

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
UFVJM**

NAYARA FELICIDADE TOMAZ BRAZ

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES INFLAMATÓRIOS E FUNCIONAIS
ASSOCIADOS À FISIOPATOLOGIA DA SILICOSE DE MORADORES DA REGIÃO
DE CORINTO – MG.**

DIAMANTINA – MG

2014

NAYARA FELICIDADE TOMAZ BRAZ

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES INFLAMATÓRIOS E FUNCIONAIS
ASSOCIADOS À FISIOPATOLOGIA DA SILICOSE DE MORADORES
DA REGIÃO DE CORINTO – MG.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, área de concentração em Ciências Fisiológicas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Amaral Mendonça - UFVJM

Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira - UFMG

DIAMANTINA - MG

UFVJM

2014

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES INFLAMATÓRIOS E FUNCIONAIS
ASSOCIADOS À FISIOPATOLOGIA DA SILICOSE DE MORADORES
DA REGIÃO DE CORINTO – MG.**

Nayara Felicidade Tomaz Braz

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, nível de Mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM 14 / 02 / 2014

Prof.^a Janetti Nogueira de Francischi – UFMG

Prof. Cláudio Heitor Balthazar – UFVJM

Prof.^a Vanessa Amaral Mendonça – UFVJM
Presidente

DIAMANTINA
2014

DEDICATÓRIA

A todos que contribuíram de alguma forma
para a realização da presente,
em especial aos meus mestres: minha mãe Simone,
e meu pai Francisco.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela dádiva da vida e por iluminar sempre meu caminho.

À minha mãe, por me ensinar ser determinada e otimista e por crer e apoiar todos os meus sonhos. Seu pensamento positivo e fé me ajudaram seguir em frente.

Ao meu pai, por ser meu porto seguro e meu exemplo de responsabilidade. Todo seu esforço em nossa criação serviu de motivação para eu buscar o sucesso.

Aos meus irmãos Guilherme e Nathália, que com a palavra amiga e de entusiasmo não me deixaram desistir nos momentos difíceis.

Aos familiares que mesmo distantes sempre me apoiaram nesta jornada.

À minha orientadora Professora Dra. Vanessa Amaral Mendonça pela confiança, amizade e pela dedicação ao estudo e à arte de ensinar.

À professora Dra. Ana Cristina Rodrigues Lacerda que me acolheu no LAFIEX desde a graduação. Suas palavras de incentivo foram determinantes para eu lutar pelos meus objetivos.

À Dra. Ana Paula Scalia Carneiro pela orientação, suporte na execução deste trabalho, acolhimento em seu ambulatório e oportunidade de aprendizado.

Aos Professores Dr. Antônio Lúcio Teixeira e Dr. Mauro Martins Teixeira pela viabilização do projeto e receptividade em seus laboratórios.

Aos médicos Dr. Eduardo Algranti e Dr. José Geraldo Félix, por contribuírem para a realização deste trabalho.

À professora Vanessa Pereira de Lima pelo auxílio na utilização do questionário Saint George.

À Aline Miranda pela colaboração no processamento do experimento.

Aos residentes de Medicina do Trabalho do Hospital das Clínicas da UFMG pelo auxílio na seleção dos participantes do estudo.

Aos meus queridos amigos pelo apoio constante e momentos de descontração, em especial a Flávia, Michele, Gabi e Juliana que acompanharam de perto esta etapa.

A todos os alunos de mestrado do LAFIEX e LIM pelo companheirismo e por todos os bons momentos que passamos juntos.

Aos garimpeiros e lapidários de Corinto pela disponibilidade e por contribuírem com o desenvolvimento científico.

