelo de indução de silicose é compatível com outros trabalhos já realizados e seu estudo tem trazido enorme contribuição para o entendimento da fisiopatologia desta doença (BORGES et al., 2001; BORGES et al., 2002; DAVIS, PFEIFFER & HENEWAY, 1999).

Para verificarmos qual seria o efeito da ativação do PPAR γ , usamos o tratamento por gavagem com rosiglitazona na dose de 10mg/kg de peso corporal, dose esta de acordo com trabalhos onde a mesma apresentou efeitos anti-inflamatórios (CUZZOCREA et al., 2004; LEE et al., 2006; NISBET, STULIFF & HART, 2007).

Almejando avaliar se havia expressão de PPAR γ em células dos pulmões dos animais de nosso estudo e quais seriam essas células com potencial de responder à rosiglitazona, agonista desse receptor, analisamos a imunexpressão de PPAR γ por imunohistoquímica (FIGURA 10 A e B).

Nossos resultados demonstraram que nos pulmões dos animais silicóticos tratados com rosiglitazona havia células imunorreativas para PPAR γ tanto 8 quanto 28 dias após a instilação da sílica. Assim, respondendo nossa primeira pergunta, demonstramos que em nosso modelo experimental as células do epitélio brônquico, macrófagos alveolares e intersticiais e células fibroblastóides são potencialmente capazes de ter esse receptor ativado pelo tratamento com rosiglitazona, o que valida

nossa análise sobre a influência desta ativação no desenvolvimento do processo patológico da silicose. Estes achados são condizentes com dados da literatura que demonstram a presença de PPAR γ nestes três tipos celulares em pulmões de camundongos durante o desenvolvimento embrionário ou em processos inflamatórios (BENAYOUN et al., 2001; HONDA et al. 2004; RICOTE, et al. 1998; SIMON et al., 2006; WANG et al., 2001).

Tendo verificado que em nosso modelo encontramos a presença de potenciais células-alvo do tratamento com a rosiglitazona, demos continuidade ao estudo comparando parâmetros de avaliação da inflamação e/ou da fibrose nos pulmões dos animais tratados com veículo e com rosiglitazona.

Na avaliação da variação do peso corporal, não observamos diferenças no tempo de 8 dias entre os animais silicóticos e não silicóticos, tratados ou não tratados com rosiglitazona. Em concordância com o trabalho de Borges et al.(2001) que demonstrou perda de peso em tempos acima de 15 dias após a instilação intratraqueal de sílica, os animais silicóticos somente apresentaram perda de peso quando comparados aos não silicóticos no tempo de 28 dias.

Contudo, mesmo em 28 dias, não houve diferença entre tratados e não tratados com rosiglitazona. Desta forma, poderíamos induzir um raciocínio de que a ativação de PPAR γ por rosiglitazona não estaria fazendo efeito na evolução da fisiopatologia da silicose, uma vez que o tratamento com a rosiglitazona não foi capaz de inibir a perda de peso dos animais silicóticos em 28 dias. Vale ressaltar, no entanto, que nossos outros resultados evidenciam uma atenuação do desenvolvimento da silicose mediante o tratamento com rosiglitazona. Portanto, a ausência de alteração de perda de peso corporal pode estar relacionada a outros fatores que não o desenvolvimento da doença, em especial a atividade do PPAR γ envolvendo regulação de vias do metabolismo de lipídios e da tolerância periférica a insulina, conforme outrora demonstrado em modelos de camundongos obesos (DESVERGENE & WAHLI, 1999; MOLLAH et al., 2008).

Além disto, há trabalhos com outras cepas de camundongos, como a C3H/HeN, que demonstram não haver perda de peso corporal em animais silicóticos após 2 e 16 semanas de exposição à sílica em aerossol (DAVIS; PFEIFFER & HEMENWAY, 1999).

A observação dos cortes histológicos dos animais instilados com salina em qualquer um dos tempos estudados demonstrou que o método de instilação utilizado não provocava por si só, na ausência de partículas de sílica, uma agressão pulmonar; o que era esperado tendo em vista os resultados obtidos em outros ensaios já realizados por nosso grupo (LIMA, 2003; REIS, 2004; VENTURA, 2007) e também por outros trabalhos a exemplo dos realizados por Borges et al.(2001), Borges et al.(2002) e Davis, Pfeiffer & Heneway (1999).

A observação histológica dos pulmões silicóticos dos animais tratados com veículo no tempo de 8 e 28 dias apresentou resultados semelhantes aos descritos na literatura (CASTRANOVA & VALLYATHAN, 2000; DING et al., 2002; KATZESTEIN & ASKIN, 1982; TERRA FILHO & SANTOS, 2006). Estes dados demonstraram que os animais tratados com o veículo poderiam ser usados como grupo controle experimental, uma vez que a administração do veículo não interferiu no desenvolvimento da silicose.

Nos animais tratados com rosiglitazona, tanto no tempo de 8 quanto no de 28 dias, notamos um menor grau de inflamação do que nos animais tratados apenas com o veículo. Identificamos pequenos nódulos peribrônquicos, pouco espessamento fibroso de septos alveolares, alveolite menos pronunciada e raros tampões exsudativo-fibróticos em luz de brônquios. Esta diminuição da inflamação observada em nosso trabalho condiz com dados já descritos em outros estudos que demonstram a ação anti-inflamatória da rosiglitazona (BECKER et al., 2006; STANDIFORD, KESHAMOUNI & REDDY, 2005).

Ao realizarmos as análises histomorfométricas nos pulmões dos animais tratados de 8 e 28 dias, a celularidade apresentou-se menor se comparada aos animais onde só foi utilizado o veículo e, quando comparados os de 28 dias tratados com os de 8 dias tratados, a celularidade apresentou-se maior nos primeiros. Esta diferença possivelmente se deve ao fato de que o tratamento no grupo de 28 dias se iniciou 21 dias após a instilação e no de 8 dias, 1 dia apenas.

Assim, inferimos que o tratamento não foi capaz de levar à regressão do quadro inflamatório, mas sim impedir seu progresso com a inibição do recrutamento de novas células inflamatórias durante o período em que a droga foi administrada. Nossos dados com relação à celularidade estão em concordância com o trabalho de Angeli et al. (2003) que demonstraram a inibição da migração de células

inflamatórias pela ação do PPAR γ e também com a descrição de Pasceri et al. (2000) onde foi demonstrado que as TZDs levam a uma diminuição da expressão de moléculas de adesão como VCAM e ICAM em células endoteliais.

