

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Estudo da participação de mastócitos no processo de fibrose pulmonar induzido por sílica em camundongos

FRANCISCO ALVES FARIAS FILHO

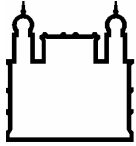
RIO DE JANEIRO

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

FRANCISCO ALVES FARIAS FILHO

Estudo da participação de mastócitos no processo de fibrose pulmonar induzido por sílica em camundongos

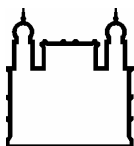
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Imunologia e Farmacologia.

Orientadora: Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva

Co-Orientador: Dr. Renato Sérgio Balão Cordeiro

RIO DE JANEIRO

2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

FRANCISCO ALVES FARIAS FILHO

Estudo da participação de mastócitos no processo de fibrose pulmonar induzido por sílica em camundongos

ORIENTADORA: Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva

CO-ORIENTADOR: Dr. Renato Sérgio Balão Cordeiro

EXAMINADORES:

Dr. Marcelo Pelajo Machado - IOC/FIOCRUZ

Dr. Bruno Lourenço Diaz - UFRJ

Dr. Helene Santos Barbosa - IOC/FIOCRUZ

Dr. Christianne Bandeira de Melo - UFRJ

Dr. Adriana Ribeiro Silva – IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 22 de dezembro de 2008.

DEDICATÓRIA

À MINHA FAMÍLIA

Ao meu pai Francisco Alves e à minha mãe Eva

Maria Farias,

Aos meus filhos Pedro Lucena e Cindy Ellen Farias,

À minha amiga, companheira e noiva Sabrina Lopes Lucena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelos ensinamentos ao longo da vida, amor, carinho e em especial pelas constantes orações de MINHA MÃE e palavras de incentivo do MEU PAI;

Agradeço em especial aos grandes amores de minha vida Sabrina “Farias”, Cindy Farias e Pedro Lucena;

Aos meus irmãos que muito contribuíram para minha criação e educação, obrigado por todo privilégio que tive em virtude do esforço de vocês;

Aos meus avós que me proporcionaram momentos marcantes entre carinho, diversão e ensinamentos;

À minha ~~sogra~~ (segunda mãe) Marlene Lopes pela liberdade, carinho, confiança e respeito, em extensão ao Sérgio;

Ao meu grande amigo irmão Alexei Rodrigues, que iniciou uma longa caminhada ao meu lado e que neste momento vibra com mais uma pequena etapa cumprida;

Ao Dr. José Geraldo Bândoli e Loide que contribuíram de forma marcante no início de minha vida;

Aos meus amigos José Carlos (Paizão), Anderson Oliveira e Érica Alves;

À “pequena” grande amiga, Carol Reigada, obrigado, dentre outras coisas, pelo aprendizado inicial;

Ao meu irmão Leandro Batista pelo incentivo, preocupação, companheirismo, ..., e em extensão à amiga Simone Teves;

Aos meus amigos André e Gisele Candéa, é bom poder contar com vocês;

Aos meus Padrinhos, Dr. Vinicius Carvalho e Dra. Magda Serra, pelo carinho, incentivo e ensinamentos científicos;

À amiga, grande companheira, protetora e carinhosa Bianca Ciambarella, obrigado Bia !

Ao Dr. Emiliano Barreto e sua esposa Juliane Barreto, os quais dispensam qualquer comentário, MUITO OBRIGADO!

À Ana Carolina Arantes e Ana Lúcia Pires, colegas do Laboratório de Inflamação, que em vários momentos difíceis ou felizes, demonstram de forma especial, preocupação e carinho;

Aos colegas do Laboratório de Inflamação que contribuíram de forma direta ou indireta para o convívio e desenvolvimento deste trabalho: Dona Osirene (Dadá), Elisa Aguiar, Dra. Márcia Coronha, Dra. Simone Cavalher, Dra. Josiane Sabbadine, Dra. Tatiana Lavich, Dr. André Bonavita, Rafaela Paiva, Tatiana Paula Ferreira, Dra. Luciana Pontes, Dra. Sandra Aurora Perez, Dra. Edna Vallota, Thiago Ramos, Patrícia Trentin, Diana Dalzy, Priscilla Olsen, Michelle dos Santos, Marcellus Menezes, Rafael Torres, dentre tantos outros;

A todos os colegas e pesquisadores do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica (DFF) pelo convívio, respeito e solidariedade;

A todas as pessoas (Dona Rozilda, Valéria, Tia Dora, Sr. Nelson, Sr. Antônio, Bira, Andréia, Tatiane, Luiza, ...) que de alguma forma fazem o DFF funcionar e alegam o meu dia com sinceros sorrisos e gestos de carinho;

À Dra. Regina Amendoeira pela oportunidade única, que permitiu iniciar minha vida acadêmica no DFF da Fiocruz;

Ao Dr. Marco Aurélio Martins por me permitir fazer parte do Grupo do Laboratório de Inflamação e pelos criteriosos ensinamentos científicos;

Ao ilustre Dr. Renato Cordeiro, pelo exemplo de amor e dedicação à Ciência (em especial à Fiocruz) pelos simples, porém valiosos gestos de incentivo, e por permitir que em algum momento de vida acadêmica tivesse meu nome atrelado ao dele;

À Dra. Patrícia Silva que me acompanha há 6 anos no Laboratório de Inflamação, período no qual me apoiou em diferentes momentos, deixou clara a sua preocupação com minha formação, soube “dar corda” e “puxar as orelhas”, mostrou muita dedicação nos momentos mais difíceis e sem dúvida nos momentos mais críticos soube direcionar para o melhor, ou no mínimo, o caminho mais fácil. Obrigado por permitir usufruir de sua experiência para o meu desenvolvimento profissional;

A todos os integrantes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial a Daniele, por estarem sempre disponíveis a ajudar em todos os momentos solicitados;

Às instituições que auxiliaram financeiramente o nosso trabalho: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro e Fundação Oswaldo Cruz.

EPÍGRAFE

“Pesquisador é cargo ou função,
Cientista é estado de espírito.
Por isso muitos pesquisadores jamais serão cientistas.
Por outro lado,
muitos foram, são ou serão cientistas sem nunca terem sido pesquisadores.”

Francisco Alves Farias Filho

O presente trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva e do Dr. Renato Sérgio Balão Cordeiro, no Laboratório de Inflamação do Instituto Oswaldo Cruz, na Fundação Oswaldo Cruz, com o apoio financeiro da própria instituição e das seguintes entidades de fomento científico:

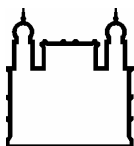
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.
- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ.

Data de ingresso no Programa de Mestrado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: março de 2007.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA.....	II
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
<i>1.INTRODUÇÃO.....</i>	<i>1</i>
1.1. Pulmão.....	1
1.2. Sílica.....	1
1.2.1. O composto.....	1
1.2.2. Silicose.....	2
1.2.2.1. Epidemiologia.....	3
1.2.2.2. Diagnóstico, tratamento e a relação com outras doenças.....	4
1.2.3. Células envolvidas na silicose.....	5
1.2.4. Fibrose intersticial na silicose.....	6
1.3. Mastócitos.....	9
1.3.1. Mastócitos x SCF.....	13
1.3.2. Mastócitos no contexto da fibrose.....	14
2. OJETIVOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Animais.....	18
3.2. Indução da silicose.....	18
3.3. Análise histológica.....	18
3.3.1. Análise morfométrica.....	18
3.3.2. Imunohistoquímica.....	19
3.4. Diferenciação de mastócitos de medula óssea.....	20
3.5. Ativação de mastócitos.....	20
3.6. Quantificação de β -hexosaminidase.....	20
3.7. Cultura de fibroblastos pulmonares.....	21
3.8. Ensaio de produção e reparo de lesão em cultura de fibroblastos pulmonares <i>in vitro</i>	22
3.9.Soluções, corantes e meios de cultura.....	22
4. RESULTADOS.....	25

4.1. Efeito da instilação de sílica na estrutura e composição tecidual pulmonar.....	25
4.2. Análise da população de mastócitos nos pulmões de camundongos silicóticos.....	28
4.3. Expressão de SCF no tecido pulmonar de animais silicóticos.....	31
4.4. Efeito da sílica sobre mastócitos de camundongos <i>in vitro</i>	34
4.5. Efeito da depleção de Ca ⁺⁺ externo e da baixa temperatura na desgranulação mastocitária induzida por sílica.....	36
4.6. Avaliação do processo de sinalização envolvido na ativação de mastócitos por partículas de sílica.....	39
4.7. Efeito do sobrenadante de mastócitos estimulados por sílica sobre fibroblastos pulmonares.....	42
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

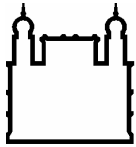
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RESUMO

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE MASTÓCITOS NO PROCESSO DE FIBROSE PULMONAR INDUZIDO POR SÍLICA EM CAMUNDONGOS

A silicose é uma doença ocupacional, caracterizada pela presença de fibrose crônica nos pulmões. Evidências apontam para a implicação de mastócitos em algumas doenças de caráter fibrótico. Assim, no presente estudo, buscamos investigar a participação de mastócitos durante o estabelecimento do quadro de silicose pulmonar em camundongos, utilizando análise tanto qualitativa como quantitativa. A ativação de mastócitos por partículas de sílica *in vitro* e a potencial interação entre mastócitos e fibroblastos foram igualmente avaliadas. Partículas de sílica (10 mg) foram administradas intranasalmente em camundongos Swiss-Webster e as análises realizadas nos tempos de 7, 14 e 28 dias após a indução da silicose. Parâmetros como morfologia pulmonar e número de mastócitos, assim como expressão de “stem-cell factor” (SCF), foram avaliados por meio de colorações específicas e imunohistoquímica, respectivamente. Para análise da ativação de mastócitos *in vitro*, foram utilizadas células derivadas a partir da medula óssea (BMMCs) e a liberação de β -hexosaminidase (β -hex) como parâmetro de ativação. A análise do tecido pulmonar de camundongos silicóticos revelou a presença de uma intensa resposta fibrótica e numerosos granulomas, majoritariamente localizados na região peribrônquica, com início detectado no dia 7 e máximo sendo observado no tempo de 28 dias pós-sílica. Verificamos um aumento acentuado no número de mastócitos pulmonares, tanto em 14 quanto em 28 após a sílica, com claro predomínio de células apresentando fenótipo do tipo conjuntivo. De forma interessante, vimos que este fenômeno foi precedido por aumento na expressão de SCF em comparação ao verificado no caso dos animais controles. Na condição da exposição de BMMC às partículas de sílica *in vitro* evidenciamos sinais claros de ativação celular, conforme atestado pelo aumento na percentagem de β -hex liberada. Esta resposta mostrou-se sensível ao tratamento com a toxina pertussis sugerindo, então, o envolvimento de receptores acoplados Gi neste sistema. Além disso, a incubação dos BMMCs com os inibidores de PI3K (wortmanina) e de PKC (calfostina C) também suprimiu significativamente a ativação dos mastócitos pela sílica, implicando ambas as enzimas neste processo. Em outra série de experimentos, mostramos que o sobrenadante proveniente de BMMCs estimulados por sílica favoreceu a resposta proliferativa de fibroblastos pulmonares murinos, dando suporte à proposição de que os mastócitos podem liberar fatores ativos no controle da função de fibroblastos. Em conclusão, nossos resultados mostram a existência de aumento no número e mudança de fenótipo em mastócitos pulmonares na condição da silicose, de forma paralela à progressão da fibrose e precedido por aumento da expressão de SCF. Mais ainda, a ativação direta de mastócitos por sílica resultou na liberação de fatores capazes de ativar fibroblastos diretamente, o que dá suporte a idéia de que mastócitos podem contribuir para a ocorrência da resposta fibrótica verificada no estabelecimento do quadro silicótico murino.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

STUDY OF MAST CELL INVOLVEMENT IN SILICA-INDUCED PULMONARY FIBROSIS PROCESS IN MICE

Silicosis is an occupational disease characterized by the presence of chronic fibrosis in the lungs. Pieces of evidence indicate the involvement of mast cells in some fibrotic diseases. In this study, we investigated potential qualitative and quantitative alterations of lung mast cells in the course of experimental silicosis in mice. Mast cell activation by silica particles *in vitro* and the potential interaction between mast cells and fibroblasts were also evaluated. Silica particles (10 mg) were administered intranasally into Swiss-Webster mice and the analyses performed 7, 14 e 28 days after silicosis induction. Parameters such as pulmonary morphology, number of mast cells and expression of SCF were assessed by means of specific staining and immunohistochemistry, respectively. For the analysis of mast cell activation *in vitro* cells derived from bone marrow (BMMCs) were used and the β -hexosaminidase (β -hex) release was used as measure of activation. Lung tissue evaluation revealed an extensive fibrotic response and the presence of numerous granulomas, mainly localized on peribronchiolar regions, on day 7 with maximum response noted at day 28 after silica. An increase in the number of MCs was noted at 14 and 28 days, with a clear predominance of cells exhibiting connective tissue phenotype. Interestingly, we noted that the phenomenon was preceded by an increase in the expression of stem-cell factor (SCF) as compared to control animals. Cultured BMMC when exposed to silica showed clear signs of activation as attested by an increase in the percentage of β -hex release as compared to control cells. This response was sensitive to treatment with pertussis toxin, suggesting the involvement of Gi coupled receptors in this system. In addition, incubation of BMMCs with PI3K (wortmannin) and PKC (calphostin C) inhibitors also suppressed significantly the activation of mast cells by silica, implicating both enzymes in this process. In another set of experiments, we showed that the supernatant recovered from silica-stimulated BMMC led to higher levels of lung fibroblast proliferation from mice, reinforcing the idea that mast cells are able to release factors active in the control of fibroblast function. In conclusion, our results show that there is an increase in number and changes of the phenotype of mast cells in experimental silicosis, phenomena which paralleled to the progression of fibrosis and which was preceded by an increased of SCF expression. In addition, silica-induced mast cell activation led to the release of factor(s) capable of activating fibroblasts directly, supporting to the idea that mast cells might contribute to the fibrotic response noted experimental silicosis in mice.

ABREVIACOES

AEC – aminoetilcarbazol
BSA – albumina bovina
BSS – solução salina tamponada
CECAL – centro de criação de animais de laboratrio
CEUA – comisso de Ética no uso de animais
EDTA – cido etilenodiamino tetra-actico
EGTA – cido etilenoglicol tetra-actico
FGF – fator de crescimento para fibroblasto
H&E – hematoxilina-eosina
IFN- γ - interferon- γ
IFN- γ KO – camundongos deficientes no gene que codifica interferon- γ
IgE – imunoglobulina específica
IgG – imunoglobulina G
IL-1 β – interleucina-1 beta
IL-6 – interleucina-6
JNK – quinase n-terminal c-Jun
MAPK – proteína quinase ativada por mitgenos
MEC – matriz extracelular
MMPs – metaloproteinases de matriz
mSCF – fator de crescimento celular ligado a membrana
NF- κ B – fator nuclear κ B
PBS – salina tamponada com fosfatos
PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas
PGD₂ – prostaglandina D₂
PGE₂ – prostaglandina E₂
PI3-quinase – fosfatidilinositol 3-quinase
PKC – proteína quinase C
PLA₂ – fosfolipase A₂
PLC β – fosfolipase C β
PTX – toxina pertussis
RMCP-1 – protease-1 de mastcito de rato
RMCP-2 – protease-2 de mastcito de rato
SBF – soro bovino fetal

SCF – fator de crescimento celular

TBS – tampão tris-salina

TGF- β – fator beta de crescimento tumoral

TIMPs – metaloproteinases do tecido

TNF- α – fator alfa de necrose tumoral

WT – wortmanina

LISTAS DE TABELAS E FIGURAS

	Página
Tabela 1: Características dos subtipos de mastócitos de roedores.	11
Figura 1. Principais vias de ativação de mastócitos.	12
Figura 3. Modelo de sistema M42.	19
Figura 4.1.1. Análise histopatológica das alterações no tecido pulmonar 7, 14 e 28 dias após a instilação nasal de 10mg de sílica.	26
Figura 4.1.2. Análise histopatológica da deposição de colágeno no tecido pulmonar 7, 14 e 28 dias após a instilação nasal de 10mg de sílica.	27
Figura 4.2.1. Análise da população de mastócitos presente no tecido pulmonar, 28 dias após a instilação nasal de 10mg de sílica.	29
Figura 4.2.2. Análise da cinética de alteração no número de mastócitos presente no tecido pulmonar 7, 14 e 28 dias após instilação de sílica.	30
Figura 4.3.1. Análise da expressão de SCF no tecido pulmonar de camundongos, através da técnica de imunohistoquímica e posterior avaliação em microscópio de luz.	32
Figura 4.3.2. Análise quantitativa da expressão de SCF no tecido pulmonar de camundongos, feita pela quantificação de pixels, através do software Image-Pro Plus 4.	33
Figura 4.4. Análise dose-resposta e cinética de ativação de mastócitos induzida por sílica <i>in vitro</i> .	35
Figura 4.5.1. Efeito da baixa temperatura na desgranulação mastocitária induzida por sílica.	37

- Figura 4.5.2. Efeito da depleção de Ca^{++} externo na desgranulação mastocitária induzida por sílica. 38
- Figura 4.6.1. Avaliação da participação de PI3 κ e proteína Gi no processo de sinalização envolvido na ativação de mastócitos por partículas de sílica. 40
- Figura 4.6.2. Avaliação da participação da via PKC no processo de sinalização envolvido na ativação de mastócitos por partículas de sílica. 41
- Figura 4.7. Análise do efeito do sobrenadante obtido de mastócitos estimulados com sílica (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre fibroblastos pulmonares *in vitro*. 43

1. INTRODUÇÃO

1.1. PULMÃO

O pulmão faz parte do sistema respiratório e localiza-se no interior do tórax, onde é responsável pelas trocas gasosas entre ar atmosférico e o sangue. Este órgão é um dos primeiros a se desenvolver na vida intrauterina, uma vez que o sistema de troca gasosa é vital para os mamíferos. Para realizar essa função o pulmão necessita de toda árvore respiratória que se constitui de traquéia, brônquio, bronquíolo e alvéolos, sendo neste último o local de troca gasosa (Farrell, 1982).

Desta forma, é compreensível que seja de suma importância a manutenção da integridade das estruturas brônquicas e alveolares. Esta integridade compreende não só adequação estrutural bem como composição bioquímica. No entanto, devido à função do sistema respiratório, estas estruturas são frequentemente expostas a microorganismos ou a agentes tóxicos. Isto tem por conseqüência a ocorrência de uma gama de patologias inflamatórias que se caracterizam por alterações estruturais, bioquímicas ou ambas, levando a disfunção pulmonar (Kobzik, 1999).

1.2. SÍLICA

1.2.1. O COMPOSTO

O termo sílica refere-se ao composto químico dióxido de silício (SiO_2)_n que apresenta-se na forma cristalina ou na forma não cristalina, também denominada de amorfa. A sílica cristalina pode apresentar polimorfismo, sendo encontrada nas formas de alfa quartzo, beta quartzo, cristobalita, coesita e tridimita. A forma quartzo é a mais comum e abundante na terra e em muitas rochas, sendo este termo normalmente utilizado para substituir sílica cristalina. Já as formas cristobalita e tridimita são produzidas quando o quartzo ou a sílica amorfa são aquecidos em alguns processos industriais. Em seu estado cristalino, um átomo de silício no centro e quatro de oxigênio são ordenados de forma repetida em estruturas tridimensionais em uma configuração tetraédrica (Niosh, 2002).

Uma vez que a sílica é formada por silício e oxigênio, dois dos elementos mais comuns na crosta terrestre, sempre que a superfície terrestre é perturbada em situações como atividades associadas à mineração, extração de areia ou perfuração de rochas ocorre a geração de sílica livre cristalina. No contexto patológico, sílica usualmente se refere ao pó de sílica cristalina, que normalmente são partículas respiráveis e usualmente apresentam tamanho menor que 7 micrometros de diâmetro.

A geometria e dimensões destes compostos podem interferir em sua deposição, cinética de eliminação, reatividade biológica e dissolução no pulmão. Além disso, suas propriedades químicas, incluindo reações de oxidação e redução, assim como sua carga de superfície, desempenham funções importantes nas respostas celulares e patogenicidade. Neste sentido, alguns estudos demonstraram que a toxicidade e patogenicidade da sílica podem ser dependentes de uma combinação de propriedades físicas, mecânicas e químicas deste composto (Guthrie e Heaney, 1995; Guthrie, 1997).

