UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Flávia Regina Bueno

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À SÍLICA SOBRE A RESPONSIVIDADE VASCULAR E DE VIAS AÉREAS DE RATOS

Rio Claro
2011

FLÁVIA REGINA BUENO

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À SÍLICA SOBRE A RESPONSIVIDADE VASCULAR E DE VIAS AÉREAS DE RATOS

Orientadora: PROFA. DRA. ANA PAULA COUTO DAVEL

Supervisora: PROFA. DRA. ANGELINA ZANESCO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2011

574.2 Bueno, Flávia Regina
B928e Efeitos da exposição à sílica sobre a responsividade vascular e de vias aéreas de ratos / Flávia Regina Bueno. - Rio Claro : [s.n.], 2011
44 f. : il., figs., gráfs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Ana Paula Couto Davel

1. Patologia. 2. Traqueia. 3. Aorta. 4. Artéria Pulmonar. 5. Função endotelial. 6. Óxido nítrico. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

FLÁVIA REGINA BUENO

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À SÍLICA SOBRE A RESPONSIVIDADE VASCULAR E DE VIAS AÉREAS DE RATOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Candidata: Flávia Regina Bueno

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel

Supervisora: Profa. Dra. Angelina Zanesco

Rio Claro, outubro de 2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre presente em minha vida.

Aos meus pais, Jurandir e Lourdes, por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus irmãos, Reginaldo, Rogério e Renato, pessoas especiais para mim.

À profa. Dra. Ana Paula Couto Davel, que me guiou nos primeiros passos da pesquisa. Obrigada por ter me acolhido em seu laboratório, por todos os conselhos, paciência e amizade!

À profa. Dra. Luciana Venturini, pelas orientações, discussões de resultados e amizade.

Ao prof. Dr. Walter Araújo Zin, por toda a ajuda concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

À Mariana Nascimento Machado, por sua grata contribuição nos protocolos experimentais.

À profa. Dra. Angelina Zanesco, por todo o auxílio prestado a mim.

À Dra. Maria Andréia Delbin, por toda dedicação e auxílio no laboratório.

À profa. Dra. Doralice Maria Cella, por ter nos proporcionado as melhores aulas de Biologia Celular do mundo! Obrigada pelos conselhos e por acreditar em mim.

À profa. Dra. Marielle Cristina Schneider, pela (grande) ajuda em Genética no terceiro ano.

Aos meus amigos do laboratório de Fisiologia da Vasomotricidade: Aline, Carmem, Rodrigo, Stéfano e Jamaira. Obrigada por toda a ajuda e amizade!

Aos técnicos de laboratório e biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica: Priscila, Marcelo, Bill e Juvenal.

Aos demais funcionários e professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica.

À Regina e Érika, do CEMIB, por toda dedicação e ajuda com os animais.

Às minhas queridas amigas e colegas de classe: Keylinha, Van e Cris, obrigada por todos os momentos de alegria (e aflição!) que compartilhamos durante esses 5 anos de convivência. Nunca me esquecerei de vocês!

À Vivi, Eduardo, André e Berg, grandes amigos que fiz na UNESP.

A todos os funcionários da UNESP, em especial os bibliotecários, por ter nos acolhido tão bem deste o primeiro ano e por estarem sempre dispostos a nos ajudar.

À Héllen, futura farmacêutica e grande amiga desde o colegial, obrigada pela amizade sincera e principalmente pelas risadas durante esses anos.

À Renata e Elaini, amigas de longa dada que sempre estiveram torcendo por mim.

A todos meus amigos do ônibus da faculdade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro, sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

Muito obrigada!

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende”

Guimarães Rosa

RESUMO

A silicose, um tipo comum de pneumoconiose, é uma doença pulmonar ocupacional causada por inalação de sílica muitas vezes em pedreiras com atividade extrativista e atinge assim os mineradores. As partículas de sílica depositadas no epitélio alveolar podem ocasionar o desenvolvimento de fibrose maciça progressiva. Um aumento da produção de radicais livres tem sido uma das propostas para explicar o mecanismo para indução da fibrose pulmonar na silicose. A deposição de partículas de sílica nos alvéolos pulmonares induz a fagocitose dos mesmos pela ação de macrófagos residentes alveolares; estes, quando ativados, liberam grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERDOs). A capacidade de varredura de enzimas oxidantes locais é prejudicada, o que resulta em maior peroxidação lipídica, além da geração de um processo inflamatório local. A fibrose difusa cursa com deposição de fibras colágenas por todo o parênquima pulmonar, o que por sua vez pode suprimir pequenas artérias e arteríolas pulmonares e assim estar correlacionada com o desenvolvimento de hipertensão pulmonar. Além disso, citocinas e partículas de sílica que atravessam a membrana respiratória podem atingir a circulação sanguínea. Um aumento na geração de ERDOs na circulação pode levar a uma redução na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), um importante vasodilatador produzido e liberado pelo endotélio vascular. Uma relativa deficiência na quantidade de NO vascular disponível pode resultar em disfunção endotelial. Já um aumento de citocinas pró-inflamatórias pode contribuir para o desenvolvimento e/ou agravamento da disfunção endotelial. Nas vias aéreas, sabe-se que citocinas pró-inflamatórias podem causar redução da responsividade da via β-adrenérgica em células musculares lisas isoladas de vias aéreas de humanos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito da instilação de sílica na função da artéria pulmonar, da aorta e da traqueia de ratos com silicose aguda. Para tal, ratos Wistar machos foram anestesiados com ketamina e xilasina (80 e 5 mg/kg) e submetidos à instilação intratraqueal com veículo (200 μL de NaCl 0,9%, Grupo Controle) ou SiO_2 (200 mg em NaCl 0,9%, Grupo Sílica). Quinze dias após a instilação, a traqueia, a aorta torácica e a artéria pulmonar foram isoladas e cortadas em segmentos para estudo da reatividade a substâncias contráteis e relaxantes. Em anéis de aorta, as respostas de contratilidade e relaxamento também foram realizadas mediante incubação com a citocina pró-inflamatória TNF-α. Valores de *P<0,05 (ANOVA 2-vias) foi considerado estatisticamente significativo.

Na traqueia, as respostas contráteis ao agente despolarizante KCl e ao carbacol e o relaxamento induzido por isoproterenol não foram modificados pela sílica. Nos anéis isolados da artéria pulmonar também não observamos diferenças significativas entre a reatividade dos anéis do grupo Controle e do grupo Sílica. Nos anéis de aorta, houve aumento da contratilidade ao KCl, entretanto as respostas contráteis induzidas pela fenilefrina, e as de relaxamento induzidas pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio não foram modificadas pela instilação de sílica. A incubação com TNF-α reduziu a reatividade da aorta à fenilefrina e à acetilcolina, mas a magnitude deste efeito foi similar entre os grupos Controle e Sílica. A análise histológica dos pulmões revelou a presença de nódulos fibróticos, confirmando o desenvolvimento de silicose nestes animais. Em conclusão, nossos dados sugerem que a silicose aguda não está associada com alteração significativa na reatividade a agonistas contráteis e relaxantes nas vias aéreas centrais, bem como na reatividade vascular da aorta e da artéria pulmonar. É possível que o estágio crônico desta doença possa provocar mudanças na capacidade de resposta das vias aéreas condutoras e artérias, podendo agravar a evolução da silicose.

Palavras-chave: Traqueia, aorta, artéria pulmonar, função endotelial, TNF-α, óxido nítrico, silicose.

ABSTRACT

Silicosis, a common type of pneumoconiosis, is an occupational lung disease caused by inhalation of silica dust often with mining activity and thus reaches the miners. The fine and ultrafine silica particles deposited in the alveolar epithelium may lead to the development of progressive massive fibrosis. An increased reactive oxygen species (ROS) production has been proposed to explain the mechanism for induction of pulmonary fibrosis in silicosis. In this situation, alveolar macrophages are activated to phagocytes silica particles deposited in the alveoli. The activated macrophages secrete large amounts of ROS that in turn induce synthesis of fibrotic factors. In addition, the activity of antioxidant enzymes is impaired, which results in increased lipid peroxidation, as well as generating a local inflammatory process. Diffuse pulmonary fibrosis progresses with interstitial collagen deposition. Interstitial collagen overlies small pulmonary arteries and arterioles and thus it is associated with pulmonary hypertension in pulmonary fibrotic diseases. In addition, cytokines and silica particles passing through the respiratory membrane can reach the bloodstream. In this context, the increase in the generation of ROS in the circulation may lead to a reduction in the bioavailability of nitric oxide, an important endothelium-derived relaxing factor. A deficiency in the nitric oxide bioavailability can result in vascular endothelial dysfunction. Moreover, pro-inflammatory cytokines could contribute to the impairment of endothelial function. In the airways, pro-inflammatory cytokines can reduce the smooth muscle responsiveness to β-adrenergic agonists as isoproterenol.

Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of silica dust instillation in the function of the pulmonary artery, aorta and trachea of rats with acute silicosis. For this purpose, male Wistar rats were anesthetized with ketamine and xylasine (80 and 5 mg/Kg) and submitted to intratracheal instillation with vehicle (200 μL of NaCl 0.9%, Silica Group) or SiO2 (200 mg in NaCl 0.9%, Silica Group. Fifteen days after instillation, the trachea, the thoracic aorta and pulmonary artery were isolated and cut into segments (~3 mm) to study the reactivity to contractile and relaxing substances. In aortic rings, the responses of contractility and relaxation were also performed in the presence of the pro-inflammatory cytokine TNF-α. Values of * $P < 0.05$ (two-way ANOVA) was considered statistically significant.

In the trachea, the contractile responses to the depolarizing agent KCl and carbachol and the relaxation response to isoproterenol was not modified by silica. The reactivity of isolated pulmonary arteries did not statically differ between Control and Silica group. In aortic rings, there was an increase in contractility to KCl, but the contractile responses induced by phenylephrine and the relaxation induced by acetylcholine and sodium nitroprusside were not modified by silica instillation. The incubation of aortic rings with the proinflammatory cytokine TNF-α impaired the reactivity to phenylephrine and to acetylcholine, but this effect was similar between Control and Silica groups. Histological analysis of lungs revealed the presence of fibrotic nodules, confirming the development of silicosis in these animals. In conclusion, our data suggest that acute silicosis is not associated with significant alteration on the reactivity to contractile and relaxating agonists in the central airway trachea, as well as, on the vascular reactivity of aorta and pulmonary artery. It is possible that in chronic state of this disease changes in the responsiveness of conducting airways and arteries might aggravate the evolution of silicosis.

Keywords: Trachea, aorta, pulmonary artery, endothelial function, TNF-α, nitric oxide, silicosis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....11
2. OBJETIVO.....17
3. METODOLOGIA.....17
3.1. Obtenção dos Modelos Experimentais.....17
3.2. Tratamento dos Animais.....17
3.3. Isolamento de Órgãos e Tecidos.....18
3.4. Estudo da Reatividade em Anéis de Traqueia, Anéis de Aorta e de Artéria Pulmonar.....18
3.5. Protocolos Experimentais dos Anéis de Traqueia.....20
3.5.1. Avaliação da resposta constritora ao cloreto de potássio (KCl).....20
3.5.2. Avaliação da resposta de relaxamento ao isoproterenol:.....20
3.5.3. Avaliação da resposta constritora ao carbacol:.....20
3.6. Protocolos Experimentais dos Anéis de Aorta e Artéria Pulmonar.....21
3.6.1. Avaliação da resposta constritora ao cloreto de potássio (KCl):.....21
3.6.2. Avaliação da resposta de relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina:.....21
3.6.3. Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina:.....21
3.6.4. Avaliação da resposta de relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio:.....21
3.7. Incubação de Anéis de Aorta com TNF-α.....21
3.8. Histologia Pulmonar.....22
3.9. Pesagem do Coração.....22
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....22
5.1. Peso corporal.....22
5.2. Histologia pulmonar.....23
5.3. Peso cardíaco.....25
5.4. Reatividade em traqueia isolada.....26
5.5. Reatividade em artéria pulmonar isolada.....29
5.6. Reatividade em aorta isolada.....31
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....37
7. REFERÊNCIAS.....38
ANEXO A - Parecer do comitê de ética.....43
ANEXO B - Certificado de apresentação de trabalho - FeSBE 2011.....44

1. INTRODUÇÃO

A expressão “pneumoconiose” se refere à doença pulmonar parenquimatosa causada pela inalação de poeira inorgânica. Um tipo comum de pneumoconiose é a silicose, uma doença pulmonar ocupacional causada por inalação de sílica cristalina muitas vezes em pedreiras com atividade extrativista e atinge assim os mineradores. A sílica ou dióxido de silício (SiO_2) é formada a partir da combinação de silício (Si) com dois átomos de oxigênio que ocorre naturalmente como quartzo ou areia. Cabe ressaltar que o silício é o segundo elemento mais abundante da Terra ao lado do carbono (HAMILTON et al., 2008).

