

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MATHEUS MORAIS NEVES

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL PARA
SILICOSE EM CAMUNDONGOS

UBERLÂNDIA - MG
NOVEMBRO DE 2024

MATHEUS MORAIS NEVES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL PARA
SILICOSE EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de curso apresentada
ao Instituto de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito final
para a obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira
Coorientador: Murilo Vieira da Silva

UBERLÂNDIA – MG
NOVEMBRO DE 2024
MATHEUS MORAIS NEVES

Desenvolvimento e validação de modelo experimental para doença ocupacional silicose em camundongos

Trabalho de Conclusão de curso apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Murilo Veira da Silva – ProPP/UFU

Presidente

Flávia Batista Ferreira França – LABME/UFU

Membro

Isabela Lemos de Lima – LABME/ufu

Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia – Minas Gerais, 18 de novembro de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro momento, a Deus por todas minhas capacidades e oportunidades, pela vida e por tudo que Ele sempre me proporcionou, por estar sempre ao meu lado e apaziguar meu coração.

À toda minha família, os quais sempre me apoiaram e me incentivaram no meu caminho dos estudos, a buscar os meus sonhos e me manter firme nas minhas crenças, mesmo nos momentos de maior dúvida. Especialmente, agradeço meus avós Raquel e Natanael, que me criaram mostrando a importância da educação, do respeito e do amor, que mesmo nas maiores dificuldades, tudo daria certo, e mesmo que eles já tenham falecido, carregarei sempre a memória deles em meu coração.

Aos meus pais, Selma e José Renato, os quais apoiaram todos os meus sonhos e nunca me deixaram desistir sob nenhum problema e tristeza, que me deram a base para eu conseguir chegar aqui e com a benção de Deus ainda chegarei mais longe e daria orgulho a eles.

Ao meu irmão, Gessynger, minha inspiração científica, quem sempre me mostrou uma opção diferente, um caminho diferente para lutar com meus problemas e serviu como modelo para muitas de minhas escolhas.

À minha namorada, Giovanna, que me acompanhou durante todo o processo de escrita deste trabalho, que escutou minhas dúvidas e sempre ofereceu um ombro amigo para os momentos de insegurança, que acalentou meu coração e sempre me deu o carinho que me ajudou em meu caminho.

Aos meus amigos, que estavam por mim em todos os momentos, que contribuíram para a alegria e diversão em momentos difíceis, que me auxiliaram a sanar dúvidas acadêmicas e pessoais, que me ajudaram nas distrações e nas noites em claro para a escrita do trabalho.

Ao Laboratório de Biotecnologia em Modelos Experimentais, minha casa acadêmica, o lugar que aprendi o que era ser um pesquisador, lugar que sob a orientação dos meus mestres, Murilo, Isabela e Flávia, além de todos meus amigos, consegui me desenvolver como pessoal e profissional.

Enfim, a todos que participaram de toda minha evolução e da construção da pessoa que sou hoje, deixo meus profundos agradecimentos.

RESUMO

O uso de animais como modelos para estudo e pesquisa é uma prática antiga nas ciências, notadamente nas ciências da vida, permitindo uma representação próxima e complexa do funcionamento de vias metabólicas, fisiologia, estruturas anatômicas e evolução de patologias humanas. Nesse contexto, a forma pela qual a condição patológica evolui no modelo animal, nos permite prever como ocorrerá no humano, possibilitando a identificação de alvos terapêuticos. A silicose é uma doença pulmonar fibrosante com impactos significativos na saúde pública, estimando-se milhões de trabalhadores expostos globalmente. Tal patologia está intimamente ligada à inspiração de partículas de dióxido de silício, sílica cristalina, destacando a relevância da exposição à esta poeira, presente em diversos setores industriais, como jateamento de areia, mineração e construção civil. A inalação destas partículas não causa apenas a silicose, mas uma série de outras condições danosas à saúde do indivíduo, como enfisema pulmonar, câncer de pulmão e doenças autoimunes. O mecanismo patológico da doença envolve a ativação de diversas vias fisiológicas inflamatórias decorrentes da inalação das partículas de sílica, resultando em fibrose por deposição de colágeno. Assim, foi proposto neste estudo o desenvolvimento e validação de um modelo experimental utilizando camundongos da linhagem C57BL/6. Visou também atingir os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3, Saúde e Bem-Estar, e 8, Trabalho Decente. Para que isto fosse possível, diversas análises foram feitas, como histopatologia pulmonar e morfometria do parênquima do pulmão, além de determinar de maneira qualitativa e quantitativa moléculas do processo inflamatório e oxidativo importantes na evolução patológica da silicose, utilizando para este fim, técnicas como ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Por fim, o modelo desenvolvido neste trabalho foi válido para observação e compreensão de mecanismos histopatológicos da doença, porém futuros ensaios são necessários para o aperfeiçoamento da metodologia proposta para análises bioquímicas e moleculares dos processos decorrentes da silicose

Palavras-Chave: Silicose; Inflamação; Doença Ocupacional; Modelo Animal

LISTA DE SIGLAS

ASC: Proteína adaptadora

bFGF: Fator de crescimento de fibroblasto

cDNA: Ácido desoxirribonucleico codificante

CEUA: Comissão de Ética em Experimentação Animal

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidade óptica

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FAZ: *Fatty acid synthase*

FASL: Ligante de *fatty acid synthase*

FRAP: Capacidade de redução férrica

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HMGB1: Grupo de proteína de alta mobilidade B1

HO-1: Heme-oxigenase 1

IFN- γ : Interferon game

IL-10: Interleucina 10

IL-18: Interleucina 18

IL-1 β : Interleucina 1 Beta

MDA: Malondialdeído

MMP-9: metaloproteinase de matriz 9

MMPs: metaloproteinases de matriz

NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

MPA: Medicamento pré-anestésico

NF-K β : Fator nuclear kappa beta

NLR: Receptores intracitoplasmáticos do tipo NOD

NLRP3: Receptores intracitoplasmáticos do tipo NOD, contendo 3 domínios de pirina

NOD: Domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo

NOX2: NADPH oxidase 2

ODS: Objetivos de desenvolvimento sustentável

OIT: Organização Internacional Do Trabalho

OMS: Organização Mundial Da Saúde

PAS: *Periodic Acid Schiff*

PBS: Tampão fosfato-salino

REBIR: Rede de Biotérios de Roedores

RNA: Ácido ribonucleico

RNS: Espécies reativas de nitrogênio

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RPM: Rotações por minuto

RT-qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

SOD: Superóxido dismutase

STAT3: *Signal transducers and activators of transcription 3*

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TGF-beta: Fator de crescimento transformador beta

TMB: Tetrametilbenzidina

TMP: 1,1,3,3-tetrametilciclo-propanotetraol

TNFR: Receptores de fator de necrose tumoral

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TPTZ: 2,4,6-tripiridil-s-triazina

UFU: Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	IMPORTÂNCIA DE ANIMAIS NA EXPERIMENTAÇÃO	8
1.2	DOENÇAS OCUPACIONAIS E SILICOSE.....	9
1.3	CLASSIFICAÇÕES DA SILICOSE	10
1.4	VIA DAS METALOPROTEÍNAS, FATOR NUCLEAR KAPPA B (NF-KB), FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA (TGF-BETA), CASPASE E APOPTOSE	12
1.5	VIA DA INFLAMASSOMA	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL:	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	15
3	METODOLOGIA.....	16
3.1	ANIMAIS:	16
3.2	MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS E INOCULAÇÃO DE NANO PARTÍCULAS DE SÍLICA:	16
3.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA PULMONAR	17
3.4	PERFIL DE CITOCINAS	17
3.5	PERFIL BIOQUÍMICO DE SORO.....	18
3.6	PREPARAÇÃO DE HOMOGENATO DE PULMÃO PARA ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	19
3.7	PARÂMETROS DE DANO E DEFESA OXIDATIVA EM HOMOGENATO DE PULMÃO	19
3.7.1	<i>Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);</i>	<i>19</i>
3.7.2	<i>Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)</i>	<i>19</i>
3.7.3	<i>Capacidade de redução férrica (FRAP)</i>	<i>20</i>
3.8	EXTRAÇÃO DE RNA:	20
3.9	DETERMINAÇÃO DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA PATOGÊNESE DA SILICOSE POR RT-QPCR.	20
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1	MANEJO E INSTILAÇÃO.....	21
4.2	HISTOLOGIA DE PARÊNQUIMA PULMONAR	21
4.3	ANÁLISE DE DANO HISTOPATOLÓGICO PULMONAR	23
4.4	PERFIL DE CITOCINAS	24
4.5	PERFIL BIOQUÍMICO DE TECIDO.....	24
4.6	PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA.	26
5	CONCLUSÃO.....	27
	REFERÊNCIA	27

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância De Animais Na Experimentação

O emprego de animais como modelos de estudo remete à Grécia Antiga, na qual nomes como Aristóteles já os utilizam para compreensão de fenômenos fisiológicos e constituições anatómicas (Franco, 2013). A sua importância, até hoje, principalmente para as ciências da vida, é inegável, haja vista que permitem uma representação verossímil e complexa do funcionamento de vias metabólicas, fisiologia, estruturas anatómicas.

É também de suma importância para estudo da evolução de patologias, o que pode ser comprovado ao analisarmos o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, que entre 1901 e 2020, aproximadamente 84% dos estudos premiados utilizaram animais modelos como forma de chegar aos resultados (Jota Baptista *et al.*, 2021). Neste contexto, é importante ressaltar que a compreensão profunda de uma doença, passa pela instauração de um modelo confiável e validado que conseguiu representar a complexidade do funcionamento patogênico e fisiológico frente ao invasor proporcionando respostas chaves para o desenvolvimento de terapias (Bale *et al.*, 2019).

Na contemporaneidade, o principal animal utilizado em pesquisas biomédicas são os roedores (Domínguez-Oliva *et al.*, 2023), devido à sua semelhança fisiológica ao ser humano, podendo emular condições normais e anormais.

Eles possuem estruturas morfológicas semelhantes e identitárias aos humanos, além de proximidade genética elevada. Além disso, possuem várias estruturas análogas que possuem um funcionamento muito próximos.