Foi demonstrado que a sílica recém fraturada durante o processo de dinamitado abrasivo é mais tóxica para macrófagos alveolares do que sílica mais antiga, possivelmente em virtude do alto potencial de oxirredução presente na sílica recente, o que facilita a geração de radicais de hidroxila ($\cdot\text{OH}$) em meio aquoso (Vallyathan, Shi *et al.*, 1988). Em 1988, foi demonstrada a correlação entre o aumento da toxicidade, inflamação e fibrogenicidade após injeção intratraqueal de cristobalita e tridimita em camundongos, em contraste ao observado com a administração de coesita. Este achado foi relacionado à baixa densidade atômica encontrada nos minerais fibrogênicos e alta densidade presente nos não fibrogênicos. Assim, esses pesquisadores concluíram que a patogenicidade da sílica aumenta à medida que a densidade atômica diminui (Wiessner, Henderson *et al.*, 1988).

1.2.2. SILICOSE

Dentre várias patologias pulmonares, uma classe é descrita desde a Antigüidade, sendo denominada como pneumoconiose. Este termo foi criado por Zenker, em 1866, para designar um grupo de doenças que se originam da exposição a poeiras com potencial fibrogênico (Ms/Cenepi, 1998). Doenças respiratórias associadas à exposição ocupacional à sílica cristalina foram descritas ao longo da história, sendo Hipócrates quem primeiro descreveu uma condição de "dificuldade respiratória" em mineradores e, em 1690, Lohneiss observou que quando "a poeira e pedras depositava sobre os pulmões, os homens apresentavam doenças pulmonares, respirando com dificuldade". Já no ano de 1860, Peacock e Greenhow relataram a presença de sílica nos pulmões dos mineradores, e 10 anos depois, Visconti teria utilizado o termo "silicose" para descrever a doença causada pela inalação de sílica (Greenberg, Waksman *et al.*, 2007). Atualmente o termo pneumoconiose é definido como uma condição induzida pela inalação de pó de minério e a reação desencadeada no tecido pulmonar em virtude da presença deste. A silicose é então caracterizada como doença ocupacional que acomete uma ampla classe de trabalhadores, operários de alvenaria, construção civil, fundição de aço, escavação de poços, jateamento de areia e mineração (Niosh, 2002).

A silicose é resultante da inalação de dióxido de silício ou sílica. É possível adquirir a doença depois de pouco tempo de exposição à poeira contendo partículas de sílica na forma cristalina, em altas concentrações, ou após longos períodos de exposição a pequenas quantidades deste mineral. Entretanto, a patogenicidade da poeira de sílica não é determinada somente pela duração e intensidade da exposição, uma vez que outros fatores podem influenciar, sendo alguns de maior complexidade que incluem a susceptibilidade individual, e outros mais simples, como o fato de que pequenas partículas teriam maior potencial fibrogênico. A doença pode ocorrer até mesmo sem uma progressiva exposição à sílica, podendo ser detectados os primeiros indícios, inclusive radiológicos, algum tempo após a exposição ter cessado. Em um estudo de coorte com mineradores de ouro, foi detectado que 57% dos indivíduos com silicose haviam desenvolvido a doença em média 7,4 anos depois de terem descontinuado a exposição, mas uma porcentagem menor apresentou danos somente depois de 20 anos (Hnizdo e Sluis-Cremer, 1993). Dentre as variações clínicas dessa patologia encontram-se a forma aguda, a silicose simples ou nodular e a forma com progressiva fibrose. A forma aguda é caracterizada por edema pulmonar, inflamação intersticial e acúmulo de proteínas e fluido rico em surfactante. Na silicose nodular verifica-se a presença de nódulos com acúmulo de macrófagos e discreto depósito de colágeno. Já nos casos de fibrose progressiva ocorre coalescência dos nódulos e intenso depósito de matriz extracelular que acarreta a destruição do parênquima pulmonar, o que resulta em insuficiência da função pulmonar (Rimal, Greenberg *et al.*, 2005).

1.2.2.1. EPIDEMIOLOGIA

A silicose acomete trabalhadores de países desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento. Nos Estados Unidos da América, o Instituto Nacional para Segurança Profissional e Saúde calculou que pelo menos 1,7 milhões de trabalhadores em ocupações industriais, e uma porcentagem desconhecida dos 3,7 milhões de trabalhadores, empregados em atividades agrícolas, são expostos à sílica. No Brasil a silicose tem sua importância na saúde pública descrita desde 1939, sendo nos últimos anos considerada a pneumoconiose de maior prevalência no país (Algranti, 2001). Foi demonstrado que no Brasil, nos anos de 1999 e 2000, o número de trabalhadores expostos à sílica aproximava-se de 5 milhões, com prevalência de 5,3%, superando o valor estimado nos Estados Unidos e a mais alta prevalência na União Européia que foi de 3,9% encontrada na Finlândia (Ribeiro, Algranti *et al.*, 2003).

Entre os primeiros estudos epidemiológicos sobre silicose realizados no Brasil estão os que ocorreram no início da década de 70, nas cidades de Pedreira e Jundiaí, no estado de São Paulo (Morrone, 1980; Nogueira, Certain *et al.*, 1981). Nesta ocasião foi observada uma elevada ocorrência de silicose em trabalhadores da indústria de cerâmicas, porém a relação com a atividade ocupacional naquele momento foi considerada de pouca importância para a gênese da doença. Em outro estudo publicado em 1995, foi relatada a ocorrência de 818 casos de silicose em vários campos da atividade industrial na região de Campinas. Como resultado, foi recomendada a criação de um programa de vigilância epidemiológica a fim de acompanhar melhor os trabalhadores presentes nestes ambientes (Bagatin, Jardim *et al.*, 1995). Mais ainda, em um trabalho realizado em 1998, foram avaliados 4279 trabalhadores empregados em indústrias de cerâmica na cidade de Pedreira e ficando constatada a existência de 159 casos diagnosticados de silicose, com prevalência de 4,7% entre todos os indivíduos expostos na área (Oliveira, 1998). Observações complementares permitiram evidenciar uma menor incidência da silicose em mulheres, fato relacionado com a limitada participação destas no desenvolvimento das atividades que promovem riscos ao desenvolvimento desta doença (Lido, Kitamura *et al.*, 2008).

1.2.2.2. DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E A RELAÇÃO COM OUTRAS DOENÇAS

O diagnóstico da silicose é normalmente baseado na combinação do histórico de exposição à sílica e observação de nódulos através de radiografia pulmonar. É possível observar a presença de alterações na radiografia do tórax após 10 a 20 anos de contato com as partículas da sílica. Estes achados radiográficos podem preceder o aparecimento de sintomas ou alterações clínicas e laboratoriais. O padrão característico observado radiograficamente é o de pequenos nódulos pulmonares circunscritos, menores que 0,5 cm, geralmente acometendo os campos pulmonares superiores. No entanto, a área total pode aumentar devido à coalescência dos nódulos, permitindo a observação de grandes opacidades na radiografia, que nos casos mais graves chegam a ser maiores que 1 cm (Stark, Jacobson *et al.*, 1992; Meirelles, Kavakama *et al.*, 2006). Porém, já foi demonstrado que para o diagnóstico da silicose a tomografia computadorizada, em especial a de alta resolução, apresenta maior sensibilidade e especificidade do que a radiografia simples (Begin, Ostiguy *et al.*, 1991).

Em relação ao tratamento, até o momento não existe uma terapia específica para a silicose, sendo, por vezes utilizados tratamentos comuns aplicados a outros casos de fibrose pulmonar, porém sem muito sucesso. Dentre estes, encontra-se o uso de corticóides e a

realização de lavado broncoalveolar para remoção das partículas (Kuwano, Hagimoto *et al.*, 2001; Rimal, Greenberg *et al.*, 2005).

O grande interesse atual em estudos relacionados à silicose aparece em virtude da escassez de tratamento, bem como da possível relação entre a silicose e outras doenças de grande relevância na saúde pública. Nas últimas duas décadas surgiram inúmeros trabalhos visando demonstrar que a exposição à sílica estaria associada com um aumento no risco de ocorrência de câncer pulmonar. Alguns estudos sugeriram que este fenômeno poderia ocorrer em consequência da fibrose presente em pulmões de indivíduos silicóticos (Morgan, 1995). Além disso, foi evidenciada a relação entre silicose e o desenvolvimento de tuberculose pulmonar. Neste sentido recentes resultados mostraram que a exposição à sílica, mesmo sem o desenvolvimento da silicose, pode predispor à tuberculose (Cowie, 1994).

1.2.3. CÉLULAS ENVOLVIDAS NA SILICOSE

Durante a patologia pulmonar causada após a deposição de sílica nos pulmões, tanto em humanos quanto em roedores, diversos tipos celulares que compõem a árvore brônquica e ductos alveolares são afetados. Neste sentido, alguns estudos *in vivo* e *in vitro* têm elucidado algumas alterações funcionais e moleculares em macrófagos alveolares, células epiteliais brônquicas e alveolares, neutrófilos, fibroblastos, linfócitos e mastócitos.

Na silicose, danos à matriz extracelular foram associados ao aumento da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) no tecido pulmonar, sendo estas enzimas conhecidas pela capacidade de degradar o tecido conjuntivo. Esta expressão foi acentuada em macrófagos e neutrófilos presentes em número elevado nos nódulos silicóticos, ficando também constatado, que na presença de sílica estas células são capazes de secretar diversos tipos de MMPs (Scabilloni, Wang *et al.*, 2005).

Após exposição a partículas de sílica *in vitro*, macrófagos alveolares também podem liberar radicais de oxigênio e ainda um grande número de citocinas, fatores de crescimento e de diferenciação de fibroblastos (Driscoll, Maurer *et al.*, 1995). A secreção de fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator beta de crescimento tumoral (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento para fibroblasto (bFGF), além de fibronectina já foi detectada na condição da silicose. Todas as citocinas e fatores acima citados estão relacionados a um potencial inflamatório e intensificação do processo fibrótico (Burns e Zarkower, 1983; Sibille e Reynolds, 1990; Gosset, Lassalle *et al.*, 1991; Driscoll, Maurer *et al.*, 1995; Melloni, Lesur *et al.*, 1996). A sílica mostrou-se também capaz de induzir a síntese de eicosanóides como

prostaglandina E₂ e D₂ (PGE₂ e PGD₂), com a PGE₂ parecendo exercer função de controle do processo fibrótico da silicose (Mohr, Davis *et al.*, 1992). Vários desses eventos foram evidenciados também *in vivo*. Além disso, a produção de grande parte desses mediadores parece ser dependente de um mecanismo comum, a ativação do fator nuclear-κB (NF-κB). Em 1994, foi demonstrado que a sílica induz a translocação nuclear do NF-κB em macrófago murino (Chen, Deng *et al.*, 1994).

Além de macrófagos e neutrófilos, os linfócitos também parecem contribuir para o desenvolvimento da silicose. No pulmão, um acúmulo de linfócitos precede e acompanha a proliferação de fibroblastos, hiperplasia de células epiteliais alveolares e o aumento na deposição de componentes de matriz extracelular. O acúmulo de linfócitos é característico nas lesões pulmonares durante a silicose experimental e até mesmo em humanos (Davis, Holmes *et al.*, 2001; Davis, Pfeiffer *et al.*, 2006).

Após a inalação de sílica por camundongos observou-se um rápido e persistente recrutamento de linfócitos, incluindo células “natural killer”, células-B, células-T CD4⁺ e CD8⁺. Uma grande parte dos linfócitos presentes na silicose experimental murina produz interferon-γ (IFN-γ). Aliado a este fato, foi demonstrado que camundongos deficientes no gene que codifica interferon-γ (IFN-γ KO), desenvolveram um quadro de silicose menos intenso do que o apresentado pelos camundongos selvagens. No entanto a real participação deste tipo celular ainda permanece sem entendimento (Davis, Holmes *et al.*, 2001; Davis, Pfeiffer *et al.*, 2006).

Após a ocorrência de um intenso processo inflamatório relatado anteriormente, observa-se uma desorganizada proliferação, diferenciação e ativação de fibroblastos, sendo que este último fenômeno parece ser dependente de IL-1β (Oghiso e Kubota, 1986; Srivastava, Rom *et al.*, 2002). Este evento favorece a um excessivo depósito de componentes da matriz extracelular e fibras colágenas, caracterizando o processo de fibrose pulmonar presente na silicose (Mossman e Churg, 1998). Este processo tem sido associado, ainda, a uma hiperplasia mastocitária tanto em humanos como em camundongos (Suzuki, Horiuchi *et al.*, 1993; Hamada, Vallyathan *et al.*, 2000).

1.2.4. FIBROSE INTERSTICIAL NA SILICOSE

Um expressivo número de estudos, tanto em humanos como em animais de experimentação, tem levado a significantes avanços no esclarecimento acerca dos mecanismos que levam ao quadro de fibrose pulmonar. O processo inicia-se com o infiltrado

de células inflamatórias e edema intersticial, com posterior proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno. Estas etapas são comuns a várias doenças pulmonares intersticiais, incluindo a silicose (Kuwano, Hagimoto *et al.*, 2001).

A fibrose pulmonar intersticial resulta de um remodelamento estrutural após lesão pulmonar. Neste processo o macrófago é visto como a célula iniciadora, uma vez que, em diferentes tipos de fibrose pulmonar, promove lesão tecidual, além de liberar citocinas fibrogênicas como TGF- β e PDGF (Homma, Nagaoka *et al.*, 1995; Ma, Barger *et al.*, 1999; Scabilloni, Wang *et al.*, 2005).

A importante contribuição das MMPs na progressão da fibrose pulmonar durante o desenvolvimento de pneumoconiose em camundongos foi demonstrada por Tan e col em 2006. No referido trabalho foi evidenciado um aumento na atividade de MMP-9 e MMP-2 após 28 dias de exposição a asbesto. Este aumento foi associado ao processo de fibrose apresentado nesse período, uma vez que foi verificada redução da fibrose quando os animais foram tratados com inibidor de MMP (Tan, Fattman *et al.*, 2006).

A atividade das MMPs pode ser controlada por uma família de inibidores endógenos, coletivamente conhecidos como inibidores de metaloproteinases do tecido (TIMPs). Assim como as MMPs, a expressão de TIMPs em tecidos é regulada de forma a manter o equilíbrio entre a proteólise e a inibição desta, que levam à estabilidade da matriz extracelular (MEC) além da manutenção da capacidade plástica. O desequilíbrio da atividade de MMPs ou TIMPs conduz freqüentemente a um remodelamento defeituoso e formação de cicatriz, podendo ainda favorecer o acúmulo exacerbado de MEC levando à fibrose (Brew, Dinakarpanian *et al.*, 2000).

Essas enzimas e seus inibidores são produzidos por células estruturais da árvore brônquica e dos alvéolos. No pulmão saudável, fibroblastos produzem constitutivamente MMP-2, mas também são precursores de MMP-1 e TIMP-1. Células epiteliais brônquicas liberam MMP-2, MMP-9 e seu principal inibidor, TIMP-1. Em adição a estas últimas, as células do epitélio alveolar produzem TIMP-2 e MMP-1 (Xu, Benyon *et al.*, 2002). As células musculares por sua vez também podem gerar MMP-2 (Johnson e Knox, 1999). Por último, foi demonstrado que os mastócitos podem desempenhar função importante no processo inflamatório da parede brônquica, local onde podem ser ativados por linfócitos e produzir, então, MMP-9 (Baram, Vaday *et al.*, 2001).

Várias citocinas são descritas como efetoras do processo de fibrose pulmonar, dentre estas o TNF- α (Greenberg, Waksman *et al.*, 2007). Após a exposição de camundongos a

partículas de sílica, foi verificado um aumento na expressão de TNF- α no tecido pulmonar destes animais, fenômeno este que se mostrou correlacionado com a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno (Piguet, Collart *et al.*, 1990). A relevante contribuição dessa citocina foi confirmada quando o tratamento com anticorpo anti-TNF- α mostrou-se capaz de prevenir o desenvolvimento de fibrose pulmonar induzida por sílica ou bleomicina em camundongos (Piguet e Vesin, 1994).

São crescentes as evidências de que a IL-1 apresenta um potencial fibrogênico (Lappalainen, Whitsett *et al.*, 2005). Alguns estudos, tanto em humanos como em animais, demonstraram a presença de IL-1 β em inflamação crônica e em processos de fibrogênese pulmonar, associada ao acúmulo de miofibroblastos e depósito de matriz extracelular (Phan e Kunkel, 1992; Johnston, Piedboeuf *et al.*, 1996; Pan, Ohtani *et al.*, 1996; Dinarello, 1997). A inibição de IL-1 β em modelos de fibrose pulmonar induzida por sílica ou bleomicina promoveu atenuação do processo patológico, sugerindo forte ligação entre esta citocina e a resposta fibrótica pulmonar (Piguet, Vesin *et al.*, 1993).

Outra citocina importante no processo de fibrogênese é o TGF- β (Fan, Huang *et al.*, 2001). Células epiteliais e macrófagos presentes no tecido pulmonar de pacientes com fibrose pulmonar idiopática apresentam elevada produção de TGF- β , sendo o mesmo verificado na fibrose pulmonar induzida por sílica (Khalil, O'connor *et al.*, 1991; Jagirdar, Begin *et al.*, 1996). Este fator age através de diferentes formas para aumentar a deposição de colágeno nos pulmões. O mesmo é quimiotático para fibroblastos, possui a capacidade de promover sua diferenciação em miofibroblastos, inibe a degradação de colágeno e induz a síntese de proteínas da matriz extracelular (Postlethwaite, Keski-Oja *et al.*, 1987; Linnala, Kinnula *et al.*, 1995; Evans, Tian *et al.*, 2003).

Outros três fatores incluindo o de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator-1 de crescimento tipo insulina (IGF-1) e o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), também possuem relevância no desenvolvimento da fibrose pulmonar (Chen, Deng *et al.*, 1994; Ohta, Nakano *et al.*, 1997). Em relação ao último já foi demonstrado que a aumentada expressão de bFGF em tecido pulmonar de indivíduos silicóticos estaria associada ao aumentado número de mastócitos neste local, porém ainda não foram suficientemente esclarecidos os mecanismos envolvidos nesta hiperplasia mastocitária (Hamada, Vallyathan *et al.*, 2000).

1.3. MASTÓCITOS

Os mastócitos foram descritos pela primeira vez, em 1878, por um cientista alemão chamado Paul Ehrlich. Assim, o termo “Mast Zellen” foi usado por Ehrlich para caracterizar células do tecido conjuntivo que continham numerosos grânulos metacromáticos e pareciam “cheias ou bem alimentadas” (Vyas e Krishnaswamy, 2006). Foi Paul Ehrlich quem também observou que estas células tinham tendência em localizarem-se próximas de vasos sanguíneos, nervos e glândulas (Metcalf, 2008). Atualmente é sabido que se trata de células mononucleares que possuem de 4-20 µm de diâmetro, contendo em seu citoplasma grânulos secretores de 0,1 a 0,4 µm de diâmetro envolvidos por uma única membrana (Dvorak, Dvorak *et al.*, 1983). Essas células são derivadas de precursores hematopoiéticos agranulares CD 34⁺ e c-Kit⁺, estes precursores têm rápida passagem pelo sangue em sua forma imatura, pois completam seu processo de maturação e diferenciação em tecidos vascularizados (Galli, 1993).