Clinicamente, a silicose pode ser dividida em três formas evolutivas: crônica, acelerada e aguda. A forma crônica é a mais comum e ocorre após muitos anos de exposição a níveis relativamente baixos de poeira. Silicose acelerada é um termo clínico aplicado a uma condição que tem a velocidade intermediária de progressão entre a silicose aguda e a doença nodular crônica clássica, requerendo, em média, de cinco a dez anos de exposição à poeira para o aparecimento de alterações radiológicas. A forma aguda da doença acomete trabalhadores expostos a concentrações excepcionalmente altas de finas partículas de sílica cristalina recentemente fraturadas, como ocorre no jateamento de areia e na moagem de pedra (FERREIRA et al., 2006)

Enquanto a poeira do carvão é praticamente inerte, as partículas de sílica quando inaladas podem ser tóxicas e provocam uma reação fibrótica no pulmão. Os nódulos silicóticos que são formados no parênquima pulmonar são compostos de círculos concêntricos de fibras de colágeno densas encontradas em torno dos bronquíolos respiratórios, no interior dos alvéolos e ao longo dos nódulos linfáticos. As partículas de sílica podem ser vistas nos nódulos (WEST, 2010). Nos pacientes com silicose há um declínio acentuado da função pulmonar, com redução do volume expiratório forçado, uma elevação do volume residual e uma queda da pO_2 arterial e às vezes morte prematura (CASTRANOVA et al., 2000), assim como um risco aumentado de tuberculose pulmonar (WEST, 2010). Estudos epidemiológicos em humanos têm demonstrado que mesmo após exposição ocupacional tenha terminado, a silicose pode se desenvolver ou mesmo progredir (HESSEL NG et al., 1987; HNIZDO & SLUIS-CREMER, 1993; KREISS & ZHEN, 1996; MILLER et al., 1998; HNIZDO & MURRAY, 1998).

Poucas doenças profissionais revelam a enorme importância da epidemiologia em estudos de Saúde Ocupacional como a silicose (NOGUEIRA et al., 1981). Segundo Hunter (1969), já em 1556 o médico alemão Georg Bauer, mais conhecido pelo seu nome latino de

Georgius Agricola, tinha descrito no seu livro "De Re Metallica" o fato de que os mineiros que trabalhavam em minas de ouro e de prata na região de Joachimstahl apresentavam alta mortalidade causada por uma doença pulmonar por eles chamada de "tísica dos mineiros" que, indiscutivelmente, eram casos de silicose (NOGUEIRA et al., 1981).

No entanto, essa primeira descrição da silicose permaneceu ignorada por séculos. Através de estudos de casos individuais, sabia-se que os mineradores de determinados tipos de rochas apresentavam doença pulmonar que recebia os mais diversos nomes tais como "doença dos ceramistas", "doença dos esmerilhadores", entre outros; não havia, no entanto, nenhuma idéia estabelecida quanto ao agente etiológico que provocava tais doenças (NOGUEIRA et al., 1981). Mais recentemente, estudos epidemiológicos descritos pela World Health Organization (WHO) mostram que até 30-50% dos trabalhadores de indústrias primárias e setores de alto risco nos países em desenvolvimento podem sofrer de silicose e outras pneumoconioses (FEDOTOV & EIJKEMANS, 2011). Há estimativas de que as pneumoconioses são responsáveis pela morte de cerca de 30.000 trabalhadores anualmente. Este número pode ser ainda maior, pois os sub-diagnóticos e sub-relatórios dos pacientes são bastante freqüentes.

No Brasil, a silicose atualmente representa a principal doença ocupacional, sendo que o número estimado de trabalhadores potencialmente expostos a poeiras contendo sílica é superior a 6 milhões, sendo 4 milhões na construção civil, 500.000 na mineração e garimpo e acima de 2 milhões em indústrias de transformação de minerais, metalurgia, indústria química, de borracha, cerâmicas e vidro. Um estudo retrospectivo observacional em pacientes internados no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas relata que de um total de 1147 casos de pneumoconiose identificados de 1978 a 2003 na região de Campinas-SP, 92,5% é decorrente da exposição à sílica (LIDO et al., 2008).

Formas leves da doença podem ser assintomáticas, ainda que em radiografias torácicas possa haver um fino infiltrado nodular. Nesta pneumoconiose há desenvolvimento de fibrose maciça progressiva que causa um padrão de função respiratória obstrutivo e restritivo misto. A distorção das vias aéreas pelo excesso de fibras colágenas depositadas na matriz extracelular produz alterações obstrutivas irreversíveis, e estas grandes massas de tecido fibrótico também reduzem o volume pulmonar utilizável. Na doença avançada, pode ocorrer fibrose intersticial generalizada com padrão restritivo, dispnéia grave, hipoxemia durante o exercício e redução da capacidade de difusão dos gases (WEST, 2010). A fibrose difusa cursa com deposição de fibras colágenas por todo o parênquima pulmonar e inclusive em regiões perivasculares, o que por sua vez pode suprimir pequenas artérias e arteríolas pulmonares e

assim estar correlacionada com o desenvolvimento de hipertensão pulmonar, uma vez que a supressão destes vasos pode causar aumento da resistência ao fluxo de sangue para o tecido pulmonar (YILDIZ, 2007). De acordo, tem-se descrito na literatura que a silicose pode cursar com hipertensão pulmonar e *cor pulmonale* (MURRAY et al., 1993), além de também poder causar estenose da artéria pulmonar em humanos (MAHNKEN et al., 2001).

A deposição de partículas de sílica nos alvéolos pulmonares induz a fagocitose dos mesmos pela ação de macrófagos residentes alveolares. Estes macrófagos ativados liberam grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERDOs) e do nitrogênio. Estas espécies reativas liberadas por esse processo superam a capacidade de varredura das moléculas e enzimas antioxidantes celulares, resultando em estresse oxidativo e danos à estrutura pulmonar.

Simultaneamente, a reação entre macrófagos alveolares e sílica leva ao recrutamento de mais células inflamatórias incluindo neutrófilos e linfócitos-T, e assim começa um processo inflamatório local (HUBBARD et al., 1989; KUMAR et al., 1990; ZHANGI et al., 1999). Neste processo, uma reação imune provoca a liberação de fatores inflamatórios, incluindo fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e ativação do fator nuclear-κB (NF-kB), que exercem efeitos adicionais em alvos celulares. Foi descrito que há um aumento da secreção de citocinas pelos fibroblastos presentes no pulmão em menos de 3 horas após a exposição à sílica, indicando os efeitos agudos da inalação destas partículas (SCHAPIRA et al., 1998; NELIN et al., 2002; PORTER et al., 2002; CASTRANOVA, 2004). Assim, uma vez iniciada a exposição a partículas de sílica, mesmo em um pulmão que tenha sofrido baixa exposição à sílica, tais lesões podem evoluir mesmo na ausência de exposição posterior (KUEMPEL et al., 2003). Em conjunto, um aumento da produção de ERDOs e a síntese elevada de fatores inflamatórios locais causam injúria do parênquima pulmonar e induzem fibrose neste órgão.

As partículas de sílica, além de se depositarem nos alvéolos pulmonares, podem depositadas nas vias aéreas centrais e periféricas, incluindo toda a árvore traqueobrônquica. A árvore traqueobrônquica, em conjunto com as vias aéreas superiores, constitui a *zona de transporte* gasoso do sistema respiratório de mamíferos, encarregada de acondicionar e conduzir o ar até os alvéolos. Estes compreendem a *zona respiratória* dos pulmões onde efetivamente se realizam as trocas gasosas (ZIN et al., 2008). A árvore traqueobrônquica se estende da traqueia, passando pelos brônquios que se ramificam até os bronquíolos terminais. Estas vias aéreas são constituídas por epitélio e musculatura lisa reforçada por anéis de cartilagem. O tônus da musculatura das vias aéreas controla a resistência ao fluxo de ar. Um

aumento da contratilidade desta musculatura lisa caracteriza o quadro de hiperresponsividade das vias aéreas, característico em doenças obstrutivas como a asma e outras doenças que cursem com um processo inflamatório pulmonar, como a silicose (LOTVALL et al., 1998). Apesar de ser uma característica comum a doenças respiratórias obstrutivas, os mecanismos celulares que levam a hiperresponsividade das vias aéreas ainda não é totalmente esclarecido. Citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α são responsáveis por induzir hiperreatividade de vias aéreas a agonistas muscarínicos (ASANO et al., 2010) e causar redução da responsividade da via β-adrenérgica em células musculares lisas isoladas de vias aéreas de humanos, reduzindo assim a responsividade de uma importante via broncodilatadora (SHORE et al., 1997). Assim, as partículas de sílica podem direta ou indiretamente, via liberação de citocinas, afetar a reatividade das vias aéreas.

ERDOs e fatores pró-inflamatórios gerados nos pulmões podem atingir a circulação tanto pulmonar como sistêmica (ZHANGI et al., 1999). Um aumento na geração de ERDOs, em especial o ânion superóxido, pode causar efeitos deletérios na vasculatura. Este mecanismo está envolvido na fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares associado à alteração da função endotelial (DAVEL et al., 2011). O endotélio é uma monocamada de epitélio pavimentoso localizada entre o sangue circulante e a camada média do músculo liso vascular e essa posição é estratégica para manter a homeostase da parede vascular e a regulação da circulação, desempenhando papel protetor do vaso sanguíneo. Pode ser considerado um órgão endócrino ativo, em resposta a estímulos humorais, neurais e mecânicos, sintetiza e libera substâncias vasoativas que modulam tônus, calibre vascular e fluxo sanguíneo, desempenhando papel fundamental na regulação da circulação. Essas substâncias vasoativas foram denominadas fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs). Dentre os EDRFs, podemos citar: óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2), e vários fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs), como o ácido opoxieicosatrienóico (EET), e endocanabinóides. São EDCFs: endotelinas (ET1, ET-2 e ET-3), produtos da ciclooxigenase, como endoperóxidos (PGH2) e tromboxano (TXA2); e a ERDO ânion superóxido (Figura 1):

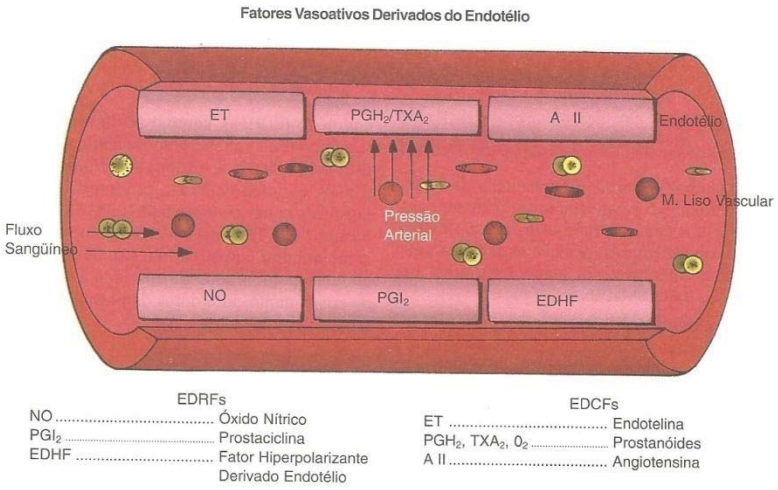


Figura 1: Vaso sanguíneo com fatores relaxantes (EDRFs) e contráteis (EDCFs) derivados do endotélio. As setas paralelas perpendiculares ao endotélio indicam as forças exercidas pelo fluxo sanguíneo *shear stress* e a pressão arterial, respectivamente.