Por fim, fidelidade, pois ao somarmos o que foi levantado acima, ao seu comportamento social e modo de vida, conseguem simular com alta verossimilhança a condição estudada de maneira reprodutível (Swearengen, 2018).

Ademais, os modelos murinos possuem outra característica de suma importância para seu uso como modelo, seu pequeno tamanho, facilidade de manutenção quando observadas e obedecidas sua dignidade e alta taxa de reprodução, permitem com que eles sejam mantidos em instalações que facilitem e permitam seu uso na pesquisa (Graham; Prescott, 2015; Kay; Hoekstra, 2008).

Por mais que existam formas aproximadas de substituição, como as organoides, culturas de células que simulam o funcionamento de um órgão, elas apresentam uma série de limitações fisiológicas e de extrapolação à condição humana, que não permitem que sejam maneiras perfeitas de substituição (Andrews; Kriegstein, 2022)

1.2 Doenças Ocupacionais e Silicose

As doenças ocupacionais são condições patológicas clinicamente diagnosticáveis relacionadas as condições de trabalho e todas os perigos envolvidos em tal ambiente, sendo necessária uma clara relação de causa e efeito entre a patologia e a ação laboral (van der Molen; Frings-Dresen, 2019), e afetam vários trabalhadores em diferentes setores da indústria mundial. As patologias ocupacionais podem mudar completamente o estado de saúde de um trabalhador que progressivamente podem surgir com sintomas leve à graves e/ou doenças com quadro agudo podendo evoluir para crônico (Algranti *et al.*, 2021).

No Brasil, as doenças ocupacionais respiratórias são consideradas de suma preocupação por atingirem trabalhadores de áreas chave do país, como mineração e construção civil (Brasil, 2001), exemplos são: a asma alérgica a antracose pulmonar e a silicose sendo a última causa de morte de cerca de 3000 mil brasileiros nos últimos 30 anos e afetando outros 310000 até 2017 em estimativas (Algranti *et al.*, 2021).

Cabe ressaltar que estas condições são causadas, principalmente pela inalação de partículas suspensas no ar, poeiras, advindas na manipulação e quebra de rochas no geral e seus derivados. A inalação constante de qualquer partícula de poeira pode levar um dano no tecido pulmonar o qual se for agravado pela constância da exposição e por situações exaustivas do trabalho podem resultar nas patologias supracitadas (Ophir *et al.*, 2016).

Poeiras são consideradas partículas sólidas de tamanho e origem variáveis, formadas pela trituração ou ruptura de material sólido, suspensa ou que é capaz de se manter suspensa no ar e normalmente são maiores que $0,5 \mu\text{m}$ (mícrons $\rightarrow 1 \mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$) (Thompson; Qi, 2022) (Arbex *et al.*, 2012).

Os setores que mais expõem os trabalhadores ao risco de inalarem micropartículas são aqueles envolvidos com jateamento de areia, indústria de cerâmica, tijolo e vidro, fundição de ferro, carvoarias, mineração, extração de rochas, construção civil, artesanatos, acabamento em mármore, ardósia, granito e outras pedras, fabricação de material abrasivo, escavação de poços, atividades de protético e atividade agrícola de aragem dentre outros, nos quais as partículas são advindas de materiais e rochas compostos principalmente por sílica e a poeira advinda deste comporta (Ribeiro, 2010).

A poeira de sílica é composta de dióxido de silício (SiO_2) que pode ser encontrada em diferentes formas, tais como: sílica cristalina; sílica vítrea e sílica amorfa. O dióxido de silício é um composto binário natural formado por oxigênio e silício, um dos compostos mais rico na crosta terrestre (Terra Filho; Santos, 2006). Segundo Ribeiro, 2010, a sílica cristalina é um grupo mineral que é mais conhecida como quartzo, abundante nos mais variados tipos de

rocha, na areia e nos solos. O quartzo pode ser encontrado em oito arranjos estruturais diferentes (polimorfos) do SiO_2 . Dentre os sete mais importantes na crosta terrestre estão: α -quartzo, cristobalita, tridimita, moganita, keatita, coesita e stishovita (FUNDACENTRO, 2020)

A inalação da poeira oriunda de tal composto pode levar a silicose, que é uma doença respiratória pulmonar fibrosante causada pela inalação e deposição de pequenas partículas de sílica cristalina, que leva a formação de granuloma e fibrose do tecido pulmonar, levando à insuficiência respiratória (Bhattacharya *et al.*, 2016; Greenberg *et al.*, 2007; Pollard, Kenneth Michael, 2016). A Silicose é muito frequente em países desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento. É estimado que trabalhadores expostos chega a 23 milhões na China, 11,5 milhões na Índia, 3,2 milhões na União Europeia e 2 milhões no Brasil (Leso *et al.*, 2019; The Lancet Respiratory, 2019)

Apesar dos avanços na prevenção da silicose em vários países, atualmente não existe tratamento clínico que reverta ou pare a progressão da patologia (Sato *et al.*, 2018), o que se torna ainda mais preocupante quando é levado em conta o potencial carcinogênico envolvido com a patogenia já relatado (Kim *et al.*, 2018). Desta forma, desde o final da década de 90 a Organização Mundial da Saúde (OMS) em parceria com a Organização Internacional do Trabalho (OIT) vem lutando para diminuir os casos de trabalhadores expostos, para evitar o número de óbitos.

1.3 Classificações Da Silicose

A silicose pode ser classificada em aguda, crônica e acelerada (Kim *et al.*, 2018). A forma aguda é caracterizada pelo agrupamento de proteinose primária nos alvéolos pulmonares, surge nos trabalhadores após poucas semanas de exposição as altas concentrações de sílica cristalina e é conhecida como silicoproteinose. Isto pode ocasionar o dano no parênquima pulmonar e normalmente há uma rápida evolução para o óbito. Ambos os sintomas são sistêmicos e respiratórios e o quadro é acompanhado de intensa dispneia, astenia, febre, dor de cabeça, perda de peso e hipoxemia.

A radiografia desta forma da doença apresenta como achados: padrão de infiltrado alveolar bilateral, com distribuição difusa. A tomografia de alta resolução, padrão de opacidade em vidro fosco, espessamento septal liso nas áreas alteradas e imagem de condensação com distribuição geográfica ou regional (Martins *et al.*, 2002). As alterações patológicas envolvem lesão de pneumócitos tipo I, presença na luz alveolar de exsudado constituído por material lipoproteínico, que pode ser corado com *Periodic Acid Schiff* (PAS),

proliferação de pneumócitos tipo II e aumento da produção de fosfolipídios, em particular o dipalmitol lecitina (1). A inflamação intersticial com presença de fibrose geralmente está presente, mas não é intensa, podendo ou não ser detectada a presença de granulomas. Geralmente está patologia acomete trabalhadores que realizam jateamento de areia ou perfuração de rochas.

A silicose crônica é mais comum e ocorre após mais de 10 a 30 anos de exposição ou de latência. A evolução é inicialmente assintomática, e pode começar com sintomas de dispneia progressiva. O exame de imagem revela a presença de infiltrado micronodular bilateral, com predomínio nas zonas pulmonares superiores, poupando os seios costofrênicos em pacientes que está no estágio inicial. Durante a progressão da doença, aumento das hilaes mediastinais, coalescência dos nódulos e a formação de grandes opacidades, geralmente bilaterais, podem ocorrer, esta condição é denominada de fibrose maciça progressiva (Cox *et al.*, 2014).

A tomografia desta segunda forma mostra a presença de espessamento de interstício axial, micronódulos centrolobulares e subpleurais, com distribuição difusa nos lobos superiores, massas conglomeradas com formato irregular, aumento de linfonodos e áreas com enfisema (Arakawa *et al.*, 2005). Tipicamente é observado alteração histopatológica de nódulo silicótico, localizado ao redor de bronquíolos respiratórios e dos vasos, nas regiões subpleurais, na pleura visceral e em linfonodos (Kuncová *et al.*, 1971).

Este possui uma estrutura central acelular formada por tecido fibroso hialino, podendo ou não estar calcificado, circundado por fibras colágenas com distribuição concêntrica, é possível notar na camada periférica a presença de infiltrado linfocitário e por macrófagos (Kreff *et al.*, 2020). Os pacientes que apresentam a forma crônica da doença podem ter sua progressão acelerada, com evolução para óbito em poucos meses ou anos.

A silicose acelerada ocorre no intervalo de progressão entre as formas aguda e crônica, com um período de exposição entre cinco e 10 anos. A diferença entre a crônica é que, a patologia acelerada é uma doença latente. As alterações histopatológicas e exames de imagem mostram que existe uma significativa presença de siliocoproteinose característica da forma aguda e a presença de nódulos silicóticos, partículas de sílica birrefringentes e fibrose intersticial que é encontrado na forma crônica (Costa *et al.*, 2015; Levin *et al.*, 2019). A progressão é mais rápida e alguns trabalhadores têm mostrado rápida e severa progressão da doença (Akgun *et al.*, 2015).

Ademais das doenças ocasionadas pela sílica cristalina, vários estudos têm mostrado que pacientes expostos a esta poeira são mais propensos a terem enfisema pulmonar, câncer de

pulmão, tuberculose, micobacterioses não-tuberculosas, glomerulonefrite, lesão aguda renal, artrite reumatóide, esclerodermia e outras doenças autoimunes (Chen *et al.*, 2019; Krefft *et al.*, 2020).

1.4 Via Das Metaloproteínas, Fator Nuclear kappa B (NF- κ B), Fator de crescimento transformador beta (TGF-beta), Caspase e Apoptose

A exposição à poeira de sílica cristalina induz um dano tecidual no parênquima pulmonar, fibrose, decorrente da atividade de macrófagos após a endocitose de partículas de sílica. Esta deposição de sílica cristalina dispara várias vias envolvendo as metaloproteínas (MMPs), o NF- κ B, o TGF-beta e a apoptose (Adamcakova, J.; Mokra, D., 2021). O aumento dos níveis do fator de transcrição NF- κ B nas células epiteliais dos brônquios e nos macrófagos induz o aumento da produção de interleucina 1-beta (IL-1 β) e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que estimulam os fibroblastos presentes no parênquima pulmonar a produzirem uma maior quantidade de fibras de colágenos (Tan; Chen, 2021).