A preservação do espaço aéreo é importante para a troca gasosa nos pulmões e sua diminuição/colapso é um fator relevante em doenças pulmonares fibróticas e em desordens do desenvolvimento pulmonar (SIMON et al., 2006). Nosso trabalho mostra que o tratamento com rosiglitazona foi capaz de inibir o processo de perda de espaço aéreo nos animais silicóticos com 8 dias e 28 dias, preservando portanto a área de troca gasosa e podendo ser utilizado também para ratificar a diminuição da inflamação .

Classicamente é descrito o *clearance* do material particulado inalado dos pulmões, através da ação de macrófagos capazes de fagocitar as partículas, translocando-as para o interstício septal e posteriormente para os linfonodos drenantes assim como devido à atividade muco-ciliar (DAVIS, 1986; GREENBERG, WAKSMAN & CURTIS, 2007; RIMAL, GREENBERG & ROM, 2005). Neste sentido, alguns autores demonstraram que este *clearance* de sílica pode estar envolvido com o receptor *Scavenger* de classe A do tipo I/II (CD204) e/ou do tipo MARCO (BEAMER & HOLIAN, 2005, HAMILTON et al., 2006). Aqui, demonstramos que a área ocupada por sílica livre nos cortes histológicos observados em microscopia de polarização diminuiu nos grupos tratados com rosiglitazona em 8 e 28 dias.

Desta forma, em nosso modelo, a diminuição de área ocupada por sílica parece ser devida, pelo menos em parte, a um aumento do *clearance* de sílica e está em concordância com o trabalho de Thakur et al.(2009) onde é demonstrado que a diminuição do *clearance* de sílica por conta da ausência do receptor MARCO leva a um aumento significativo da inflamação na silicose, por meio de resposta imune inata exacerbada. Por outro lado, nossos dados a respeito da diminuição do número de células positivas para a lectina BSL I, portanto, de macrófagos ativados, poderiam nos levar a pensar numa diminuição da fagocitose por essas células. Esta aparente contradição deve ser mais bem estudada, tentando-se entender melhor a correlação da marcação de BSL I com a atividade fagocítica de macrófagos.

Ao avaliarmos a fibrose por microscopia confocal de forma semelhante a Taylor et al. (2002) em um estudo sobre o modelo de lesão pulmonar induzida por bleomicina, encontramos uma deposição menor de fibras da trama colagênica nos

animais tratados com rosiglitazona quando comparados com os tratados apenas com o veículo, nos tempos de 8 e 28 dias.

Vale salientar que nossos dados obtidos ao compararmos os animais tratados com rosiglitazona de 8 dias com os de 28 dias nos levam a inferir que a rosiglitazona foi capaz de reduzir a deposição de colágeno durante o período do tratamento, mas não de reverter o quadro de fibrose já instalado, uma vez que o percentual de volume ocupado pelas fibras de colágeno foi maior nos animais silicóticos tratados com rosiglitazona de 28 dias do que no mesmo grupo de 8 dias.

Em um trabalho sobre o papel das citocinas pró- e anti-inflamatórias na silicose, Barbarin et al. (2005) verificaram que o tratamento com pioglitazona em ratos foi capaz de inibir o progresso da fibrose em ratos silicóticos, mas não observaram o mesmo em camundongos NMRI, o que é discordante de nossas observações. Tal divergência talvez seja oriunda da diferença de cepas utilizadas, já que para ratos os achados do referido grupo são condizentes com os nossos e que há outros trabalhos na literatura demonstrando que na lesão por bleomicina em camundongos, a ativação de PPAR γ foi capaz também de inibir a deposição de colágeno e instalação da fibrose (GENOVESE et al., 2005; MILAM et al., 2008).

As fibras do sistema elástico são muito importantes para manter a função do pulmão, garantindo a elastância necessária para o órgão realizar sua função e em lesões pulmonares onde há destruição dos septos alveolares, como no caso da silicose ou de enfisema pulmonar, há degradação do arcabouço de fibras do sistema elástico e conseqüente perda de elastância (FUSCO et al., 2005).

No intuito de verificar o remodelamento do sistema elástico em nosso modelo, analisamos os cortes histológicos corados com orceína oxidada e verificamos que os animais tratados somente com veículo possuíam uma área ocupada por fibras do sistema elástico menor do que os tratados com rosiglitazona tanto em 8 quanto em 28 dias. Isto nos leva a pensar em uma maior destruição das fibras elásticas nos animais que receberam somente o veículo e portanto numa inibição do processo elastolítico pelo tratamento com a rosiglitazona.

Nossos dados demonstram ainda que o tratamento com rosiglitazona parece não ser capaz de reverter o quadro de fibras do sistema elástico já destruído ou promover elastogênese uma vez que o grupo de animais tratados com rosiglitazona

de 28 dias apresenta uma menor área com reatividade ao corante do que o grupo de animais tratados com rosiglitazona de 8 dias.

Estes dados se unem aos achados de celularidade e quantificação de colágeno e nos levam a reforçar a idéia de que a rosiglitazona apresentou capacidade de inibir o processo patológico da silicose enquanto da sua administração, mas não foi capaz de reverter o quadro da doença que já havia se instalado nos animais que só receberam o tratamento a partir de 21 dias após a instilação da sílica. Nossa observação está de acordo com o descrito na literatura para o tratamento de silicose, onde corticosteróides são utilizados para reduzir os sintomas e impedir o progresso da doença, mas não são capazes de reverter o quadro previamente instalado (RIMAL, GREENBERG & ROM, 2005; SHERSON, 2007).

Os macrófagos são as principais células efetoras do processo patológico na silicose (CASTRANOVA & VALLYATHAN, 2000). Para estudar essa população celular, utilizamos o marcador F4/80 descrito por Austyn & Gordon (1981) como específico para macrófagos de camundongos e a lectina BSL I, descrita como marcador da ativação de macrófagos (TABOR et al., 1989).