Fonte: LUZ et al., 2005

Através de estímulo fisiológico como a força de arraste e a tensão de cisalhamento *(shear stress)* exercida pelo fluxo sanguíneo sobre as células endoteliais, há a formação basal de NO; este é o principal fator vasodilatador de ação fisiológica liberado pelo endotélio. É inibidor da agregação plaquetária, da coagulação e da proliferação celular (NASCIMENTO et al., 2005; MICHELINI & ROSSONI, 2008). O NO é sintetizado através do aminoácido L-arginina por ação das enzimas NO sintases (NOSs) e difunde-se para o músculo liso, ao qual relaxa. O efeito vasodilatador do NO é mediado por ativação da enzima guanilato ciclase solúvel com consequente aumento dos níveis de GMPc. O GMP c tem seus principais efeitos mediados pela proteína quinase G (PKG), dentre eles: inibição dos canais para Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático e da membrana plasmática (CORNWELL et al., 1991). O NO pode também ativar diretamente a enzima $Na^{+}K^{+}$ATPase e canais para Ca^{+2}, mecanismos que hiperpolarizam a célula muscular. Em conjunto, estes mecanismos culminam com a redução da concentração de Ca^{+2} intracelular e diminuição da sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{+2}, o que induz o relaxamento do músculo liso vascular (KARAKI et al., 1997). Três isoformas distintas da NOS têm sido identificadas, produtos de três genes diferentes: nNOS (também conhecida por NOS-1, tipo I), primeiramente descrita em tecido neural; iNOS (NOS-2, tipo II) que é a isoforma induzível numa variedade de células e tecidos; e eNOS (NOS-3, tipo III), a qual foi primeiramente encontrada na célula endotelial. A eNOS e a nNOS têm papel importante na fisiologia cardiovascular e sintetizam pequenas quantidades de

NO que vai agir como mensageiro intracelular. A iNOS é fortemente ligada à calmodulina, sendo funcionalmente independente da concentração de cálcio (CARVALHO et al., 2005).

O NO endotelial é essencial para a regulação das respostas vasculares, incluindo tônus vascular, fluxo sanguíneo, interações leucócitos-endotélio e proliferação de células musculares lisas vasculares. Uma relativa deficiência na quantidade de NO vascular disponível pode resultar em disfunção endotelial, criando condições para o desenvolvimento de trombose e vasoconstrição (ATOCHIN & HUANG, 2010). Uma das principais ações deletérias do ânion superóxido sobre o tecido vascular é que o mesmo pode reagir com o NO causando uma redução na biodisponibilidade do NO, reduzindo assim seu efeito vasodilatador. Em somatória ao papel fisiopatológico do ânion superóxido, estudos demonstram que um processo inflamatório vascular pode estar associado ao desenvolvimento de disfunção endotelial na hipertrofia cardíaca (DAVEL et al., 2008) e na isquemia/reperfusão pulmonar (DELBIN et al., 2010).

É proposto na literatura que as partículas de sílica e outros metais inalados como chumbo e ferro podem atravessar a membrana respiratória ao nível dos pulmões e desta maneira entrarem na circulação sanguínea. Isto acontece principalmente durante o desenvolvimento de um processo inflamatório pulmonar, situação onde há um aumento do espaço intersticial entre as células epiteliais alveolares e entre as células endoteliais dos capilares. Esta seria uma via pela qual as partículas de sílica poderiam induzir efeitos diretos sobre tecidos não pulmonares (MILLS et al., 2009).

Desta maneira, hipotetiza-se que tanto a exposição direta à sílica, como o aumento da síntese de fatores pró-oxidantes, fibróticos e inflamatórios nos pulmões, poderiam causar efeitos deletérios em vasos sanguíneos locais da circulação pulmonar e da circulação periférica, assim como das vias aéreas de transporte. Alterações da responsividade das vias aéreas, das artérias pulmonares e da aorta a substâncias que controlam o tônus da musculatura lisa destas estruturas poderiam levar à piora do quadro patológico dos indivíduos portadores de silicose, agravando o padrão obstrutivo da doença e causando alterações da homeostasia cardiovascular. Cabe ressaltar que a investigação de possíveis mecanismos fisiopatológicos que prejudiquem o sistema cardiorrespiratório de indivíduos expostos à sílica no ar ambiente como principalmente mineradores e trabalhadores de fábricas de cerâmica e jateamento de areia pode auxiliar ao tratamento dos mesmos, o que por si só justifica o empenho em se estudar estes mecanismos, uma vez que ainda não há nos dias de hoje um tratamento específico para esta doença.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito da instilação de sílica na função da artéria pulmonar, da aorta e da traqueia de ratos.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção dos Modelos Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com aproximadamente 3 meses de idade. Os animais foram obtidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) – UNICAMP.

Após o desmame, os ratos foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do IB-UNICAMP. Todos os animais foram mantidos em gaiolas sob condições controle de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à ração e água.

Os presentes protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Ética de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP em 06.12.2010 (Anexo A).

3.2. Tratamento dos Animais

Estes animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: Sílica, que receberam uma instilação intratraqueal de 200 mg de sílica (SiO_2, Sigma) dissolvida em solução salina (0,9%, 200µL) e Controle, onde os animais foram submetidos apenas à instilação intratraqueal de solução salina (0,9%, 200µL).

A instilação de sílica ou salina foi realizada nos animais submetidos à anestesia com ketamina e xilasina (80 e 5mg/Kg de rato, respectivamente) utilizando-se uma seringa de insulina (25 gauge) que foi inserida a 45° entre os primeiros anéis cartilaginosos da traqueia proximal. Após este procedimento a pele do pescoço do animal foi suturada com linha de algodão.

Os experimentos de reatividade vascular e de vias aéreas foram conduzidos após 15 dias seguidos da instilação de sílica ou salina. Isto por que há um pico da resposta inflamatória neste período de tempo, que se recupera após 30 dias da instilação, fase na qual o animal entra no estágio crônico da doença (BORGES et al., 2002).

3.3. Isolamento de Órgãos e Tecidos

Após 15 dias da instilação, os animais foram novamente anestesiados e então a traqueia distal, a aorta torácica (Figura 2) e a artéria pulmonar foram isoladas e cortadas em segmentos cilíndricos (~3 mm) denominados anéis que foram montados em um banho para tecidos isolados. Foram avaliadas as respostas a agentes relaxantes e contráteis nos anéis das artérias e da traqueia isolados e os fatores locais envolvidos com possíveis alterações encontradas.

Além da utilização da traqueia e vasos sanguíneos para o estudo da reatividade, os pulmões foram avaliados para verificação do desenvolvimento da silicose e o coração foi retirado para pesagem dos ventrículos direito e esquerdo.

A **B**

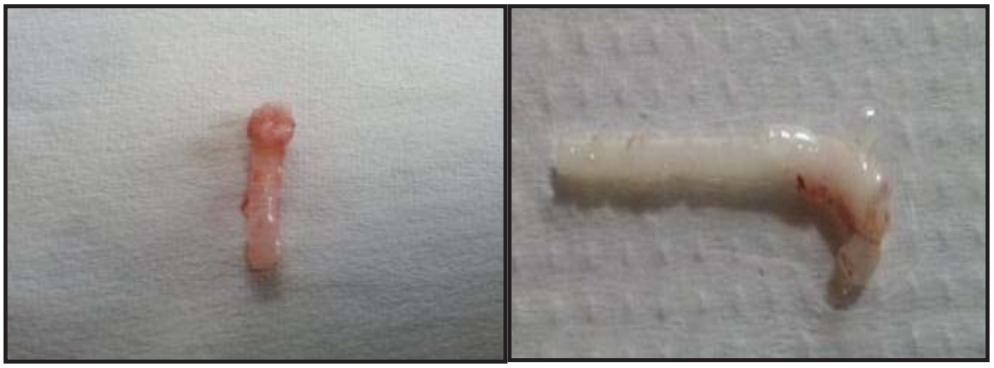


Figura 2: Traqueia **(A)** e aorta torácica **(B)** isoladas. A aorta está livre dos tecidos conectivo e adiposo.

Fonte: Própria autora

3.4. Estudo da Reatividade em Anéis de Traqueia, Anéis de Aorta e de Artéria Pulmonar

Os anéis de traqueia, aorta e artéria pulmonar foram imersos em cubas contendo 10 mL de solução de Krebs-Henseleit, cuja composição (em mM): NaCl 115; KCl 4,6; $CaCl_2$ 2,5; KH_2PO_4 1,2; $MgSO_4.7H_2O$; $NaHCO_3$ 25; Glicose 11,1; EDTA 30; aquecida a 37°C, pH=7,4 gaseificada com mistura de oxigênio (95%) e gás carbônico (5%), para registro da tensão isométrica, através de um transdutor de força, desenvolvida pelos anéis (Figura 3). Para tal, dois arames metálicos foram passados através do lúmen dos segmentos (Figura 4). Um fio metálico foi fixado à parede do banho e o outro conectado a um sistema de aquisição de dados (LabChart 7) e este, a um computador (Figura 5). Em algumas aortas, a camada endotelial foi removida mecanicamente através do uso de um fio metálico. Os anéis de

traqueia e aorta dos ratos foram submetidos a uma tensão de repouso de 1,0 g, e os de artéria pulmonar a 0,5 g, que foram reajustadas quando necessário, durante 30 minutos de estabilização.

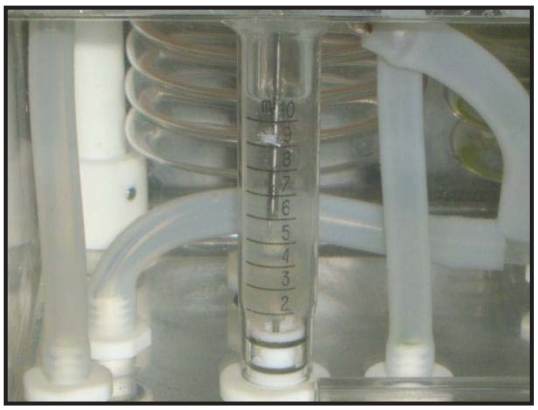


Figura 3: Anel de aorta isolado imerso em cuba de 10 mL contendo solução gaseificada de Krebs-Hanseleit (37°C, pH 7,4).

Fonte: Própria autora

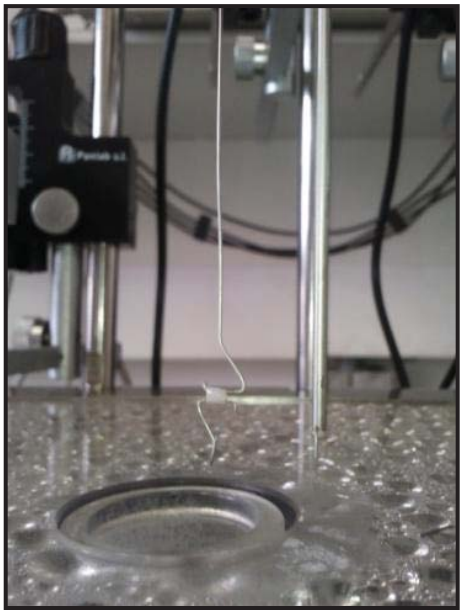


Figura 4: Anel de aorta isolado preso a dois fios metálicos, sendo que um deles (superior) é conectado a um transdutor de força e o outro (inferior) é fixo na cuba do banho de órgãos.

Fonte: Própria autora

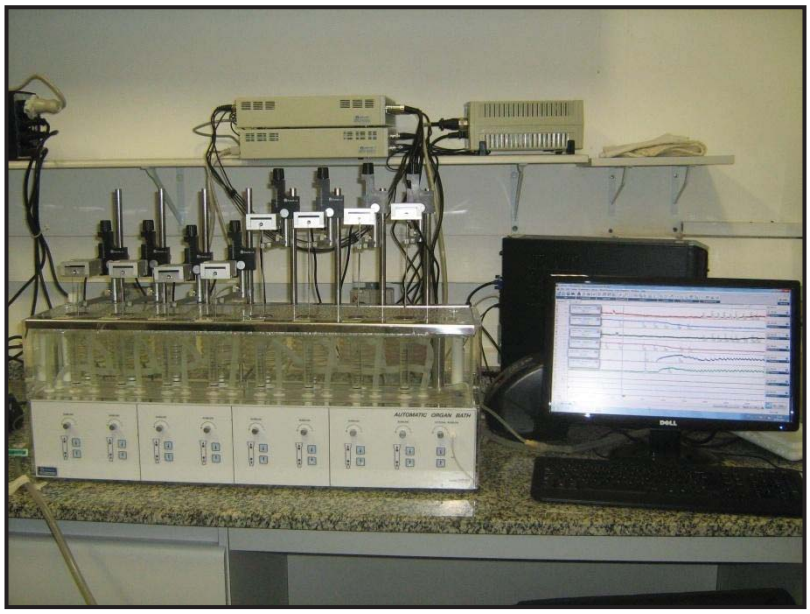


Figura 5: Banho de órgãos utilizado para o estudo da reatividade conectado ao sistema de aquisição de dados (Powelab) e ao computador para registro da força desenvolvida.