Nos tecidos periféricos, a diferenciação mastocitária é totalmente influenciada por fatores do microambiente, dentre estes merecem destaque SCF e IL-3. Estas citocinas também são amplamente relacionadas à sobrevivência dos mastócitos, visto que a ausência destas contribui para a apoptose destas células. Após a maturação, os mastócitos normalmente localizam-se nas proximidades de vasos sanguíneos e linfáticos, além de estarem em grande número na pele e mucosas do trato intestinal e respiratório. Também foram demonstradas diferenças fenotípicas e histoquímicas entre mastócitos de diferentes sítios anatômicos (Metcalf, Baram *et al.*, 1997; Galli, Nakae *et al.*, 2005). Assim sendo, os mastócitos de roedores são divididos em dois subtipos: i) mastócitos de tecido conjuntivo ou maduros, encontrados na pele, coração, timo e cavidades celomáticas, e ii) mastócitos do tipo mucoso ou imaturos, encontrados no trato intestinal e pulmão. A tabela 1 resume as diferenças entre estas duas populações, que compreendem tamanho, conteúdo de histamina e proteoglicanas, sendo esta última a responsável pela distinção na coloração entre as duas populações. Além destas características os subtipos apresentam diferenças na responsividade a vários segretagogos, bem como na inibição por drogas (Galli, Nakae *et al.*, 2005). Em relação à dependência de fatores, estudos com camundongos depletados de genes responsáveis pela síntese de IL-3 ou usando anticorpos neutralizantes para esta citocina, revelaram a importância da mesma no desenvolvimento da população de mastócitos de tecido mucoso. Nestas mesmas situações o número de mastócitos do tecido conjuntivo não foi influenciado (Madden, Urban *et al.*, 1991). Por outro lado, a perda da função do receptor para SCF, presente em camundongos W/W^V, ou a falha na produção desse fator, presente em camundongos Sl/Sld, resulta na ausência de ambas as populações mastocitária. É bem

estabelecido que os dois subtipos de mastócitos dependem da atividade do SCF, e que o subtipo mucoso depende, ainda, de fatores derivados de células T (Galli, Nakae *et al.*, 2005).

Os mastócitos respondem a uma grande variedade de estímulos que compreende desde ativação dependente de receptores como de imunoglobulina específica (IgE), FcεRI, receptores do sistema complemento, também por receptores do tipo Toll (“Toll-like receptor”) e as outras vias independentes de receptores como ionóforo de cálcio (Galli, Nakae *et al.*, 2005). Alguns autores preferem simplificar e dividir a ativação de mastócitos como dependente ou independente de FcεRI (Kalesnikoff e Galli, 2008). Na primeira situação, a ativação dos mastócitos pode ser iniciada após a interação de um antígeno (alergeno) com seu anticorpo específico (IgE), fixado a superfície da membrana celular através de seu receptor FcεRI. A ligação cruzada (“cross-link”) da IgE promovida pela interação do alergeno com a porção Fab da molécula inicia a ativação dos mastócitos através de uma cascata de sinalização que passa por tirosina quinases, incluindo membros Lyn e Syk, e que ao término resulta na liberação de mediadores. Em relação à ativação não imunológica, um grande número de substâncias pode induzir a desgranulação mastocitária, dentre estas encontram-se os neuropeptídeos (ex.: substância P), compostos básicos (ex.: mastoparam e composto 48/80) e algumas drogas como opiáceos (Galli, 1993). Os processos bioquímicos que conduzem à desgranulação promovida por essas substâncias diferem do estímulo imunológico, e também possuem variações entre elas, mas a grande maioria promove sua ativação por via dependente de proteína G inibitória (Gi), uma via sem relevância na ativação imunológica. Resumidamente, após ativação da proteína Gi por secretagogos básicos, ocorre a estimulação da fosfolipase Cβ (PLCβ) com posterior aumento de cálcio intracelular e subsequente exocitose dos grânulos mastocitários. Por outro lado, grande número dos processos que induzem a exocitose e a desgranulação mastocitária passa por pontos comuns, como a dependência de íons de cálcio, ainda que estimulado através de diferentes vias (figura 1) (Metcalf, Baram *et al.*, 1997; Ferry, Brehin *et al.*, 2002).

Tabela 1. Características dos subtipos de mastócitos de roedores.

Características	Conjuntivo	Mucoso
Tamanho	10 - 20µm	5 – 10 µm
Coloração	Safranina	Azul de alcian
Dependência de célulasT	Não	Sim
Conteúdo de proteases	Quimase (RMCP-1), Carboxipeptidase	Quimase (RMCP-2), Carboxipeptidase
Proteoglicanas	Heparina	Sulfato de condroitina
Histamina	10 –20 pg/célula	1 pg/célula
Serotonina	1 – 2 pg/célula	< 0,5 pg/célula
PGD2	+	+
LTC4	-	++
Ativados por:		
FcεRI	Sim	Sim
C48/80 ou polimixina B	Sim	Não
Substância P	Sim	Não
Inibição por cromoglicato de sódio	Sim	Não

Adaptado de Metcalfe e col. (1997).

A ativação mastocitária pode induzir a liberação de diferentes mediadores inflamatórios. Alguns, estocados em grânulos citoplasmáticos específicos, podem ser liberados em poucos minutos e incluem as aminas vasoativas (histamina e serotonina), triptases e colagenase, e estão mais associados com eventos iniciais da inflamação. Outros são neo-sintetizados como mediadores lipídicos, prostaglandinas e leucotrienos, e podem ser associados à fase inicial e intermediária. Além destes mediadores, os mastócitos são capazes de liberar uma gama de citocinas que possui grande potencial na fase tardia da inflamação e de remodelamento tecidual, a exemplo temos IL-1, IL-13, FGF, TNF- α e TGF- β (Metcalfe, 2008).

A participação dos mastócitos em processos inflamatórios foi evidenciada já em 1949, quando foi detectada a presença de hiperplasia mastocitária em um caso de urticária pigmentosa (Ellis, 1949; Austin e Brocklehurst, 1961; Orange, Valentine *et al.*, 1968). Atualmente, os mastócitos, em virtude do grande número de mediadores que estão aptos a

liberar, são reconhecidos como células efetoras na reação inflamatória associada à hipersensibilidade imediata. Além disso, existem evidências de que essas células poderiam participar de inúmeras patologias associadas ou não a hipersensibilidade, assim como em doenças autoimunes, neoplasias e também na fibrose (Metcalf, Baram *et al.*, 1997). Frente à relação entre mastócitos e SCF, muito se discute sobre a importância do SCF para manutenção e progressão de quadros patológicos envolvendo os mastócitos. Isto devido ao fato de que este fator interfere não somente com pontos vitais destas células, mas também induz a liberação de alguns dos mediadores citados anteriormente (Tkaczyk, Horejsi *et al.*, 2004; Metcalfe, 2008).

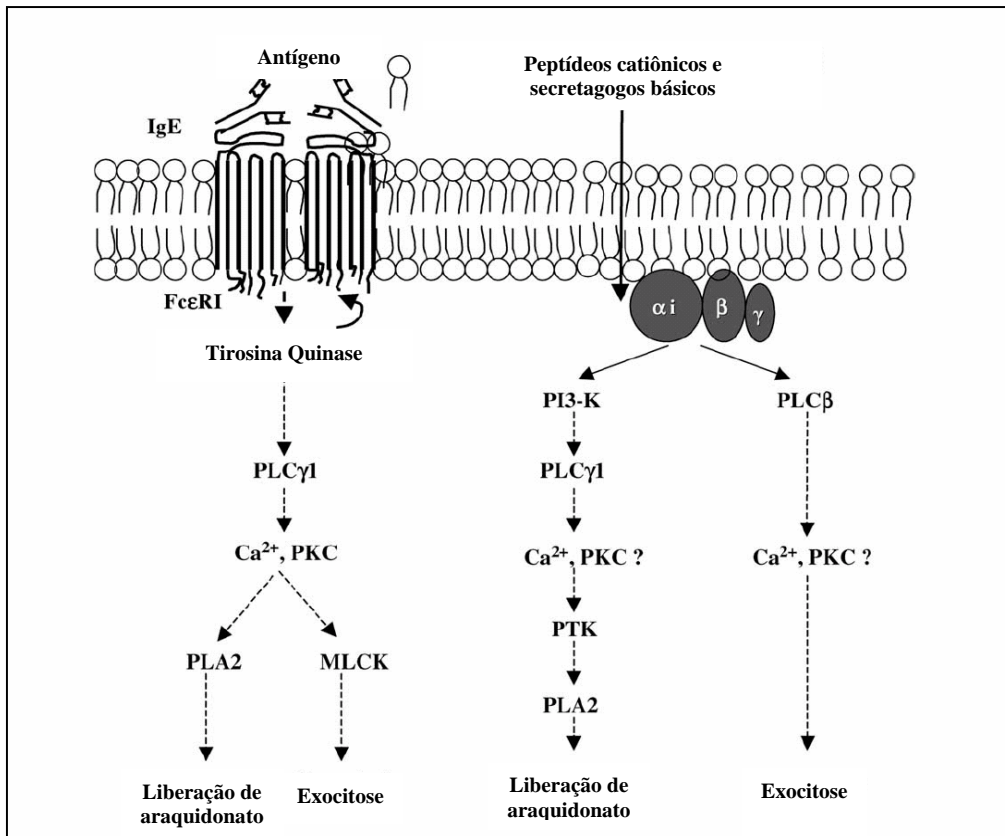


Figura 1: Principais vias de ativação de mastócitos. Adaptado de Ferry e col. (2002)

1.3.1 MASTÓCITOS x SCF

O SCF, também conhecido como ligante do c-kit, é expresso em duas formas solúvel (sSCF) ou ligada a membrana (mSCF). Exerce sua atividade celular após ligar-se ao receptor c-kit (CD 117), que possui um domínio intrínseco com proteína tirosina quinase na região citoplasmática. A produção deste fator foi detectada em vários tipos celulares que compreendem células endoteliais, epiteliais, musculares, macrófagos, fibroblastos, eosinófilos e inclusive os mastócitos. O SCF exerce função relevante na hematopoiese, porém já é amplamente caracterizado que este fator está intimamente relacionado à biologia dos mastócitos (Lukacs, Strieter *et al.*, 1996; Hogaboam, Kunkel *et al.*, 1998; Kassel, Schmidlin *et al.*, 1999; Mierke, Ballmaier *et al.*, 2000; Hartman, Piliponsky *et al.*, 2001; Da Silva e Frossard, 2005; Metcalfe, 2008)

Neste sentido, é consenso que os mastócitos são células diferenciadas e que em todas as etapas do processo de maturação dependem de um único fator, o SCF, ao passo que boa parte das células diferenciadas depende de diferentes fatores. Sabemos também que os mastócitos mantêm expressos os receptores c-kit ao longo de toda diferenciação, além de mantê-los até a finalização do processo. Por outro lado, outras células de origem hematopoiética quando completam sua diferenciação reduzem a expressão de c-kit e passam a depender de fatores de crescimento linhagem específico (Williams, Eisenman *et al.*, 1990; Metcalfe, Baram *et al.*, 1997).

Além da produção de SCF por diferentes tipos de células, incluindo células estruturais, a ampla expressão de receptores c-kit em mastócitos permite que o SCF seja capaz de interferir com a proliferação, sobrevivência, migração, adesão, alteração fenotípica, ativação e bem como a já mencionada diferenciação celular (Hogaboam, Kunkel *et al.*, 1998; Metcalfe, 2008; Yamada, Sanchez-Aguilera *et al.*, 2008).

No que se refere à proliferação *in vitro*, já foi demonstrado que a ativação de c-kit culmina em uma cascata de sinalização que envolve quinases do tipo Src (como Fyn) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), e que a inibição destas proteínas resulta na completa inibição da proliferação de mastócitos induzida por SCF. Além disso, a sinalização através da PI3K e quinases do tipo Src converge para a ativação de Rac e da quinase n-terminal c-Jun (JNK), sendo ainda observado que o tratamento com wortmanina inibe a ativação de JNK induzida por c-kit, confirmando que a ativação de PI3K precede a via da JNK (Kirshenbaum, Goff *et al.*, 1992; Timokhina, Kissel *et al.*, 1998).

A sobrevivência da população mastocitária também é influenciada pela via SCF/c-kit. Foi evidenciado que a presença de SCF impede a apoptose espontânea de mastócitos *in vitro*, e

que a inibição da produção de SCF *in vivo* favorece a apoptose de mastócitos teciduais (Mekori, Oh *et al.*, 1993; Iemura, Tsai *et al.*, 1994; Finotto, Mekori *et al.*, 1997). Pelo menos em parte, o efeito antiapoptótico do SCF sobre os mastócitos pode ser favorecido pelo aumento na expressão de proteínas capazes de favorecer a sobrevivência celular, dentre elas as proteínas Bcl-2 e Bcl-X_L. Ainda neste sentido, foi demonstrado que a síntese destas proteínas, induzidas por SCF é dependente do fator de transcrição de sinais e ativador de transcrição 5 (Stat-5) (Mekori, Gilfillan *et al.*, 2001; Baghestanian, Jordan *et al.*, 2002; Shelburne, McCoy *et al.*, 2003).

Outro fenômeno influenciado pela atividade do SCF é a migração de mastócitos, tendo sido estabelecido que esta atividade é exercida frente a fosforilação de tirosina associada ao c-kit. Também foi demonstrado o envolvimento de PI3K e fosfolipase γ , como evento posterior à fosforilação de resíduos de tirosina associados ao c-kit (Ronnstrand, 2004; Roskoski, 2005; Samayawardhena e Pallen, 2008). Foi evidenciado que a migração mastocitária requer uma reorganização do citoesqueleto, mais especificamente dos filamentos de actina. Neste contexto, foi descrito que SCF contribui para a formação destes filamentos, sendo para tanto necessária a ativação de proteína quinase p-38 ativada por mitógenos (p38 MAPK) (Jeong, Na *et al.*, 2003; Simon, Dondi *et al.*, 2008). Um evento que precede a migração mastocitária *in vivo* é a adesão celular. Neste contexto, foi demonstrado que o SCF, em evento dependente de PI3K e MAPK, favorece a adesão de mastócitos a componentes da matriz extracelular. Isto é possível visto que os mastócitos expressam receptores de superfície da família das integrinas que por sua vez medeiam o processo de adesão celular a componentes da matriz extracelular como laminina, fibronectina e variados tipos de colágeno (Lorentz, Schuppan *et al.*, 2002).

Desde 1991, foi descrito que mastócitos com características de fenótipo mucoso, podem, em presença de SCF, sofrer alterações fenotípicas, marcadas por um aumento na síntese de histamina e heparina, sendo reativos para safranina e passando a ser caracterizados como do tipo conjuntivo (Tsai, Takeishi *et al.*, 1991). Em paralelo, já é bem descrito que além de todos efeitos anteriormente citados, o SCF pode atuar sobre a população de mastócitos induzindo a liberação de citocinas e promovendo a desgranulação destas células (Tkaczyk, Horejsi *et al.*, 2004).

1.3.2. MASTÓCITOS NO CONTEXTO DA FIBROSE

Várias linhas de evidências sugerem que os mastócitos podem participar de processos fibróticos. Em 1995, foi demonstrada a participação destas células em um processo de fibrose presente no quadro de escleroderma em camundongos, quando ficou evidenciada uma

redução da fibrose associada à depleção mastocitária (Everett, Pablos *et al.*, 1995). Este fato encontrou respaldo nos achados que demonstraram a capacidade de um inibidor de quimases de mastócitos em suprimir o desenvolvimento do escleroderma em camundongos (Shiota, Kakizoe *et al.*, 2005). Também foi descrita a associação entre o aumento da população de mastócitos e o processo fibrótico desenvolvido no coração, em modelos experimentais, bem como em casos de fibrose hepática em humanos (Matsunaga, Kawasaki *et al.*, 1999; Hara, Ono *et al.*, 2002; Akgul, Youker *et al.*, 2005).

Em relação à fibrose pulmonar, foi demonstrada a associação de mastócitos com o desenvolvimento de fibrose em modelo de alergia crônica com repetida exposição ao alérgeno. Nesta condição, foi detectado um aumento no número de mastócitos em paralelo com a progressão da fibrose peribrônquica, quadro ausente em animais depletados de mastócitos (Yu, Tsai *et al.*, 2006). O quadro de hiperplasia mastocitária também foi demonstrado ter função relevante em modelos de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, quando foi proposta a contribuição dos mastócitos, pelo menos em parte, associada à liberação de quimases (Tomimori, Muto *et al.*, 2003). Além destes dois exemplos, os mastócitos foram identificados como participantes do desenvolvimento da fibrose pulmonar na silicose, uma vez que recentes estudos constataram aumento do número de mastócitos em área de remodelamento pulmonar de pacientes com silicose. Além disso, animais depletados de mastócitos falharam em desenvolver fibrose pulmonar após exposição a partículas de sílica (Brown, Swindle *et al.*, 2006; Delgado, Parra *et al.*, 2006).

Várias são as substâncias liberadas pelos mastócitos que teriam potencial fibrogênico, e que fazem parte das especulações acerca da contribuição dos mastócitos para o desenvolvimento do processo de fibrose. Dentre estas, a histamina apresentou capacidade de induzir proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, sendo esse mesmo tipo de atividade comum à heparina (Yamashita, Nakagomi *et al.*, 1992; Kunzmann, Schmidt-Weber *et al.*, 2007; Murota, Bae *et al.*, 2008). Outra substância também estocada nos grânulos, a triptase, foi capaz de induzir a proliferação de fibroblastos *in vitro* (Kondo, Kagami *et al.*, 2001). Mais ainda, os mastócitos podem liberar uma ampla gama de citocinas com atividade fibrogênica, nestas estão inclusas IL-4, IL-13, TNF- α , TGF- β e FGF. Outra possibilidade seria uma contribuição direta dos mastócitos para o processo de fibrose através da potencialidade destas células em produzir glicoproteínas de matriz extracelular (Metcalf, Baram *et al.*, 1997). Apesar de muitos dos mediadores produzidos pelos mastócitos serem liberados independentemente do processo de desgranulação, alguns estudos sugerem relação direta

entre a desgranulação dos mastócitos e a evolução do quadro de fibrose (Palaniyandi Selvaraj, Watanabe *et al.*, 2005).

Assim, considerando o acima exposto fica claro que mais estudos se fazem necessários para elucidação acerca dos mecanismos implicados no processo de contribuição dos mastócitos para a resposta fibrótica associada ao quadro da silicose.

2. OBJETIVOS

No presente trabalho tivemos como objetivo geral avaliar o comportamento da população mastocitária no quadro de fibrose pulmonar induzida por sílica em camundongos, bem como investigar a interação mastócitos-fibroblastos na condição de estimulação com sílica. Para tanto, mediante a utilização do modelo de silicose experimental em camundongos, foram investigados os seguintes pontos:

- i) cinética de alterações (número e característica fenotípica) da população mastocitária pulmonar bem como a correlação destas com a resposta fibrótica na condição da silicose;
- ii) cinética de expressão de SCF no tecido pulmonar de camundongos silicóticos;
- iii) processo de sinalização envolvido na ativação de mastócitos murinos derivados de medula óssea frente à estimulação com sílica *in vitro*;
- iv) interação entre mastócitos e fibroblastos pulmonares na condição de ativação por sílica *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss Webster e BALB/c machos, pesando entre 18 e 20 gramas, mantidos em ciclo de claro/escuro de 12 horas, e com acesso livre à ração e água. Os animais utilizados foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz e todos os procedimentos experimentais estavam de acordo com normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ (CEUA-FIOCRUZ, código número P0213/04).

3.2. Indução da Silicose

Após anestesia com halotano, foi induzida silicose em camundongos Swiss Webster, através de única instilação nasal de 10 mg de sílica suspensa em 50 µL de solução salina estéril (0,9 %). O grupo de animais em que foi instilada somente solução salina estéril, e submetido a condições experimentais similares, foi utilizado como controle negativo.

3.3. Análise Histológica

Para obtenção dos pulmões foi realizada perfusão, por meio de uma cânula intracardiaca, com solução de salina e heparina 20 UI/mL. Em seguida os mesmos foram perfundidos e mantidos em solução fixadora de Carnoy durante 6 horas e depois transferidos para solução de etanol a 70 %. Após 48 horas, os pulmões foram processados em soluções de concentrações crescentes de etanol e clarificados em xileno, para posterior inclusão em parafina. Foram realizados cortes histológicos de 4 µm de espessura, os quais foram submetidos a um processo de desparafinização em xileno seguido de hidratação em concentrações decrescentes de álcool. Os mesmos foram submetidos à coloração com hematoxilina-eosina, Picro-Sírius e azul de alcian/safranina para análise da estrutura do tecido pulmonar, deposição de colágeno e identificação de mastócitos, respectivamente.