De forma somatória o TGF- β também promove o aumento da produção de colágeno pelos fibroblastos presentes no pulmão de pacientes com silicose. O estímulo gerado nos fibroblastos também promove a síntese de novos componentes da matriz extracelular e as MMPs são alvos deste estímulo. As MMPs que participam na remodelagem tecidual, são sintetizadas massivamente pelos macrófagos alveolares no estágio inicial da fibrose na tentativa de controlar e degradar as fibras de colágeno excedente (Xie *et al.*, 2021).

A resposta inflamatória também é notável nesta patologia. As Caspases são responsáveis pela maturação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e interleucina 18 (IL-18), além de levar a um tipo de apoptose chamada piroptose, a qual resulta em morte celular, dano tecidual por consequência e liberação de fatores de inflamação (Schmidt, 2023). Este evento envolve as enzimas Caspases ativadoras (Caspase 8, Caspase 9) e efetoras (Caspase 3, Caspase 7 e Caspase 6).

Geralmente as Caspases são ativadas por dois mecanismos, pela via intrínseca e extrínseca. Na via intrínseca, as Caspases são ativadas por meio de liberação do Citocromo C pela mitocôndria e na via extrínseca é através da interação de receptores de morte com seus ligantes. Os receptores de mortes são compostos por receptor TNF (TNFR), dos quais incluem FAS, TNF-R1 e TRAIL-R1 e 2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 and 2), cujos respectivos ligantes são FASL (*Fatty acid synthase* (FAZ) ligand), TNF- α e TRAIL (Adam-Klages *et al.*, 2005; Itoh; Nagata, 1993).

Nesse contexto, cabe-se ressaltar que estudos que buscam entender a função de FASL

na silicose existem, sendo aquele desenvolvido por Borges e colaboradores em 2001 (Borges *et al.*, 2001) responsável por demonstrar que tal molécula tem ação protetora, já que animais expostos a sílica cristalina na ausência de tal ligante não desenvolveram silicose, enquanto os animais selvagens, com o ligante, desenvolveram.

Ainda neste contexto de apoptose, outros marcadores de suma importância na silicose são aqueles que envolvem o estresse oxidativo, isto ocorre devido ao grande número de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) advinda tanto da própria estrutura da sílica e seus radicais óxidos e superóxidos (Gulumian *et al.*, 2006) e pela ativação da macrófagos alveolares que, após a fagocitose da sílica, entram em um processo de apoptose o qual libera grandes quantidades de ROS (Du *et al.*). A ativação de tais células pode ocorrer por vias como do inflamassoma NLRP3 e Phox (Marrocco; Ortiz, 2022), Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (NADPH) oxidase 2 (NOX2) e vias mitocondriais danificadas (Joshi *et al.*, 2015).

Ademais, estudos propostos por Zeidler e colaboradores (Zeidler *et al.*, 2004), mostram que as RNS também participam ativamente da inflamação por silicose, sendo produzidas pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) a qual tem sua transcrição aumentada em ambientes inflamatórios a fim de aumentar o recrutamento imunológico e ativar macrófagos (Gao *et al.*, 2022), levando a formação de moléculas extremamente oxidativas as quais levam ao dano do tecido.

Neste contexto, complexos antioxidativos são ativados, como aqueles envolvendo a heme-oxigenase 1 (HO-1) (Nakashima *et al.*, 2018), haja vista que esta enzima é responsável pela neutralização de ROS, além de outras como a superóxido dismutase (SOD), a qual tem a mesma funcionalidade, mas para compostos específicos (Miao, 2012).

Dessa forma, espera-se que, no desenvolvimento patológico da silicose, exista uma expressão aumentada de enzimas sintetizadoras de espécies oxidativas, além de concentrações aumentadas de tais moléculas no perfil bioquímico, além também, do aumento daquelas responsáveis por combater ou suprimir o processo de oxidação e morte celular.

1.5 Via da Inflamassoma

A internalização de partículas de sílica pela via endocítica e o reconhecimento destas partículas como antígenos leva à união de receptores intracitoplasmáticos do tipo domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NOD) (NLR) que contribui para a formação dos complexos multienzimáticos denominados inflamassoma. A formação do inflamassoma por ativação do receptor 3, NLRP3, é composto por três estruturas básicas, os NLR, a proteína

adaptadora (ASC) e a pró-Caspase, capaz de promover a resposta inflamatória. Nas últimas décadas, o papel da via do inflamassoma na silicose tem sido estudado por vários pesquisadores (Cassel *et al.*, 2008; Dostert *et al.*, 2008; Hornung *et al.*, 2008).

O inflamassoma leva a conversão de citocinas pró-inflamatória IL-1 β e IL-18 em suas formas ativa por meio da ação da Caspase-1 e liberação de fatores de crescimento, fator de crescimento de fibroblasto (bFGF) e o grupo de proteína de alta mobilidade B1 (HMGB1) no meio extracelular (Keller *et al.*, 2008; Lamkanfi *et al.*, 2010; Rubartelli, 2012). Os camundongos deficientes ASC, NLRP3 e IL1- β , quem apresentam silicose, são resistentes à infiltração de células inflamatórias, à formação de granuloma, à deposição de colágeno e desenvolvimento de fibrose em resposta à instilação de sílica (Cassel *et al.*, 2008).

Além do mais, o antagonista do receptor IL1- β demonstrou ser efetivo na redução de IL1- β e atenuou a inflamação e fibrose induzida pela presença de sílica em camundongos (Guo *et al.*, 2013; Piguet *et al.*, 1993). Quanto ao envolvimento do NLRP3 na modulação da apoptose em modelo de camundongo com insuficiência respiratória aguda, foi observado que em camundongos deficientes de NLRP3 tem menor expressão da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (STAT3), o qual regula a metaloproteinase de matrix 9 (MMP-9) e Bcl-2, consequentemente aumentando o número de apoptose nas células epiteliais alveolar (Mizushina *et al.*, 2015).

As descobertas acima descritas indicam que o inflamassoma e a apoptose são cruciais no desenvolvimento da patofisiologia da silicose em humanos e no modelo animal. Porém, investigações que estude a ativação do inflamassoma após ativação da Caspase-1, ainda é pouco explorado. A inflamação em células de mamíferos em resposta ao TNF- α pode ser direcionar à apoptose o qual ativa a pro-Caspase-8, por outro lado se a via NF-K β for ativada em resposta ao TNF- α a inflamação geralmente é mantida. Entretanto, a resposta dual gerada pelo TNF- α nos eventos de apoptose e da manutenção da resposta inflamatória foi pouco endereçada na silicose. Por outro lado, as Caspases podem ser alvos terapêuticos para o tratamento da silicose, considerando o alto potencial destas moléculas serem centrais no desenvolvimento da silicose.

Considerando que a experimentação animal é essencial para a compreensão dos mecanismos de *onset* das doenças, na descoberta de métodos preventivos, diagnóstico e tratamento da doença a proposta desta pesquisa é usar o modelo animal para melhor compreender a silicose. Portanto, este trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um modelo experimental animal para que, enquanto não exista métodos de substituição, criar um processo refinado que permita a compreensão da evolução da patologia ocupacional silicose

de forma verossímil ao que ocorre no ser humano. Para isto, foram utilizados camundongos C57BL/6 com a finalidade de construir um modelo para tal doença e observar as mudanças fisiológicas decorrentes de tal processo em um ponto de vista histológico, bioquímico e molecular. Neste contexto o trabalho se encaixa nos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3, Saúde e Bem-Estar, e 8, Trabalho Decente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Desenvolver e validar um modelo experimental silicose crônica utilizando camundongos da linhagem C57BL/6.

2.2 Objetivos Específicos:

- Analisar a histopatologia no parênquima pulmonar de camundongos sem silicose e com silicose.
- Avaliar a morfometria do parênquima pulmonar em animais sem silicose e com silicose.
- Medir os níveis de creatinina e ureia no soro dos animais sem silicose e com silicose.
- Determinar os níveis das citocinas TNF- α e IL-10 no soro de camundongos selvagens.
- Determinar, em homogenato de pulmão de camundongos selvagens, com e sem silicose, a concentração dos analitos bioquímicos:
 - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
 - Espécies reativas de oxigênio (ROS);
 - Capacidade de redução férrica do plasma (FRAP);
- Determinar, em pulverizado de pulmão de camundongos selvagens, com e sem silicose, a expressão e abundância das seguintes moléculas envolvidas na evolução patológica da silicose:
 - Óxido nítrico sintase induzida (iNOS);
 - Hemoxigenase (HO-1)
 - NLRP3;

3 METODOLOGIA

3.1 Animais:

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 com 8 a 12 semanas de idade e pesando entre 20-25 g, fornecidos pela Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo de claro/escuro (12/12 h), controlados automaticamente com acesso livre à alimentação e água até o momento da realização dos ensaios. A utilização dos animais foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) em protocolo 041/21.

Os animais foram divididos em 2 grupo, com 5 animais cada, em 4 repetições:

- Grupo 01: Animais selvagens – Controle: instilados com solução salina;
- Grupo 02: Animais selvagens – Silicose: instilados com sílica cristalina;

3.2 Manutenção dos animais e inoculação de nano partículas de sílica:

As nanopartículas de sílica (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) foram esterilizadas por aquecimento em autoclave a 200°C por 4 horas, após isso foram preparadas, para cada repetição do ensaio, uma suspensão, contendo, respectivamente: 0,312mg, 0,625mg, 1,25mg e 2,5mg dos cristais em 50 μL de tampão fosfato-salino (PBS) (12,5mg/kg, 25mg/kg, 50mg/kg e 100mg/kg animal respectivamente) em PBS estéril, imediatamente antes do uso foram sonicadas por 15 minutos.