Em nosso estudo, o tratamento com rosiglitazona foi capaz de diminuir o número de células positivas para F4/80 e o número células positivas para BSL I tanto em 8 dias quanto em 28 dias. Entretanto, foi observado para os dois marcadores que havia mais células positivas nos animais silicóticos tratados com rosiglitazona de 28 dias do que nos de 8 dias. Estes dados corroboram com a idéia de diminuição do processo inflamatório durante a administração da droga e estão a favor de dados encontrados na literatura de desativação de macrófagos murinos por intermédio da ativação de PPAR γ (FREIRE-DE-LIMA et al. 2006; REDDY et al., 2004).

Para tentarmos entender um pouco melhor e formular hipóteses de possíveis mecanismos pelos quais nosso tratamento estaria agindo na inibição da evolução da silicose, verificamos a presença da citocina TGF β , por imunohistoquímica. Esta citocina é descrita na literatura no interior de granulomas de pacientes silicóticos, contribuindo para a regulação positiva de genes envolvidos na biossíntese de colágeno e fibronectina, na síntese de fatores de crescimento pró-fibróticos, citocinas e seus receptores (JAGIRDAR et al., 1996). O TGF- β produzido pelo macrófago

alveolar pode ainda ter a função de estimular a proliferação de fibroblastos (MOSSSMAN & CHURG, 1998; VAN DEN BRÛLE et al., 2005).

Nosso estudo demonstrou que o tratamento com rosiglitazona foi capaz de inibir a imunexpressão da citocina TGF- β , condizente com dados da literatura que demonstram que a ativação de PPAR γ pode levar a uma diminuição da expressão de TGF- β via inibição de NF κ B (OHGA et al., 2007). Outro grupo demonstrou recentemente o papel anti-inflamatório da ativação de PPAR γ por diminuição também da expressão de TGF- β em modelo de obstrução ureteral (EFRATI et al., 2009).

A diminuição da produção de TGF β durante o tratamento pode ser então um mecanismo indireto que explicaria a diminuição da deposição de fibras de colágeno, conforme correlação direta estabelecida na literatura (JAGIRDAR et al., 1996). Há ainda um possível mecanismo de ação da ativação de PPAR γ diretamente em fibroblastos que teriam a produção de colágeno inibida mesmo na presença de TGF- β conforme Burgess et al. (2005) demonstraram.

Um aspecto importante da patogênese da silicose é a formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (CASTRANOVA & VALLYATHAN, 2000). Uma das enzimas envolvidas na formação de óxido nítrico é a sintase de óxido nítrico induzível, iNOS, que apresenta nível de expressão aumentado em pulmões de ratos que sofreram instilação de quartzo (BLACKFORD et al. 1994).

Para acessarmos esse possível alvo também do tratamento com agonista de PPAR γ , realizamos a imunomarcagem para tal enzima. Nossos resultados demonstram que o tratamento com rosiglitazona foi eficaz em reduzir a imunexpressão de iNOS nos tempos de 8 e 28 dias. A diminuição da expressão de iNOS, resultante da ativação do PPAR γ já é descrita na literatura em pulmões de ratos em modelo que utiliza LPS (LIU et al. 2005a). Este dado reforça o papel do PPAR γ na inibição da progressão da silicose, tendo em vista que já foi verificado que as espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio têm papel central na patogênese e autoperpetuação desta desordem pulmonar (PORTER et al., 2006).

A apoptose é outro relevante fator na patogênese da silicose (DOSREIS, BORGES & ZIN, 2004). Nossos dados demonstram que a quantidade de células positivas para o TUNEL diminuiu nos animais tratados com rosiglitazona para 8 e 28 dias.

De forma controversa, alguns estudos têm demonstrado que a ativação de PPAR γ é capaz de induzir a apoptose em linhagens de células tumorais de pulmão (FULZELE et al., 2007; LI et al., 2005). Em concordância com nossos resultados, estudos recentes demonstraram a ação anti-inflamatória do PPAR γ com redução do número de células apoptóticas marcadas por TUNEL em lesão cerebral e renal (EFRATI et al., 2009; YI et al., 2008). A divergência verificada nesses trabalhos pode ser explicada pelo fato dos trabalhos, que apresentam a ativação de PPAR γ como indutor de apoptose, utilizarem linhagens celulares tumorais e realizarem seus estudos *in vitro*, identificando a ação direta do agonista do PPAR γ na regulação transcricional das células em questão; enquanto que a diminuição da apoptose correlacionada ao tratamento com agonista de PPAR γ foi demonstrada em estudos realizados *in vivo*. Nessa conjuntura, podemos supor que o tratamento com o agonista de PPAR γ pode estar agindo de forma indireta na regulação da apoptose nos modelos *in vivo*, influenciando outros parâmetros da inflamação (como o próprio número total de células inflamatórias - celularidade) que diminuem a quantidade de células positivas para a técnica de TUNEL. Para esclarecer melhor esta questão, estudos futuros deverão ser realizados, focando os mecanismos de apoptose envolvidos em cada caso.

Enfim, o conjunto de nossos resultados sugere que o tratamento com rosiglitazona está correlacionado a uma diminuição do processo patológico da silicose, envolvendo uma inibição do recrutamento de células inflamatórias, da ativação de macrófagos, da deposição de fibras colágenas e da destruição de fibras elásticas. As prováveis células nas quais a rosiglitazona está agindo são os macrófagos, as células do epitélio brônquico e células fibroblastóides e alguns dos mecanismos pelos quais o tratamento pode estar diminuindo a inflamação por sílica são a inibição da produção de TGF β e a inibição da expressão de iNOS e conseqüente produção de espécies reativas de nitrogênio. Um outro mecanismo de ação, possivelmente indireto, é a redução no número de células apoptóticas e deve ser estudado com mais aprofundamento.

Desta forma, a partir do entendimento da ação do tratamento com o agonista de PPAR γ e sua conseqüente ativação biológica na silicose murina, nosso trabalho abre premissas que sustentam possíveis linhas de estudo para uma compreensão melhor da patogênese da doença.