RESUMO

A Silicose é uma pneumoconiose fibrótica, irreversível e potencialmente fatal, causada pela inalação de poeira contendo sílica cristalina. Causa disfunção respiratória e desregulação do sistema imunológico. Este trabalho foi dividido em dois estudos e teve como objetivos: avaliar as concentrações plasmáticas das citocinas e quimiocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, CCL2, CCL3, CCL11, CCL24, TNF- α e dos receptores solúveis sTNFR1 e sTNFR2, de sujeitos expostos à sílica (SES), com e sem a silicose e de sujeitos não expostos à poeira de sílica; verificar se existe associação entre esses biomarcadores com a gravidade da silicose, avaliada pela radiografia de tórax; verificar se existe associação entre os biomarcadores com o questionário de qualidade de vida *Saint George's Respiratory Questionnaire* (SGRQ), com o Teste de Caminhada de Seis Minutos (TC6), com a escala de dispneia do *Medical Research Council* e com a função pulmonar, avaliada pelo volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁); verificar se existe associação entre os biomarcadores com o tempo de exposição à sílica; verificar se existe associação entre o tempo de exposição com a gravidade da silicose. **Métodos:** No primeiro momento do estudo, foram investigadas as concentrações plasmáticas de CCL2, CCL3, CCL11, CCL24, TNF- α , sTNFR1 e sTNFR2. Foram incluídos 57 SES, garimpeiros e lapidários de quartzo, sendo 36 com silicose. O grupo controle (GC) foi composto por 22 indivíduos saudáveis sem história de exposição à sílica. Os biomarcadores foram avaliados por ELISA. **Resultados:** CCL3, CCL24, sTNFR1 e sTNFR2 estavam aumentados no grupo SES e nos SES com silicose em relação aos controles. As concentrações plasmáticas de sTNFR1 e sTNFR2 foram maiores nos SES, com e sem silicose. A concentração de sTNFR2 foi maior nos SES com silicose que nos SES sem silicose. Houve correlação positiva entre sTNFR1 e sTNFR2 e a gravidade radiológica da silicose e o tempo de exposição. Além disso, sTNFR2 foi associado à todas as categorias da gravidade radiológica. **Métodos:** No segundo momento do estudo foram investigadas as concentrações plasmáticas de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , sTNFR1 e sTNFR2, de 30 SES, sendo 23 indivíduos silicóticos e 7 sem silicose. O GC foi composto por 24 indivíduos não expostos à sílica. Nessa fase foram também avaliados, a função pulmonar, o grau de dispneia, a capacidade funcional e a qualidade de vida dos SES. Os biomarcadores foram avaliados por ELISA. **Resultados:** A concentração plasmática de IL-6 estava maior nos SES e nos pacientes com silicose comparados ao GC. Houve correlação positiva entre a gravidade radiológica e o escore total do SGRQ, e correlação negativa entre a gravidade radiológica e o VEF₁. Foi encontrada correlação negativa entre a concentração plasmática de sTNFR1 e a distância percorrida no TC6. IL-10 correlacionou-se negativamente com o escore total no

SGRQ e correlacionou-se positivamente com a distância percorrida no TC6 e com o VEF₁.

Conclusão: Os sujeitos expostos à sílica apresentaram aumento das concentrações plasmáticas de IL-6, CCL3, CCL24, sTNFR1 e sTNFR2. sTNFR2 foi associado à gravidade radiológica e à exposição precoce à poeira de sílica. A qualidade de vida relacionada à respiração foi afetada negativamente pela gravidade da silicose, que, por sua vez, prejudicou a função pulmonar. Elevadas concentrações plasmáticas de sTNFR1 foram relacionadas com uma menor capacidade funcional. Além disso, a concentração elevada de IL-10, citocina anti-inflamatória, indicaram maior capacidade funcional, melhor função pulmonar e qualidade de vida. Em conclusão, este estudo mostrou que indivíduos expostos à poeira de sílica apresentaram indicação de inflamação sistêmica, com prejuízo da função pulmonar, da capacidade funcional e da qualidade de vida da população avaliada.

Palavras-chave: silicose, citocinas, quimiocinas, sTNFR1, sTNFR2, qualidade de vida, dispneia, VEF₁, capacidade funcional.