Os animais utilizados nos ensaios instilados intratraquealmente com suspensão de nanopartículas de sílica preparadas tal qual descrito na literatura em uma única dose (Yang *et al.*, 2021). Brevemente, os animais foram injetados com medicamento pré-anestésico (MPA), composto por uma solução de morfina (dose: 2,5 mg/kg animal) e meloxicam (dose: 0,2 mg/kg animal), após 30 minutos foi aplicado o anestésico, sendo este uma solução de quetamina (dose: 7,5 mg/kg animal) e midazolam (dose: 0,65 mg/kg animal)

Em seguida, a região foi desinfetada e uma incisão de aproximadamente 0,5 cm foi realizada na região do pescoço do animal para expor a traqueia, sendo injetada a dose de sílica correspondente à repetição do ensaio, sendo elas: 12,5mg/kg, 25mg/kg, 50mg/kg e 100mg/kg animal de nanopartículas de sílica. A solução com volume de 50 μl foi depositada diretamente na traqueia através de uma seringa de 30 unidades entre os anéis cartilagosos. Após a instilação foi realizada uma massagem no tórax do animal, para espalhar melhor a solução de sílica, e posteriormente a este procedimento o animal foi suturado na incisão. Os animais do

grupo controle receberam 50 μ L de PBS. Após 8 semanas, período para desenvolvimento de silicose crônica, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após anestesiados em isoflurano, foi coletado o sangue e o pulmão dos animais.

3.3 Análise histopatológica pulmonar

Para observação da morfologia e alterações histológicas nos diferentes órgãos dos animais infectados, C57BL/6J, a coleta dos órgãos foi realizada após 8 semanas de inoculação da nano partícula de sílica. Os cortes teciduais do lóbulo pulmonar esquerdo de todos os animais foram coletados e então fixados em uma solução tamponada de formalina a 10% v/v. Posteriormente, os órgãos passaram por desidratação seguindo o protocolo: imersão em soluções sequenciais de álcool a 70%, 85%, 95% (v/v) e três soluções distintas de álcool absoluto por 30 minutos cada. Em seguida, serão submersos por 30 minutos em três soluções de xileno, seguidos por imersão em parafina líquida. Os órgãos foram posteriormente embutidos em blocos de parafina em posição vertical e deixados em temperatura ambiente para ocorrer a solidificação.

Após 24 horas, os blocos foram seccionados em duas seções perpendiculares de 4 μ m de espessura, utilizando um Micrótomo Leica RM2125 RTS (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). As lâminas foram colocadas em estufa por 24 horas para fixar os cortes. Posteriormente, as lâminas foram coradas com eosina e hematoxilina (Cardiff *et al.*, 2014).

Após esse procedimento, as lâminas foram digitalizadas utilizando um scanner Scanscope AT, Leica (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), e as imagens obtidas dos pulmões, em um aumento de 20x, foram divididas em 10 campos microscópicos, os quais foram analisados em relação ao espessamento do área de septo pulmonar.

Além disso, foi avaliado o dano tecidual por fibrose de maneira qualitativa, criando um escore variável (entre 0 e 3, sendo 0 dano inexistente, e 3, dano grave), para os parâmetros: Manguito perivascular; migração leucocitária; eritrócitos em tecido, a fim de avaliar hemorragias; congestão vascular; edema; infiltração leucocitária; rompimento alveolar. Posteriormente, foram comparadas as médias de cada parâmetro entre os animais controle e com silicose.

3.4 Perfil de citocinas

As concentrações de TNF e IL-10 foram mensuradas em amostras séricas dos camundongos de todos os grupos. A quantificação das citocinas foi realizada a partir de kits

de ELISA comerciais, conduzidos de acordo com protocolos recomendados pelo fabricante (BD Biosciences, San Diego, EUA).

Brevemente, placas de alta afinidade de 96 poços (Corning Laboratories Inc, New York, EUA) foram revestidas com anticorpos de capturas anti-camundongos específicos para citocinas dosadas, e incubadas overnight a 4°C. Posteriormente, para se bloquear os sítios inespecíficos, foi adicionado a placa, 10% de soro fetal bovino em PBS 0,01M (pH7,2) por 1 hora. Após o bloqueio, curvas padrões das respectivas citocinas em diluições seriadas e amostras a serem testadas foram acrescidas as placas e incubadas por 2 horas. Para a quantificação da presença das citocinas nas amostras, anticorpos de detecção anti-citocinas murinas conjugadas com biotina e acrescidos de estreptavidina-peroxidase foram incubados por 1 hora. Entre cada passo, as placas foram lavadas com PBS-T 0,05% (PBS- T). A reação foi desenvolvida com tetrametilbenzidina (TMB) seguido pela adição de ácido sulfúrico 2M para interromper a reação. A densidade óptica (DO) foi determinada a 450 nm em um leitor de microplacas (SpectraMax M2e, Molecular Devices, EUA). As concentrações das citocinas foram determinadas a partir da curva padrão com concentrações conhecidas de citocinas, e os resultados expressos em pg/mL, de acordo com os limites de detecção do ensaio.

3.5 Perfil bioquímico de soro

As coletas de sangue para as análises bioquímicas foram realizadas no dia da eutanásia, pela via retro orbital e sob anestesia inalatória com isoflurano. As amostras foram coletadas em tubo eppendorf de 1,5 ml e centrifugadas à 3000 rotações por minuto (RPM) durante 10 minutos em centrífuga refrigerada automática para separação do soro e acondicionamento em tubos criogênicos. As amostras foram mantidas sob refrigeração (2 °C a 8 °C) até o momento da análise, realizada no mesmo dia da coleta.

As determinações das concentrações de creatinina no soro, foram realizadas com o uso de kits comerciais da Labtest Diagnóstica (S.A., Lagoa Santa, Brasil), que utiliza um procedimento cinético otimizado de dois pontos, baseado na reação de Jaffé modificada. Para as dosagens, 50 µL da amostra de soro serão adicionados à 50 µL de picrato alcalino, misturados e aspirados para a cubeta do analisador automático, ajustado a zero em 510 nm, e então medidas as absorbâncias aos 30 e 90 segundos. Os resultados foram expressos em mg/dL. Para dosagem da ureia que é hidrolisada pela urease, gerando amônia e dióxido de carbono. Foi usado 10 µL de soro para a cubeta do fotômetro previamente ajustado a 340 nm, e então medidas as absorbâncias aos 30 e 90 segundos. Os resultados foram calculados pela diferença de absorbância entre os dois tempos e expressos em mg/dL.

3.6 Preparação de homogenato de pulmão para ensaios bioquímicos

Os pulmões dos animais grupo controle e silicose foram homogeneizados, individualmente, em 1 mL de tampão de homogeneização frio (tampão fosfato 0,1 M contendo 0,15 M de KCl; pH 7,4). O sobrenadante, após centrifugação a 9000 G durante 10 minutos a 4°C, foi utilizado para as seguintes determinações:

- Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Espécies reativas de oxigênio (ROS);
- Capacidade de redução férrica do plasma (FRAP);

O método de Bradford (Bradford, 1976), com uma curva analítica feita com albumina sérica bovina, foi utilizado para determinar a concentração total de proteínas nos homogeneizados. A absorbância foi medida a 570 nm em um espectrofotômetro leitor de placas de 96 poços.

3.7 Parâmetros de dano e defesa oxidativa em homogenato de pulmão

3.7.1 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);

As análises de estresse oxidativo no tecido pulmonar foram divididos em dois ensaios que mensuram o dano oxidativo e um que mensurara mudanças em caracteres de defesa a tal processo. Nesse contexto, o primeiro desenvolvido foi aquele utilizado como indicador de peroxidação lipídica, a mensuração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), processo que envolve a reação de Malondialdeído (MDA), um dos principais produtos liberados quando radicais livres de processos inflamatórios e oxidativos atacam lipídeos de membrana, com substâncias reativas a ácido tiobarbitúrico (Ruiz-Ojeda *et al.*, 2018).

Para o ensaio, foi utilizado o procedimento original descrito por Yagi e colaboradores (Yagi, 1982). Os homogeneizados de pulmão foram incubados com ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v) e ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% (p/v), diluídos em Na₂SO₄ a 7,1%, a 100 °C por 2 horas. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x G por 6 minutos a 4 °C, e a fluorescência do sobrenadante foi analisada em microplacas de 96 poços a 515 nm de excitação e 553 nm de emissão (PerkinElmer LS 55, Boston, MA, EUA). Uma curva analítica foi construída utilizando 1,1,3,3-tetrametilciclo-propanotetraol (TMP) como padrão para quantificar a peroxidação lipídica.

3.7.2 Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Outro método utilizado para mensurar o dano oxidativo ou estado oxidativo do pulmão acometido pela silicose, foi a medida das espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são moléculas altamente reativas baseadas em oxigênio as quais são produzidas no metabolismo

normal dos organismos e ainda mais em quadros de inflamação, seja pela ação acelerada das células de defesa do corpo ou pelo desenvolvimento da própria condição inflamatória (Birben *et al.*, 2012).

Para sua quantificação, as amostras foram incubadas com 10 μ M da molécula fluorescente de marcação, diacetato de dicloro-dihidro fluoresceína e o tampão Tris-HCl (5mM, pH 7,4) por 3 minutos. Posteriormente lidas em placas de 96 poços a 530nm, tudo de acordo com o descrito por Kim e colaboradores (Kim; Xue, 2020).

3.7.3 Capacidade de redução férrica (FRAP)

A capacidade de redução férrica do plasma, ou de um homogenato de tecido, é conhecida como sua capacidade antioxidante total, pois envolve a ação de todos os sistemas antioxidantes do tecido, em pH e condições específicas a fim de converter íons férricos para ferrosos, atestando o quão hábil estão os sistemas da amostra para combater contextos oxidativos (Benzie; Strain, 1996).

Para isto, o método baseia-se na conversão de Fe³⁺ em Fe²⁺, que é complexado pelo reagente 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), formando o complexo Fe²⁺-TPTZ. Os homogeneizados de pulmão foram incubados, no escuro, a 37 °C, por 6 minutos, com 10 mM de TPTZ e 20 mM de cloreto férrico, ambos diluídos em uma solução tampão de acetato 0,3 M, com pH ajustado para 3,6. A leitura da absorbância foi realizada em placas de 96 poços a um comprimento de onda de 593 nm. Para determinar a capacidade antioxidante total, foi elaborada uma curva padrão utilizando trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).

Além disso, foi feito um teste em branco com a amostra para minimizar interferências cromáticas na absorbância.