3.3.1. Análise Morfométrica

Para a análise morfométrica foi utilizado o sistema teste M42 que utiliza um conjunto de linhas e pontos que ficam superpostos à imagem morfológica (Mandarim-De-Lacerda,

2003). A característica deste sistema-teste compreende 21 linhas-teste (L_T , 21d), e dois pontos-teste em cada extremidade (P_p , 42 ponto-teste total). As imagens foram obtidas mediante uso microscópio de luz (Olympus BX 50) acoplado a uma vídeo-câmera (Optronics Engineering, DEI-750). Assim sendo, para determinar a porcentagem de área ocupada por granulomas em animais silicóticos, foram analisados 50 campos em um aumento de 400X, e utilizada a seguinte fórmula:

Densidade de volume (V_V):
$$V_V (\%) = (P_P/P_T) \cdot 100$$

P_P = ao número de pontos contados sobre a área granulomatosa

P_T = ao número total de pontos-teste.

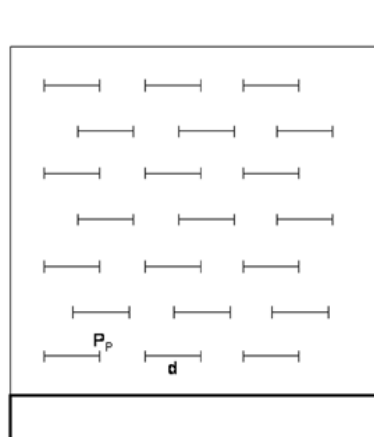


Figura 3: Modelo de Sistema M42. (Mandarim-De-Lacerda, 2003)

3.3.2. Imunohistoquímica

Após desparafinização e hidratação, os cortes foram submetidos a um processo de recuperação antigênica por solução 3M de uréia durante 15 minutos. Posterior a uma hidratação por 10 minutos em tampão tris-salina (TBS) com pH 7,6 os cortes foram incubados por 10 minutos com solução de H_2O_2 (3%) para bloqueio de peroxidase endógena. Em seguida, os tecidos foram submetidos a uma solução de albumina bovina (BSA) 2% em Tris-HCl de pH 7,6 por 20 minutos. Após lavagem por 5 minutos com TBS, os cortes foram incubados por 12 horas com o anticorpo primário diluído 1:100 em solução de BSA 1% em Tris-HCl. Tecidos incubados somente com solução de BSA 1% em Tris-HCl foram utilizados como controle negativo. Passado o período de incubação, os cortes foram novamente lavados com TBS e então receberam anticorpo secundário conjugado com peroxidase, diluído 1:80 em Tris-HCl por 1 hora. Após nova lavagem foi feita revelação aplicando o substrato H_2O_2 em associação com o revelador aminoetilcarbazol (AEC) por 8 minutos, seguido de montagem

em meio aquoso de gelatina – glicerina. Foram utilizados os seguintes anticorpos: IgG policlonal de cabra anti-SCF murino, e anticorpos secundários anti-IgG de cabra, acoplados com peroxidase. As imagens foram obtidas usando um microscópio de luz (Olympus BX 50) que estava acoplado a uma vídeo-câmera (Optronics Engineering, DEI-750). As análises quantitativas foram realizadas através do software analisador de imagens, Image Pro-Plus 4. Níveis de SCF foram estimados por densitometria, (pixels)/ μm^2 .

3.4. Diferenciação de Mastócitos da Medula Óssea

Após sacrifício em câmara de CO_2 , foram retiradas as duas tíbias e os dois fêmures de camundongos BALB/c, sendo cada cavidade óssea lavada com 5 mL de meio RPMI suplementando com 20 % de soro fetal bovino (SBF), em seguida todo volume obtido foi homogeneizado com auxílio de pipeta Pasteur. O lavado foi centrifugado a $277 \times g$ durante 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 40 mL de meio (70% RPMI suplementado + 30% meio condicionado de WEHI). As células foram repassadas uma vez por semana, sendo ajustadas, após a primeira semana, para 5×10^5 células/mL. Após quatro semanas as células foram identificadas através de coloração com Giemsa e azul de toluidina, sendo detectados mais de 95% de mastócitos.

3.5. Ativação de Mastócitos.

Mastócitos, na concentração de 8×10^5 cél/mL em meio RPMI foram adicionados a placa de 24 poços e em seguida estimulados com meio ou sílica (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Um grupo de células recebeu somente meio e o outro foi estimulado com sílica (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 90 minutos, a 37 °C em estufa com 5% de CO_2 . O sobrenadante foi recolhido, filtrado em membrana de 0,22 μm e armazenado para posterior uso.

3.6. Quantificação de β -hexosaminidase

Para quantificação de β -hexosaminidase foram utilizados $1,25 \times 10^5$ mastócitos ressuspensos em 90 μL de solução tyrode gelatina, aos quais foram acrescidos 10 μL de estímulo e incubação a 37 °C, por períodos de tempo que variaram de acordo com o estímulo em questão. Na seqüência, foi realizada centrifugação a $300 \times g$ por 5 minutos, recolhimento do sobrenadante e adição de 100 μL de tyrode gelatina ao “pellet” (decantado) celular. Após

intensa homogeneização foram realizados três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e banho a 37 °C, respectivamente, com vistas à indução de lise celular e conseqüente liberação da β -hexosaminidase residual. Em seguida, o material foi centrifugado a 15000 x g por 5 minutos e sobrenadante recolhido. Foram adicionados a placa de 96 poços, 10 μ L do sobrenadante antes e depois da lise celular, seguidos de 40 μ L do substrato p-nitrofenil-B-D.2acetamido-2-deoxi-glicopiranosídeo (4 mM). Após incubação por 20 minutos a 37 °C, foram adicionados 150 μ L da solução de glicina e realizada leitura colorimétrica através de espectrofotômetro em comprimento de onda de 405nm. Os resultados foram expressos em percentual com base na seguinte fórmula $[(\beta\text{-hexosaminidase liberada}) \times 100] / \beta\text{-hexosaminidase total liberada}$. Considerando como β -hexosaminidase total liberada a soma dos valores obtidos no pellet e no sobrenadante.

3.7. Cultura de Fibroblastos Pulmonares

Camundongos Swiss Webster foram sacrificados através de injeção de dose letal de barbitúrico, e os pulmões submetidos a perfusão por meio de uma cânula intracardiaca com 20 mL de solução salina tamponada (BSS). O pulmão foi então retirado, os lobos separados e dissociados com auxílio de tesoura. Posteriormente, os fragmentos foram incubados em solução de colagenase 1A (1 mg/mL em meio Dulbecco`s) por 20 minutos em estufa a 37 °C, sob agitação a cada 20 minutos. Após 1 hora de incubação foram adicionados 15 mL de BSS, recolhido o sobrenadante e adicionados 5 mL de solução de colagenase 1 A (1 mg/mL em meio Dulbecco`s) para digestão, sendo realizada incubação por mais 1 hora. Após repetição deste processo a suspensão celular obtida nas duas horas de digestão tecidual foi centrifugada a 277 x g por 10 minutos. Após lavagem, as células foram ressuspensas em 24 mL de meio Dulbecco`s suplementado, divididas em duas garrafas de cultura (75 cm²), que foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. Ao atingir confluência, as células foram desaderidas com auxílio de solução de tripsina (0,125 %), e repassadas para outras garrafas (1x10⁶ células/75 cm²). Após três semanas, as células foram identificadas através de imunocitoquímica utilizando como marcador α -actina, sendo detectado mais de 95% de miofibroblastos.

3.8. Ensaio de Produção e Reparo de Lesão em Cultura de Fibroblastos Pulmonares *in vitro*.

Os fibroblastos pulmonares foram adicionados à placa de 24 poços (1,25 x 10⁵ células/poço) em meio RPMI suplementado com SBF (10%), e incubados em estufa com 5% de CO₂, a 37 °C, por 24 horas. Após este período, foi produzida uma lesão central na monocamada de células com o auxílio de um “scraper”, criando assim três áreas distintas: 1) uma área rica em células, 2) uma marcada borda denominada “linha de lesão”, 3) uma área livre de células denominada de “lesão” (adaptado da técnica descrita por Levi-Schaffer, F. et al, 1990). Imediatamente após a produção da lesão, as culturas de miofibroblastos pulmonares foram incubadas com 250 µL de meio RPMI livre de SBF e mais 250µl de sobrenadante obtido de mastócitos estimulados com meio ou com sílica, por 24 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. O grupo controle recebeu 500 µL de meio RPMI livre de SBF.

3.9. Soluções, Corantes e Meios de Cultura

3.9.1. Solução Fixadora de Carnoy

. Álcool absoluto	60 mL
. Clorofórmio	30 mL
. Ácido acético	10 mL

3.9.2. Solução de TBS

. Cloreto de sódio 0,85%	90 mL
. Tris-HCl 0,05 M pH 7,6	10 mL

3.9.3. Meio RPMI Suplementado

. RPMI	10,4 g
. Bicarbonato de sódio	2 g
. Piruvato de sódio	10 mL
. β-mercapto	1 mL
. Penicilina	2 x 10 ⁵ Ui
. Estreptomicina	200 mg
. L-Glutamina	10 mL
. SBF	200 mL
. Água destilada	1 L
Ajustado o pH para 7,2	

3.9.4. Solução de Tyrode Gelatina

. Cloreto de sódio	137,0 mM
. Cloreto de potássio	2,7 mM
. Cloreto de cálcio	1,8 mM
. Cloreto de magnésio	0,5 mM
. Bicarbonato de sódio	11,9 mM
. Fosfato de sódio	0,42 mM
. Glicose	5,5 mM
. Gelatina	0,1 %
Ajustado o pH para 7,0	

3.9.5. Substrato para Enzima β -hexosaminidase

. Fosfato de sódio	0,2 M
. Ácido cítrico	0,4 M
. p-nitrofenil-B-D.2acetamido-2-deoxi-glicopiranosídeo	4 mM
Ajustado o pH para 4,5	

3.9.6. Solução de Glicina

- Glicina	0,2 M
- Ajustado o pH para 10,7	

3.9.7. Solução de BSS

Sol A	50 mL
Sol B	50 mL
Sol C	50 mL
Sol D	2,5 mL
Água destilada	850 mL
Ajustado o pH para 7,4	

. Solução A	
Cloreto de sódio	80 g
Cloreto de potássio	4 g
Fosfato de potássio	1,5 g
Fosfato de sódio	1,55 g
Água destilada	500 mL

. Solução B	
Sulfato de magnésio	1,54 g
Cloreto de cálcio	0,12 g
Água destilada	500 mL

. Solução C	
Glicose	11g
Água destilada	500 mL

. Solução D

Vermelho de Fenol	0,5 g
Água destilada	500 mL
Ajustado o pH para 7,4	

3.9.8. Meio Dulbecco`s Suplementado

. Dulbecco`s	10 g
. Bicarbonato de sódio	2,2 g
. Hepes	2,0 g
. Água destilada	1 L
. Penicilina	2 x 10 ⁵ Ui
. Estreptomicina	200 mg
. SBF	100 mL
Ajustado o pH para 7,2	

3.9.9. Solução de Tripsina

. Tripsina	0,125 g
. EDTA	0,02 g
. PBS 1X	100 mL
Ajustado o pH para 7,8	

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da Instilação de Sílica na Estrutura e Composição Tecidual Pulmonar

Através da análise histopatológica pela coloração com hematoxilina-eosina (H&E), verificamos que os animais instilados com salina apresentaram, em todos os tempos analisados (7, 14 e 28 dias), total integridade da estrutura pulmonar (figura: 4.1.1. A). No entanto, os pulmões de animais intranasalmente instilados com sílica apresentaram, em 7 dias, um intenso processo inflamatório caracterizado por infiltrado leucocitário composto principalmente por macrófagos e neutrófilos. Nesse mesmo tempo observou-se claramente a formação de pequenos granulomas distribuídos no parênquima pulmonar dos animais silicóticos (Fig.: 4.1.1. B). Este quadro manteve-se em 14 dias (Fig.: 4.1.1. C), porém a análise realizada em 28 dias revelou uma piora no quadro de comprometimento pulmonar, marcado por um aumento na área granulomatosa, evidenciando-se também coalescência dos granulomas (Fig.: 4.1.1. D). Através da análise morfométrica confirmamos a ocorrência de resposta fibrótica progressiva, representada pelo aumento da área granulomatosa nos pulmões de animais silicóticos no período entre 7 a 28 dias (Fig.: 4.1.1. E). Mediante uso da coloração com picro-sírius, específica para colágeno, notamos que os pulmões dos animais controles apresentaram uma deposição basal de colágeno de forma predominante nas regiões peribrônquica e perivascular (Fig.: 4.1.2. A), em condições nas quais os animais silicóticos de 7 dias apresentaram um claro aumento na deposição de colágeno nas áreas de granuloma (Fig.: 4.1.2. B). O processo de deposição de colágeno ficou mantido por 14 dias (Fig.: 4.1.2. C), e claramente aumentado 28 dias após exposição a sílica (Fig.: 4.1.2. D), de forma paralela à progressão da área granulomatosa, caracterizando, assim, a instalação do quadro clássico de fibrose pulmonar.

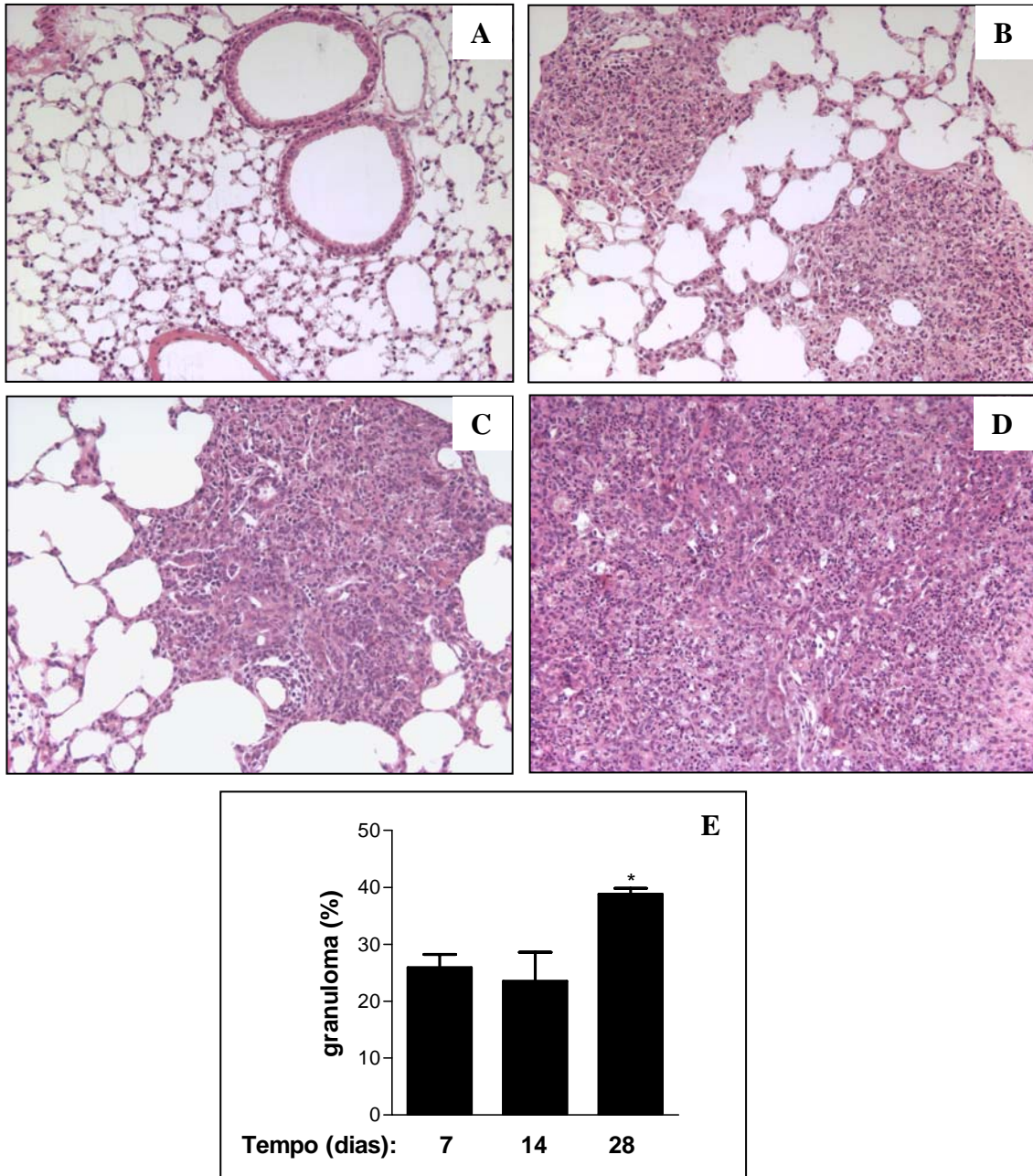


Figura 4.1.1. - Análise histopatológica das alterações no tecido pulmonar 7, 14 e 28 dias após a instilação nasal de 10 mg de sílica. Foram realizados cortes com 4 μ m de espessura, corados com H&E e avaliados em microscópio de luz. O grupo de animais controles está apresentado no painel A, já os animais silicóticos estão representados nos painéis B (silicóticos 7 dias), C (silicóticos 14 dias) e D (silicóticos 28 dias). O resultado quantitativo obtido por análise morfométrica está representado no painel E. * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos de animais silicóticos de 7 e 14 dias. As imagens foram obtidas em aumento de 200X.

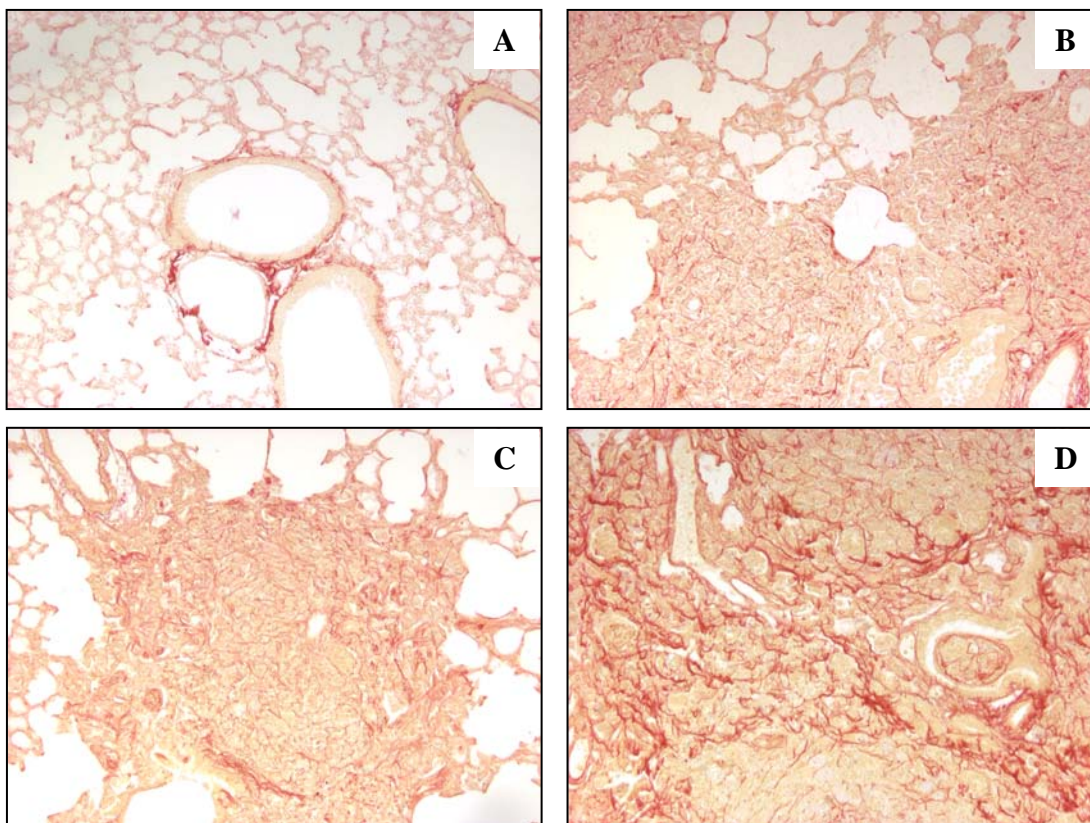


Figura 4.1.2. - Análise histopatológica da deposição de colágeno no tecido pulmonar 7, 14 e 28 dias após a instilação nasal de 10 mg de sílica. Foram realizados cortes com 4 μ m de espessura, corados com picro-sírius avaliados em microscópio de luz. O grupo de animais controles está representado no painel A e os animais silicóticos estão representados nos painéis B (7 dias), C (14 dias) e D (28 dias). As imagens foram obtidas em aumento de 200X.