Fonte: Própria autora

3.5. Protocolos Experimentais dos Anéis de Traqueia

3.5.1. Avaliação da resposta constritora ao cloreto de potássio (KCl):

Após 30 minutos de estabilização, foi administrado KCl 60 mM em todos os anéis de traqueia estudados. Após 30 minutos de estabilização, ou seja, até que se atingiu um platô, a resposta máxima obtida foi considerada a contração máxima do anel. Em seguida os anéis foram lavados com solução de Krebs para avaliação das respostas subsequentes.

3.5.2 Avaliação da resposta de relaxamento ao isoproterenol:

O relaxamento ativado pelos receptores β-adrenérgicos foi avaliado através de uma curva concentração-resposta ao isoproterenol (hidrocloridrato, Sigma) nos anéis de traqueia. Para tal, após estabilização, os anéis foram pré-contraídos com uma concentração submáxima de carbacol. Após a obtenção de um platô, curvas concentração-resposta ao isoproterenol (10^{-9} a $3x10^{-5}$ M) foram realizadas.

3.5.3. Avaliação da resposta constritora ao carbacol:

A constrição foi avaliada através de uma curva concentração-resposta ao agonista muscarínico carbacol (Sigma) nas concentrações de 10^{-8} a $3x10^{-5}$ M.

3.6. Protocolos Experimentais dos Anéis de Aorta e Artéria Pulmonar

3.6.1. Avaliação da resposta constritora ao cloreto de potássio (KCl):

Após 30 minutos de estabilização, foi administrado KCl 75 mM em todos os anéis de aorta e artéria pulmonar estudados. Após 30 minutos de estabilização, ou seja, até que se atingiu um platô, a resposta máxima obtida foi considerada a contração máxima do anel. Em outros anéis de aorta dos grupos Controle e Sílica, realizou-se uma curva concentração-resposta ao KCl nas concentrações de 10-125 mM.

3.6.2. Avaliação da resposta de relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina:

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (Sigma). Para tal, após 30 minutos de estabilização, os anéis de aorta e de artéria pulmonar foram pré-contraídos com fenilefrina, em uma concentração capaz de induzir aproximadamente 50 a 70% da resposta máxima induzida pelo KCl (75 mM). Uma vez obtido o platô, foram realizadas curvas concentração-resposta, cumulativas, à acetilcolina (10^{-9} a 10^{-5} M).

3.6.3. Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina:

A responsividade vasoconstritora vascular foi avaliada através de uma curva concentração-resposta à fenilefrina (Sigma) nas concentrações de 10^{-9} a 10^{-5} M.

3.6.4. Avaliação da resposta de relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio:

Imediatamente após a curva concentração-resposta à fenilefrina atingir o platô correspondente a última dose administrada da droga, foi administrado nitroprussiato de sódio em concentrações crescentes (10^{-10} a 10^{-5} M) para avaliação da resposta de relaxamento vascular a um doador de óxido nítrico.

3.7. Incubação de Anéis de Aorta com TNF-α

A avaliação das respostas vasoconstritoras (ao KCl e à fenilefrina) e dilatadoras (à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio) também foi realizada após incubação por 2 horas da citocina pró-inflamatória TNF-α (10 μg/mL, 10μL) (EL-BASSOSSY et al., 2009). Após o

período de incubação, realizaram-se curvas concentração-resposta nas mesmas doses descritas anteriormente.

3.8. Histologia Pulmonar

Após o isolamento dos pulmões dos animais, foi avaliada a presença de nódulos silicóticos. Para tal, realizou-se a fixação do tecido pulmonar através da perfusão de formol (4%) pela artéria pulmonar. Em seguida os lobos pulmonares foram emblocados em parafina e foram feitos cortes histológicos seguido de coloração Hematoxilina-Eosina tradicional.

3.9. Pesagem do Coração

Após o isolamento dos corações dos animais, foi realizada a separação dos ventrículos direito e esquerdo, e estes foram pesados separadamente.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão representados como média ±EPM. A análise estatística dos dados foi realizada por teste *t* de *Student* não-pareado para comparação entre dois grupos, ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, completamente randomizada, realizados a partir do programa GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA). Valores de $p<0,05$ são considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte dos resultados obtidos neste trabalho foi apresentado sob a forma de painel na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizado de 24 a 27 de agosto de 2011 no Rio de Janeiro, RJ (Anexo B).

5.1. Peso corporal

A análise do poso corporal dos animais antes e após a instilação de sílica ou salina é demonstrada através do gráfico abaixo (Figura 6):

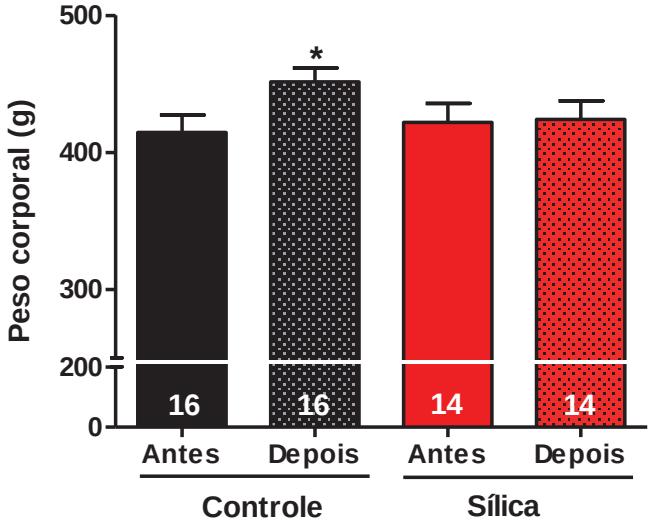


Figura 6: Análise do peso corporal antes e depois de 15 dias seguidos à instilação de salina (Controle) ou sílica em ratos. *p<0,05. Sílica depois *vs.* Controle depois, ANOVA 1-via. As barras representam média ± EPM. O número de animais está indicado dentro das barras.

Fonte: Própria autora

Através da análise dos resultados, observa-se que houve aumento significativo do peso corporal dos animais 15 dias após a instilação intratraqueal de solução salina. Os animais tratados não obtiveram o mesmo resultado, indicando perda de peso dos ratos que receberam instilação de sílica. Este resultado indica que os animais tratados estão debilitados em consequência da patologia desenvolvida.

Em humanos, estudos revelam que a silicose resulta em quadro de franca insuficiência respiratória, perda de peso e fraqueza, ocasionando susceptibilidade a infecções do trato respiratório inferior (FERREIRA et al., 2006).

5.2. Histologia pulmonar

A seguir, imagens histológicas de cortes de pulmões de animais 15 dias seguidos à instilação intratraqueal de sílica ou salina (Figura 7):

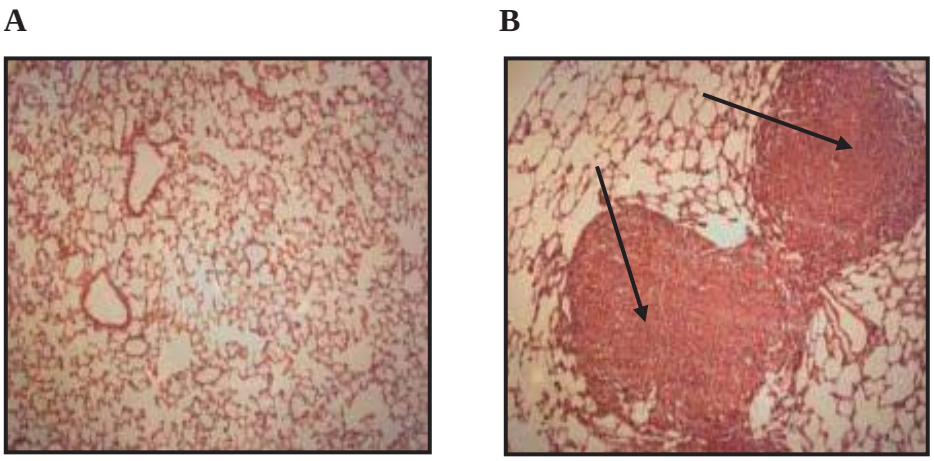


Figura 7: Imagens típicas histológicas de cortes de pulmão de ratos Controle e Sílica. O grupo Controle apresenta integridade dos alvéolos pulmonares e vias aéreas **(A)**. No grupo Sílica, observa-se espessamento e destruição dos alvéolos, bem como nítidos nódulos fibróticos, indicados pelas setas **(B).** Aumento: 100x.

Fonte: Própria autora

A pneumoconiose é definida como um estado patológico devido à retenção de poeira inorgânica no pulmão, sendo os principais tipos a asbestose (pneumoconiose dos mineiros de carvão) e a silicose; esta ocasionada devido à aspiração de sílica livre (SiO_2) (MAFRA Jr. & MADEIRA, 2005). A etiologia da doença permanece indefinida, sendo que os tipos de lesões dependem do tempo de exposição, tamanho das partículas aspiradas e da qualidade da composição química (MENDES, 2003).

Inúmeros estudos apontam evidências de reação inflamatória pulmonar em resposta a poluentes ocupacionais atmosféricos **(**BLACKFORD et al., 1997; SALDIVA et al., 2002; TAO et al., 2003). A exposição à sílica nos humanos está associada com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e com a indução de citocinas pró-inflamatórias, entre elas TNF-α e IL-1β, que implicam diretamente na patogênese da pneumoconiose (VALLYATHAN et al., 2000). De acordo com trabalhos prévios, concentrações crescentes de sílica induziram liberação de citocinas (TNF-α, IL-1β, IL-6, MCP-1 e IL-8) e estresse oxidativo em células endoteliais isoladas em cultura (HERSETH et al., 2008; LIU & SUN 2010). Além disso, há síntese da matriz extracelular e proliferação de fibroblastos (SCHINS & BORM, 1999).

A silicose caracteriza-se pela presença de grandes opacidades, com áreas homogêneas de consolidação, de distribuição não segmentar, acometendo principalmente as porções superior e média dos pulmões. Resulta da confluência dos pequenos nódulos fibróticos que se

tornam maiores que 10 mm de diâmetro. A doença é também referida como fibrose maciça progressiva, termo utilizado pela primeira vez por Fletcher, em 1948, para as pneumoconioses que evoluíam das formas simples para as formas complicadas. A fibrose maciça progressiva ocorre basicamente na pneumoconiose de mineiros de carvão e na silicose, sendo mais rara em outras pneumoconioses (FERREIRA et al., 2006). Assim, podemos observar que o modelo experimental foi efetivo em causar um quadro de silicose característico, uma vez que similar ao descrito em humanos, observamos o desenvolvimento de fibrose maciça e formação de nódulos fibróticos nos pulmões isolados dos ratos após 15 dias de instilação de sílica, o que não ocorreu nos animais que receberam instilação de apenas salina. Lesão pulmonar bastante similar é descrita também em pulmões de camundongos sacrificados 15 dias após instilação intratraqueal de sílica (FAFFE et al., 2001).

5.3. Peso cardíaco

Os gráficos a seguir mostram a relação entre os pesos dos ventrículos direito e esquerdo dos animais após 15 dias seguidos às instilações (Figura 8). Devido às diferenças entre os valores de peso corporal entre os grupos de animais estudados, optou-se pela análise do peso dos ventrículos normalizado pelo comprimento da tíbia:

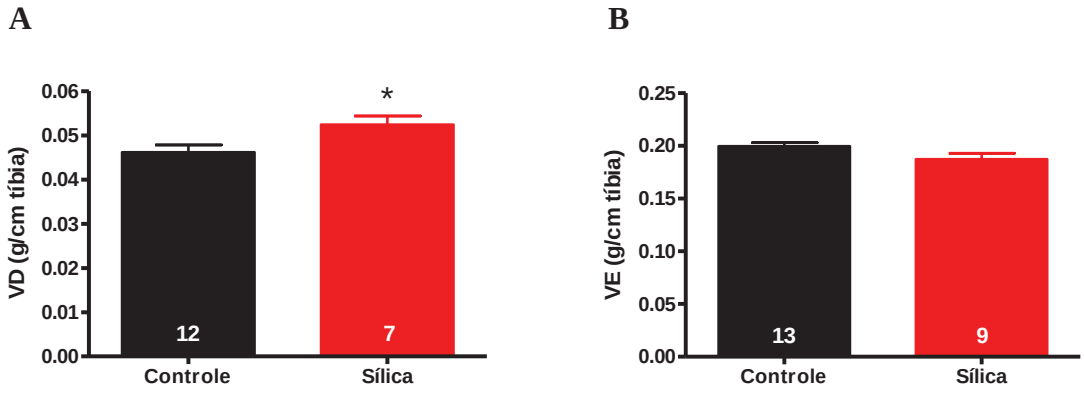


Figura 8: Peso dos ventrículos direito (VD) **(A)** e esquerdo (VE) **(B)** dos animais Controle e Sílica, expresso em gramas por centímetro de comprimento da tíbia. *p<0,05 *vs.* Controle, teste *t.* As barras representam média ± EPM. O número de animais está indicado dentro das barras.