3.8 Extração de RNA:

O RNA total foi extraído do homogenato do tecido pulmonar. Para isto, após a eutanásia, os órgãos serão mantidos em tubos de 2 mL e armazenados em ultrafreezer a -80°C. Logo antes do processamento eles foram retirados e macerados em cadinho com pistilo até que formaram um fino pó. Após isso o tecido teve o RNA extraído com reagente Trizol (sob especificação do fabricante) seguindo orientação de Lima e colaboradores (Lima *et al.*, 2010)

3.9 Determinação de moléculas envolvidas na patogênese da silicose por RT-qPCR

Para a reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) o primeiro passo foi o uso do ácido ribonucleico (RNA) extraído de acordo com o passo

anterior para a produção de ácido desoxirribonucleico codificante (cDNA), para isto foram utilizados 300 ng de primers aleatórios em conjunto com 500 ng de RNA já tratado anteriormente com DNases. Os testes serão feitos em triplicatas e utilizando a expressão do gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como normalizador na construção das análises. O RT-qPCR será feito utilizando o sistema SYBR Green com quantidades e proporções descritos por Lima e colaboradores (Lima *et al.*, 2013)

3.10 Análise estatística

Gráficos e cálculos estatísticos foram realizadas usando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelos testes de Two-way ANOVA utilizando o teste de comparação múltipla entre os grupos. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (SEM). Valores para $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Manejo e Instilação

Os animais os quais foram instilados com as concentrações de: 12,5mg/kg, 25mg/kg e 50mg/kg não desenvolveram nenhuma mudança clínica e histológica as quais poderiam indicar o desenvolvimento da silicose, logo, esses valores não conseguiram fomentar o modelo para a doença, portando, demais ensaios não foram desenvolvidos. Por fim, os resultados comentados neste trabalho são aqueles referentes ao ensaio com concentração de 100mg/kg animal, o qual mostrou-se válido para o desenvolvimento da patogenia e, portando, um modelo utilizável.

Durante o manuseio dos animais não foi observada nenhuma alteração notável das condições comportamentais, sejam dos grupos os quais a patologia não se manifestou, seja aquele que a silicose foi perceptível

4.2 Histologia de parênquima pulmonar

Após instilação, foi feita a medida do parênquima pulmonar, haja vista que, doenças inflamatórias causam danos ao tecido alveolar, o qual resulta na ativação de cascatas de reconstrução tecidual, visando remediar o que foi danificado, resultando tanto no acúmulo celular na região, quando a depósitos de colágeno e demais componentes da matriz extracelular (Pollard, K. M., 2016).

Quando o tecido alvo em questão é o pulmonar, há o espessamento das paredes, ou septos, alveolares, resultando na diminuição do volume alveolar total, consequentemente, redução do espaço disponível para que sejam feitas as trocas gasosas, hematose. Tais achados foram descritos para um roedor em 1980 por Dauber e seu grupo de pesquisa (Dauber *et al.*, 1980),

Foram escolhidos 10 campos aleatórios das imagens histológicas do pulmão e estes foram avaliados, no *software* ImageJ, o qual permite quantificar a área total de tecido por espaço histológico analisado.

Para a análise estatística testamos a normalidade das distribuições através do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual comprovou a distribuição normal dos dados de medida de septo pulmonar média dos animais dos grupos. Posteriormente, foi executado um teste T com correção de Welch, haja vista a não igualdade dos desvios dos grupos. Foi observado que nos animais acometidos pela silicose, houve um aumento significativo da área média de tecido no órgão de estudo, sendo a do controle de 38,66% e do animal silicótico 55,71%, indicando, portanto, uma redução da área total livre para execução de hematose, logo, redução da capacidade respiratória total advindo da silicose (Figura 1).

Área de Septo Pulmonar ente animais Controle x Silicose

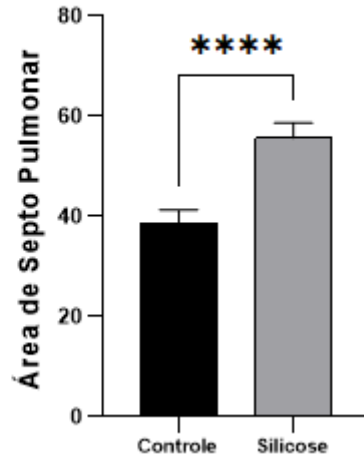


Figura 1: Gráfico representativo da porcentagem média da área pulmonar preenchida por parede alveolar, comparação da área de septo pulmonar em porcentagem em relação aos grupos instilados (controle) e não instilados (silicose). **** $p \leq 0.0001$;

Tal achado, aumento do septo, vai de acordo com o esperado de acordo com a literatura, como reportado por Yang e colaboradores (Yang *et al.*, 2021), que fizeram a instilação intratraqueal, resultando em um dano inflamatório no tecido pulmonar, o qual levaria a um processo fibrótico, marcado pela deposição de colágeno no septo do órgão, tal evento é diretamente correlato ao aumento da área do tecido e comprometimento do espaço de hematose.

4.3 Análise de dano histopatológico pulmonar

Ademais ao espessamento de septo, existem outros marcadores que indicam o dano causado pelo processo patológico da silicose (King, 1952). Cabe citar presença de células inflamatórias, tanto no tecido, quanto dentro dos vasos, presença de edema, rompimento alveolar por dano celular, vasos congestionados, manguito perivascular, (King, 1952; Zaidi *et al.*, 1971) e em normativas para quantificação de dano por doenças causadoras de fibrose, como proposto por Hübner (Hübner *et al.*, 2008).

Ao avaliar o *heatmap* (Figura 2) constata-se que para todos os parâmetros avaliados, o dano tecidual foi maior nos animais com silicose do que naqueles utilizados como controle, indicando que o protocolo preconizado neste estudo foi efetivo para criar um modelo fidedigno para silicose em relação a parâmetros e avaliações histológicas, o que é esperado ao observar outros estudos que propõem diferentes protocolos de instilação de sílica em modelos murinos (Li *et al.*, 2021).

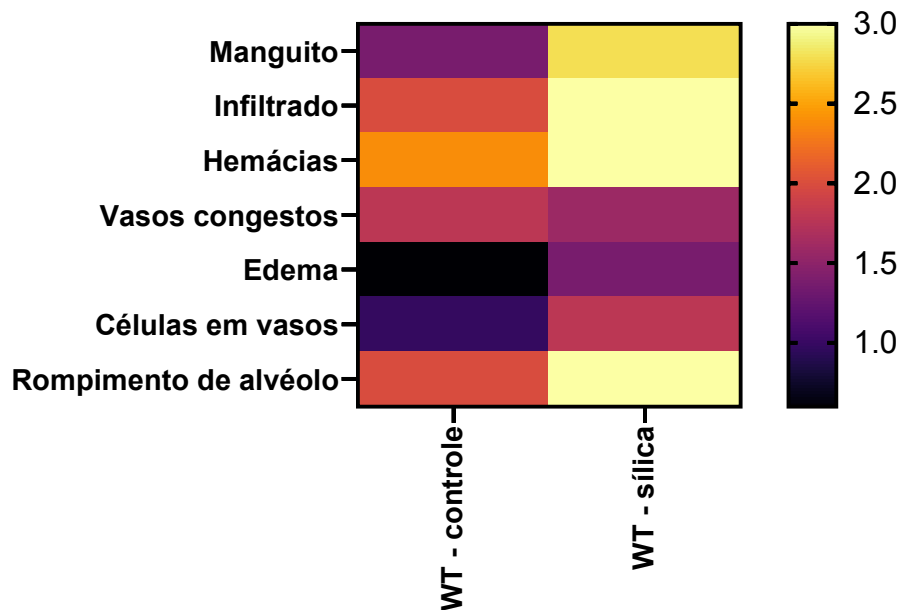


Figura 2: Heatmap representativo da média dos escores para cada parâmetro e grupo de estudo para o que foi avaliado. Cores mais quentes (próximas ao amarelo) indicam maiores valores, cores mais frias (próximas ao preto) indicam valores menores.

Portanto, o modelo proposto neste trabalho é válido para a compreensão de mecanismos inflamatórios por dano tecidual os quais podem ser extrapolados do contexto murino para o humano por conseguir reproduzir a fibrose tecidual tal qual ocorre em casos crônicos de fibroses em humanos (Baum; Arnold, 2024),

4.4 Perfil de citocinas

A ativação do inflamassoma decorrente da inalação das partículas de sílica é responsável pela ativação de uma série de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o TNF-alfa e interleucinas (Adamcakova, Jana; Mokra, Daniela, 2021), as quais iniciam e perpetuam o estado inflamatório característico da silicose o qual, por dano tecidual prolongado, leva à fibrose.

Desta forma, pelo processo inflamatório observado nas análises histológicas mostradas nos tópicos anteriores, esperava-se uma elevada presença desta citocina. No teste de ELISA não foi constatado o aumento de TNF e IL-10, a concentração desta ficou abaixo do limite de detecção do Kit, não sendo possível mensurar a mesma.

Tal impossibilidade de avaliação não é decorrente, provavelmente, da ineficiência do modelo proposto, haja vista a possibilidade de avaliar inflamação de maneira marcante. Assim, acreditamos que o problema descrito é decorrente do teste ter sido desenvolvido utilizando amostras de soro, o qual não é material adequado para a análise feita especificamente neste trabalho, sendo o homogenato de tecido um provável substituo eficaz que será testado nos próximos ensaios. Ademais, outra opção para contornar o erro seria utilizar amostras de homogenato de tecido para determinar as concentrações das citocinas, não do soro.

4.5 Perfil bioquímico de tecido

O primeiro dano oxidativo a ser analisado no pulmão foi a peroxidação dos lipídeos de membrana, o que ocorre pela formação de espécies peroxidativas no tecido, resultante da exposição a um agente indutor de inflamação aguda e crônica (Ramos *et al.*, 2021), como os radicais peróxido e superperóxido de sílica advindos da evolução da silicose (Gulumian *et al.*, 2006). Não foi possível observar nenhuma variação entre os animais saudáveis e aqueles com silicose, como indicado na figura 3A. A literatura não apresenta muitos trabalhos que descrevem estes marcadores em relação à silicose.