4.2. Análise da População de Mastócitos nos Pulmões de Camundongos Silicóticos

Através da coloração com azul de alcian/safranina, foi possível verificar que em comparação com o verificado no grupo dos animais controles (Fig.: 4.2.1. A), o número de mastócitos mostrou-se elevado no pulmão de camundongos expostos à sílica, conforme exemplificado nos cortes de tecido de pulmão de animais no 28º dia após exposição à sílica (figuras 4.2.1. B, C e D). Nos pulmões de animais que receberam somente salina, notamos que os mastócitos mostraram-se localizados principalmente na região peribrônquica, enquanto que no caso dos animais silicóticos estas células apresentaram-se mais amplamente distribuídas, incluindo a região peribrônquica (Fig.: 4.2.1. B), região de granulomas (Fig.: 4.2.1. C) e principalmente as áreas de fibrose (Fig.: 4.2.1. D). Além disso, vale ressaltar que de forma marcante, foi observada uma mudança no fenótipo dos mastócitos na condição da silicose. Nos animais controles os mastócitos mostram-se em sua totalidade do subtipo mucoso (marcado pelo azul de alcian) e nos animais silicóticos, os mastócitos apresentaram em sua maioria coloração avermelhada (marcado pela safranina), caracterizando o subtipo conjuntivo. A análise de cinética de alteração na população mastocitária revelou que o aumento no número de mastócitos pode ser evidenciado a partir do 14º dia, acompanhando temporalmente o perfil de formação do quadro de fibrose pulmonar, com resposta máxima sendo detectada em 28 dias (Fig.: 4.2.2.).

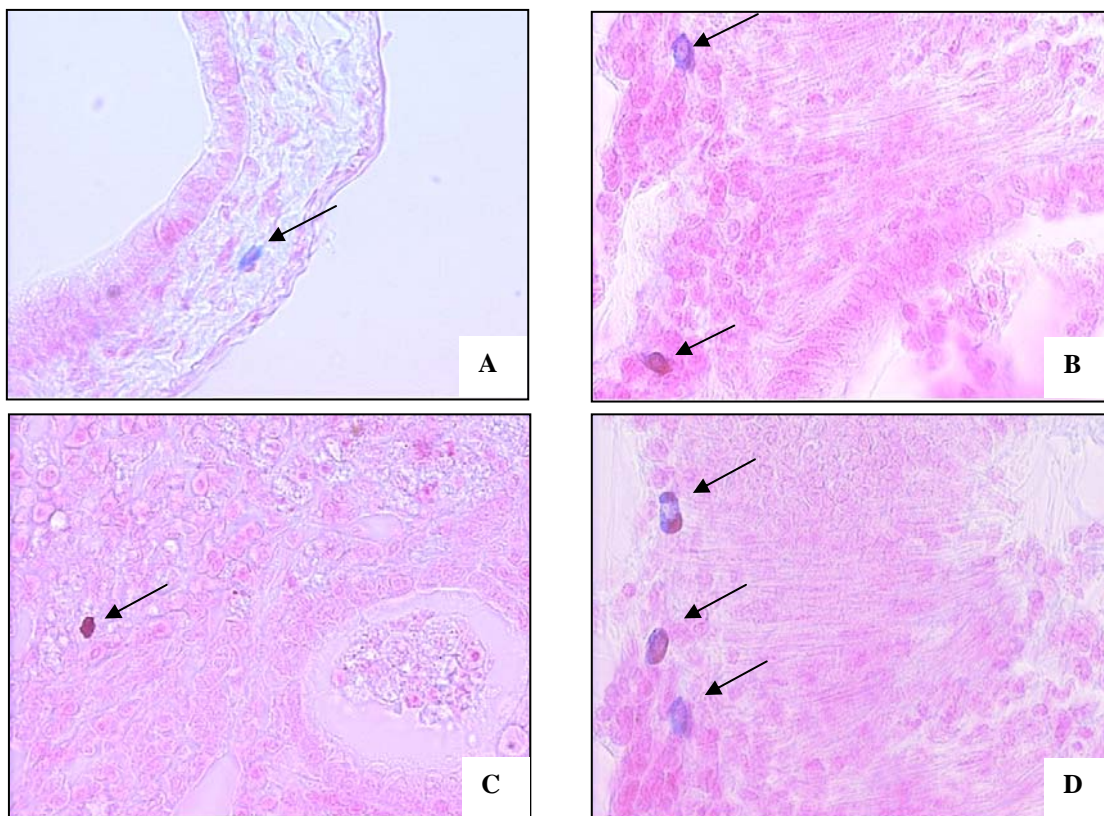


Figura 4.2.1. - Análise da população de mastócitos presente no tecido pulmonar, 28 dias após a instilação nasal de 10 mg de sílica. Foram realizados cortes com 4 μ m de espessura, corados com Azul de Alcian & Safranina e avaliados em microscópio de luz. O grupo de animais controles está representado no painel A, e os dos animais silicóticos estão representados nos painéis B (peribrônquico), C (intranodular) e D (fibrose). As imagens foram obtidas em aumento de 1000X.

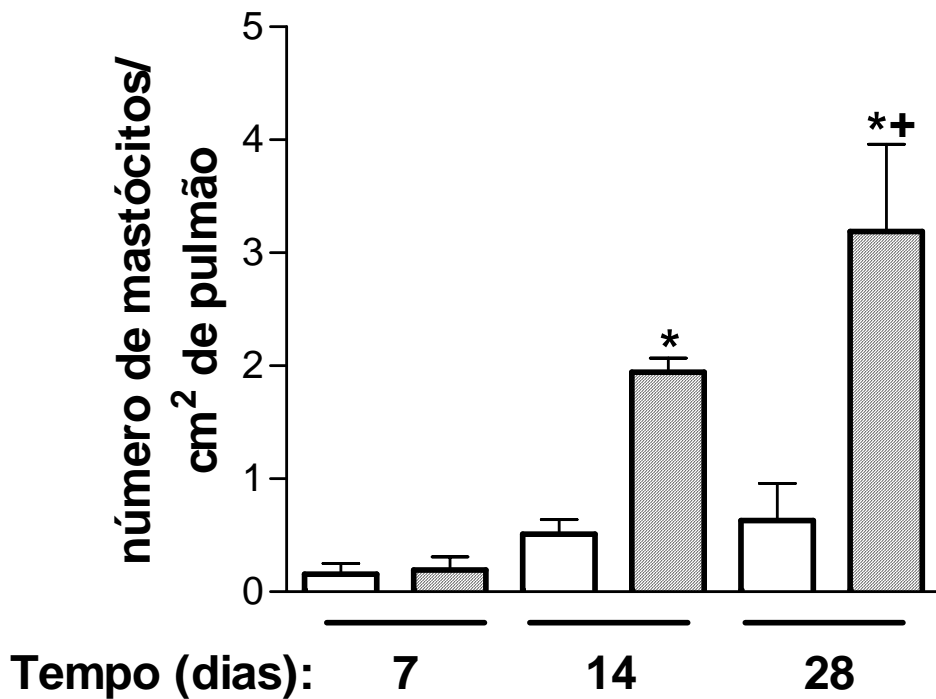


Figura 4.2.2. - Análise da cinética de alteração no número de mastócitos presente no tecido pulmonar 7, 14 e 28 dias após instilação de sílica. Foram realizados cortes com 4 μ m de espessura, corados com azul de alcian/safranina, e os mastócitos contados em microscópio de luz. Os grupos de animais controles estão representados pelas barras brancas e os grupos de animais silicóticos estão representados pelas barras hachuradas. * $p < 0,05$ quando comparado aos animais do grupo controle. + $p < 0,05$ quando comparado aos animais do grupo silicótico de 14 dias.

4.3. Expressão de SCF no Tecido Pulmonar de Animais Silicóticos

Através da técnica de imunohistoquímica, avaliamos no tecido pulmonar a expressão de SCF, fator relacionado com a migração e sobrevivência de mastócitos (Meininger, Yano *et al.*, 1992; Iemura, Tsai *et al.*, 1994). Na figura 4.3.1. A, está representada a marcação para SCF em pulmão de animais que receberam somente instilação de salina, quando observou-se a presença de cor marrom localizada principalmente nas células do epitélio brônquico. Por outro lado, quando feita a mesma marcação no tecido pulmonar de animais após 7 dias de instilação de sílica, observou-se presença de marcação mais difusa de SCF, principalmente na região correspondente ao intenso infiltrado inflamatório (Fig.: 4.3.1. B), fenômeno este que se mostrou mantido 14 dias após instilação de sílica (Fig.: 4.3.1. C). Porém quando foram observados cortes do tecido pulmonar 28 dias após exposição dos animais à sílica foi possível notar uma intensa marcação para SCF localizada na região granulomatosa (Fig.: 4.3.1. D).

Quando realizada uma análise quantitativa da expressão de SCF no tecido pulmonar, utilizando técnica de quantificação de pixels através do software Image-Pro Plus 4, nitidamente notamos que a produção de SCF mostrou-se aumentada após 7 dias de instilação de sílica, e que esta ocorreu de forma paralela ao processo de progressão da resposta fibrótica, aumentando ainda mais no tempo de 28 dias. Estes resultados claramente indicam que a produção de SCF ocorre precedendo a elevação no número de mastócitos pulmonares nos animais silicóticos (Fig.: 4.3.2.).

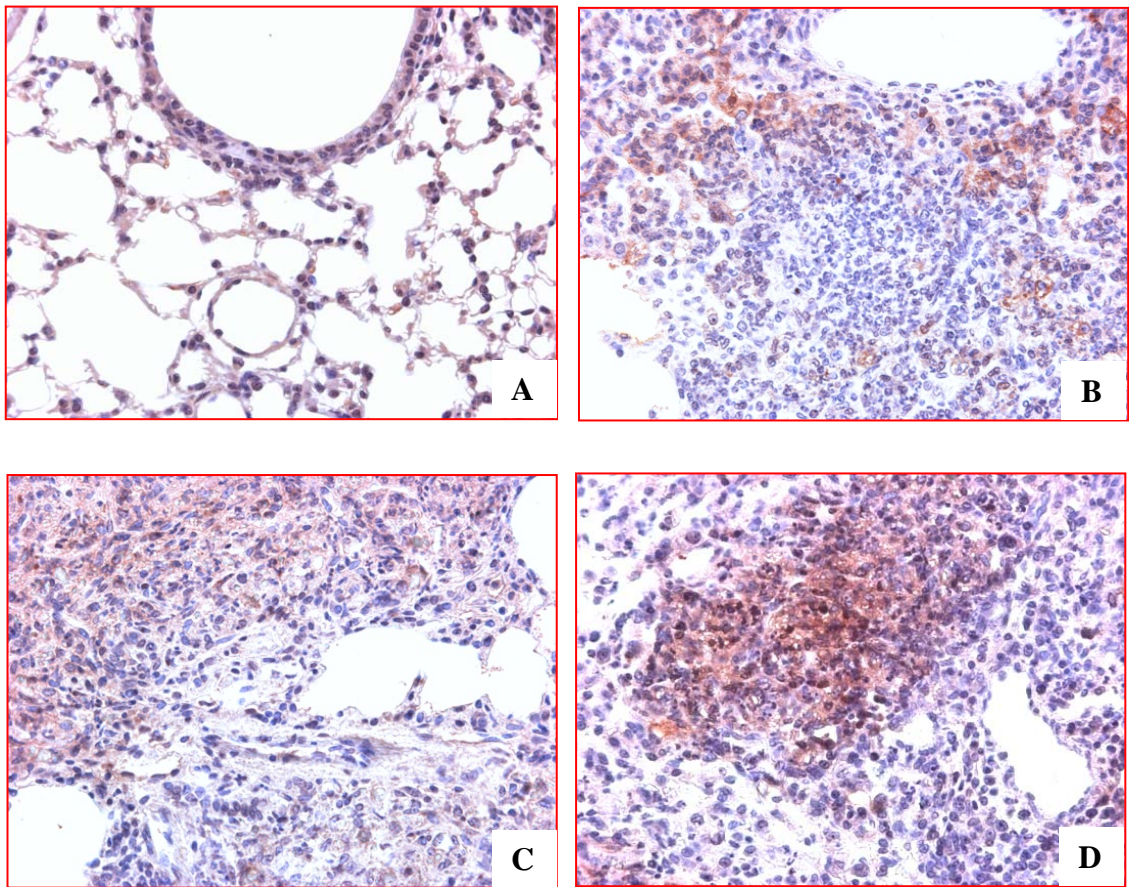


Figura 4.3.1. - Análise da expressão de SCF no tecido pulmonar de camundongos, através da técnica de imunohistoquímica e posterior avaliação em microscópio de luz. A marcação para SCF no pulmão de animais do grupo controle está representada no painel A, e no caso dos animais dos grupos silicóticos está representada nos painéis B (7 dias), C (14 dias) e D (28 dias). As imagens foram obtidas em aumento de 600X.

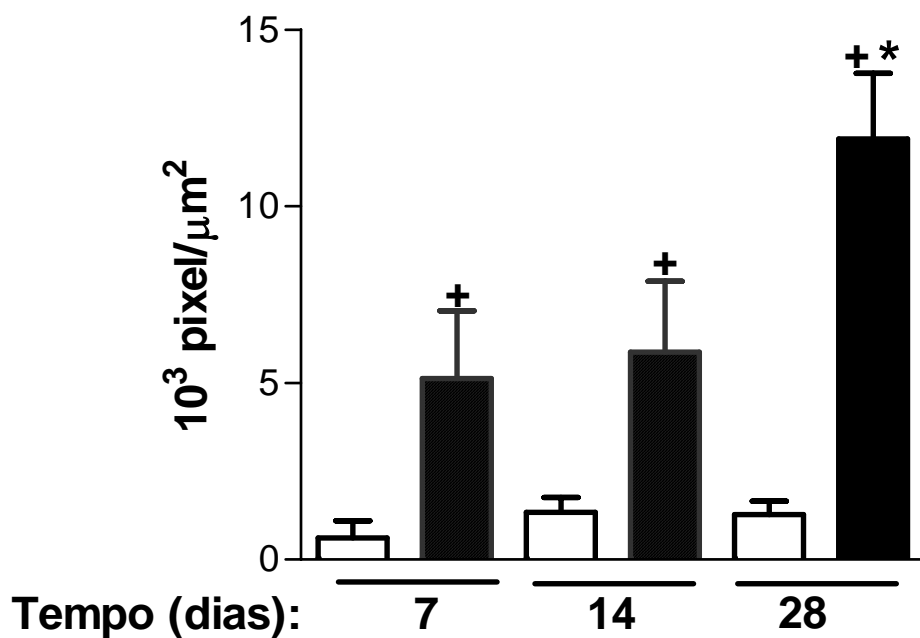


Figura 4.3.2. - Análise quantitativa da expressão de SCF no tecido pulmonar de camundongos, feita pela quantificação de pixels, através do software Image-Pro Plus 4. A quantificação da marcação para SCF no pulmão de animais do grupo controle está representada pela barra branca e no caso dos animais dos grupos silicóticos está representada pelas barras hachuradas. + $p < 0,05$ quando comparado aos animais do grupo controle. * $p < 0,05$ quando comparado aos animais do grupo silicótico de 14 dias.

4.4. Efeito da Sílica sobre Mastócitos de Camundongos *in vitro*

Para estudos acerca da avaliação do efeito da sílica sobre mastócitos, fizemos utilização de mastócitos diferenciados a partir de células de medula óssea cultivadas mediante contato com sobrenadante de células WEHI, utilizado como fonte de IL-3. Estas células após 4 semanas apresentaram características fenotípicas de mastócitos do tipo mucoso (dados não mostrados). Após 90 minutos de incubação a 37 °C na presença de sílica, em concentrações que variaram de 0,03 a 1 mg/mL, foi possível verificar uma resposta de desgranulação mastocitária, atestada através da liberação da enzima β -hexosaminidase, que se mostrou de forma concentração-dependente, sendo detectado resposta máxima com a concentração de 1 mg/mL. Nesta condição a resposta foi de intensidade equiparada àquela do composto ativador clássico de mastócitos, o ionóforo de cálcio - A 23187 (Fig.: 4.4. A). Analisando-se, ainda, a cinética da resposta mastocitária frente à estimulação com sílica, observamos que a desgranulação dos mastócitos iniciou-se com 60 minutos, sendo detectado aumento ainda maior no tempo de 90 minutos (Fig.: 4.4. B). Com base nestes resultados, escolhemos a concentração de 0,3 mg/mL para utilização nos ensaios posteriores, aquela que apresentou efeito intermediário porém significativo.

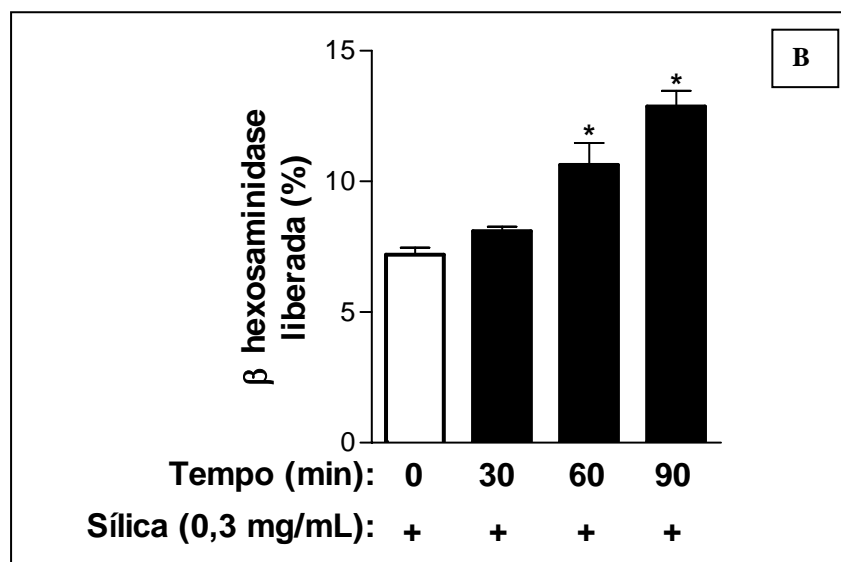
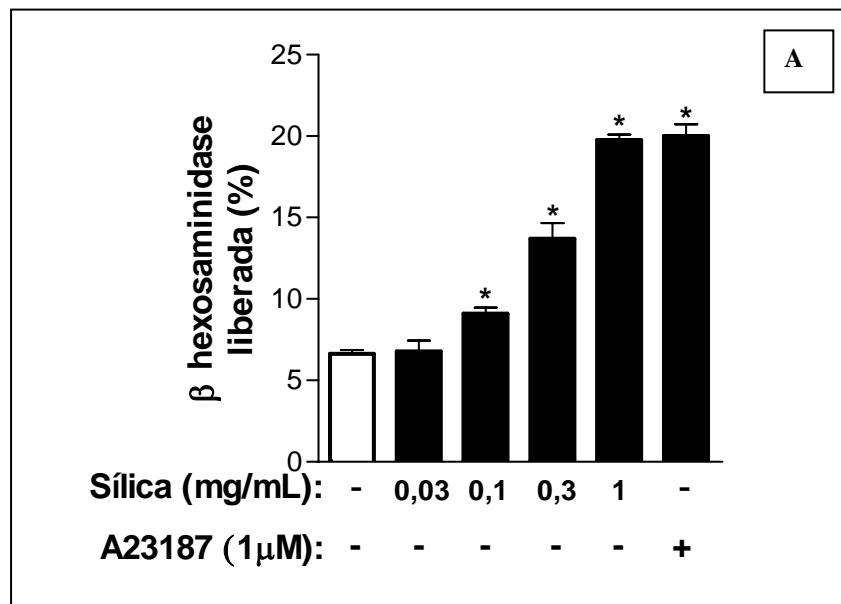


Figura 4.4. – Análise dose-resposta e cinética de ativação de mastócitos induzida por sílica *in vitro*. A parte A mostra a curva dose-resposta do efeito da incubação dos mastócitos com sílica 0,03 – 1 mg/mL por 90 minutos. Na parte B os mastócitos foram incubados com sílica (0,3 mg/mL) por um período que variou de 0 a 90 minutos. Na parte A, * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não estimulado. Na parte B, * significa $p < 0,05$ quando comparado ao tempo zero.