7 SUMÁRIO DE RESULTADOS

- ✓ Nos pulmões dos animais estudados, a imunexpressão de PPAR γ ocorre em células epiteliais brônquicas, macrófagos e células fibroblastóides.
- ✓ A ativação do PPAR γ pelo tratamento com rosiglitazona provoca uma diminuição da inflamação nos animais de 8 e 28 dias.
- ✓ Com o tratamento de rosiglitazona, há uma diminuição na celularidade dos animais silicóticos de 8 e 28 dias.
- ✓ O espaço aéreo é mais preservado nos animais tratados com rosiglitazona em 8 e 28 dias.
- ✓ Os pulmões dos animais silicóticos de 8 e 28 dias tratados com rosiglitazona apresentam menor área ocupada por partículas de sílica, evidenciando um maior *clearance* destas.
- ✓ Há menor deposição de fibras da trama colágena nos pulmões dos animais silicóticos de 8 e 28 dias tratados com rosiglitazona.
- ✓ Há maior preservação do sistema elástico nos animais silicóticos de 8 e 28 dias tratados com rosiglitazona.
- ✓ O número de células positivas para o marcador F4/80 e para a lectina BSL I é menor nos animais silicóticos tratados com rosiglitazona em 8 e 28 dias.
- ✓ Há redução da imunexpressão de TGF- β e iNOS nos pulmões dos animais silicóticos tratados com rosiglitazona em 8 e 28 dias.
- ✓ Há redução no número de células positivas para TUNEL nos pulmões dos animais silicóticos tratados com rosiglitazona em 8 e 28 dias.

8 CONCLUSÃO

Nosso trabalho demonstra que a ativação de PPAR γ através do tratamento com rosiglitazona é capaz de inibir em parte o processo patológico da silicose murina; provavelmente por mecanismos ligados à diminuição da ativação de macrófagos e da produção de óxido nítrico e TGF β .

9 PERSPECTIVAS

Análise da mecânica respiratória dos animais silicóticos tratados com rosiglitazona e com veículo para verificar a influência do tratamento no teste funcional dos pulmões.

Análise e detecção da produção de citocinas nos pulmões dos animais silicóticos tratados com rosiglitazona e veículo, através da dosagem no lavado broncoalveolar por métodos como ELISA ou Luminex (técnica para detecção várias citocinas de forma concomitante em uma mesma amostra).

Visando um estudo mais aprofundado sobre qual seria a ação da ativação deste receptor em cada tipo celular, sugerimos ensaios *in vitro* com estimulação por partículas de sílica, utilizando os três tipos celulares aqui descritos como positivos para a imunomarcação com PPAR γ e fazendo uso de técnicas de biologia molecular como RT-PCR e quiçá Microarranjo para análise da expressão de genes regulados pela ativação de PPAR γ .

REFERÊNCIAS

ANGELI, V.; HAMMAD, H.; STAELS, B.; CAPRON, M.; LAMBRECHT, B. N.; TROTTEIN, F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits the migration of dendritic cells: consequences for the immune response. **J Immunol**, 170(10), p.5295-301, 2003.

AUSTYN, J. M.; GORDON, S. Expression of the macrophage-specific antigen F4/80 during differentiation of mouse bone marrow cell culture. **J Exp Med**, 154(3), p. 713-725, 1981.

BARBARIN, V.; ARRAS, M.; MISSON, P.; DELOS, M.; MCGARRY, B.; PHAN, S. H. Characterization of the Effect of Interleukin-10 on Silica-Induced Lung Fibrosis in Mice. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 31, p. 78-85, 2004.

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**. 6(1), p.112. 2005

BEAMER, C. A.; HOLIAN, A. Scavenger receptor class A type I/II (CD204) null mice fail to develop fibrosis following silica exposure. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 289(2), p. L186-195, 2005.

BECKER, J.; DELAYRE-ORTHEZ, C.; FROSSARD, N.; PONS, F. Regulation of inflammation by PPARs: a future approach to treat lung inflammatory diseases? **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 20(5), p.429-47, 2006.

BENAYOUN, L.; LETUVE, S.; DRUILHE, A.; BOCZKOWSKI, J.; DOMBRET, M. C.; MECHIGHHEL, P.; MEGRET, J.; LESECHE, G.; AUBIER, M.; PRETOLANI, M. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human asthmatic airways: relationship with proliferation, apoptosis, and airway remodeling. **Am J Respir Crit Care Med.**, 164(8 Pt 1), p. 1487-94, 2001.

BIRRELL, M. A.; PATEL, H. J.; MCCLUSKIE, K.; WONG, S.; LEONARD, T.; YACOUB, M. H.; BELVISI, M. G. PPAR-gamma agonists as therapy for diseases involving airway neutrophilia. **Eur Respir J**, 24(1), p. 18-23, 2004.

BLACKFORD, J. A.; ANTONINI, J. M.; CASTRANOVA, V.; DEY, R. D. Intratracheal instillation of silica up-regulates inducible nitric oxide synthase gene expression and increases nitric oxide production in alveolar macrophages and neutrophils. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 11 (4), p. 426-431, 1994.

BORGES, V. M.; FALCÃO, H.; LEITE-JÚNIOR, J. H.; ALVIM, L.; TEIXEIRA, G. P.; RUSSO, M.; NÓBREGA, 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.**, 194(2), p. 155-163, 2001.

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

BROWN, J. D.; PLUTZKY, J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors as Transcriptional Nodal Points and Therapeutic Targets. **Circulation**, 115, p. 518-533, 2007.

BURGESS, H. A.; DAUGHERTY, L. E.; THATCHER, T. H.; LAKATOS, H. F.; RAY, D. M.; REDONNET, M.; PHIPPS, R. P.; SIME, P. J. PPARgamma agonists inhibit TGF-beta induced pulmonary myofibroblast differentiation and collagen production: implications for therapy of lung fibrosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 288(6), p. L1146-53, 2005.

CÂMARA, F. P. **Glossário da Dinâmica Não-Linear**. 2007. Disponível em: <www.microbiologia.ufrj.br/Gloss%20de%20Din%20micaN%20o-Linear.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2008, 19:30.

CARSON, F. L.; MARTIN, J. H.; LYNN, J. A. Formalin Fixation for Electron Microscopy. **Am. J. Clin. Pathol**, 59, p. 365-373, 1973.

CASTRANOVA, V. Signaling Pathways Controlling The Production Of Inflammatory Mediators in Response To Crystalline Silica Exposure: Role Of Reactive Oxygen/Nitrogen Species. **Free Radical Biology and Medicine**, 37(7), p.916-25, 2004.