Desta forma, baseamo-nos em ensaios que mostram mudanças nas concentrações de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico, marcadores do dano peroxidativo, em outros quadros inflamatórios pulmonares decorrentes de inalação de compostos particulados tóxicos. Um dos estudos indica que, em humanos, tais realidades levariam ao aumento das moléculas marcadoras, porém, quando relacionados a inalação de compostos metálicos particulados, não disponibilizando dados semelhantes para demais compostos (Ghio; Devlin, 2001).

Já outro ensaio, que utilizou ratos como modelo, utilizando silicatos complexados com moléculas metálicas, mostrou que a produção de reativos à TBA é diretamente relacionada com a característica do metal quelado ao silicato, sendo que este de forma isolada não mudaria a os resultados do ensaio de TBARS (Ghio *et al.*, 1996), o que iria de acordo com nossos ensaios.

Em continuidade, foi feita a análise de outro importante marcador da inflamação por silicose, as ROS. É notável que as concentrações das ROS, têm um pico inicial importante, definindo o início da inflamação e da formação dos nódulos de silicose, o qual é diminuído com a evolução para patologia crônica, mas nunca zerado, sempre sendo renovado para a manutenção da inflamação, característica da doença (Kumari *et al.*, 2024)

Os resultados obtidos, descritos na figura 3B, são distintos daqueles esperados pela literatura, já que não houve diferença entre o grupo controle e o doente. Em relação a isto, foi construída a hipótese que o método selecionado para a detecção das ROS não teve a sensibilidade necessária para quantificar tais moléculas em estágio crônico, sendo necessárias sondas moleculares mais sensíveis.

Por fim, o teste escolhido para medir a capacidade antioxidante do tecido, o FRAP, ocorreu por ser um teste mais simples do que alguns outros capazes de medir tal atividade, além de funcionar de forma mais geral para análise de vias antioxidantes de tecido. Neste contexto, também não foram observadas variações significativas entre os grupos, como mostrado na figura 3C.

Na literatura não foram encontrados ensaios que usassem o FRAP como medida de capacidade antioxidante em relação à silicose, cabendo assim, em ensaios seguintes, analisarmos enzimas e complexos com capacidade de bloquear processos oxidativos mais específicos, a fim de buscarmos padronizações mais completas para nosso métodos, tal qual a análise das enzimas SOD e catalase, como atestado por Esfahani e colaboradores (Esfahani *et al.*, 2023).

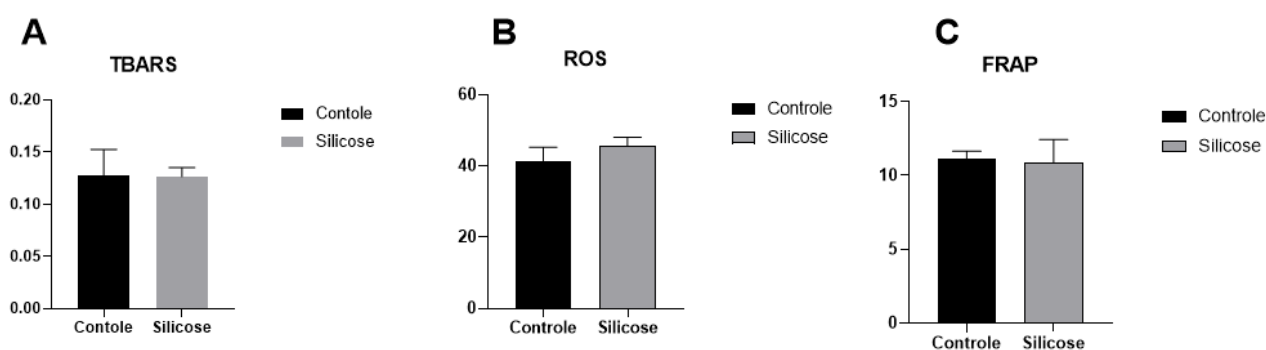


Figura 3: Gráficos representativos de: (A) Concentração de espécies reativas a ácido tiobarbitúrico, expressa em nmol/mg; (B) Espécies reativas de oxigênio. (C) Atividade antioxidante total de tecido pela redução

férica, medida em μmol trolox eq/mg de proteína. Comparação feita entre o grupo não instilado com sílica cristalina (Controle) e instilado (silicose). Não houve diferença significativa.

4.6 Perfil de expressão gênica.

Em relação aos marcadores moleculares, escolhemos alguns aqueles característicos da inflamação decorrente da silicose: HO-1, iNOS e NLRP3 (Cassel *et al.*, 2008; Nakashima *et al.*, 2018). Em nossos ensaios observamos um aumento médio da expressão dessas três moléculas, como demonstrado na figura 4, entretanto não foi observada diferença estatística significativa, após verificação de normalidade por teste de Kolmogorov-Smirnov e análise por Teste T.

Sabe-se, de acordo com o apresentado na literatura que o HO-1 mostra um aumento na sua concentração quando avaliamos humanos com silicose crônica, haja vista que tal molécula tem sua expressão aumentada a fim de evitar a propagação do dano oxidativo decorrente das ROS (Sato *et al.*, 2006).

Ademais, a interação de macrófagos com a sílica cristalina, caracteristicamente é responsável pela superexpressão do marcador inflamatório iNOS, produzindo um excesso de óxidos de nitrogênio, que, em primeira instância é responsável pelo recrutamento imunológico e capacidade de ação dos macrófagos, mas que em excesso, como no caso, leva a dano oxidativo no tecido (Gao *et al.*, 2022).

Por fim, um dos maiores contribuidores para o dano inflamatório da silicose, NLRP3, responsável pela formação do inflamassoma que contribui para a maturação de diversas moléculas pró-inflamatórias, é marcadamente superexpresso, sendo este um dos principais alvos terapêuticos para a doença (Lam *et al.*, 2022).

O modelo proposto, portanto, conseguiu representar o aumento médio da expressão de moléculas característica da evolução da patologia da silicose, porém, tal aumento não foi estatisticamente significativo, sendo necessário um “n” amostral maior para melhor padronizar e definir estatisticamente as mudanças moleculares características da doença.

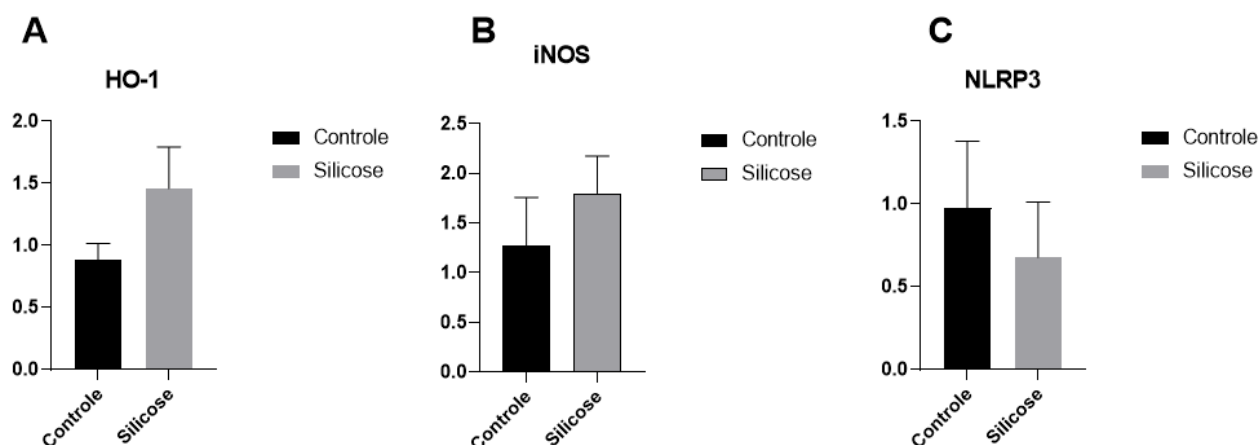


Figura 4: Gráficos representativos da variação da expressão, em $\Delta\Delta C_t$ das seguintes enzimas: (A) HO-1; (B) iNOS. (C) NLRP3. Comparação feita entre o grupo não instilado com sílica cristalina (Controle) e instilado (silicose). Não houve diferença significativa.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com este trabalho permitiram o início da construção de um modelo confiável, reprodutível e válido para os estudos da silicose em modelos murinos com importante capacidade de extrapolação de dados para o contexto humano. A concentração proposta e utilizada de dióxido de sílica, além do método de instilação escolhido, foram capazes de gerar importantes alterações histopatológicas, tanto qualitativas quanto quantitativas as quais foram documentadas e padronizadas como resultante da inflamação decorrente da silicose.

Entretanto, o modelo não conseguiu mimetizar a alteração bioquímicas relativas à doença e apresentou um rol amostral reduzido, sendo incapaz de tornar as mudanças moleculares apresentadas, representativas. Tal fato decorreu, além do reduzido “n” amostral de animais, das escolhas incorretas das metodologias de análise dos analitos bioquímicos.

Cabe-se ressaltar, entretanto que, o modelo desenvolvido foi eficaz, pois, se existiram alterações histológicas, implicam-se na necessidade de mudanças bioquímicas e genéticas, das quais apenas a metodologia escolhida para análise não foi a mais adequada

Dessa forma, cabe, assim, a necessidade da repetição do ensaio com o rol de amostras maiores tangente a quantidade de animais dos grupos experimentais, além da escolha de diferentes metodologias, principalmente em relação as análises de perfil bioquímico para contribuir com a robustez do modelo para estudo verossimilhante da doença.

Por fim, conclui-se que a metodologia desenvolvida neste trabalho, após as devidas adaptações, tem um potencial marcante para ser uma alternativa para os estudos envolvendo a silicose, haja vista que criou uma plataforma que permite correlacionar os danos causados por estresse oxidativo e apoptose em uma visão histológica com todas as mudanças do microambiente metabólico do inflamassoma.

REFERÊNCIA

ADAM-KLAGES, S.; ADAM, D.; JANSSEN, O.; KABELITZ, D. Death receptors and caspases: role in lymphocyte proliferation, cell death, and autoimmunity. **Immunol Res**, v.33, n. 2, p. 149-166, DOI: 10.1385/ir:33:2:149.

ADAMCAKOVA, J.; MOKRA, D. New Insights into Pathomechanisms and Treatment Possibilities for Lung Silicosis. **Int J Mol Sci**, 20210417, v.22, n. 8, DOI: 10.3390/ijms22084162. Acesso em: Apr 17.