ABSTRACT

Silicosis is a fibrotic, irreversible and potentially fatal pneumoconiosis caused by inhalation of dust containing crystalline silica. This disease is associated with respiratory dysfunction and dysregulation of the immune system. This research was divided into two studies and aimed to: evaluate the plasma levels of cytokines and chemokines IL-1 β , IL-6, IL-10, CCL2, CCL3, CCL11, CCL24, TNF- α and soluble receptors sTNFR1 and sTNFR2 in subjects exposed to silica (SES), with and without silicosis and subjects unexposed to silica dust; to investigate the association between biomarkers with the silicosis severity, evaluated by chest X-rays; to check the association between biomarkers with Saint George's Respiratory Questionnaire (SGRQ), a quality of life questionnaire, with the Six-Minute Walk Test (6MWT), with the dyspnea scale of Medical Research Council and pulmonary function, as assessed by forced expired volume in one second (FEV₁); to investigate the association between biomarkers with duration of exposure to silica; to investigate the association between duration of exposure and the radiological severity. **Methods:** In the first phase of the study, plasma levels of CCL2, CCL3, CCL11, CCL24, TNF- α , sTNFR1 and sTNFR2 were investigated. 57 SES, stone carving/polishing and/or quartz mining, 36 with silicosis were included. The control group (CG) consisted of 22 healthy men with no history of exposure. Inflammatory biomarkers were measured by ELISA. **Results:** CCL3, CCL24, sTNFR1 and sTNFR2 were greater in the SES group and in SES with silicosis than in the CG. Plasma levels of sTNFR1 and sTNFR2 were greater in SES, with and without silicosis. The concentration of sTNFR2 was greater in SES with silicosis than in SES without silicosis. There was a positive correlation between sTNFR1 and sTNFR2 and radiological severity of silicosis and duration of exposure. Moreover, sTNFR2 was associated with all categories of radiological severity. **Methods:** In the second phase of the study, plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , sTNFR1 and sTNFR2 were investigated. There were 30 SES, 23 with silicosis and 7 subjects without silicosis. The CG was composed of 24 subjects unexposed to silica. In this phase we also evaluated pulmonary function, degree of dyspnea, functional capacity and quality of life of SES. Inflammatory biomarkers were measured by ELISA. **Results:** The plasma level of IL-6 was greater in SES and in patients with silicosis than in the CG. There was a positive correlation between radiological severity and SGRQ total score, whereas there was a negative correlation between radiological severity and FEV₁. A negative correlation between plasma level of sTNFR1 and 6MWT was found. IL-10 was negatively correlated with the total score on the SGRQ and was positively correlated with the 6MWT and FEV₁. **Conclusion:** The subjects exposed to silica showed increased plasma

concentrations of IL-6, CCL3, CCL24, sTNFR1 and sTNFR2. sTNFR2 was associated with radiological severity and early exposure to silica dust. The respiration-related quality of life was negatively affected by the severity of silicosis, which, in turn, impaired lung function. Elevated plasma levels of sTNFR1 were associated with a lower functional capacity. In addition, high levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, showed greater functional capacity, improved lung function and quality of life. In conclusion, this study showed that subjects exposed to silica dust had indicators of systemic inflammation with impaired pulmonary function, functional capacity, and quality of life of the studied population.

Keywords: silicosis, cytokines, chemokines, sTNFR1, sTNFR2, quality of life, dyspnea, FEV₁, functional capacity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Lapidários de Corinto, Minas Gerais.....16
- Figura 2-** Concentrações plasmáticas de CCL3 (a), CCL24 (b), sTNFR1 (c) e sTNFR2 (d) (em pg/ml) apresentadas pelos grupos controle, SES sem silicose e SES com silicose.....28
- Figura 3-** Curva ROC da concentração plasmática de sTNFR1 (a) e sTNFR2 (b) para os sujeitos com silicose e o grupo controle e sTNFR2 (c) para os sujeitos com e sem silicose....29
- Figura 4-** Concentração plasmática de IL-6 do GC e dos SES (a) e do GC, do grupo SES sem silicose e do grupo SES com silicose (b).....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características gerais dos sujeitos do primeiro estudo.....	27
Tabela 2- Regressão logística multinomial, considerando sTNFR2 como variável independente e profusão radiológica como variável dependente.....	30
Tabela 3- Características gerais dos sujeitos expostos à sílica, com e sem silicose, do segundo estudo.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACGIH: *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*