4.5. Efeito da Depleção de Ca^{++} Externo e da Baixa Temperatura na Desgranulação Mastocitária Induzida por Sílica

Quando os mastócitos foram estimulados com sílica por 90 minutos à temperatura de 37 °C, foi possível observar uma significativa resposta de desgranulação quando comparado à das células na ausência deste estímulo. Por outro lado, na condição de 4 °C a sílica foi incapaz de promover desgranulação quando realizada incubação por igual período de tempo (Fig.: 4.5.1.). Além disso, a desgranulação mastocitária induzida por sílica foi em grande parte dependente de íons de Ca^{++} externo. Conforme pode ser observado na figura 6.5.2., a sílica induziu a desgranulação quando incubada em meio contendo Ca^{++} , porém teve sua atividade inibida, em aproximadamente 80%, na condição de ausência de Ca^{++} extracelular.

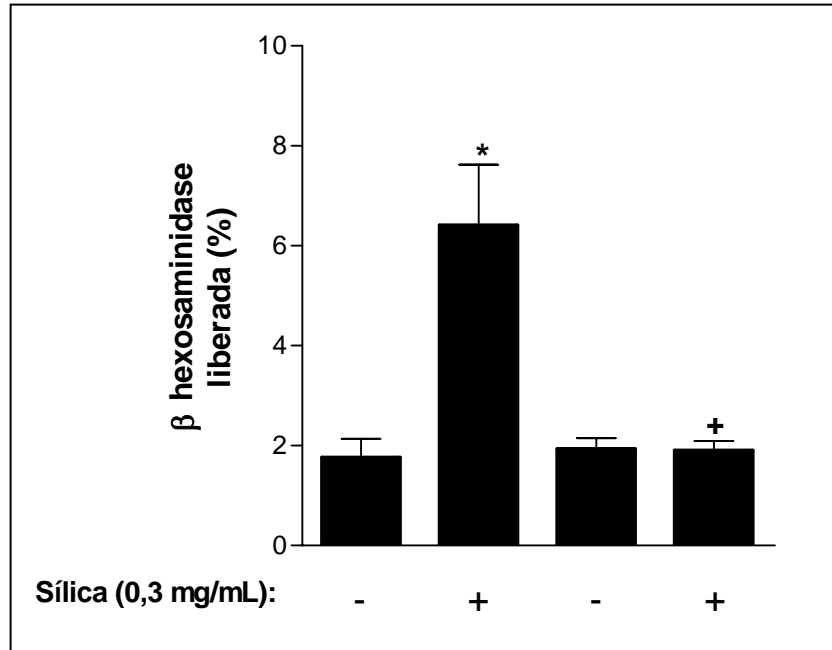


Figura 4.5.1. - Efeito da baixa temperatura na desgranulação mastocitária induzida por sílica. Exposição à sílica (300 µg/mL) por 90 min a 37 °C promoveu desgranulação de mastócitos derivados de medula (barra hachurada), mas não quando estimulados a 4 °C (barra preta). * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não estimulado e na mesma temperatura; + indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo estimulado com sílica a 37 °C.

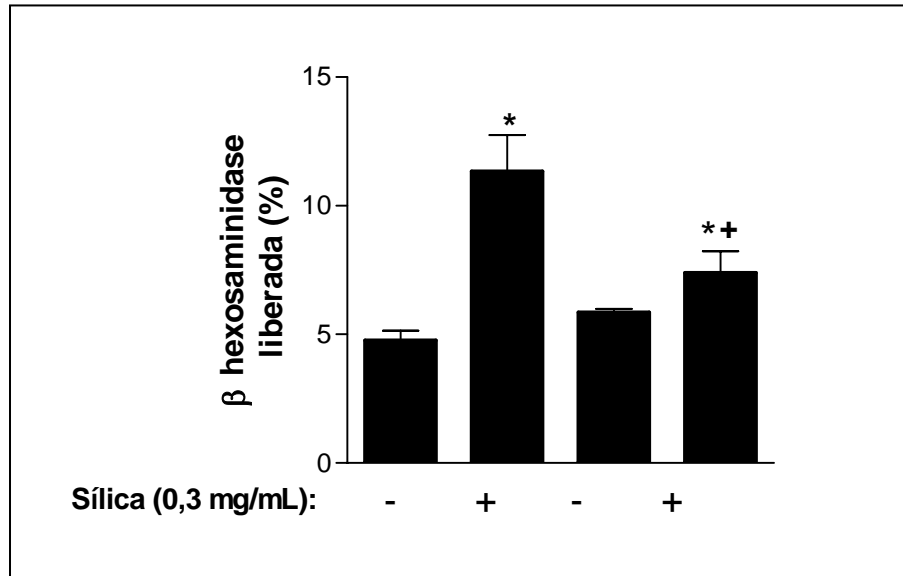


Figura 4.5.2. - Efeito da depleção de Ca^{++} externo na desgranulação mastocitária induzida por sílica. Exposição à sílica (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 90 min a 37 °C promoveu desgranulação de mastócitos derivados de medula na presença de Ca^{++} extracelular (barra hachureada), mas sua atividade é inibida ($\pm 80\%$) na ausência de Ca^{++} (barra preta). * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não estimulado sob mesmas condições; + indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo estimulado com sílica na presença de cálcio externo.

4.6. Avaliação do Processo de Sinalização Envolvido na Ativação de Mastócitos por Partículas de Sílica

Recentes estudos têm demonstrado que a desgranulação de mastócitos derivados de medula induzida por estímulos não imunológicos é, em parte, dependente da ativação de PI₃K através da proteína G_i (Gilfillan e Tkaczyk, 2006). Na figura 6.6.1. pode ser observado que a pré-incubação dos mastócitos, por 2 horas, com um inativador de proteína G_i, toxina pertussis (450 ng/mL), ou com o inibidor de PI₃K, wortmanina (50 nM), por 30 minutos, preveniram a desgranulação mastocitária induzida pelas partículas de sílica.

Também foi descrita a possibilidade de uma sinalização via proteína G, independente e paralela a que envolve a PI₃K, sendo a via PKC uma destas opções. Para verificar, se essa via paralela poderia estar envolvida na sinalização associada à estimulação por sílica, analisamos o efeito do pré-tratamento dos mastócitos com o inibidor de PKC, calfofostina C. A figura 4.6.2. ilustra claramente que o composto em ambas as concentrações testadas foi capaz de inibir a desgranulação induzida por sílica.

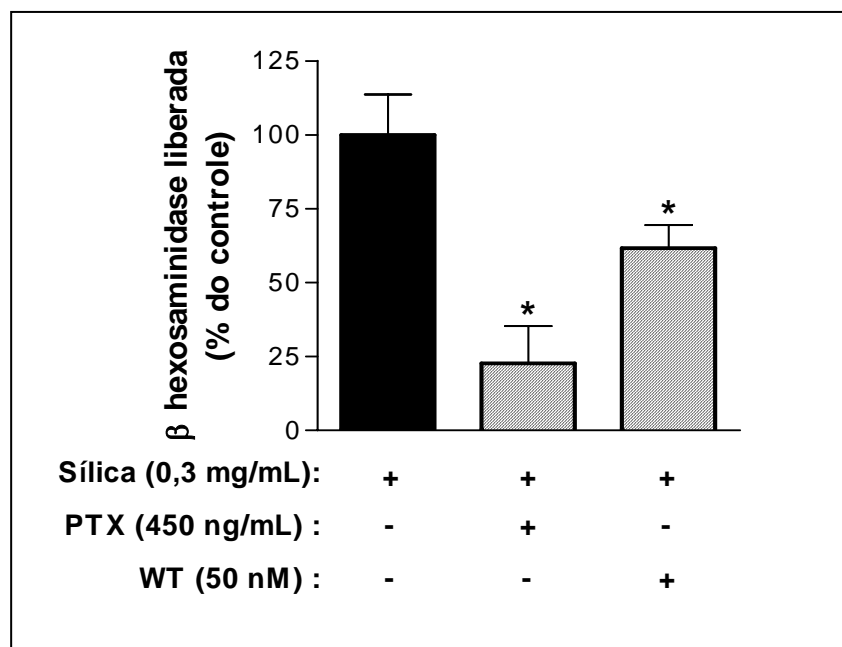


Figura 4.6.1. - Avaliação da participação de PI3 κ e proteína Gi no processo de sinalização envolvido na ativação de mastócitos por partículas de sílica. Desgranulação mastocitária induzida por sílica foi sensível ao pré-tratamento com inibidor de proteína Gi, toxina pertussis (PTX), e inibidor de PI₃K, wortmanina (WT). As células foram pré-incubadas com PTX (450 ng/mL) por 2 horas, ou com WT (50 nM) por 30 minutos e, posteriormente, estimuladas com sílica (300 μ g/mL) por 90 minutos. Os resultados foram expressos como porcentagem de liberação da enzima β -hexosaminidase. Sendo a liberação induzida por sílica na ausência de tratamento, menos a liberação espontânea, considerada 100%. Os resultados são a média \pm EPM, e representativo de três experimentos diferentes. * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não tratado.

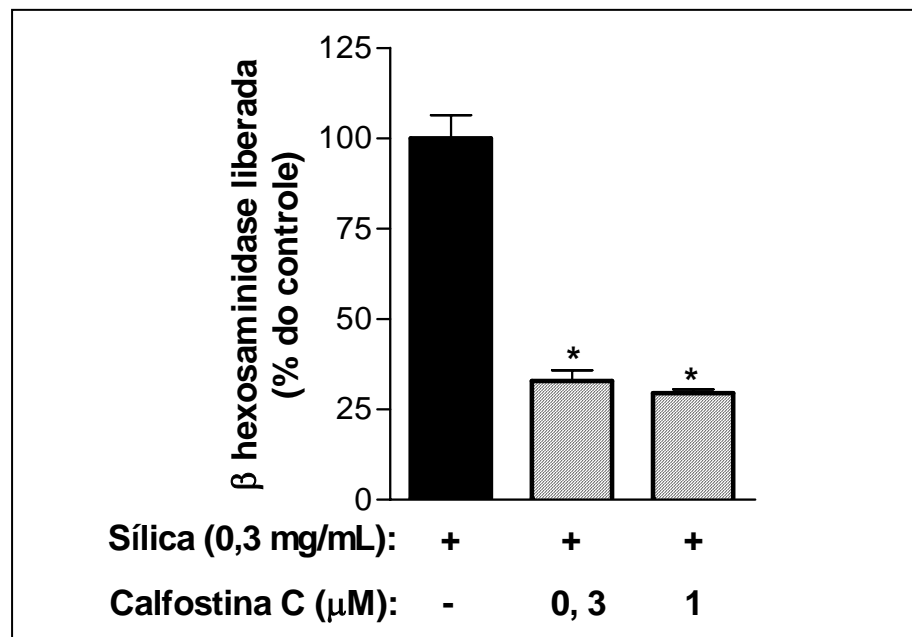


Figura 4.6.2. - Avaliação da participação da via PKC no processo de sinalização envolvido na ativação de mastócitos por partículas de sílica. Desgranulação mastocitária induzida por sílica foi sensível ao pré-tratamento com inibidor de PKC, calyculina C (0,3 e 1 μ M). As células foram pré-tratadas por 1 hora, e posteriormente estimuladas com sílica (300 μ g/mL) por 90 minutos. Os resultados foram expressos como porcentagem de liberação da enzima β -hexosaminidase. Sendo a liberação induzida por sílica na ausência de tratamento, menos a liberação espontânea, considerada 100%. Os resultados são a média \pm EPM, e representativo de três experimentos diferentes. * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não tratado.

4.7. Efeito do Sobrenadante de Mastócitos Estimulados por Sílica sobre Fibroblastos Pulmonares

Na tentativa de esclarecer de que forma os mastócitos poderiam contribuir para evolução do quando de fibrose presente na silicose, avaliamos o efeito do sobrenadante de mastócitos estimulados por sílica sobre fibroblastos para tanto utilizando um modelo de reparo *in vitro*. Na figura 4.7. (painéis A, B, C) é possível notar claramente a existência de uma área lesionada no tempo zero. No tempo de 24 horas, na presença apenas de meio, observou-se a ocupação da área lesionada por uma pequena quantidade de células, evidenciada pelo número de células que tocam ou ultrapassam a linha utilizada para demarcação (painel 4.7. D). Por outro lado, verificamos que quando os fibroblastos foram incubados com o sobrenadante proveniente de mastócitos estimulados apenas com meio, ocorreu uma maior ocupação da área lesionada (painel 4.7. E). Este fenômeno mostrou-se ainda mais intenso, no caso de incubação das células com sobrenadante de mastócitos estimulados por sílica, quando uma grande quantidade de células tocava ou ultrapassava a linha de marcação (painel 4.7. F).

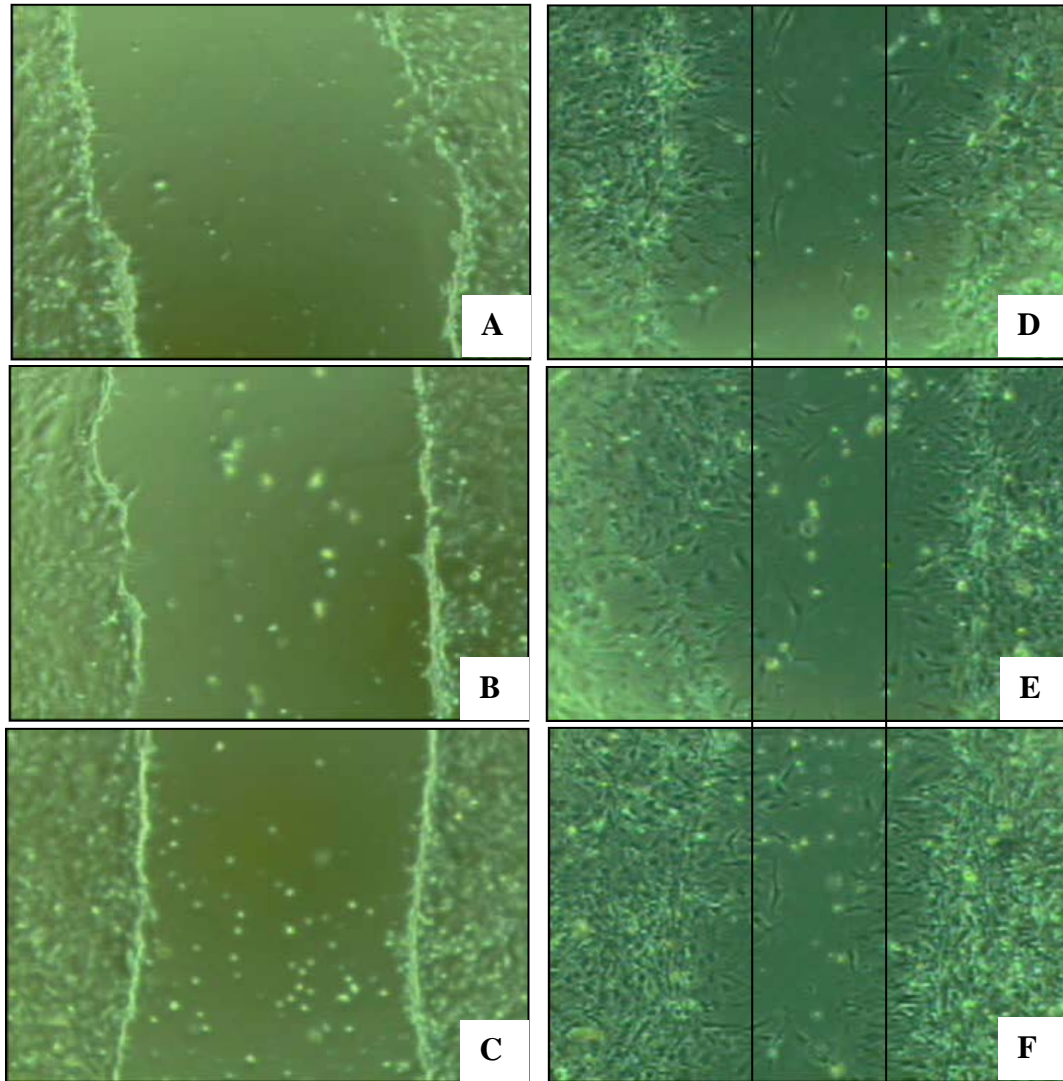


Figura 4.7.– Análise do efeito do sobrenadante obtido de mastócitos estimulados com sílica (300 $\mu\text{g/mL}$) sobre fibroblastos pulmonares *in vitro*. Nos painéis à esquerda e à direita estão representadas as áreas lesionadas após o período de 1 e 24 horas respectivamente. Os painéis A e D são representativos da incubação com meio, B e E incubação com sobrenadante de mastócitos estimulados com meio, já em C e F incubação com sobrenadante de mastócitos estimulados com sílica. As imagens foram obtidas em aumento 100 X.

5. DISCUSSÃO

Dados da literatura demonstram que a fibrose pulmonar é um componente característico da silicose, além de indicarem a existência de uma associação entre mastócitos e a resposta fibrótica (Suzuki, Horiuchi *et al.*, 1993; Brown, Swindle *et al.*, 2006). Com base nestas premissas, no presente trabalho tivemos como objetivo avaliar potenciais alterações na população mastocitária presente nos pulmões de camundongos silicóticos, bem como investigar a potencial interação entre estas células e fibroblastos na condição de estimulação pela sílica. Em nosso modelo experimental de silicose, observamos que 7 dias após uma única instilação nasal de 10 mg de sílica, os animais apresentaram intenso infiltrado leucocitário pulmonar, caracterizado pela presença de macrófagos e neutrófilos, acompanhado da formação inicial de granulomas. Estes mostraram-se constituídos em boa parte, por colágeno além de outros componentes de matriz extracelular como fibronectina (dados não mostrados), sendo este momento caracterizado como de fase aguda. Demonstramos, ainda que este processo mantém-se por 14 dias, porém claramente mais intenso com 28 dias, quando foi evidenciado um processo de fibrose exacerbado e marcado aumento da área granulomatosa. Estudos prévios desenhados para o estabelecimento de modelos experimentais de silicose em camundongos compararam a evolução dos componentes inflamatório e fibrótico utilizando diferentes cepas. Foram identificadas diferenças na intensidade da resposta inflamatória e fibrótica entre as várias cepas testadas, ficando evidente que todas elas, em maior ou menor intensidade, apresentaram uma evolução do quadro de fibrose pulmonar que se mostrou tempo-dependente (Callis, Sohnle *et al.*, 1985).

Vários trabalhos têm associado o aumento no número de mastócitos teciduais à evolução de diferentes quadros de fibrose, conforme observado em órgãos como rins, pele e fígado (Hamada, Vallyathan *et al.*, 2000; Wang, Tedla *et al.*, 2005; Sakamoto-Ihara, Suzuki *et al.*, 2007; Welker, Kramer *et al.*, 2008). Dentro deste contexto, após termos caracterizado a evolução da fibrose pulmonar em camundongos Swiss-Webster tornados silicóticos, realizamos uma análise da população de mastócitos presente nos pulmões destes animais nos três diferentes tempos. Não observamos nenhuma alteração na população de mastócitos após 7 dias, porém detectamos um quadro de hiperplasia mastocitária a partir de 14 dias, que se mostrou ainda mais intenso 28 dias após instilação de sílica. Além disso, notamos que cerca de 80% do perfil dos mastócitos presentes nos pulmões dos animais silicóticos apresentaram-se do subtipo conjuntivo. Isto pode ser evidenciado através da visualização de células apresentando coloração avermelhada, típica da marcação por safranina, característica da reação do corante com proteoglicanas como a heparina presente nos grânulos de mastócitos

conjuntivos. Estes dados encontram respaldo em dados de literatura que verificaram a possibilidade de mudança de fenótipo no caso de mastócitos maduros. Foi evidenciado que em sistema de co-cultura de fibroblastos com mastócitos do subtipo mucoso, quando estes últimos alteraram seu fenótipo para do subtipo conjuntivo (Dayton, Pharr *et al.*, 1988). Uma vez que a fibrose é um processo marcante, podemos especular que o aumento verificado no número de fibroblastos ao nível do parênquima pulmonar poderia contribuir para alteração fenotípica dos mastócitos por nós evidenciada. Da mesma forma, foi demonstrado que o SCF apresenta a capacidade de promover uma troca de fenótipo em mastócitos, de forma que estes possam passar do subtipo mucoso para o conjuntivo (Karimi, Redegeld *et al.*, 2000).