Fonte: Própria autora

De acordo com os resultados, os animais tratados apresentaram um aumento significativo do ventrículo direito em relação aos animais do grupo Controle. O mesmo não se

observou comparando-se o peso do ventrículo esquerdo, já que os dados demonstram que os dois grupos permaneceram estatisticamente iguais.

O ventrículo direito, uma das quatro câmaras do coração, recebe sangue desoxigenado do átrio direito através da válvula tricúspide, e o bombeia para a artéria pulmonar através da válvula e tronco pulmonar. A compressão exercida pelos nódulos fibróticos às artérias e arteríolas dos animais tratados com sílica pode levar a uma diminuição do raio destes vasos, ocasionando, desta maneira, um aumento da resistência vascular e alteração da circulação pulmonar. O sangue passa a não fluir adequadamente do coração para os pulmões e há então sobrecarga do ventrículo direito, proporcionando um quadro de hipertrofia ventricular direita. A hipertrofia cardíaca representa a principal resposta adaptativa do coração submetido a uma sobrecarga de trabalho, fisiológica ou patológica (ASSAD et al., 2006). Assim, o aumento do peso do ventrículo direito nos animais expostos à sílica pode indicar o desenvolvimento de hipertrofia ventricular em resposta a um aumento da pós-carga pulmonar causada por estreitamento das pequenas artérias pulmonares devido à extensa área de fibrose observada no modelo induzido de silicose (Figura 1).

5.4. Reatividade em traqueia isolada

Nos anéis de traqueia estudados foi avaliada a resposta contrátil causada por alta concentração de íons K^+ no meio extracelular, em resposta à administração de uma dose única de KCl 60 mM com consequente despolarização celular. Também avaliamos a resposta contrátil ao carbacol, um agonista do receptor muscarínico. A seguir, os resultados (Figura 9):

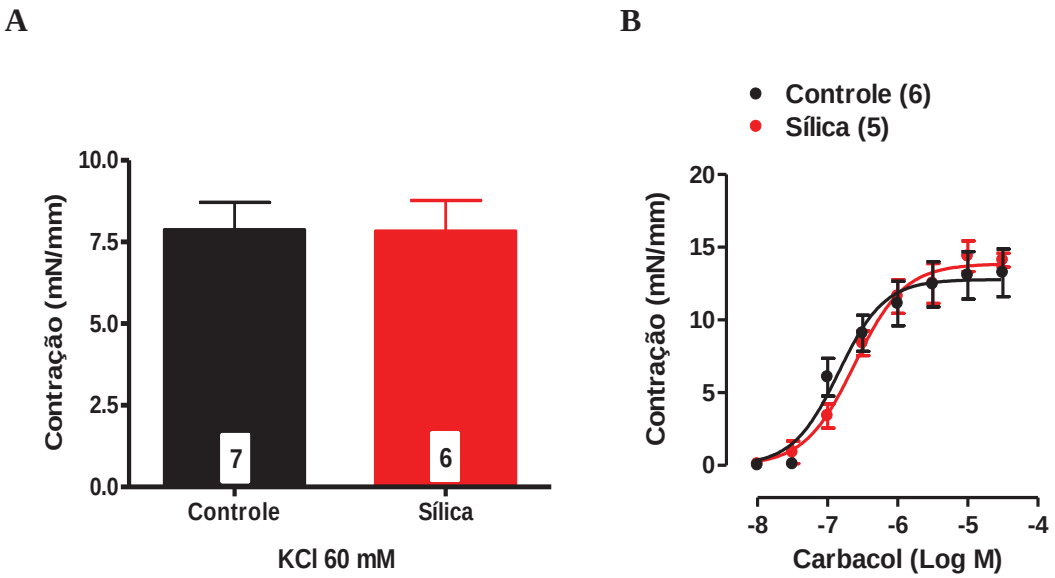


Figura 9: Reatividade de anéis de traqueia isolados de ratos Controle e Sílica ao KCl 60 mM **(A)** e ao carbacol **(B).** As respostas contráteis estão expressas como delta de contração em mN/mm de comprimento de anel. Os valores estão expressos como média ± EPM. O número de animais está indicado dentro das barras ou em parênteses. Análise estatística: teste *t* para KCl e ANOVA 2-vias para curva concentração-resposta ao carbacol.

Fonte: Própria autora

Os agonistas dos receptores muscarínicos são frequentemente denominados parassimpatomimétricos, sendo que o carbacol é capaz de ativar tanto receptores muscarínicos 2 e 3 (M_2 e M_3) como os nicotínicos (RANG et al., 2004). Na musculatura lisa de diferentes órgãos do trato gastrintestinal, da bexiga urinária e das vias aéreas, a ativação de receptores muscarínicos causa contração por ativar uma cascata intracelular dependente da ativação da proteína Gq que conduz ativação da fosfolipase C e consequentemente da proteína kinase C e do IP_3, o que em conjunto causa aumento da concentração de cálcio intracelular (RANG et al., 2004).

Os resultados obtidos demonstram que não houve diferença na contratilidade da traqueia ao KCl (agente despolarizante), bem como ao carbacol (agonista muscarínico) comparando-se estas respostas entre os grupos controle e instilados com sílica.

Em seguida, avaliamos nos anéis de traqueia isolados a resposta de relaxamento ao isoproterenol, um agonista β-adrenérgico não-seletivo. A seguir, os resultados (Figura 10):

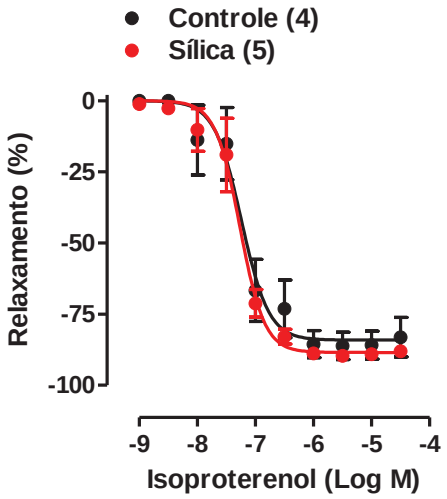


Figura 10: Reatividade de anéis de traqueia isolados de ratos Controle e Sílica ao isoproterenol. A resposta de relaxamento está expressa em % de relaxamento ao valor da pré-contração induzida por carbacol (10^{-5} M). Os valores estão expressos como média ± EPM. O número de animais está indicado dentro dos parênteses. Análise estatística: ANOVA 2-vias.

Fonte: Própria autora

O isoproterenol é um composto que ativa a via de sinalização intracelular acoplada aos receptores β-adrenérgicos. Estes receptores quando ativados induzem relaxamento da musculatura lisa via ativação da cascata intracelular dependente de adenilato ciclase com consequente aumento da produção de AMPc e ativação da proteína kinase A, o que ativa canais para K^+, hiperpolarixando a célula muscular lisa, o que diminui o influxo de cálcio e causa relaxamento. Na musculatura das vias aéreas este relaxamento caracteriza uma redução da resistência das vias aéreas ao fluxo de ar. Sendo assim, fármacos agonistas dos receptores β-adrenérgicos são amplamente utilizados na clínica para o tratamento de doenças obstrutivas pulmonares como a asma.

Os resultados das curvas de concentração-resposta indicam que não houve diferença significativa no relaxamento induzido pelo isoproterenol entre os dois grupos de animais estudados. Dados da literatura demonstram que citocinas pró-inflamatórias podem causar redução da responsividade β-adrenérgica em células musculares lisas das vias aéreas de humanos em cultura (SHORE et al., 1997). Além disso, o tratamento de ratos com IL-1β e TNF-α por 3 dias é capaz de causar hiperresponsividade da musculatura lisa de brônquios à metacolina, um agonista dos receptores muscarínicos, além de reduzir a resposta de relaxamentos dos mesmos albuterol, agonista dos receptores β_2-adrenérgicos (HORIBA et al., 2011). Entretanto, no presente estudo, não foi possível observar efeitos da sílica e/ou dos

fatores pró-inflamatórios que são sintetizados em quantidade elevada por macrófagos do tecido pulmonar durante o desenvolvimento da silicose sobre a reatividade das vias aéreas. Neste estudo avaliamos a reatividade das vias aéreas na fase aguda da silicose, que em ratos e camundongos corresponde aos 15 dias após instilação (BORGES et al., 2002). É possível que com o avançar da patologia este quadro modifique-se e alterações da responsividade das vias aéreas possam ser observadas.

5.5. Reatividade em artéria pulmonar isolada

Isolou-se a artéria pulmonar com o intuito de se realizar estudo de reatividade em um vaso sanguíneo intimamente ligado ao leito pulmonar.

Nos anéis de artéria pulmonar estudados foi avaliada a resposta contrátil a alta concentração de K^+, induzida por despolarização, em resposta a uma dose única de KCl 75 mM, como também a resposta contrátil à fenilefrina, um agonista α_1-adrenérgico. A seguir, os resultados (Figura 11):

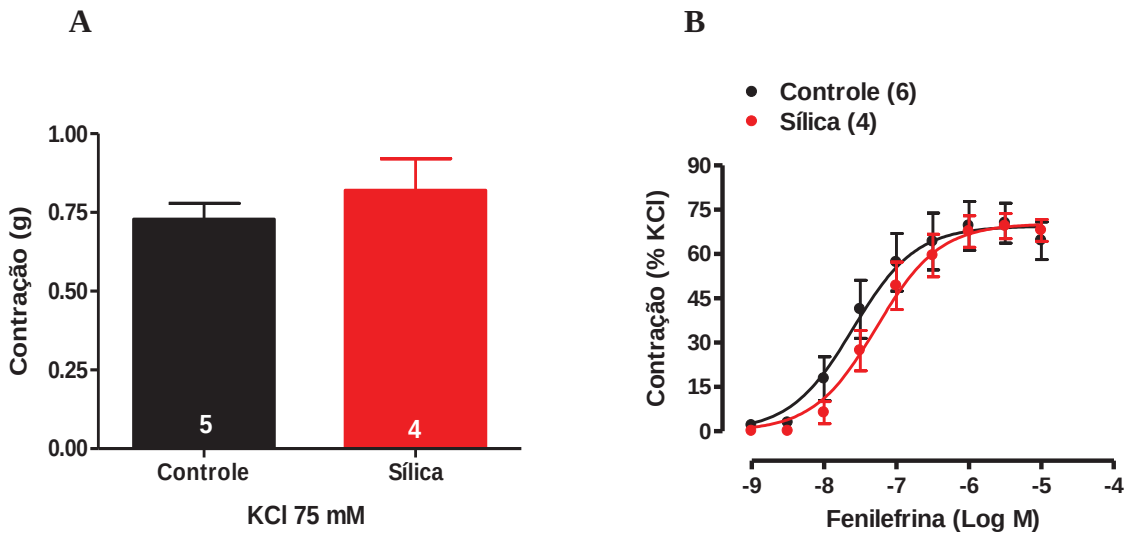


Figura 11: Reatividade de anéis de artéria pulmonar isolados de ratos Controle e Sílica ao KCl **(A)** e à fenilefrina **(B).** A resposta contrátil ao KCl está expressa como delta de contração em grama. A resposta contrátil à fenilefrina foi normalizada para resposta máxima de contração induzida pelo KCl (75 mM) em cada respectivo anel de artéria pulmonar analisado. Os valores estão expressos como média ± EPM. O número de animais está indicado dentro das barras ou em parênteses. Análise estatística: teste *t* para KCl e ANOVA 2-vias para curva concentração-resposta à fenilefrina.

Fonte: Própria autora

De acordo com os resultados observados na figura 11, não houve diferença contrátil nas respostas dos anéis de artéria pulmonar ao KCl e à fenilefrina.