ADAMCAKOVA, J.; MOKRA, D. New Insights into Pathomechanisms and Treatment Possibilities for Lung Silicosis. **International Journal of Molecular Sciences**, 22, n. 8, p. 4162, 2021.

AKGUN, M.; ARAZ, O.; UCAR, E. Y.; KARAMAN, A. *et al.* Silicosis Appears Inevitable Among Former Denim Sandblasters: A 4-Year Follow-up Study. **Chest**, v.148, n. 3, p. 647-654, DOI: 10.1378/chest.14-2848. Acesso em: Sep.

ALGRANTI, E.; SAITO, C. A.; CARNEIRO, A. P. S.; BUSSACOS, M. A. Mortality from silicosis in Brazil: Temporal trends in the period 1980-2017. **Am J Ind Med**, 20210106, v.64, n. 3, p. 178-184, DOI: 10.1002/ajim.23215. Acesso em: Mar.

ANDREWS, M. G.; KRIEGSTEIN, A. R. Challenges of Organoid Research. **Annual Review of Neuroscience**, v.45, n. Volume 45, 2022, p. 23-39, DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-111020-090812>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-neuro-111020-090812>.

ARAKAWA, H.; HONMA, K.; SAITO, Y.; SHIDA, H. *et al.* Pleural Disease in Silicosis: Pleural Thickening, Effusion, and Invagination. **Radiology**, v.236, p. 685-693, DOI: 10.1148/radiol.2362041363. Acesso em: 08/01.

ARBEX, M. A.; SANTOS, U. D. P.; MARTINS, L. C.; SALDIVA, P. H. N. *et al.* A poluição do ar e o sistema respiratório. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.38.

BALE, T. L.; ABEL, T.; AKIL, H.; CARLEZON, W. A., JR. *et al.* The critical importance of basic animal research for neuropsychiatric disorders. **Neuropsychopharmacology**, 20190502, v.44, n. 8, p. 1349-1353, DOI: 10.1038/s41386-019-0405-9. Acesso em: Jul.

BAUM, L.; ARNOLD, T. C. Silicosis. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC., 2024.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, 239, n. 1, p. 70-76, 1996/07/15/ 1996.

BHATTACHARYA, S.; DEY, A.; PAL, A.; KAR, S.; SAHA, S. Silicosis in the form of progressive massive fibrosis: A diagnostic challenge. **Indian J Occup Environ Med**, v.20, n. 2, p. 114-117, DOI: 10.4103/0019-5278.197548. Acesso em: May-Aug.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, 5, n. 1, p. 9-19, Jan 2012.

BORGES, V. M.; FALCÃO, H.; LEITE-JÚNIOR, J. H.; ALVIM, L. *et al.* Fas ligand triggers pulmonary silicosis. **J Exp Med**, v.194, n. 2, p. 155-164, DOI: 10.1084/jem.194.2.155. Acesso em: Jul 16.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, n. 1, p. 248-254, 1976/05/07/ 1976.

BRASIL. Doenças relacionadas ao trabalho: manual de procedimentos para os serviços de saúde. **Ministério da Saúde do Brasil, Organização Pan-Americana da Saúde no Brasil**, org Elizabeth Costa Dias, colaboradores Idelberto Muniz Almeida et al. – Brasília: Ministério da Saúde do Brasil, pp. 580.

CARDIFF, R. D.; MILLER, C. H.; MUNN, R. J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. **Cold Spring Harb Protoc**, 20140602, v.2014, n. 6, p. 655-658, DOI: 10.1101/pdb.prot073411. Acesso em: Jun 2.

CASSEL, S. L.; EISENBARTH, S. C.; IYER, S. S.; SADLER, J. J. *et al.* The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 20080624, v.105, n. 26, p. 9035-9040, DOI: 10.1073/pnas.0803933105. Acesso em: Jul 1.

CHEN, F. F.; TANG, H. Y.; YU, F.; QUE, C. L. *et al.* Renal involvement in a silicosis patient - case report and literature review. **Ren Fail**, v.41, n. 1, p. 1045-1053, DOI: 10.1080/0886022x.2019.1696209. Acesso em: Nov.

COSTA, F.; OLIVEIRA, E.; ALGRANTI, E.; MENDONÇA, E. *et al.* Accelerated silicosis: A report of three patients. **European Respiratory Journal**, v.46, p. PA1163, DOI: 10.1183/13993003.congress-2015.PA1163. Acesso em: 09/01.

COX, C. W.; ROSE, C. S.; LYNCH, D. A. State of the art: Imaging of occupational lung disease. **Radiology**, v.270, n. 3, p. 681-696, DOI: 10.1148/radiol.13121415. Acesso em: Mar.

DAUBER, J. H.; ROSSMAN, M. D.; PIETRA, G. G.; JIMENEZ, S. A.; DANIELE, R. P. Experimental silicosis: morphologic and biochemical abnormalities produced by intratracheal instillation of quartz into guinea pig lungs. **Am J Pathol**, 101, n. 3, p. 595-612, Dec 1980.

DOMÍNGUEZ-OLIVA, A.; HERNÁNDEZ-ÁVALOS, I.; MARTÍNEZ-BURNES, J.; OLMOS-HERNÁNDEZ, A. *et al.* The Importance of Animal Models in Biomedical Research: Current Insights and Applications. **Animals**, v.13, n. 7, p. 1223, Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/13/7/1223>.

DOSTERT, C.; PÉTRILLI, V.; VAN BRUGGEN, R.; STEELE, C. *et al.* Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. **Science**, 20080410, v.320, n. 5876, p. 674-677, DOI: 10.1126/science.1156995. Acesso em: May 2.

DU, S.-L.; ZHOU, Y.-T.; HU, H.-J.; LIN, L.; ZHANG, Z.-Q. Silica-induced ROS in alveolar macrophages and its role on the formation of pulmonary fibrosis via polarizing macrophages into M2 phenotype: a review. **Toxicology Mechanisms and Methods**, p. 1-12.

ESFAHANI, M.; RAHBAR, A. H.; ASL, S. S.; BASHIRIAN, S. *et al.* The Effects of Resveratrol on Silica-Induced Lung Oxidative Stress and Inflammation in Rat. **Saf Health Work**, 14, n. 1, p. 118-123, Mar 2023.

FRANCO, N. H. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. **Animals (Basel)**, 20130319, v.3, n. 1, p. 238-273, DOI: 10.3390/ani3010238. Acesso em: Mar 19.

FUNDACENTRO. **Sílica e Silicose**. FUNDACENTRO - Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/fundacentro/pt-br/aceso-a-informacao/acoes-e-programas/projetos-encerrados/silica-e-silicose>. Acesso em: 23/04/2024.

GAO, J.; LI, C.; WANG, X.; SUN, X. *et al.* Oridonin attenuates lung inflammation and fibrosis in silicosis via covalent targeting iNOS. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 153, p. 113532, 2022/09/01/ 2022.

GHIO, A. J.; DEVLIN, R. B. Inflammatory Lung Injury after Bronchial Instillation of Air Pollution Particles. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 164, n. 4, p. 704-708, 2001.

GHIO, A. J.; PRITCHARD, R. J.; LEHMANN, J. R.; WINSETT, D. W.; HATCH, G. E. Lung Inflammation After Exposure to Nonfibrous Silicates Increases with Chelatable [Fe³⁺]. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 49, n. 1, p. 11-28, 1996/09/01 1996.

GRAHAM, M. L.; PRESCOTT, M. J. The multifactorial role of the 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease. **European Journal of Pharmacology**, v.759, p. 19-29, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.040>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299915002575>. Acesso em: 2015/07/15/.

GREENBERG, M. I.; WAKSMAN, J.; CURTIS, J. Silicosis: A Review. **Disease-a-Month**, v.53, n. 8, p. 394-416, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2007.09.020>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011502907001101>. Acesso em: 2007/08/01/.

GULUMIAN, M.; BORM, P. J. A.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V. *et al.* Mechanistically Identified Suitable Biomarkers of Exposure, Effect, and Susceptibility for Silicosis and Coal-Worker'S Pneumoconiosis: A Comprehensive Review. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, 9, n. 5, p. 357-395, 2006/12/01 2006.

GUO, J.; GU, N.; CHEN, J.; SHI, T. *et al.* Neutralization of interleukin-1 beta attenuates silica-induced lung inflammation and fibrosis in C57BL/6 mice. **Arch Toxicol**, 20130503, v.87, n. 11, p. 1963-1973, DOI: 10.1007/s00204-013-1063-z. Acesso em: Nov.

HORNUNG, V.; BAUERNFEIND, F.; HALLE, A.; SAMSTAD, E. O. *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nat Immunol**, 20080711, v.9, n. 8, p. 847-856, DOI: 10.1038/ni.1631. Acesso em: Aug.

HÜBNER, R.-H.; GITTER, W.; EDDINE EL MOKHTARI, N.; MATHIAK, M. *et al.* Standardized Quantification of Pulmonary Fibrosis in Histological Samples. **BioTechniques**, 44, n. 4, p. 507-517, 2008/04/01 2008.

ITOH, N.; NAGATA, S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. **J Biol Chem**, v.268, n. 15, p. 10932-10937, Acesso em: May 25.

JOSHI, G. N.; GOETJEN, A. M.; KNECHT, D. A. Silica particles cause NADPH oxidase-independent ROS generation and transient phagolysosomal leakage. **Mol Biol Cell**, 26, n. 18, p. 3150-3164, Sep 15 2015.

JOTA BAPTISTA, C. V.; FAUSTINO-ROCHA, A. I.; OLIVEIRA, P. A. Animal Models in Pharmacology: A Brief History Awarding the Nobel Prizes for Physiology or Medicine. **Pharmacology**, 20210521, v.106, n. 7-8, p. 356-368, DOI: 10.1159/000516240.

KAY, E. H.; HOEKSTRA, H. E. Rodents. **Curr Biol**, 18, n. 10, p. R406-r410, May 20 2008.

KELLER, M.; RÜEGG, A.; WERNER, S.; BEER, H. D. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. **Cell**, v.132, n. 5, p. 818-831, DOI: 10.1016/j.cell.2007.12.040. Acesso em: Mar 7.