Ao avaliarmos a expressão de SCF através de imunohistoquímica, demonstramos que ocorreu um aumento na expressão deste fator no tecido pulmonar de animais silicóticos, 7 dias após a instilação nasal de sílica, produção que se manteve com 14 dias, porém intensificando-se com 28 dias. O fato de haver aumento da expressão de SCF antecedendo a hiperplasia mastocitária, poderia auxiliar no esclarecimento acerca deste tal fenômeno, uma vez que o SCF é considerado como um dos fatores possuidores de marcada atividade quimiotática para mastócitos, podendo favorecer a migração destas células para o foco inflamatório silicótico. Mais ainda, o SCF é considerado como a citocina de maior importância para o controle de várias funções biológicas como proliferação, distribuição e diferenciação de mastócitos, principalmente do tipo conjuntivo. Dentro deste contexto foi também demonstrado que a estimulação de células progenitoras CD34⁺ com SCF promoveu a diferenciação de mastócitos e a proliferação destes, tendo ambos os processos mostrado-se dependentes de receptor c-kit (Takeuchi, Koike *et al.*, 2003). O SCF foi também capaz de inibir apoptose deste tipo celular (Meininger, Yano *et al.*, 1992; Nilsson, Butterfield *et al.*, 1994; Mekori e Metcalfe, 1995). Alguns casos de hiperplasia mastocitária foram descritos em associação ao SCF, quando ficou demonstrado que o bloqueio de receptores c-kit *in vivo*, impediu um quadro de mastocitose sistêmica em camundongos (Yamada, Sanchez-Aguilera *et al.*, 2008). Desta forma poderia-se especular que expressão pulmonar de SCF aumentada aos 28 dias da silicose, poderia estar, pelo menos em parte, associada à intensificação do fenômeno de fibrose, visto que, fibroblastos e miofibroblastos, são consideradas células responsáveis pela produção de SCF (Zhang, Howarth *et al.*, 1996; Kassel, Schmidlin *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos até o momento indicaram claramente que a resposta inicial de inflamação e fibrose precedeu o aumento no número de mastócitos pulmonares, que foi seguido pelo agravamento do quadro de fibrose induzido pela sílica. Evidenciamos, também, uma associação entre a expressão de SCF e o aumento no número de mastócitos. No entanto,

experimentos direcionados à neutralização do SCF fazem-se necessários de forma a permitir o esclarecimento acerca da correlação entre SCF e hiperplasia mastocitária na condição de silicose. Entretanto, vale mencionar que em dados preliminares verificamos que o tratamento com mesilato de imatinibe, um fármaco capaz de interferir negativamente com o processo de sinalização intracelular resultante da interação de SCF e seu receptor c-kit, foi capaz de inibir a hiperplasia mastocitária e a fibrose presente na silicose experimental. Estes achados reforçam a hipótese da implicação do SCF e de mastócitos no desenvolvimento da fibrose pulmonar induzida por sílica.

Alguns estudos têm proposto a associação entre o processo de desgranulação mastocitária e diferentes quadros de fibrose (Walker, Harley *et al.*, 1987; Shiota, Rysa *et al.*, 2003; Palaniyandi Selvaraj, Watanabe *et al.*, 2005). Na tentativa de obter evidências acerca dos mecanismos pelos quais os mastócitos poderiam contribuir para o processo fibrótico, inicialmente investigamos o efeito direto da sílica sobre mastócitos, que neste caso foram obtidos a partir de células de medula óssea de camundongos submetidas à estimulação com sobrenadante de WEHI, utilizado como fonte de IL-3. Para avaliar a resposta de ativação mastocitária, foi utilizado o ensaio de quantificação de β -hexosaminidase, uma enzima pré-formada presente nos grânulo de mastócitos, que é comumente empregada como marcador biológico de desgranulação. Nossos achados mostraram que a sílica foi capaz de promover a desgranulação mastocitária, de maneira concentração dependente, com efeito máximo observado a (1mg/mL). Esta concentração foi capaz de promover efeito de intensidade semelhante ao apresentado pelo desgranulador clássico de mastócitos, o composto ionóforo de cálcio (1 μ M). Vimos ainda, que a desgranulação induzida por sílica mostrou-se presente após 60 minutos, porém mais elevada no tempo de 90 minutos de incubação. O tempo necessário que a sílica inicie seu efeito indutor de desgranulação mastocitária não foi considerado curto quando comparado àquele observado no caso do uso de indutores de desgranulação independente da via imunológica. Como exemplo temos o composto 48/80, que em mastócitos do tipo conjuntivo mostrou ser capaz de promover a desgranulação em 5 minutos, bem como o ionóforo de cálcio que promoveu a extrusão dos grânulos em 10 minutos, e por último temos íons de prata que promoveram a desgranulação de mastócitos em 15 minutos (Razin e Marx, 1984; Jozaki, Kuriu *et al.*, 1990; Yoshimaru, Suzuki *et al.*, 2006; Sheen, Schleimer *et al.*, 2007). Observamos, ainda, que quando a estimulação dos mastócitos foi realizada a 4 °C não foi detectada resposta de desgranulação celular. Esses achados indicaram que o fenômeno de desgranulação induzida por sílica *in vitro* poderia ser dependente de sinalização bioquímica, requerendo temperatura ideal. Já foi demonstrado que a desgranulação de mastócitos, induzida por vários estímulos que ativam vias bioquímicas, só é

possível em temperaturas acima de 20 °C, mas não a 4 °C (Saito, Kurata *et al.*, 1990; Mio, Yabuta *et al.*, 1999).

A ativação mastocitária induzida por sílica foi parcialmente inibida pela exclusão de íons de Ca^{++} do meio extracelular, sugerindo dependência parcial de Ca^{++} extracelular. Esses achados encontram suporte em outros dados da literatura que mostraram que a grande maioria dos estímulos indutores da exocitose de grânulos dos mastócitos é dependente de cálcio extracelular (Suzuki, Yoshimaru *et al.*, 2002; Mitsutake, Kim *et al.*, 2004). Entretanto, observamos a existência de uma discreta ativação mastocitária na condição de ausência de cálcio extracelular. Neste sentido, trabalhos recentes mostraram que alguns estímulos são capazes de promover desgranulação mastocitária na ausência de cálcio extracelular (Sheen, Schleimer *et al.*, 2007). Desta forma, nossos achados vão ao encontro de relatos da literatura que indicam que o uso do agente quelante de cálcio EGTA impede parcialmente a desgranulação de mastócitos induzida por nitrato de prata, o que sugere o envolvimento de estoques intracelulares de cálcio na desgranulação mastocitária (Suzuki, Yoshimaru *et al.*, 2002).

Como próxima etapa, buscamos melhor entender as vias de sinalização envolvidas na ativação de mastócitos pela sílica. Demonstramos que o pré-tratamento das células com toxina pertussis inibiu a desgranulação de mastócitos induzida por sílica *in vitro*. A sensibilidade a inibidores de proteína G_i encontra respaldo em relatos indicativos de que agentes secretagogos clássicos de mastócitos induzem a exocitose através de subunidades de proteína G_i (Ferry, Eichwald *et al.*, 2001). O pré-tratamento das células com inibidor de PI_3K , wortimanina, também foi capaz de inibir a desgranulação mastocitária, indicando que, pelo menos em parte, a desgranulação provocada por sílica parece ser dependente da enzima PI_3K . De fato já foi demonstrado que a ativação de PI_3K resulta em acúmulo de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato na membrana plasmática, que age induzindo aumento nos níveis de Ca^{++} intracelular através da ativação da fosfolipase C, aumentando inositol 1,4,5-trifosfato e promovendo a liberação de Ca^{++} dos estoques intracelulares. Outra possibilidade a ser proposta é que o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato poderia agir nos canais de Ca^{++} ao nível de membrana celular (Zhong, Shlykov *et al.*, 2003). Embora não tenhamos investigado com mais detalhes qual a isoforma de PI_3K que estaria envolvida na desgranulação de mastócitos promovida por sílica, poderíamos propor que a $\text{PI}_3\text{K}\gamma$ seria uma forte candidata. A $\text{PI}_3\text{K}\gamma$ tem sido associada a processo de desgranulação mastocitária em associação com ativação de proteína G_i (Kim, Radinger *et al.*, 2008). Trabalhos recentes mostraram que a desgranulação de mastócitos foi parcialmente inibida em animais geneticamente depletados de $\text{PI}_3\text{K}\gamma$, e que

o uso de inibidor seletivo desta isoforma também foi capaz de promover efeito supressor semelhante (Ali, Camps *et al.*, 2008).

Além disso, nossos resultados sugerem o envolvimento de vias paralelas de sinalização intracelular, uma vez que o pré-tratamento de mastócitos com o inibidor PKC, calfofostina C, também foi capaz de inibir a desgranulação induzida por sílica. Dados da literatura reforçam nosso achado, uma vez que já foi demonstrado o envolvimento da proteína quinase C na resposta de exocitose de grânulos mastocitários (Buccione, Di Tullio *et al.*, 1994; Li, Lucas *et al.*, 2005; Peng e Beaven, 2005). Existem ainda relatos que indicam a existência de dez diferentes isoformas de PKC, dependentes e independentes de Ca^{++} , e que uma ou mais isoformas desta enzima podem estar envolvidas na desgranulação mastocitária (Steinberg, 2008).

Em conjunto, nossos achados indicam o envolvimento das enzimas PI_3K e PKC na ativação mastocitária pela sílica, indicando que há uma integração de múltiplas vias de sinalização intracelular no processo de desgranulação mastocitária (Gilfillan e Tkaczyk, 2006).

Por último, buscamos obter evidências indicativas de que a ativação mastocitária induzida por sílica poderia contribuir para o processo de fibrose pulmonar na silicose. Estudamos então a interação dos mastócitos com fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos normais, utilizando para tanto um sistema de remodelamento *in vitro*. Verificamos que incubação de fibroblastos com o sobrenadante de mastócitos previamente estimulados com meio produziu um discreto efeito, em contrapartida o sobrenadante de mastócitos estimulados com sílica foi capaz de promover uma ativação ainda mais intensa de fibroblastos pulmonares no modelo anteriormente citado. Dados da literatura apontam a utilização deste modelo como ferramenta importante no estudo acerca da proliferação de fibroblastos no contexto do remodelamento. Entretanto, não podemos descartar também a ocorrência de resposta de migração celular. Vários são os mediadores que podem ser liberados durante o processo de ativação mastocitária, e alguns destes poderiam apresentar atividade sobre fibroblastos. Foi demonstrado, em outro contexto, que o produto da ativação de mastócitos poderia aumentar a área de reparo neste sistema, mediante estimulação da migração e proliferação de fibroblastos (Levi-Schaffer e Kupietzky, 1990). Também já foi descrito que histamina em baixa concentração aumenta a produção de colágeno por fibroblastos derivados de pele humana (Hatamochi, Ueki *et al.*, 1991). Além disso, proteases presentes nos grânulos mastocitários mostraram-se aptas a atuarem como agentes efetores da fibrose, uma vez que o tratamento com inibidor de quimase mostrou-se eficaz em inibir a fibrose pulmonar induzida por bleomicina (Sakaguchi, Takai *et al.*, 2004). Ainda neste

contexto, a enzima triptase de mastócitos de humanos foi capaz de estimular a proliferação de fibroblastos *in vitro* (Frungieri, Weidinger *et al.*, 2002). Vale ressaltar, no entanto, que embora nosso sistema de ativação mastocitária estivesse baseado na resposta de desgranulação dos mastócitos, não se pode descartar que a ativação destas células culminaria com liberação de outros mediadores como citocinas. Dando suporte à esta proposição, Brown e col (2007) demonstraram que a ação da sílica sobre mastócitos derivados de medula induziu a liberação de TNF- α e IL-13, ambos com reconhecida atividade profibrótica. De forma contrária ao observado no presente estudo, os autores não observaram desgranulação mastocitária frente à sílica. Este fato poderia ser explicado através do uso de diferentes concentrações de sílica em ambos os estudos (Brown, Swindle *et al.*, 2006).

Nossos resultados em conjunto com dados da literatura, reforçam a idéia de que a hiperplasia mastocitária poderia favorecer uma maior interação entre mastócitos e fibroblastos pulmonares. Além disso, o aumento no número de mastócitos parece estar associado a níveis elevados de SCF e a interação com fibroblastos é intensificada após ativação dos mastócitos induzida por sílica. Neste sentido, parece racional especular que artifícios farmacológicos capazes de impedir a ativação de receptores c-kit ou com capacidade de impedir a ativação mastocitária poderiam ser alvos promissores em estudos voltados para a busca por tratamentos para a silicose.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que:

- Única exposição à sílica levou à ocorrência de um intenso infiltrado inflamatório, com formação de área granulomatosa e fibrose, fenômeno este que manteve presente em 14 dias, porém claramente exacerbado no tempo de 28 dias após a sílica;
- Em paralelo foi verificada uma elevação no número de mastócitos no tecido pulmonar dos animais silicóticos, máximo em 28 dias, que foi precedido por aumento na expressão de SCF;
- A incubação de mastócitos derivados a partir de medula óssea de camundongos com partículas de sílica promoveu a desgranulação desta célula por um mecanismo dependente de proteína Gi e das enzimas PI₃K e PKC;
- O sobrenadante obtido a partir de mastócitos foi capaz de exercer atividade sobre fibroblastos em um sistema de remodelamento *in vitro*, fenômeno este que se mostrou mais intenso na condição de ativação de mastócitos por sílica.

Assim, nossos achados fornecem evidências indicativas de que mastócitos podem contribuir para o estabelecimento do quadro fibrótico na silicose experimental murina, de forma dependente da geração de SCF e da regulação positiva sobre a funcionalidade de fibroblastos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akgul, A., K. A. Youker, *et al.* Quantitative changes in mast cell populations after left ventricular assist device implantation. Asaio J, v.51, n.3, p.275-80. 2005.

Algranti, E. Epidemiologia das Doenças Ocupacionais Respiratórias no Brasil. Menezes AMB. Epid Doen Resp – Pneumolog Bras., p.119-143. 2001.

Ali, K., M. Camps, *et al.* Isoform-specific functions of phosphoinositide 3-kinases: p110 delta but not p110 gamma promotes optimal allergic responses in vivo. J Immunol, v.180, n.4, p.2538-44. 2008.

Austin, K. e W. Brocklehurst. Anaphylaxis in chopped guinea pig lung. II. Enhancement of the anaphylactic release of histamine and slow reacting substance by certain dibasic aliphatic acids and inhibition by monobasic fatty acids. J Exp Med v.113, p.541-557. 1961.

Bagatin, E., J. Jardim, *et al.* Ocorrência de silicose pulmonar na região de Campinas - SP. Jorn de Pneum., v.21, n.1, p.17-26. 1995.

Baghestanian, M., J. H. Jordan, *et al.* Activation of human mast cells through stem cell factor receptor (KIT) is associated with expression of bcl-2. Int Arch Allergy Immunol, v.129, n.3, p.228-36. 2002.

Baram, D., G. G. Vaday, *et al.* Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha. J Immunol, v.167, n.7, p.4008-16. 2001.

Begin, R., G. Ostiguy, *et al.* Computed tomography scan in the early detection of silicosis. Am Rev Respir Dis, v.144, n.3 Pt 1, p.697-705. 1991.

Brew, K., D. Dinakarpanian, *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochim Biophys Acta, v.1477, n.1-2, p.267-83. 2000.

Brown, J. M., E. J. Swindle, *et al.* Silica Directed Mast Cell Activation is Enhanced by Scavenger Receptors. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006.

Buccione, R., G. Di Tullio, *et al.* Analysis of protein kinase C requirement for exocytosis in permeabilized rat basophilic leukaemia RBL-2H3 cells: a GTP-binding protein(s) as a potential target for protein kinase C. Biochem J, v.298 (Pt 1), p.149-56. 1994.

Burns, C. A. e A. Zarkower. Increased alveolar macrophage effector cell function after intratracheal instillation of particulates. J Clin Lab Immunol, v.10, n.2, p.107-12. 1983.

Callis, A. H., P. G. Sohnle, *et al.* Kinetics of inflammatory and fibrotic pulmonary changes in a murine model of silicosis. J Lab Clin Med, v.105, n.5, p.547-53. 1985.

Chen, F., H. Y. Deng, *et al.* Excessive production of insulin-like growth factor-I by silicotic rat alveolar macrophages. Apmis, v.102, n.8, p.581-8. 1994.

Cowie, R. L. The epidemiology of tuberculosis in gold miners with silicosis. . Am J Respir Crit Care Med v.150, p.1460-1462. 1994.

Da Silva, C. A. e N. Frossard. Regulation of stem cell factor expression in inflammation and asthma. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.100 Suppl 1, p.145-51. 2005.

Davis, G. S., C. E. Holmes, *et al.* Lymphocytes, lymphokines, and silicosis. J Environ Pathol Toxicol Oncol, v.20 Suppl 1, p.53-65. 2001.

Davis, G. S., L. M. Pfeiffer, *et al.* Interleukin-12 is not essential for silicosis in mice. Particle and Fibre Toxicology, v.3, n.2. 2006.

Dayton, E. T., P. Pharr, *et al.* 3T3 fibroblasts induce cloned interleukin 3-dependent mouse mast cells to resemble connective tissue mast cells in granular constituency. Proc Natl Acad Sci U S A, v.85, n.2, p.569-72. 1988.

Delgado, L., E. R. Parra, *et al.* Apoptosis and extracellular matrix remodelling in human silicosis. Histopathology, v.49, n.3, p.283-9. 2006.

Dinarello, C. A. Interleukin-1. Cytokine Growth Factor Rev, v.8, n.4, p.253-65. 1997.

Driscoll, K. E., J. K. Maurer, *et al.* Alveolar macrophage cytokine and growth factor production in a rat model of crocidolite-induced pulmonary inflammation and fibrosis. J Toxicol Environ Health, v.46, n.2, p.155-69. 1995.

Dvorak, A. M., H. F. Dvorak, *et al.* Ultrastructural criteria for identification of mast cells and basophils in humans, guinea pigs, and mice. Am Rev Respir Dis, v.128, n.2 Pt 2, p.S49-52. 1983.

Ellis, J. Urticaria pigmentosa: a report of a case with autopsy. AMA Arch Pathol, v.48, p.426-435. 1949.

Evans, R. A., Y. C. Tian, *et al.* TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. Exp Cell Res, v.282, n.2, p.90-100. 2003.

Everett, E. T., J. L. Pablos, *et al.* The role of mast cells in the development of skin fibrosis in tight-skin mutant mice. Comp Biochem Physiol A Physiol, v.110, n.2, p.159-65. 1995.

Fan, J. M., X. R. Huang, *et al.* Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism in vitro. Am J Kidney Dis, v.37, n.4, p.820-31. 2001.

Farrell, P. M. Lung development: Biological and Clinical Perspectives. New York, v.1. 1982. 3 - 49 p.

Ferry, X., S. Brehin, *et al.* G protein-dependent activation of mast cell by peptides and basic secretagogues. Peptides, v.23, n.8, p.1507-15. 2002.

Ferry, X., V. Eichwald, *et al.* Activation of betagamma subunits of G(i2) and G(i3) proteins by basic secretagogues induces exocytosis through phospholipase Cbeta and arachidonate release through phospholipase Cgamma in mast cells. J Immunol, v.167, n.9, p.4805-13. 2001.

Finotto, S., Y. A. Mekori, *et al.* Glucocorticoids decrease tissue mast cell number by reducing the production of the c-kit ligand, stem cell factor, by resident cells: in vitro and in vivo evidence in murine systems. J Clin Invest, v.99, n.7, p.1721-8. 1997.

Frungieri, M. B., S. Weidinger, *et al.* Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma : Possible relevance to human fibrotic disorders. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.23, p.15072-7. 2002.

Galli, S. J. New concepts about the mast cell. N Engl J Med, v.328, n.4, p.257-65. 1993.

Galli, S. J., S. Nakae, *et al.* Mast cells in the development of adaptive immune responses. Nat Immunol, v.6, n.2, p.135-42. 2005.

Gilfillan, A. M. e C. Tkaczyk. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. Nat Rev Immunol, v.6, n.3, p.218-30. 2006.

Gosset, P., P. Lassalle, *et al.* Production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 by human alveolar macrophages exposed in vitro to coal mine dust. Am J Respir Cell Mol Biol, v.5, n.5, p.431-6. 1991.