Avaliou-se também a resposta de relaxamento à acetilcolina, um agonista muscarínico e ao nitroprussiato de sódio, um doador de NO. A seguir, os resultados (Figura 12):

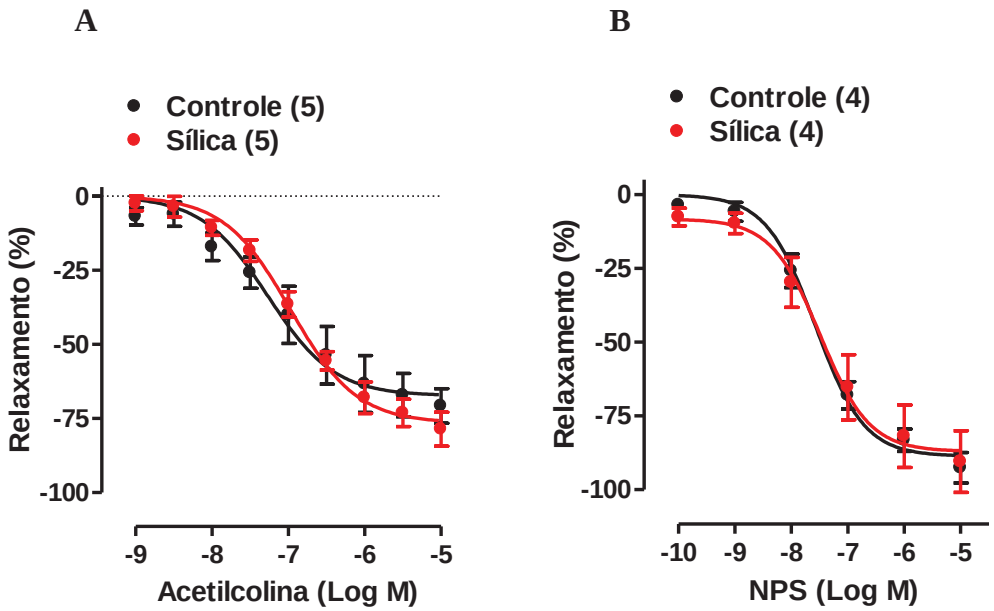


Figura 12: Curvas concentração-resposta à acetilcolina **(A)** e ao nitroprussiato de sódio (NPS) **(B)** em anéis de artéria pulmonar isolados em ratos Controle e Sílica. Os dados demonstram o relaxamento em relação à contração à fenilefrina (~10^{-6} M) e estão expressos como média ± EPM. O número de animais está indicado dentro dos parênteses. Análise estatística: ANOVA 2-vias.

Fonte: Própria autora

De acordo com os resultados, não houve diferença na resposta de relaxamento das artérias pulmonares a um vasodilatador dependente de endotélio, a acetilcolina e a um vasodilatador independente do mesmo, o nitroprussiato de sódio, sendo este apenas um doador de NO. A acetilcolina causa vasodilatação ao agir nos receptores muscarínicos das células endoteliais. Nestas células, o aumento da concentração de cálcio intracelular em resposta a ativação de receptores M_3 ativa a eNOS que por sua vez aumenta a síntese de NO.

A circulação pulmonar pode ser um dos principais alvos de partículas de dimensões mais finas que penetram profundamente nos pulmões após inalação (COURTOIS et al., 2010). Apesar do estresse oxidativo e inflamatório que pode ser gerado nos pulmões pela inalação de sílica, que é classicamente descrito na literatura, não foi observado no presente estudo uma alteração da reatividade das artérias pulmonares extralobares, apesar de sua

proximidade com o tecido pulmonar. Segundo Batalha (2002), a exposição a altas concentrações de partículas em suspensão no ambiente, como silício e sulfatos, pode estar associada à vasoconstrição e ao remodelamento de arteríolas pulmonares em ratos.

Estudos realizados *in vitro* indicam diminuição da resposta vasoconstritora à acetilcolina em artérias pulmonares isoladas de ratos que sofreram instilação intratraqueal de nanopartículas de carbono Por outro lado, não houve modificação no tônus vascular em resposta ao KCl, agente despolarizante (COURTOIS et al., 2010). Quando se avaliou as respostas decorrentes de instilação intratraqueal de outra nanopartícula, o dióxido de titânio (TiO_2), não houve diferença à ação de agentes vasoconstritores e relaxantes entre os grupos de animais estudados. Estes resultados foram obtidos após 21 dias de instilação das partículas estudadas (COURTOIS et al., 2010). Assim, é possível que alterações da reatividade vascular, se ocorrerem após a inalação de partículas em suspensão no ar ambiente, venham a manifestar-se após um tempo mais prolongado seguido da exposição. Ou aconteçam apenas em pequenos vasos sanguíneos da circulação pulmonar, mais sensíveis e em mais íntimo contato com os dados causados no parênquima pulmonar. Assim, futuros estudos deverão ser conduzidos no sentido de elucidar os possíveis mecanismos vasculares locais no pulmão associados à fisiopatologia da silicose.

5.6. Reatividade em aorta isolada

Segundo estudos prévios, as partículas de sílica podem atravessar a membrana respiratória quando há a indução de um processo inflamatório local. Uma vez ocorrido este processo, as partículas de sílica poderiam atingir a circulação periférica, causando efeitos diretos sobre os tecidos não pulmonares (MILLS et al., 2009). Além disso, ERDOs e citocinas pró-inflamatórias poderiam mediar efeitos vasculares sistêmicos na silicose. Dentro deste contexto, os estudos de reatividade vascular foram realizados em anéis de aorta isolados, utilizando-se a aorta como modelo de vaso sanguíneo sistêmico.

Nos anéis de aorta estudados foi avaliada a resposta contrátil ao KCl (agente despolarizante), como também a resposta contrátil à fenilefrina, um agonista α-adrenérgico. Em alguns anéis, o endotélio vascular foi removido mecanicamente para avaliação das respostas na ausência das células endoteliais. A seguir, os resultados (Figura 13):

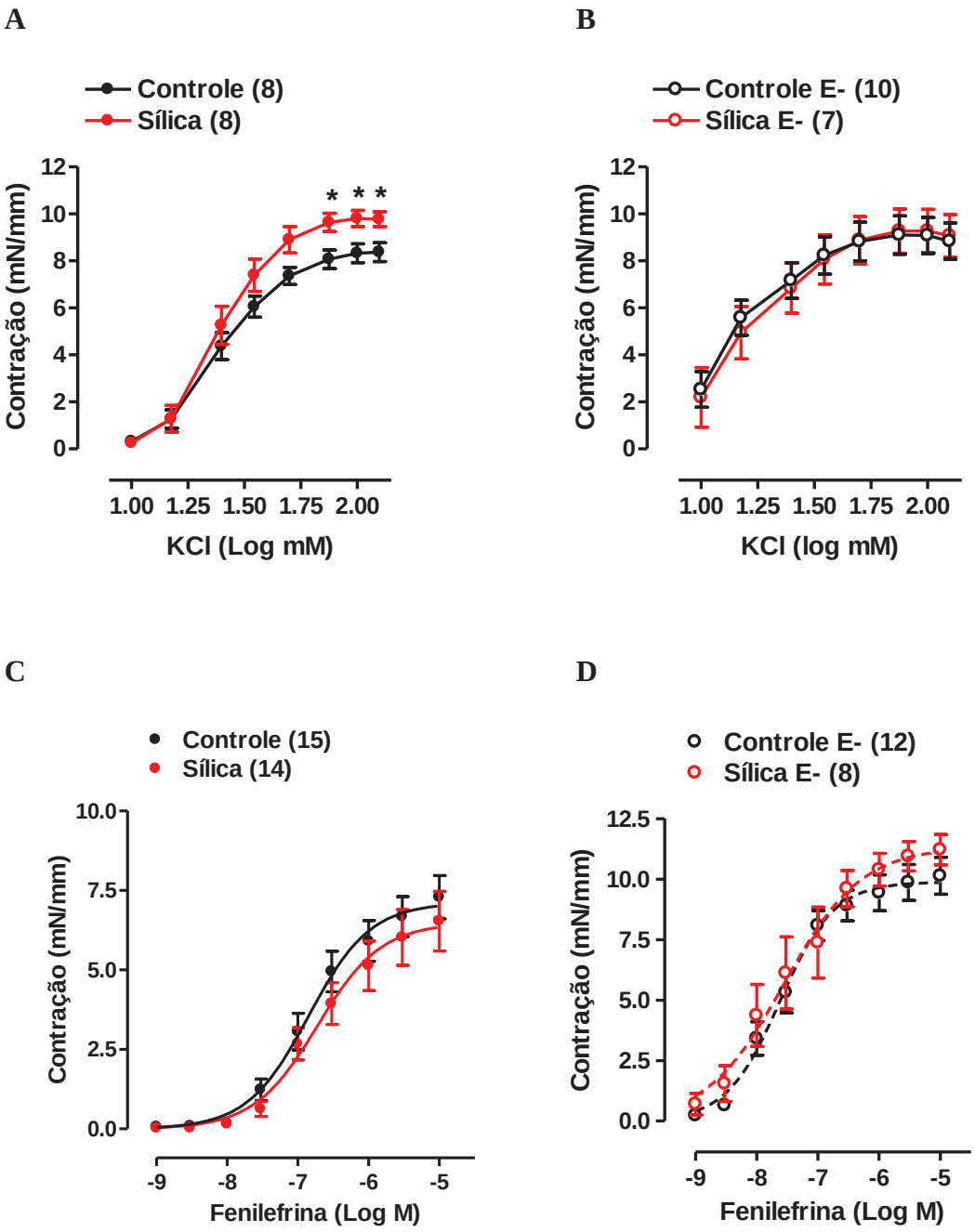


Figura 13: Avaliação da resposta contrátil de anéis de aorta intactos (símbolos cheios) ou após remoção mecânica do endotélio (E-, símbolos vazios) ao KCl **(A, B)** e à fenilefrina **(C, D)** em ratos Controle e Sílica. Os valores estão expressos como delta de contração em mN/mm de comprimento do anel e representam média ± EPM. O número de animais está indicado dentro dos parênteses. Análise estatística: ANOVA 2-vias, *p<0,05 Controle *vs.* Sílica.

Fonte: Própria autora

De acordo com os resultados obtidos para os anéis de aorta, observa-se que há um pequeno, mas significativo aumento da contração ao KCl em anéis de animais tratados com endotélio preservado. Quando se retirou o endotélio, os dois grupos tiveram a resposta

contrátil aumentada e se igualaram; indicando, desta forma, um possível papel das células endoteliais no aumento da resposta contrátil ao KCl. Os mesmos resultados não ocorreram em resposta à fenilefrina. Não houve diferença significativa na contração ao agonista α_1-adrenérgico entre os dois grupos de animais estudados. Quando se removeu o endotélio de alguns anéis, houve um aumento de contratilidade à fenilefrina nos dois grupos, efeito esperado pela remoção das células endoteliais, mas este efeito foi de magnitude similar entre os dois grupos estudados, mantendo-se a resposta da fenilefrina igual entre os grupos Controle e Sílica.

Além das respostas contráteis, nos anéis de aorta estudados foi avaliada a resposta de relaxamento à acetilcolina, agonista muscarínico, e ao nitroprussiato de sódio, doador de NO. A seguir, os resultados (Figura 14):

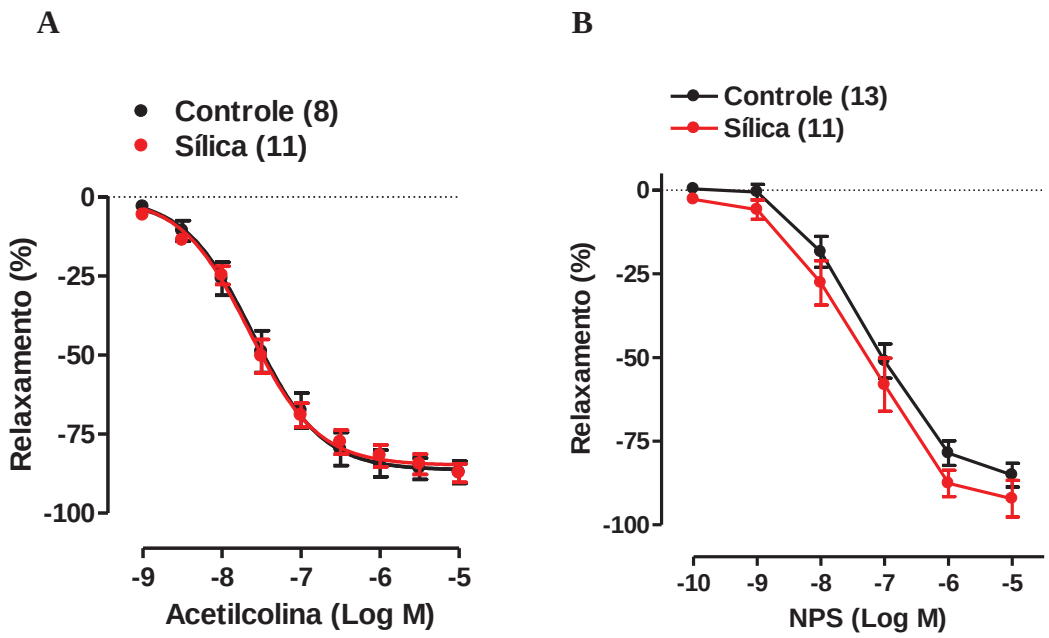


Figura 14: Avaliação da resposta de relaxamento de anéis de aorta à acetilcolina **(A)** e ao nitroprussiato de sódio (NPS) **(B)** em ratos Controle e Sílica. Os dados demonstram o relaxamento em relação à contração à fenilefrina (~10^{-6} M) e estão expressos como média ± EPM. O número de animais está indicado dentro dos parênteses. Análise estatística: ANOVA 2-vias.