CASTRANOVA, V.; VALLYATHAN, V. Silicosis and Coal Workers' Pneumoconiosis. **Environmental Health Perspectives**, 108(4), p. 675-684, 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Silicosis deaths among young adults -- United States, 1968-1994. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 47 (16), p.331-5, 1998.

CHEN, S.; SHI, X. NF- κ B, a pivotal transcription factor in silica-induced diseases. **Molecular and Cellular Biochemistry**, (234/235), p. 169-176, 2002.

COOK, M. **The Anatomy of the Laboratory Mouse**. Disponível em <<http://www.informatics.jax.org/cookbook/subjectindex.shtml>>, Acesso em: 05 jun. 2008, 21:50.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia Celular I: Lesão e Morte da Célula O Pulmão. In: _____, **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. Tradução de Marcio Moacyr de Vasconcelos. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap.16, p. 1-26.

COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F. G. & BITTENCOURT-SAMPAIO, S. Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. **J. Invest. Dermatol.**, 66, p. 143-148, 1976.

CRAIGHEAD, J. E.; KLEINERMAN, J.; ABRAHAM J. L., GIBBS, A. R.; GREEN, F. H. Y.; HARLEY, R. A.; RUETTNER J. R.; VALLYATHAN, N. V. JULIANO, E. B. Diseases associated with exposure to silica and non-fibrous silicate minerals. **Arch Pathol Lab Med**, 112 (3), p. 673-720, 1988.

CUZZOCREA, S. Peroxisome proliferator-activated receptors and acute lung injury. **Current Opinion in Pharmacology**, 6, p. 263-270, 2006.

CUZZOCREA, S.; PISANO, B.; DUGO, L.; IANARO, A.; MAFFIA, P.; PATEL, N. S.; D. I.; PAOLA, R.; IALENTI, A.; GENOVESE, T.; CHATTERJEE, P. K.; DI ROSA, M.; CAPUTI, A. P.; THIEMERMANN, C. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation. **Eur J Pharmacol**, 483(1), p.79-93, 2004.

DAVIS, G. Pathogenesis of Silicosis: Current Concepts and Hypotheses. **Lung**, 164, p.139-154, 1986.

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**, 20, p. 813-824, 1999.

DEMETRI, G. D.; FLETCHER, C. D. M.; MUELLER, E.; SARRAF, P.; NAUJOKS, R.; CAMPBELL, N.; SPIEGELMAN, B. M.; SINGER, S. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand troglitazone in patients with liposarcoma. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96, p. 3951-3956, 1999.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocrine Reviews**, 20, p.649-688, 1999.

DIDON, L. **Intracellular signaling in the lung: A role of C/EBP transcription factors in chronic obstructive pulmonary disease glucocorticoid signaling and lung development**. 2008. 53f. Department of Medicine, Division of Respiratory Medicine, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suécia, 2008.

DING, M.; CHEN, F.; SHI, X.; YUCESAY, B.; MOSSMAN, B.; VALLYATHAN, V. Diseases caused by silica: mechanisms of injury and disease development. **International Immunopharmacology**, 2, p. 173-182, 2002.

DING, M.; SHI, X.; DONG, Z.; CHEN, F.; LU, Y.; CASTRANOVA, V.; VALLYATHAN, V. Freshly Fractured Crystalline Silica Induces Activator Protein-1 Activation through ERKs and p38 MAPK. **J Biol Chem**, 274(43), p. 30611-30616, 1999.

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

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.**, 8 (3), p. 285-293, 2004.

DREYER, C.; KREY, G.; KELLER, H.; GIVEL, F.; HELFTENBEIN, G.; WAHLI, W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. **Cell**, 68(5), p. 879-87, 1992.

EFRATI, S.; BERMAN, S.; CHACHASHVILI, A.; COHEN, N.; SIMAN-TOV, Y.; AVERBUKH, Z.; WEISSGARTEN, J. Rosiglitazone treatment attenuates renal tissue inflammation generated by urinary tract obstruction. **Nephrology (Carlton)**, 2009 (Em impressão)

FELS, A O.; COHN, Z. A. The alveolar macrophage. **J Appl Physiol**, 60(2), p.353-369, 1986.

FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B. P.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; DE MELLO, F. G.; DOSREIS, G. A.; LOPES, M. F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, 403, p. 199-203, 2000.

FREIRE-DE-LIMA, C. G.; XIAO, Y. Q.; GARDAL, S. J.; BRATTON, D. L.; SCHIEMANN, W. P.; HENSON, P. M. Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. **Biol Chem.**, 281 (50), p. 38376-38384, 2006.

FUBINI, B.; HUBBARD, A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. **Free Radical Biology & Medicine**, 34 (12), p.1507-1516, 2003.

FULZELE, S. V.; CHATTERJEE, A.; SHAIK, M. S.; JACKSON, T.; ICHITE, N.; SINGH, M. 15-Deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂ enhances docetaxel anti-tumor activity against A549 and H460 non-small-cell lung cancer cell lines and xenograft tumors. **Anticancer Drugs**, 18(1), p.65-78, 2007.

FUSCO, L. B.; FONSECA, M. H.; PÊGO-FERNANDES, P. M.; PAZETTI, R.; CAPELOZZI, V.; BISCEGLI JATENE, F.; OLIVEIRA, S. A. Cirurgia de redução do volume pulmonar em modelo experimental de enfisema em ratos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 31(1), p. 34-40, 2005.

GENOVESE, T.; CUZZOCREA, S.; DI PAOLA, R.; MAZZON, E.; MASTRUZZO, C.; CATALANO, P.; SORTINO, M.; CRIMI, N.; CAPUTI, A. P.; THIEMERMANN, C.; VANCHERI, C. Effect of rosiglitazone and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ on bleomycin-induced lung injury. **Eur. Respir. J.**, 25, p. 225-234, 2005.

GLASS, C. K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol.** 6(1), p. 44-55, 2006.

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

HAMILTON, R. F. Jr.; THAKUR, S. A.; MAYFAIR, J. K.; HOLIAN, A. MARCO mediates silica uptake and toxicity in alveolar macrophages from C57BL/6 mice. **J Biol Chem.**, 281(45), P. 34218-34226, 2006.

HOLANDA M. A.; HOLANDA M. A.; MARTINS M. P.; FELISMINO P. H.; PINHEIRO V. G. Silicosis in Brazilian pit diggers: relationship between dust and radiologic findings. **Am J Ind Med**, 27 (3), p.245-51, 1995.