KIM, H.; XUE, X. Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. **J Vis Exp**, n. 160, Jun 23 2020.

KIM, H. R.; KIM, B.; JO, B. S.; LEE, J. W. Silica exposure and work-relatedness evaluation for occupational cancer in Korea. **Ann Occup Environ Med**, 20180131, v.30, p. 4, DOI: 10.1186/s40557-018-0216-1.

KING, E. J. Silicosis. **Lect Sci Basis Med**, 2, p. 108-138, 1952.

KREFFT, S.; WOLFF, J.; ROSE, C. Silicosis: An Update and Guide for Clinicians. **Clin Chest Med**, v.41, n. 4, p. 709-722, DOI: 10.1016/j.ccm.2020.08.012. Acesso em: Dec.

KUMARI, S.; SINGH, P.; SINGH, R. Repeated Silica exposures lead to Silicosis severity via PINK1/PARKIN mediated mitochondrial dysfunction in mice model. **Cell Signal**, 121, p. 111272, Sep 2024.

KUNCOVÁ, M.; HAVRÁNKOVÁ, J.; HOLUA, R.; PALEČEK, F. Experimental Silicosis of the Rat. **Archives of Environmental Health: An International Journal**, 23, n. 5, p. 365-372, 1971/11/01 1971.

LAM, M.; MANSELL, A.; TATE, M. D. Another One Fights the Dust: Targeting the NLRP3 Inflammasome for the Treatment of Silicosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 66, n. 6, p. 601-611, 2022.

LAMKANFI, M.; SARKAR, A.; VANDE WALLE, L.; VITARI, A. C. *et al.* Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. **J Immunol**, 20100827, v.185, n. 7, p. 4385-4392, DOI: 10.4049/jimmunol.1000803. Acesso em: Oct 1.

LESO, V.; FONTANA, L.; ROMANO, R.; GERVETTI, P.; IAVICOLI, I. Artificial Stone Associated Silicosis: A Systematic Review. **Int J Environ Res Public Health**, 20190216, v.16, n. 4, DOI: 10.3390/ijerph16040568. Acesso em: Feb 16.

LEVIN, K.; MCLEAN, C.; HOY, R. Artificial stone-associated silicosis: clinical-pathological-radiological correlates of disease. **Respirol Case Rep**, 20190816, v.7, n. 7, p. e00470, DOI: 10.1002/rcr2.470. Acesso em: Oct.

LI, B.; MU, M.; SUN, Q.; CAO, H. *et al.* A suitable silicosis mouse model was constructed by repeated inhalation of silica dust via nose. **Toxicology Letters**, 353, p. 1-12, 2021/12/15/2021.

LIMA, W. R.; MORAES, M.; ALVES, E.; AZEVEDO, M. F. *et al.* The P α NF-YB transcription factor is a downstream target of melatonin and cAMP signalling in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **J Pineal Res**, 20120716, v.54, n. 2, p. 145-153, DOI: 10.1111/j.1600-079X.2012.01021.x. Acesso em: Mar.

LIMA, W. R.; PARREIRA, K. S.; DEVUYST, O.; CAPLANUSI, A. *et al.* ZONAB promotes proliferation and represses differentiation of proximal tubule epithelial cells. **J Am Soc Nephrol**, 20100204, v.21, n. 3, p. 478-488, DOI: 10.1681/asn.2009070698. Acesso em: Mar.

MARROCCO, A.; ORTIZ, L. A. Role of metabolic reprogramming in pro-inflammatory cytokine secretion from LPS or silica-activated macrophages. **Front Immunol**, 13, p. 936167, 2022.

MARTINS, E. M. L.; MARCHIORI, E.; SOUZA, A. S.; IRION, K. L. *et al.* Proteinose alveolar pulmonar Aspectos na tomografia computadorizada de alta resolução**Trabalho realizado nos Departamentos ou Serviços de Radiologia da Universidade Federal Fluminense (UFF) - RJ; Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - RJ; Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) -SP; Universidade de Campinas (UNICAMP) - SP; Pavilhão Pereira Filho - RS, e Universidade Federal de Santa Catarina - SC. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v.8, n. 4, p. 303-314, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0873-2159\(15\)30772-8](https://doi.org/10.1016/S0873-2159(15)30772-8). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0873215915307728>. Acesso em: 2002/07/01/.

MIAO, R.-M. Effect of oxidative stress on development of silicosis. **World Journal of Respiriology**, 2, p. 1, 02/28 2012.

MIZUSHINA, Y.; SHIRASUNA, K.; USUI, F.; KARASAWA, T. *et al.* NLRP3 protein deficiency exacerbates hyperoxia-induced lethality through Stat3 protein signaling independent of interleukin-1 β . **J Biol Chem**, 20141229, v.290, n. 8, p. 5065-5077, DOI: 10.1074/jbc.M114.603217. Acesso em: Feb 20.

NAKASHIMA, K.; SATO, T.; SHIGEMORI, S.; SHIMOSATO, T. *et al.* Regulatory role of heme oxygenase-1 in silica-induced lung injury. **Respiratory Research**, 19, n. 1, p. 144, 2018/08/01 2018.

OPHIR, N.; SHAI, A. B.; ALKALAY, Y.; ISRAELI, S. *et al.* Artificial stone dust-induced functional and inflammatory abnormalities in exposed workers monitored quantitatively by biometrics. **ERJ Open Res**, 20160317, v.2, n. 1, DOI: 10.1183/23120541.00086-2015. Acesso em: Jan.

PIGUET, P. F.; VESIN, C.; GRAU, G. E.; THOMPSON, R. C. 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, DOI: 10.1016/1043-4666(93)90024-y. Acesso em: Jan.

POLLARD, K. M. Silica, Silicosis, and Autoimmunity. **Front Immunol**, 7, p. 97, 2016.

POLLARD, K. M. Silica, Silicosis, and Autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v.7, DOI: 10.3389/fimmu.2016.00097. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2016.00097>. Acesso em: 2016-March-11.

RAMOS, L. P. A.; JUSTINO, A. B.; TAVERNELLI, N.; SARAIVA, A. L. *et al.* Antioxidant compounds from *Annona crassiflora* fruit peel reduce lipid levels and oxidative damage and maintain the glutathione defense in hepatic tissue of Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 142, p. 112049, 2021/10/01/ 2021.

RIBEIRO, F. S. N. **O mapa da exposição à sílica no Brasil**. Rio de Janeiro: UERJ, Ministério da Saúde, 2010. 94 p.

RUBARTELLI, A. Redox control of NLRP3 inflammasome activation in health and disease. **J Leukoc Biol**, 20120802, v.92, n. 5, p. 951-958, DOI: 10.1189/jlb.0512265. Acesso em: Nov.

RUIZ-OJEDA, F. J.; OLZA, J.; GIL, Á.; AGUILERA, C. M. Chapter 1 - Oxidative Stress and Inflammation in Obesity and Metabolic Syndrome. *In*: DEL MORAL, A. M. e AGUILERA GARCÍA, C. M. (Ed.). **Obesity**: Academic Press, 2018. p. 1-15.

SATO, T.; SHIMOSATO, T.; KLINMAN, D. M. Silicosis and lung cancer: current perspectives. **Lung Cancer (Auckl)**, 20181026, v.9, p. 91-101, DOI: 10.2147/ltt.S156376.

SATO, T.; TAKENO, M.; HONMA, K.; YAMAUCHI, H. *et al.* Heme oxygenase-1, a potential biomarker of chronic silicosis, attenuates silica-induced lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 174, n. 8, p. 906-914, Oct 15 2006.

SCHMIDT, F. I. Chapter 13 - Inflammatory caspases. *In*: PELEGRIN, P. (Ed.). **Inflammasome Biology**: Academic Press, 2023. p. 205-214.

SWEARENGEN, J. R. Choosing the right animal model for infectious disease research. **Animal Model Exp Med**, 20180728, v.1, n. 2, p. 100-108, DOI: 10.1002/ame2.12020. Acesso em: Jun.

TAN, S.; CHEN, S. Macrophage Autophagy and Silicosis: Current Perspective and Latest Insights. **Int J Mol Sci**, 20210105, v.22, n. 1, DOI: 10.3390/ijms22010453. Acesso em: Jan 5.

TERRA FILHO, M.; SANTOS, U. D. P. Silicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 32, 2006.

THE LANCET RESPIRATORY, M. The world is failing on silicosis. **Lancet Respir Med**, 7, p. 283, Apr 2019. p. 4.

THOMPSON, D.; QI, C. Characterization of the Emissions and Crystalline Silica Content of Airborne Dust Generated from Grinding Natural and Engineered Stones. **Annals of work exposures and health**, v.67, DOI: 10.1093/annweh/wxac070. Acesso em: 10/11.

VAN DER MOLEN, H. F.; FRINGS-DRESEN, M. H. W. Occupational Diseases: From Cure to Prevention. **Journal of Clinical Medicine**, 8, n. 10, p. 1681, 2019.

XIE, Y.; MA, J.; YANG, M.; FAN, L.; CHEN, W. Extracellular signal-regulated kinase signaling pathway and silicosis. **Toxicol Res (Camb)**, 20210507, v.10, n. 3, p. 487-494, DOI: 10.1093/toxres/tfaa109. Acesso em: May.

YAGI, K. Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. **Lipid peroxides in biology and medicine**, 223, p. 242, 1982.

YANG, M.; WANG, D.; GAN, S.; WANG, B. *et al.* Triiodothyronine ameliorates silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. **Sci Total Environ**, 20210526, v.790, p. 148041, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.148041. Acesso em: Oct 10.

ZAIDI, S. H.; SHANKER, R.; DOGRA, R. K. S. Experimental studies on early stages of the development of pulmonary silicosis in pups. **Environmental Research**, 4, n. 3, p. 243-252, 1971/08/01/ 1971.

ZEIDLER, P. C.; HUBBS, A.; BATTELLI, L.; CASTRANOVA, V. Role of Inducible Nitric Oxide Synthase-Derived Nitric Oxide in Silica-Induced Pulmonary Inflammation and Fibrosis. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, 67, n. 13, p. 1001-1026, 2004/07/01 2004.