Fonte: Própria autora

De acordo com os resultados obtidos, não houve diferença na resposta de relaxamento das aortas à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio (NPS).

Testar a função vasomotora dependente do endotélio, mediada por NO, tem sido ferramenta importante para avaliar a integridade funcional do endotélio vascular tanto *in vitro* como *in vivo,* sendo que a vasodilatação dependendo do endotélio pode servir como referência para a biodisponibilidade do NO (CARVALHO et al., 2005).

Embora nas aortas tenha se observado apenas um pequeno aumento na contratilidade ao KCl entre os animais tratados com sílica, estudos de reatividade em ratos que ingeriram sílica contida na água de beber por 8 dias demonstram um aumento da contratilidade à noradrenalina e uma redução do relaxamento ao nitroprussiato de sódio que foram associados a um prejuízo da responsividade da musculatura lisa ao NO. Apesar da deficiência da sinalização do NO, a resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina foi aumentada nos animais que ingeriram sílica. Os dados deste estudo revelaram que esta resposta aumentada de relaxamento nos animais tratados com sílica foi devida a um mecanismo compensatório à falta de síntese de NO, através da elevação de níveis de EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio) em aortas isoladas (ONER, et al., 2006). Assim, a exposição à sílica pode causar efeitos controversos na vasculatura, como, por exemplo, desde aumentar a reduzir respostas vasodilatadoras. Entretanto, há poucos trabalhos na literatura que avaliaram os efeitos da inalação de sílica e/ou da silicose aguda ou crônica sobre a reatividade de vasos sistêmicos. Este trabalho é pioneiro neste sentido. Levando-se em consideração que o ar ambiente de grandes cidades apresenta a cada ano maior concentração de partículas de sílica em suspensão avaliar os possíveis destas partículas sobre o sistema cardiovascular.

As partículas de sílica podem não apresentar efeitos vasculares *per se,* mas é possível que em associação com outros fatores que causem dano vascular, estas partículas agravem o quadro patológico. Neste sentido que a exposição à citocinas pró-inflamatórias como a IL-1β e o TNF-α pode causar disfunção vascular em animais com doença cardiovascular prévia como a hipertensão (DORRANCE, 2007). Assim, hipotetizou-se no presente trabalho se nos ratos com silicose aguda a função vascular poderia ser prejudicada na presença de citocinas pró-inflamatórias. Para testar tal hipótese, realizou-se o estudo de reatividade de anéis intactos de aorta incubados com TNF-α. Os resultados da resposta contrátil à fenilefrina e do relaxamento à acetilcolina encontram-se a seguir (Figuras 15 e 16):

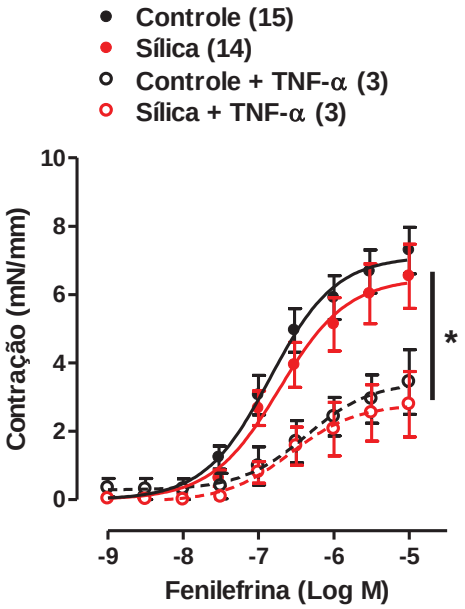


Figura 15: Estudo da resposta contrátil à fenilefrina de anéis de aorta incubados com TNF-α (símbolos vazios, linha tracejada) e anéis de aorta sem incubação (símbolos cheios) em ratos Controle e Sílica. Os valores estão expresso como delta de contração em mN/mm de comprimento do anel e representam média ± EPM. O número de animais está indicado dentro dos parênteses. Análise estatística: ANOVA 2-vias; *p<0,05 *vs*. sem TNF-α.

Fonte: Própria autora

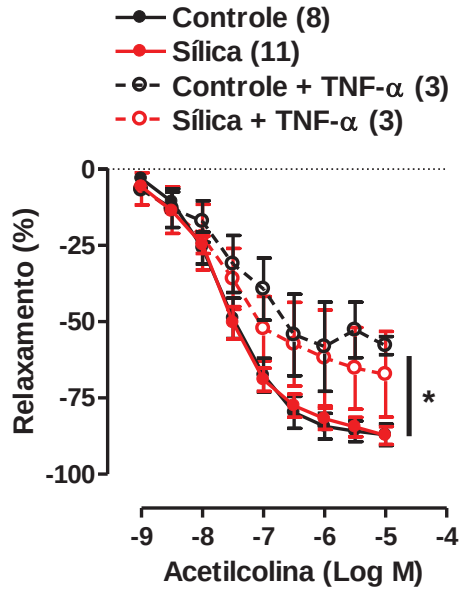


Figura 16: Estudo da resposta de relaxamento de anéis de aorta à acetilcolina incubados com TNF-α (símbolos vazios, linha tracejada) e anéis de aorta sem incubação (símbolos cheios) em ratos Controle e Sílica. Os dados demonstram o relaxamento em relação à contração à fenilefrina (~10^{-6} M) e estão expressos como média ± EPM. O número de animais está indicado dentro dos parênteses. Análise estatística: ANOVA 2-vias; *p<0,05 *vs*. sem TNF-α.

Fonte: Própria autora

Observou-se que a incubação por 2 horas com TNF-α reduziu significativamente a resposta contrátil da fenilefrina em ambos os grupos estudados, e mesmo na presença desta citocina, não houve diferença entre a reatividade do grupo Controle em comparação ao grupo Sílica. Já é descrito na literatura que a incubação com citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α podem causar redução da contratilidade vascular (NAKAMURA et al., 2000). Isso ocorre, entre outros, pela capacidade do TNF-α estimular a atividade da iNOS, que sintetiza NO em grande quantidade (NATAN & XIE, 1994). Uma hiporresponsividade vascular associada a um aumento da atividade e expressão da iNOS é associada a vasos sanguíneos isolados expostos ao agrotóxico paraquat (ZOCRATO et al., 2010). No presente estudo, este efeito do TNF-α foi similar entre as aortas dos dois grupos experimentais estudados, sugerindo que no tempo de silicose estudado não há diferença no efeito vascular causado por esta citocina.

Em somatória ao efeito na resposta fenilefrina, observou-se que houve uma redução na resposta de relaxamento à acetilcolina nos anéis que foram pré- incubados com TNF-α. Sabe-se que citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF-α podem desencadear disfunção endotelial principalmente por reduzir a biodisponibilidade de NO (ATOCHIN et al., 2010). O TNF-α é uma citocina que pode induzir disfunção endotelial por vários mecanismos, dentre eles: aumento da produção de ERDOs e ativação do fator nuclear-κB (NF-kB) que por sua vez pode aumentar a síntese de enzimas como a iNOS (ZEMZE et al., 2009; MACHADO, 2008).

Neste sentido, foi demonstrado que o estresse inflamatório induzido pelo agrotóxico paraquat leva a um aumento da expressão protéica da iNOS no endotélio. Este evento, além de reduzir a contração à fenilefrina em artéria pulmonar de ratos, causou uma diminuição da resposta de relaxamento à acetilcolina nesta artéria. Valores aumentados da expressão gênica de iNOS resulta no aumento da produção de NO endotelial basal, sendo este um mecanismo subjacente à hiporesponsividade da artéria pulmonar a agentes vasoconstritores e relaxantes (ZOCRATO et al., 2010). Entretanto, este efeito de prejuízo da função endotelial foi observado em ambos os grupos estudados, ou seja, as aortas dos animais que receberam instilação de sílica não apresentam maior ou menor sensibilidade aos efeitos vasculares do TNF-α após 15 dias seguidos da exposição.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados indicaram que houve o desenvolvimento de silicose após 15 dias seguidos que os animais receberam instilação de sílica, que foi caracterizada pelo menor peso corporal do grupo, aumento do peso do ventrículo direito e presença de nódulos concêntricos de fibrose nos pulmões. Apesar das alterações pulmonares e cardíacas, os presentes dados sugerem que a silicose aguda não é associada a alterações da reatividade da traqueia, nem da artéria pulmonar, ou da aorta.

Em relação aos anéis de aorta, houve aumento da contratilidade a altas concentrações de KCl, agente despolarizante, que foi dependente do endotélio. Entretanto a resposta contrátil à fenilefrina e as respostas de relaxamento induzidas por acetilcolina e nitroprussiato de sódio não foram modificadas. Isso indica que na silicose aguda, apesar de não haver mudanças da reatividade significativas, já há um indício de alteração da contratilidade de um vaso sanguíneo sistêmico como a aorta. A incubação com o TNF-α *in vitro* reduziu a reatividade da aorta à fenilefrina e à acetilcolina, mas de maneira similar entre os grupos, sugerindo que este fator não parece sensibilizar a reatividade vascular de maneira diferenciada na presença de sílica.

Especula-se que com o avançar da doença para a frase crônica, na presença de doenças cardiovasculares prévias e/ou em artérias de resistência e vias aéreas periféricas, os efeitos da sílica *per se* e/ou da silicose possam ser magnificados. Estas hipóteses devem ser foco de estudos futuros para melhor entendimento da fisiopatologia desta doença ocupacional de incidência significativa no Brasil e no mundo, e que cursa com baixa qualidade de vida e alta mortalidade e custos aos cofres públicos.

7. REFERÊNCIAS

ASANO, T. et al. Thalidomide attenuates airway hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. **Biol Pharm Bull.** v. 33, n. 6, p. 1028-1032, 2010.

ASSAD, R. S. et al. Adjustable pulmonary trunk banding: comparision of two methods of acute subpulmonary ventricle hypertrophy. **Braz J Cardiovasc Surg.** v. 21, n. 4, p. 418-428, 2006.

ATOCHIN, D. N.; HUANG, P. L. Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction. **Eur J Physiol.** v. 460, p. 965-974, 2010.

BATALHA, J. R. F. Concentrated air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. **Envrirom Health Perspec.** v. 110, n. 12, 2002.

BLACKFORD, J. A. et al. Comparasion of inducible nitric oxide synthase gene expression and lung inflammation following intratracheal instillation of silica, coal, carbonyl iron, or titanium dioxide in rats. **J Toxicol Environ Health.** v. 51, n. 3, p. 203-218, 1997.

BORGES, V. M. et al. Apoptosis underlies immunopathogenic mechanisms in acute silicosis. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v. 27, n. 1, p. 78-84, 2002.

CARVALHO, M. H. C. et al. Funções normais do endotélio – uma visão geral. In: LUZ, P. L.; LAURINDO, F. R. M.; CHAGAS, A. C. P. **Endotélio e doenças cardiovasculares.** 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 17-20.

CASTRANOVA, V.; VALLYAATHAN, V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. **Environ Health Perspect.** v. 108, n. 4, p. 675-684, 2000.

CASTRANOVA, V. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: Role of reactive oxygen/nitrogen species. **Free Radic Biol Med.** v. 37, n. 7, p. 916-925, 2004.