Greenberg, M. I., J. Waksman, *et al.* Silicosis: a review. Dis Mon, v.53, n.8, p.394-416. 2007.

Guthrie, G. D., Jr. Mineral properties and their contributions to particle toxicity. Environ Health Perspect, v.105 Suppl 5, p.1003-11. 1997.

Guthrie, G. D., Jr. e P. J. Heaney. Mineralogical characteristics of silica polymorphs in relation to their biological activities. Scand J Work Environ Health, v.21 Suppl 2, p.5-8. 1995.

Hamada, H., V. Vallyathan, *et al.* Mast cell basic fibroblast growth factor in silicosis. Am J Respir Crit Care Med, v.161, n.6, p.2026-34. 2000.

Hara, M., K. Ono, *et al.* Evidence for a role of mast cells in the evolution to congestive heart failure. J Exp Med, v.195, n.3, p.375-81. 2002.

Hartman, M., A. M. Piliponsky, *et al.* Human peripheral blood eosinophils express stem cell factor. Blood, v.97, n.4, p.1086-91. 2001.

Hatamochi, A., H. Ueki, *et al.* Effect of histamine on collagen and collagen m-RNA production in human skin fibroblasts. J Dermatol Sci, v.2, n.6, p.407-12. 1991.

Hnizdo, E. e G. K. Sluis-Cremer. Risk of silicosis in a cohort of white South African gold miners. Am J Ind Med, v.24, n.4, p.447-57. 1993.

Hogaboam, C., S. L. Kunkel, *et al.* Novel role of transmembrane SCF for mast cell activation and eotaxin production in mast cell-fibroblast interactions. J Immunol, v.160, n.12, p.6166-71. 1998.

Homma, S., I. Nagaoka, *et al.* Localization of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor I in the fibrotic lung. Am J Respir Crit Care Med, v.152, n.6 Pt 1, p.2084-9. 1995.

Iemura, A., M. Tsai, *et al.* The c-kit ligand, stem cell factor, promotes mast cell survival by suppressing apoptosis. Am J Pathol, v.144, n.2, p.321-8. 1994.

Jagirdar, J., R. Begin, *et al.* Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in silicosis. Am J Respir Crit Care Med, v.154, n.4 Pt 1, p.1076-81. 1996.

Jeong, H. J., H. J. Na, *et al.* Inhibition of the stem cell factor-induced migration of mast cells by dexamethasone. Endocrinology, v.144, n.9, p.4080-6. 2003.

Johnson, S. e A. Knox. Autocrine production of matrix metalloproteinase-2 is required for human airway smooth muscle proliferation. Am J Physiol, v.277, n.6 Pt 1, p.L1109-17. 1999.

Johnston, C. J., B. Piedboeuf, *et al.* Early and persistent alterations in the expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha mRNA levels in fibrosis-resistant and sensitive mice after thoracic irradiation. Radiat Res, v.145, n.6, p.762-7. 1996.

Jozaki, K., A. Kuriu, *et al.* Proliferative potential of murine peritoneal mast cells after degranulation induced by compound 48/80, substance P, tetradecanoylphorbol acetate, or calcium ionophore A23187. J Immunol, v.145, n.12, p.4252-6. 1990.

Kalesnikoff, J. e S. J. Galli. New developments in mast cell biology. Nat Immunol, v.9, n.11, p.1215-23. 2008.

Karimi, K., F. A. Redegeld, *et al.* Stem cell factor and interleukin-4 increase responsiveness of mast cells to substance P. Exp Hematol, v.28, n.6, p.626-34. 2000.

Kassel, O., F. Schmidlin, *et al.* Up- and down-regulation by glucocorticoids of the constitutive expression of the mast cell growth factor stem cell factor by human lung fibroblasts in culture. Mol Pharmacol, v.54, n.6, p.1073-9. 1998.

_____. Human bronchial smooth muscle cells in culture produce stem cell factor. Eur Respir J, v.13, n.5, p.951-4. 1999.

Khalil, N., R. N. O'connor, *et al.* Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol, v.5, n.2, p.155-62. 1991.

Kim, M. S., M. Radinger, *et al.* The multiple roles of phosphoinositide 3-kinase in mast cell biology. Trends Immunol, v.29, n.10, p.493-501. 2008.

Kirshenbaum, A. S., J. P. Goff, *et al.* Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells. J Immunol, v.148, n.3, p.772-7. 1992.

Kobzik, L. The Lung. In: Pathological basis of disease. New York. 1999. 697 - 755 p.

Kondo, S., S. Kagami, *et al.* Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol, v.12, n.8, p.1668-76. 2001.

Kunzmann, S., C. Schmidt-Weber, *et al.* Connective tissue growth factor expression is regulated by histamine in lung fibroblasts: potential role of histamine in airway remodeling. J Allergy Clin Immunol, v.119, n.6, p.1398-407. 2007.

Kuwano, K., N. Hagimoto, *et al.* Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis and current treatment. Curr Mol Med, v.1, n.5, p.551-73. 2001.

Lappalainen, U., J. A. Whitsett, *et al.* Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. Am J Respir Cell Mol Biol, v.32, n.4, p.311-8. 2005.

Levi-Schaffer, F. e A. Kupietzky. Mast cells enhance migration and proliferation of fibroblasts into an in vitro wound. Exp Cell Res, v.188, n.1, p.42-9. 1990.

Li, G., J. J. Lucas, *et al.* Protein kinase C alpha, betaI, and betaII isozymes regulate cytokine production in mast cells through MEKK2/ERK5-dependent and -independent pathways. Cell Immunol, v.238, n.1, p.10-8. 2005.

Lido, V., S. Kitamura, *et al.* Occupational exposure and occurrence of pneumoconioses in Campinas, Brazil, 1978-2003. J Bras Pneumol., v.34, n.6, p.367-372. 2008.

Linnala, A., V. Kinnula, *et al.* Transforming growth factor-beta regulates the expression of fibronectin and tenascin in BEAS 2B human bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol, v.13, n.5, p.578-85. 1995.

Lorentz, A., D. Schuppan, *et al.* Regulatory effects of stem cell factor and interleukin-4 on adhesion of human mast cells to extracellular matrix proteins. Blood, v.99, n.3, p.966-72. 2002.

Lukacs, N. W., R. M. Strieter, *et al.* Stem cell factor (c-kit ligand) influences eosinophil recruitment and histamine levels in allergic airway inflammation. J Immunol, v.156, n.10, p.3945-51. 1996.

Ma, J. Y., M. W. Barger, *et al.* Use of tetrandrine to differentiate between mechanisms involved in silica-versus bleomycin-induced fibrosis. J Toxicol Environ Health A, v.57, n.4, p.247-66. 1999.

Madden, K. B., J. F. Urban, Jr., *et al.* Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis. J Immunol, v.147, n.4, p.1387-91. 1991.

Mandarim-De-Lacerda, C. A. Stereological tools in biomedical research. An Acad Bras Cienc, v.75, n.4, p.469-86. 2003.

Matsunaga, Y., H. Kawasaki, *et al.* Stromal mast cells and nerve fibers in various chronic liver diseases: relevance to hepatic fibrosis. Am J Gastroenterol, v.94, n.7, p.1923-32. 1999.

Meininger, C. J., H. Yano, *et al.* The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. Blood, v.79, n.4, p.958-63. 1992.

Meirelles, G. S., J. I. Kavakama, *et al.* Imaging in occupational lung diseases. J Bras Pneumol, v.32 Suppl 2, p.S85-92. 2006.

Mekori, Y. A., A. M. Gilfillan, *et al.* Human mast cell apoptosis is regulated through Bcl-2 and Bcl-XL. J Clin Immunol, v.21, n.3, p.171-4. 2001.

Mekori, Y. A. e D. D. Metcalfe. The role of c-Kit and its ligand, stem cell factor, in mast cell apoptosis. Int Arch Allergy Immunol, v.107, n.1-3, p.136-8. 1995.

Mekori, Y. A., C. K. Oh, *et al.* IL-3-dependent murine mast cells undergo apoptosis on removal of IL-3. Prevention of apoptosis by c-kit ligand. J Immunol, v.151, n.7, p.3775-84. 1993.

Melloni, B., O. Lesur, *et al.* Effect of exposure to silica on human alveolar macrophages in supporting growth activity in type II epithelial cells. Thorax, v.51, n.8, p.781-6. 1996.

Metcalfé, D. D. Mast cells and mastocytosis. Blood, v.112, n.4, p.946-56. 2008.

Metcalfé, D. D., D. Baram, *et al.* Mast cells. Physiol Rev, v.77, n.4, p.1033-79. 1997.

Mierke, C. T., M. Ballmaier, *et al.* Human endothelial cells regulate survival and proliferation of human mast cells. J Exp Med, v.192, n.6, p.801-11. 2000.

Mio, M., M. Yabuta, *et al.* Ultraviolet B (UVB) light-induced histamine release from rat peritoneal mast cells and its augmentation by certain phenothiazine compounds. Immunopharmacology, v.41, n.1, p.55-63. 1999.

Mitsutake, S., T. J. Kim, *et al.* Ceramide kinase is a mediator of calcium-dependent degranulation in mast cells. J Biol Chem, v.279, n.17, p.17570-7. 2004.

Mohr, C., G. S. Davis, *et al.* Enhanced release of prostaglandin E2 from macrophages of rats with silicosis. Am J Respir Cell Mol Biol, v.6, n.4, p.390-6. 1992.

Morgan, W. K. The pneumoconioses. Curr Opin Pulm Med, v.1, n.2, p.82-8. 1995.

Morrone, L. Epidemiologia da silicose no estado de São Paulo. Rev Saúde Ocup., v.8, n.1, p.6-30. 1980.

Mossman, B. T. e A. Churg. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. Am J Respir Crit Care Med, v.157, n.5 Pt 1, p.1666-80. 1998.

Ms/Cenepi. Guia de Vigilância Epidemiológica. C. N. Epidemiologia: 1 - 9 p. 1998.

Murota, H., S. Bae, *et al.* Emedastine difumarate inhibits histamine-induced collagen synthesis in dermal fibroblasts. J Investig Allergol Clin Immunol, v.18, n.4, p.245-52. 2008.

Nilsson, G., J. H. Butterfield, *et al.* Stem cell factor is a chemotactic factor for human mast cells. J Immunol, v.153, n.8, Oct 15, p.3717-23. 1994.

Niosh. *Health Effects of Occupational Exposure to Respirable Crystalline Silica.* DHHS (NIOSH), v.2002-129. 2002

Nogueira, D., D. Certain, *et al.* Ocorrência de silicose entre trabalhadores da indústria cerâmica da cidade de Jundiaí, SP (Brasil). Ocorrência de silicose entre trabalhadores da indústria cerâmica da cidade de Jundiaí, SP (Brasil). Rev Saúde Pública., v.15, n.3, p.263-271. 1981.

Oghiso, Y. e Y. Kubota. Enhanced interleukin 1 production by alveolar macrophages and increase in Ia-positive lung cells in silica-exposed rats. Microbiol Immunol, v.30, n.11, p.1189-98. 1986.

Ohta, K., J. Nakano, *et al.* Suppressive effect of antisense DNA of platelet-derived growth factor on murine pulmonary fibrosis with silica particles. Chest, v.111, n.6 Suppl, p.105S. 1997.

Oliveira, J. Prevalência da silicose entre os trabalhadores das indústrias cerâmicas do município de Pedreira (SP). Universidade Estadual de Campinas 1998.

Orange, R., M. Valentine, *et al.* Antigen induced release of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A rat) in rats prepared with homologous antibody. . J Exp Med., v.127, p.767-782. 1968.

Palaniyandi Selvaraj, S., K. Watanabe, *et al.* Involvement of mast cells in the development of fibrosis in rats with postmyocarditis dilated cardiomyopathy. Biol Pharm Bull, v.28, n.11, Nov, p.2128-32. 2005.

Pan, L. H., H. Ohtani, *et al.* Co-expression of TNF alpha and IL-1 beta in human acute pulmonary fibrotic diseases: an immunohistochemical analysis. Pathol Int, v.46, n.2, p.91-9. 1996.

Peng, Z. e M. A. Beaven. An essential role for phospholipase D in the activation of protein kinase C and degranulation in mast cells. J Immunol, v.174, n.9, p.5201-8. 2005.

Phan, S. H. e S. L. Kunkel. Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Exp Lung Res, v.18, n.1, p.29-43. 1992.

Piguet, P. F., M. A. Collart, *et al.* Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. Nature, v.344, n.6263, p.245-7. 1990.

Piguet, P. F. e C. Vesin. Treatment by human recombinant soluble TNF receptor of pulmonary fibrosis induced by bleomycin or silica in mice. Eur Respir J, v.7, n.3, p.515-8. 1994.

Piguet, P. F., C. Vesin, *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica. Cytokine, v.5, n.1, p.57-61. 1993.

Postlethwaite, A. E., J. Keski-Oja, *et al.* Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. J Exp Med, v.165, n.1, p.251-6. 1987.

Razin, E. e G. Marx. Thrombin-induced degranulation of cultured bone marrow-derived mast cells. J Immunol, v.133, n.6, p.3282-5. 1984.

Ribeiro, F. S. N., E. Algranti, *et al.* Exposição Ocupacional à sílica no Brasil. Rev Ciên & Saúd Colet., v.8, n.1 e 2. 2003.

Rimal, B., A. K. Greenberg, *et al.* Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. Curr Opin Pulm Med, v.11, n.2, p.169-73. 2005.

Ronnstrand, L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. Cell Mol Life Sci, v.61, n.19-20, p.2535-48. 2004.

Roskoski, R., Jr. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. Biochem Biophys Res Commun, v.337, n.1, p.1-13. 2005.

Saito, T., Y. Kurata, *et al.* Characteristics of histamine release from rat mast cells induced by a bracken toxin, braxin A1. Jpn J Pharmacol, v.53, n.2, p.165-73. 1990.

Sakaguchi, M., S. Takai, *et al.* A specific chymase inhibitor, NK3201, suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. Eur J Pharmacol, v.493, n.1-3, p.173-6. 2004.

Sakamoto-Ihara, T., Y. Suzuki, *et al.* Possible involvement of mast cells in renal fibrosis in patients with IgA nephropathy. Inflamm Res, v.56, n.10, p.421-7. 2007.

Samayawardhena, L. A. e C. J. Pallen. Protein-tyrosine Phosphatase {alpha} Regulates Stem Cell Factor-dependent c-Kit Activation and Migration of Mast Cells. J Biol Chem, v.283, n.43, p.29175-85. 2008.

Scabilloni, J. F., L. Wang, *et al.* Matrix metalloproteinase induction in fibrosis and fibrotic nodule formation due to silica inhalation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.288, n.4, p.L709-17. 2005.

Sheen, C. H., R. P. Schleimer, *et al.* Codeine induces human mast cell chemokine and cytokine production: involvement of G-protein activation. Allergy, v.62, n.5, p.532-8. 2007.

Shelburne, C. P., M. E. McCoy, *et al.* Stat5 expression is critical for mast cell development and survival. Blood, v.102, n.4, p.1290-7. 2003.

Shiota, N., E. Kakizoe, *et al.* Effect of mast cell chymase inhibitor on the development of scleroderma in tight-skin mice. Br J Pharmacol, v.145, n.4, p.424-31. 2005.

Shiota, N., J. Rysa, *et al.* A role for cardiac mast cells in the pathogenesis of hypertensive heart disease. J Hypertens, v.21, n.10, p.1935-44. 2003.

Sibille, Y. e H. Y. Reynolds. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. Am Rev Respir Dis, v.141, n.2, p.471-501. 1990.

Simon, C., E. Dondi, *et al.* Lnk adaptor protein down-regulates specific Kit-induced signaling pathways in primary mast cells. Blood. 2008.

Srivastava, K. D., W. N. Rom, *et al.* Crucial role of interleukin-1beta and nitric oxide synthase in silica-induced inflammation and apoptosis in mice. Am J Respir Crit Care Med, v.165, n.4, p.527-33. 2002.

Stark, P., F. Jacobson, *et al.* Standard imaging in silicosis and coal worker's pneumoconiosis. Radiol Clin North Am, v.30, n.6, p.1147-54. 1992.

Steinberg, S. F. Structural basis of protein kinase C isoform function. Physiol Rev, v.88, n.4, p.1341-78. 2008.

Suzuki, N., T. Horiuchi, *et al.* Mast cells are essential for the full development of silica-induced pulmonary inflammation: a study with mast cell-deficient mice. Am J Respir Cell Mol Biol, v.9, n.5, p.475-83. 1993.

Suzuki, Y., T. Yoshimaru, *et al.* Silver activates calcium signals in rat basophilic leukemia-2H3 mast cells by a mechanism that differs from the Fc epsilon RI-activated response. J Immunol, v.169, n.7, p.3954-62. 2002.

Takeuchi, K., K. Koike, *et al.* STI571 inhibits growth and adhesion of human mast cells in culture. J Leukoc Biol, v.74, n.6, p.1026-34. 2003.

Tan, R. J., C. L. Fattman, *et al.* Matrix Metalloproteinases Promote Inflammation and Fibrosis in Asbestos-induced Lung Injury in Mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006.

Timokhina, I., H. Kissel, *et al.* Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. Embo J, v.17, n.21, p.6250-62. 1998.

Tkaczyk, C., V. Horejsi, *et al.* NTAL phosphorylation is a pivotal link between the signaling cascades leading to human mast cell degranulation following Kit activation and Fc epsilon RI aggregation. Blood, v.104, n.1, p.207-14. 2004.

Tomimori, Y., T. Muto, *et al.* Involvement of mast cell chymase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Eur J Pharmacol, v.478, n.2-3, p.179-85. 2003.

Tsai, M., T. Takeishi, *et al.* Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.14, p.6382-6. 1991.

Vallyathan, V., X. L. Shi, *et al.* Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. Potential role in acute silica-induced lung injury. Am Rev Respir Dis, v.138, n.5, p.1213-9. 1988.

Vyas, H. e G. Krishnaswamy. Paul Ehrlich's "Mastzellen"--from aniline dyes to DNA chip arrays: a historical review of developments in mast cell research. Methods Mol Biol, v.315, p.3-11. 2006.

Walker, M. A., R. A. Harley, *et al.* Inhibition of fibrosis in TSK mice by blocking mast cell degranulation. J Rheumatol, v.14, n.2, p.299-301. 1987.

Wang, H. W., N. Tedla, *et al.* Mast cell accumulation and cytokine expression in the tight skin mouse model of scleroderma. Exp Dermatol, v.14, n.4, p.295-302. 2005.

Welker, P., S. Kramer, *et al.* Increased mast cell number in human hypertensive nephropathy. Am J Physiol Renal Physiol, v.295, n.4, p.F1103-9. 2008.

Wiessner, J. H., J. D. Henderson, Jr., *et al.* The effect of crystal structure on mouse lung inflammation and fibrosis. Am Rev Respir Dis, v.138, n.2, p.445-50. 1988.

Williams, D. E., J. Eisenman, *et al.* Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. Cell, v.63, n.1, p.167-74. 1990.

Xu, J., R. C. Benyon, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 from bronchial epithelial cells induces the proliferation of subepithelial fibroblasts. Clin Exp Allergy, v.32, n.6, p.881-8. 2002.

Yamada, Y., A. Sanchez-Aguilera, *et al.* FIP1L1/PDGFRalpha synergizes with SCF to induce systemic mastocytosis in a murine model of chronic eosinophilic leukemia/hypereosinophilic syndrome. Blood, v.112, n.6, p.2500-7. 2008.

Yamashita, Y., K. Nakagomi, *et al.* Effect of heparin on pulmonary fibroblasts and vascular cells. Thorax, v.47, n.8, Aug, p.634-9. 1992.

Yoshimaru, T., Y. Suzuki, *et al.* Silver activates mast cells through reactive oxygen species production and a thiol-sensitive store-independent Ca²⁺ influx. Free Radic Biol Med, v.40, n.11, p.1949-59. 2006.

Yu, M., M. Tsai, *et al.* Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. J Clin Invest, v.116, n.6, p.1633-41. 2006.

Zhang, S., P. H. Howarth, *et al.* Cytokine production by cell cultures from bronchial subepithelial myofibroblasts. J Pathol, v.180, n.1, p.95-101. 1996.

Zhong, H., S. G. Shlykov, *et al.* Activation of murine lung mast cells by the adenosine A₃ receptor. J Immunol, v.171, n.1, p.338-45. 2003.

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](#)