HONDA, K.; MARQUILLIES, P.; CAPRON, M.; DOMBROWICZ, D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in airways and inhibits features of airway remodeling in a mouse model. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 113, p. 882-888, 2004.

HUAUX, F.; LOUAHED, J.; HUDSPITH, B.; MEREDITH, C.; DELOS, M.; RENAULD, J. C.; LISON, D. Role of interleukin-10 in lung response to silica in mice. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 18(1), p. 51-59, 1998.

INOUE, K.; TAKANO, H.; YANAGISAWA, R.; MORITA, M.; ICHINOSE, T.; SADAKANE, K.; YOSHINO, S.; YAMAKI, K.; KUMAGAI, Y.; UCHIYAMA, K.; YOSHIKAWA, T. Effect of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. **European Journal of Pharmacology**, 481, p. 261-269, 2003.

ISSEMAN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, 347(6294), p. 645-50, 1990.

JAGIRDAR J.; BEGIN R.; DUFRESNE A.; GOSWAMI S.; LEE T. C.; ROM, W. N. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in silicosis. **Am J Respir Crit Care Med**, 154(4 pt1), p. 1076-1081, 1996.

JANSSEN, Y. M. MARSH, J. P.; ABSHER, M. P.; HEMENWAY, D.; VACEK, P. M.; LESLIE, K. O.; BORM, P. J.; MOSSMAN, B. T. Expression of antioxidant enzymes in rat lungs after inhalation of asbestos or silica. **J. Biol. Chem.**, 267 (15), p. 10625-10630, 1992.

JUNQUERIA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho Respiratório. In: _____. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, Cap. 17, p. 339-358.

KATZENSTEIN, A. L.; ASKIN, F. B. Pneumoconiosis In: _____. **Surgical Pathology of Non-Neoplastic Lung Disease**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1982. Cap. 4, p. 73-107. (Major problems in pathology, v.13)

KAUSCH, C.; KRÜTZFELDT, J.; WITKE, A.; RETTIG, A.; BACHMANN, O.; RETT, K.; MATTHAEI, S.; MACHICAO, F.; HÄRING, H. U.; STUMVOLL, M. Effects of troglitazone on cellular differentiation, insulin signaling and glucose metabolism in cultured human skeletal muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 280(3), p. 664-674, 2001.

KIERSZENBAUM, A. L. Sistema Respiratório. In: _____. **Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia**. Tradução de Maria Inês Corrêa do Nascimento . 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Cap. 13, p. 375-401.

KOBZIK, L. O Pulmão. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. Tradução de Patrícia Josephine Voeux. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap.16, p. 626-679.

KOTA, B. P.; HUANG, T. H.; ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacological Research**, 51, p. 85-94, 2005.

LEE, S.; KIM, W.; MOON, S. O.; SUNG, M. J.; KIM, D. H.; KANG, K. P.; JANG, Y. B.; LEE, J. E.; JANG, K. Y.; PARK, S. K. Rosiglitazone ameliorates cisplatin-induced renal injury in mice. **Nephrol Dial Transplant**, 21(8), p. 2096-2105, 2006.

LEIGH, J.; WANG, H.; BONIN, A.; PETERS, M.; RUAN, X. Silica-induced apoptosis in alveolar and granulomatous cells in vivo. **Environ Health Perspect**, 105 (5), p.1241-5, 1997.

LI, M.; LEE, T. W.; MOK, T. S.; WARNER, T. D.; YIM, A. P.; CHEN, G. G. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by troglitazone(TGZ) inhibits human lung cell growth. **J Cell Biochem**, 96(4), p.760-74, 2005.

LIMA, Januário. **O Papel da Interleucina-4 na Silicose Experimental Murina**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) — Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

LIU, D.; ZENG, B. X.; ZHANG, S. H.; WANG, Y. L.; ZENG, L.; GENG, Z. L.; ZHANG, S. F. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, reduces acute lung injury in endotoxemic rats. **Crit Care Med**, 33(10), p. 2309-16, 2005a.

LIU, D.; ZENG, B. X.; ZHANG, S. H.; YAO, S. L. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor γ , reduces pulmonary inflammatory response in a rat model of endotoxemia. **Inflamm. Res**, 54, p. 464-470, 2005b.

MADDOX, D.E., GOLDSTEIN, I.J. & LOBUGLIO, A.F. Griffonia simplicifolia I lectin mediates macrophage-induced cytotoxicity against Ehrlich ascites tumor. **Cell Immunol**, 71, p.202-207, 1982a.

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 USA**, 79, p.166-170, 1982b.

MANNETJE, A't.; STEENLAND, K.; ATTIFIELD M.; BOFFETTA, P.; CHECKOWAY, H.; DEKLERK, N.; KOSKELA, R-S. Exposure-response analysis and risk assessment for silica and silicosis mortality in a pooled analysis of six cohorts. **Occup. Environ. Med**, 59(11), p.723-728, 2002.

MARX, N.; SUKHOVA, G.; MURPHY, C.; LIBBY, P.; PLUTZKY, J. Macrophages in human atheroma contain PPAR γ : differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) expression and reduction of MMP-9 activity through PPAR γ activation in mononuclear phagocytes in vitro. **Am J Pathol**, 153(1), p. 17-23, 1998.

MELLONI, B.; LESUR, O.; BOUHADIBA, T.; CANTIN, A.; BÉGIN, R. Partial characterization of the proliferative activity for fetal lung epithelial cells produced by silica-exposed alveolar macrophages. **J Leukoc Biol**, 55(5), p. 574-580, 1994.

MELLONI, B.; LESUR, O.; BOUHADIBA, T.; CANTIN, A.; MARTEL, M.; BÉGIN, R. Effect of exposure to silica on human alveolar macrophages in supporting growth activity in type II epithelial cells. **Thorax**, 51(8), p.781—786, 1996.

MILAM, J. E.; KESHAMOUNI, V. G.; PHAN, S. H.; HU, B.; GANGIREDDY, S. R.; HOGABOAM, C. M.; STANDIFORD, T. J.; THANNICKAL, V. J.; REDDY, R. C. PPAR- γ agonists inhibit profibrotic phenotypes in human lung fibroblasts and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 294(5), p. 891-901, 2008.

MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO. **Silicose**. Disponível em <<http://www.fundacentro.gov.br/conteudo.asp?D=SES&C=920&menuAberto=785>>. Acesso em: 05 jun. 2008, 03:20.

MOLLAH, M. L.; KIM, G. S.; MOON, H. K.; CHUNG, S. K.; CHEON, Y. P.; KIM, J. K.; KIM, K. S. Antiobesity effects of wild ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) mediated by PPAR- γ , GLUT4 and LPL in ob/ob mice. **Phytother Res.**, 23(2), p. 220-225, 2008.

MOORE, K. L.; DALLEY II, A. F.; Tórax. In: _____. **Anatomia orientada para a clínica**. Tradução de Alexandre Lins Werneck e Wilma Lins Werneck. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 1, p. 52-151.

MOSSMAN, B. T.; CHURCH, A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. **Am J Respir Crit Care Med**, 157, p.1666-80, 1998.

MURPHY, G. J.; HOLDER, J. C. PPAR γ agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. **TIPS**, 21, p. 469-474, 2000.

NISBET, R. E.; SUTLIFF, R. L.; HART, C. M. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in pulmonary vascular disease. **PPAR Res**, 2007; 2007: ID 18797, 10 páginas.

NOLTE, R.T.; WISELY, G. B.; WESTIN, S.; COBB, J. E.; LAMBERT, M. H.; KUROKAWA, R.; ROSENFELD M. G.; WILLSON, T. M.; GLASS, C. K.; MILBURN, M. V. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **Nature**, 395(6698), p. 37-43, 1998.

OHGA, S.; SHIKATA, K.; YOZAI, K.; OKADA, S.; OGAWA, D.; USUI, H.; WADA, J.; SHIKATA, Y.; MAKINO, H. Thiazolidinedione ameliorates renal injury in experimental diabetic rats through anti-inflammatory effects mediated by inhibition of NF-kappaB activation. **Am J Physiol Renal Physiol**, 292(4), p.1141-50, 2007.

OKUNO, A.; TAMEMOTO, H.; TOBE, K. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. **J Clin Invest**, 101, p. 13540-1361, 1998.

OSHA (OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH ADMINISTRATION). 1218-AB70-2040. **Occupational Exposure to Crystalline Silica**. OSHA. Disponível em: <http://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.show_document?p_table=UNIFIED_AGENDA&p_id=4506>. Acesso em: 30 nov. 2007, 01:03.

PAOLA, R. D.; CUZZOCREA, S. Peroxisome proliferator-activated receptors and acute lung injury. **PPAR Res**, 2007; 2007: ID 63745, 8 páginas.

PASCERI, V.; WU, H. D.; WILLERSON, J. T.; YEH, E. T. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators. **Circulation**, 101, p. 235-238, 2000.

PASCUAL, G.; FONG, A. L.; OGAWA, S.; GAMLIEL, A.; LI, A. C.; PERISSI, V.; ROSE, D. W.; WILLSON, T. M.; ROSENFELD, M. G.; GLASS, C. K. A sumoylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. **Nature**, 437(7059), p. 759-63, 2005.

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.**,90(1), p.188-97, 2006.

REDDY R.C., KESHAMOUNI V.G., JAIGIRDAR S.H., ZENG X., LEFF T., THANNICKAL V.J., STANDIFORD, T.J. Deactivation of murine alveolar macrophages by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 286(3), p. 613-619, 2004.

REES, D; MURRAY, J. Silica, silicosis and tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, 11(5), p. 474-484, 2007.

REIS, Luis Felipe. **O Papel da Galectina-3 na Silicose Experimental Murina**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) — Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

RENAUD, J. P.; ROCHEL, N.; RUFF, M.; VIVAT, V.; CHAMBON, P.; CRONEMEYER, H.; MORAS, D. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. **Nature**, 378(6558), p.681-9, 1995.

RIBEIRO, F. S. N.; ALGRANTI, E.; CAMARGO, E. A.; WÜNSCH FILHO. Exposição Ocupacional à sílica no Brasil. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, 8, p1-5, 2003. (Suplementos 1 e 3)

RICOTE, M.; GLASS, C K. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771, p. 926-935, 2007.

RICOTE, M.; LI, A. C.; WILLSON, T. M.; KELLY, C. J.; GLASS, C. K. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, 391 (6662), p. 79-82, 1998.

RIMAL, B.; GREENBERG, A. K.; ROM, W. N. Basic pathogenic mechanisms in silicosis: current understanding. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, 11, p.169-173, 2005.

RUBINS, J. B. Alveolar macrophages: wielding the double-edged sword of inflammation. **Am J Respir Crit Care Med**, 167(2), p.103-104, 2003.

SETOGUCHI, K.; TAKEYA, M.; AKAIKE, T.; SUGA, M.; HATTORI, R.; MAEDA, H.; ANDO, M.; TAKAHASHI, K. Expression of inducible nitric oxide synthase and its involvement in pulmonary granulomatous inflammation in rats. **Am J Pathol**, 149(6), p. 2005-2022, 1996.

SHEN, H. M.; ZHANG, Z.; ZHANG, Q. F., ONG, C. N. Reactive oxygen species and caspase activation mediate silica-induced apoptosis in alveolar macrophages. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, 280 (1), L10-17, 2001.

SHERSON, D. Silicosis in the twenty first century. **Occup. Environ. Med**, 59, p.721-722, 2007.

SHIBASAKI, M.; TAKAHASHI, K.; ITOU, T.; BUJO, H.; SAITO, Y. A PPAR agonist improves TNF- α -induced insulin resistance of adipose tissue in mice. **Biochem Biophys Res Commun**, 309, p. 419-424, 2003.

SHOJIMA, N.; SAKODA, H.; OGIHARA, T.; FUJISHIRO, M.; KATAGIRI, H. ANAI, M.; ONISHI, Y.; ONO, H.; INUKAI, K.; ABE, M.; FUKUSHIMA, Y.; KIKUCHI, M.; OKA, Y.; ASANO, T. Humoral Regulation of Resistin Expression in 3T3-L1 and Mouse Adipose Cells. **Diabetes**, 51, p. 1737-1744, 2002.