CORNWELL, T. L.; PRYZWANSKY, K. B.; LINCOLN, T. M. Regulation of sarcoplasmatic reticulum protein phosphorilation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. **Molec Pharmacol.** v. 40, p. 923-931, 1991.

COURTOIS, A. et al. Effect of engineered nanoparticles on vasomotor responses in rat intrapulmonary artery. **Toxicol and Applied Pharm.** v. 245, n. 2, p. 203-210, 2010.

DAVEL, A. P. et al. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. **Br J Pharmacol**. v. 148, p. 629-639, 2006.

DAVEL, A. P. et al. Effects of isoproterenol-treatment for 7 days on inflammatory mediators in rat aorta. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 295, p. 211-219, 2008.

DAVEL, A. P. et al. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: un update. **Braz J Med Biol Res.** v. 44, n. 9, p. 920-932, 2011.

DELBIN, M. A. et al. Beneficial effects of physical training on the cardio-inflammatory disorder induced by lung ischemia/reperfusion in rats. **Inflammation**. v. 34, n. 5, p. 319-325, aug. 2010.

DORRANCE, A. M. Interleukin 1-Beta (IL-1β) enhances contractile responses in endothelium-denuded aorta from hypertensive, but not normotensive rats. **Vascul Pharmacol**. v. 47, n. 2-3, p. 160-165, 2007.

EL-BASSOSSY, H. M. Haem oxygenase-1 induction ptotects against tumour necrosis factor α impairment of endothelial-dependent relaxation in rat isolated pulmonary artery. **Br J Pharmacol.** v. 158, n. 6, p. 1527-1535, 2009.

FAFFE, D. S. et al. Lung tissue mechanics and extracellular matrix composition in a murine model of silicosis. **J Appl Physiol.** v. 90, p. 1400-1406, 2001.

FEDOTOV, I. A.; EIJKEMANS, G. J. M. The ILO/WHO global programme for the ilimination of silicosis (GPES). **The Global Occup Health network.** n. 12, p. 1-3, 2011.

FERREIRA, A. S. et al. Fibrose maciça progressiva em trabalhadores expostos à sílica. Achados na tomografia computadorizada de alta resolução. **J Bras Pneumol.** v. 32, n. 6, p. 523-528, 2006.

HAMILTON, R. F.; THAKUR, S. A.; HOLIAN, A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. **Free Biol Med.** v. 44, p. 1246-1258, 2008.

HERSETH, J. I. et al. IL-1β a determinant in silica-induced cytokine responses in monocyte-endothelial cell co-cultures. **Human & Experiment Toxicol.** v. 27, p. 387-399, 2008.

HNIZDO, E.; SLUIS-CREMER, G. K. Risk of silicosis in a cohort of white South African gold miners. **Am J Ind Med.** v. 24, n. 4, p. 447-457, 1993.

HNIZDO, E.; MURRAY, J. Risk of pulmonary tuberculosis relative to silicosis and exposure to silica dust in South African gold miners. **Occup Environ Med.** v. 55, n. 7, p. 496-505, 1998.

HORIBA, M. et al. Effect of IL-1β and TNF-α vs IL-13 on bronchial hiperresponsivenes, β(2)-adrenergic responses and cellularity of bronchial alveolar lavage fluid. **Auton Autacoid Pharmacol.** v. 31, n. 3-4, p. 37-49, 2011.

HUBBARD, A. K. Role for T lymphocytes in silica-induced pulmonary inflammation. **Lab. Invest**. v. 61, n. 1, p. 46-52, 1989.

KARAKI, H. et al. Calcium movement, distribution and function in smooth muscle. **Pharmacol Reviews.** v. 49, p. 157-225, 1997.

KREISS, K.; ZHEN, B. Risk of silicosis in a Colorado mining community. **Am J Ind Med.** v. 30, n. 5, p. 529-539, 1996.

KUEMPEL, E. D. et al. Pulmonary inflammation and crystalline silica in respirable coal mine dust: dose-response. **J Biosci.** v. 28, n. 1, p. 61-69, 2003.

KUMAR, R. K.; LI, W.; O'GRADY, R. Activation of lymphocytes in the pulmonary inflammatory response to silica. **Immunol. Invest.** v. 19, n. 4, p. 363-372, 1990.

KUME, H.; TAKI, F.; HASEGAWA, Y. Thalidomide attenuates airway hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. **Biol Pharm Bull.** v. 33, n. 6, p. 1028-1032, 2010.

LIDO, A. V.; KITAMURA, S.; OLIVEIRA, J. I. et al. Occupational exposure and occurrence of pneumoconiosis in Campinas, Brazil, 1978-2003**. J Bras Pneumol.** v. 34, n. 6, p. 367-72, 2008.

LIU, X.; SUN, J. Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF-κB pathways. **Biomaterials.** v. 31, n. 32, p. 8198-8209, 2010.

LOTVALL, J.; INMAN, M.; O'BYRNE, P. Measurement of airway hiperresponsiveness: new considerations. **Thorax.** v. 53, p. 419-424, 1998.

MACHADO, U. G. Introdução à fisiologia endócrina. In: AIRES, M. M. **Fisiologia.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 927.

MAFRA JÙNIOR, A.; MADEIRA, M. S. **A segurança do trabalho em minas de carvão agindo na prevenção de pneumoconiose – Região carbonífera de Santa Catarina.** 74f. Monografia (Especialização em Engenharia de Segurança do Trabalho). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, 2005.

MAHNKEN, A. H.; BREUER, C.; HAAGE, P. Silicosis-induced pulmonary artery stenosis: demonstration by MR angiography and perfusion MRI. **Br J Radiol**. v. 74, n. 885, p. 859-61, 2001.

MENDES, R. **Patologia do trabalho.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 1767-1789.

MICHELINI, L. C.; ROSSONI, L. V. Vasomotricidade e regulação local de fluxo. In: AIRES, M. M. **Fisiologia.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 502.

MILLER, B. G. Risks of silicosis in coalworkers exposed to unusual concentrations of respirable quartz. **Occup Environ Med.** v. 55, n. 1, p. 52-58, 1998.

MILLS, N. L.; DONALDSON, K.; HADOKE, P. W. et al. Adverse cardiovascular effects of air pollution. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med.** v. 6, n. 1, p. 36-44, 2009.

MURRAY, J.; REID, G.; KIELKOWSKI, D. et al. Cor pulmonale and silicosis: a necropsy based case-control study. **Br J Ind Med.** v. 50, n. 6, p. 544-548, 1993.

NASCIMENTO, C. A.; PATRIARCA, G.; HEIMANN, J. C. Estrutura orgânica do endotélio vascular. In: LUZ, P. L.; LAURINDO, F. R. M.; CHAGAS, A. C. P. **Endotélio e doenças cardiovasculares.** 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 11.

NATAN, C.; XIE, Q. W. Nitric oxide syntheses: roles, tolls, controls. **Cell**. v. 78, n. 6, p. 915-918, 1994.

NELIN, L. D. et al. L-Arginine uptake and metabolism following in vivo silica exposure in rat lungs. **Am J Respir Cell Mol Biol.** v. 26, n. 3, p. 348-355, 2002.

NG, T.; CHAN, S. L.; LAM, K. Radiological progression and lung function in silicosis: a ten year follow up study. **British Med Journ.** v. 295, p. 164-168, 1987.

NOGUEIRA, D. P. et al. Occurence of silicosis among workers of the ceramic industry of the city of Jundiaí, SP (Brazil). **Rev Saude Publica.** v. 15, n. 3, p. 263-271, 1981.

PORTER, D. W. et al. Enhanced nitric oxide and reactive oxygen species production and damage after inhalation of silica. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v. 283, n. 2, p. L485–L493, 2002.

ONER, G. et al. Dietary solica modifies the characteristics of endothelial dilation in rat aorta. **Endothelium.** v. 13, n.1, p. 17-23, 2006.

RANG, H. P. et al. Transmissão colinérgica. **Farmacologia.** 5. ed. Tradução de Patrícia Lydie Voeux e Antônio Magalhães da Silva Moreira. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 155-162.

SALDIVA, P. H. N. et al. Lung inflammation inducedby concentrated ambient air particles is related to particle composition. **Am J Resp Crit Care Med.** v. 165, n. 12, p. 1610-1617, 2002.

SCHAPIRA, R. M.; WIESSNER, J. H.; MORRISEY, J. F. et al. L-Arginine uptake and metabolism by lung macrophages and neutrophils following intraracheal instillation of silica in vivo. **Am J Respir Cell Mol Biol.** v. 19, n. 2, p. 308-315, 1998.

SCHINS, R. P. F.; BORM, P. J. A. Mechanisms of mediators in coal dust inducedtoxicity: a review**. Ann Occup Hyg.** v. 43, n. 1, p. 7-33, 1999.

SHORE, S. A.; LAPORTE, J.; HALL, I. P. et al. Effect of IL-1β on responses of cultured human airway smooth muscle cells to bronchodilator agonists. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v. 16, n. 6, p. 702-712, 1997.

SUN, Q. et al. Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. **JAMA.** v. 294, n. 23, p. 3003-3010, 2005.

TAO, F.; GONZALEZ-FLECHA, B.; KOBZIK, L. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. **Free Rad Biol Med**. v. 35, n. 4, p. 327-340, 2003.

VALLYATHAN, V. et al. Changes in Bronchoalveolar Lavage Indices**. J Respir Crit Care Med.** v. 162, n. 3, p. 958-965, 2000.

WEST, J. **Fisiologia Pulmonar – Princípios Básicos.** 7.ed. Tradução de E. M. Rodrigues Filho e A. C. C. Botelho. São Paulo: Artmed, 2010. p. 161-164.

YILDIZ, O. A.; GULBAY, B. E.; SARYAL, S. et al. Evaluation of the relationship between radiological abnormalities and both pulmonary function and pulmonary hypertension in coal workers' pneumoconiosis. **Respirology.** v. 12, n. 3, p. 420-426, 2007.

ZANGHI, Z., SHEN, H. M., ZHANG, Q. F. Critical role of GSH in silica-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in alveolar macrophages. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v. 277, n. 4, p. L743-L748, 1999.

ZEMZE, S. M. et al. Interleukin-10 inhibits the in vivo and in vitro adverse effects of TNF-α on the endothelium of murine aorta. **Am J Heart Circ Physiol.** v. 299, p. H1160-H1167, 2010.

ZIN, W. A.; ROCCO, P. R. M.; FAFFE, D. S. Organização morfoestrutural do sistema respiratório. In: AIRES, M. M. **Fisiologia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 607-608.

ZOCRATO, L. B. R. et al. Increased expression of endothelial iNOS accounts for hyporesponsiveness of pulmonary artery to vasoconstrictors after paraquat poisoning. **Toxicol in Vitro.** v. 24, p. 1019-1025, 2010.

ANEXO A- Parecer do comitê de ética

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **2308-1**, sobre **"Efeitos da exposição à sílica sobre a responssividade vascular e de vias aéreas de ratos"**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel / Flávia Regina Bueno**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **06 de dezembro de 2010**.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **2308-1**, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **December 6, 2010**.

Campinas, 06 de dezembro de 2010.

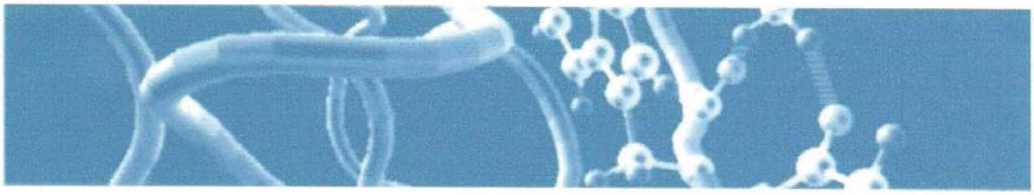
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/

ANEXO B – Certificado de apresentação de trabalho - FeSBE 2011



FeSBE 2011

24 a 27 de agosto de 2011
Rio de Janeiro – RJ

CERTIFICADO

Certificamos que o resumo 02.068 – TRACHEAL AND AORTIC REACTIVITY IN A RAT MODEL OF ACUTE SILICOSIS, autoria de BUENO, F. R.; MACHADO, M. N.; ZIN, W. A.; ROSSONI, L. V.; DAVEL, A. P. C., foi apresentado na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizado de 24 a 27 de agosto de 2011 no Rio de Janeiro, RJ.

Comissão Organizadora

CAPES CNPq FAPESP FAPERJ

Para verificar a autenticidade deste certificado, acesse www.fesbe.org.br/certificados