SHUKLA, A.; TIMBLIN, C. R.; HUBBARD, A. K.; BRAVMAN, J.; MOSSMAN, B. T. Silica-induced Activation of c-Jun-NH₂-Terminal Amino Kinases, Protracted Expression of the Activator Protein-1 Proto-Oncogene, fra-1, and S-Phase Alterations Are Mediated via Oxidative Stress. **Cancer Research**, 61, p.1791-1795, 2001.

SIMON, D. M.; ARIKAN, M. C.; SRISUMA, S.; BHATTACHARYA, S.; TSAI, L. W.; INGENITO, E. P.; GONZALEZ, F.; SHAPIRO, S. D.; MARIANI, T. J. Epithelial cell PPAR[γ] contributes to normal lung maturation. **FASEB J.**, 20(9), p. 1507-9, 2006.

STANDIFORD, T. J.; KESHAMOUNI, V. G.; REDDY, R. C. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ as a regulator of lung inflammation and repair. **Proc Am Thorac Soc**, 2(3), p. 226-231, 2005.

TABOR, D. R.; LARRY, C. H.; JACOBS, R. F. Differential induction of macrophage GSIB4-binding activity. **J Leukoc Biol**, 45(5), p.452-7, 1989.

TAKAYOSHI, K.; OGAMI, A.; YAMATO, H.; OYABU, T.; MORMOTO, Y.; TANAKA, I. Effect of Particle Size of Intratracheally Instilled Crystallin Silica on Pulmonary Inflammation. **J Occup Health**, 49, p.88-94, 2007.

TAKEDA, K.; ICHIKI, T.; TOKUNOU, T.; FUNAKOSHI, Y.; IINO, N.; HIRANO, K.; KANAIDE, H.; TAKESHITA, A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. **Circulation**, 102(15), p.1834-9, 2000.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 51(4), p. 526-533, 2007.

TAYLOR, C. R.; LEVENSON, R. M. Quantification of immunohistochemistry -issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*, 49(4), p. 411-24, 2006.

TAYLOR, M. D.; ROBERTS, J. R.; HUBBS, A. F.; REASOR, M. J.; ANTONINI, J. M. Quantitative image analysis of drug-induced lung fibrosis using laser scanning confocal microscopy. **Toxicol Sci.**, 67(2), p.295-302, 2002.

TERRA FILHO, M.; SANTOS, U. P. Silicose. **J Bras Pneumol**, 32, p.41-47, 2006. (Suplemento 1)

THAKUR, S. A.; BEAMER, C. A.; MIGLIACCIO, C. T.; HOLIAN, A. Critical Role of Marco in Crystalline Silica-Induced Pulmonary Inflammation. **Toxicol Sci.** 2009 Jan 16. (Em impressão)

TYLER, W. S.; JULIAN, M. D. Gross and Subgross Anatomy of Lungs, Pleura, Connective Tissue Septa, Distal Airways, and Structural Units. In: PARENT, R. A. **Treatise on Pulmonary Toxicology: Comparative Biology of the Normal Lung.** 1992. Cap.4, p.37-48. Disponível em <<http://books.google.com.br/books?id=VDhRbicW6-C&printsec=frontcover&dq=comparative+biology+lung&sig=tlQIPBUoNlyCBjcg3n2AVMORRb4#PPP15,M1>>. Acesso em: 05 jun. 2008, 22:07.

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**, 138 (5), p.1213-9, 1988.

VAN DEN BRÛLE, S.; MISSON, P.; BÜHLING, F.; LISON, D.; HUAUX, F. Overexpression of cathepsin K during silica-induced lung fibrosis and control by TGF- β . **Respiratory Research**, 6, p. 84, 2005.

VANHÉE, D.; GOSSET, P.; BOITELLE, A.; WALLAERT, B.; TONNEL, A. B. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal workers' pneumoconiosis. **Eur Respir J**, 8, p. 834-842, 1995.

VENTURA, Túlio. **Terapia celular na silicose murina experimental.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) — Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

WAKINO, S.; KINTSCHER, U.; KIM, S.; YIN, F.; HSUEH, W. A.; LAW, R. E. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1--> S transition in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem**, 275(29), p. :22435-41, 2000.

WALKER RA. Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. **Histopathology**, 49(4), p. 406-10, 2006.

WANG, A. C.; DAI, X.; LUU, B.; CONRAD, D. J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates airway epithelial cell activation. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 24(6), p.:688-93, 2001.

WHO (World Health Organization). Fact sheet N^o 238, Maio 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs238/en/>>. Acesso em: 02 dez. 2008, 03:15.

WARD, J. E.; FERNANDES, D. J.; TAYLOR, C. C.; BONACCI, J. V.; QUAN, L.; STEWART A. G. The PPAR γ ligand, rosiglitazone, reduces airways hyperresponsiveness in a murine model of allergen-induced inflammation. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, 19, p. 39-46, 2006.

WIESSNER, J. H.; HENDERSON, J. D. Jr.; SOHNLE, P. G.; MANDEL N. S.; MANDEL G. S. The effect of crystal structure on mouse lung inflammation and fibrosis. **Am Rev Respir Dis**, 138(2), p.445-50, 1988.

WILLIAMSON, B. J.; PASTIROFF, S.; CRESSEY, G. Piezoelectric properties of quartz and cristobalite airborne particulates as a cause of adverse health effects. **Atmospheric Environment**, 35, p.3539-42, 2001.

WILLSON, T. M.; COBB, J. E.; COWAN, D. J.; WIETHE, R. W.; CORREA, I. D.; PRAKASH, S. R.; BECK, K. D.; MOORE, L.B.; KLIEWER, S. A.; LEHMANN, J. M. The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. **J Med Chem**, 39(3), p. 665-8, 1996.

WU, Z.; ROSEN, E. D.; BURN, R.; HAUSER, S.; ADELMANT, G.; TROY, A. E.; McKEON, C.; DARLINGTON, G. J.; SPIEGELMAN, B. M. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. **Mol Cell**, 3, p. 151-158, 1999.

YI, J. H.; PARK, S. W.; BROOKS, N.; LANG, B. T.; VEMUGANTI, R. PPARgamma agonist rosiglitazone is neuroprotective after traumatic brain injury via anti-inflammatory and anti-oxidative mechanisms. **Brain Res**, 1244, p.164-72, 2008.

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](#)