AVD: Atividade de vida diária

CCL2/MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos 1

CCL3/MIP- α : Proteína inflamatória de macrófagos 1 α

CCL11: Eotaxina 1

CCL24: Eotaxina 2

CCL26: Eotaxina 3

CVF: Capacidade vital forçada

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FC: Frequência cardíaca

FEF₅₀: Fluxo expiratório forçado em 50% da capacidade vital forçada

FEF₇₅: Fluxo expiratório forçado em 75% da capacidade vital forçada

FEF₂₅₋₇₅: Fluxo expiratório forçado entre 25-75% da capacidade vital forçada

FGF: Fator de crescimento derivado de fibroblasto

G-CSF: Fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos

GC: Grupo controle

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

IL-12(p70): Interleucina 12

IL-13: Interleucina 13

IL-15: Interleucina 15

IL-18: Interleucina 18

ILO: *International Labor Office*

IMC: Índice de massa corporal

LBA: Lavado broncoalveolar

MCAF: Fator ativador e quimiotático de macrófagos

MRC: *Medical Research Council*

nM: nanômetro

NO: Óxido nítrico

PA: Pressão arterial

PBMCs: Células mononucleares do sangue periférico

PDGF: Fator de crescimento derivado da plaqueta

RCQ: Relação cintura-quadril

ROC: *Receiver operating characteristic*

SES: Sujeitos expostos à sílica

SGRQ: *Saint George's Respiratory Questionnaire*

SiO₂: Dióxido de silício

sTNFR1: Receptor solúvel tipo 1 de TNF- α

sTNFR2: Receptor solúvel tipo 2 de TNF- α

TC6: Teste de Caminhada de Seis Minutos

TGF: Fator de transformação de crescimento

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

VEF₁: Volume expiratório forçado no primeiro segundo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 O CONCEITO DA SILICOSE	15
2.2 EPIDEMIOLOGIA DA SILICOSE	15
2.3 PREVENÇÃO E CONTROLE DA SILICOSE	16
2.4 COMORBIDADES ASSOCIADAS À SILICOSE	17
2.5 DIAGNÓSTICO DA SILICOSE	17
2.6 FORMAS CLÍNICAS DA SILICOSE	18
2.7 TRATAMENTO DA SILICOSE	18
2.8 FISIOPATOLOGIA DA SILICOSE E BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	18
2.9 FUNÇÃO PULMONAR, GRAU DE DISPNEIA, CAPACIDADE FUNCIONAL E QUALIDADE DE VIDA DE SUJEITOS EXPOSTOS À SÍLICA	21
3. OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. MÉTODOS	24
4.1 DESENHO DO PRIMEIRO ESTUDO	24
4.2 RADIOGRAFIA DE TÓRAX	24
4.3 PREPARO DO PLASMA	25
4.4 ANÁLISE DOS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS	25
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO DO PRIMEIRO ESTUDO.....	27
5.1 SUJEITOS	27
5.2 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DOS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS	28
5.3 ANÁLISE DA <i>RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC (ROC)</i> PARA AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE <i>STNFR1</i> E <i>STNFR2</i>	29
5.4 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO	30
5.5 REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTINOMIAL UNIVARIADA DOS RECEPTORES SOLÚVEIS DE <i>TNF-α</i> E A PROFUSÃO RADIOLÓGICA	30
6. DESENHO DO SEGUNDO ESTUDO.....	34
6.1 RADIOGRAFIA DE TÓRAX	34
6.2 FUNÇÃO PULMONAR	34
6.3 QUALIDADE DE VIDA RELACIONADA À RESPIRAÇÃO.....	35
6.4 DISPNEIA	35
6.5 CAPACIDADE FUNCIONAL SUBMÁXIMA	36
6.6 PREPARO DO PLASMA	36
6.7 ANÁLISE DAS CITOCINAS E DOS RECEPTORES SOLÚVEIS DO <i>TNF-A</i>	36
6.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO DO SEGUNDO ESTUDO.....	38
7.1 SUJEITOS	38
7.2 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DAS CITOCINAS E DOS RECEPTORES SOLÚVEIS DO <i>TNF-A</i>	39
7.3 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO	39
8. CONCLUSÃO FINAL	43
REFERÊNCIAS	44

ANEXO I- Termo de consentimento livre e esclarecido.

ANEXO II- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.

ANEXO III- Artigo aceito para publicação.

BRAZ, N.F.T; CARNEIRO, A.P.S; AMORIM, M.R; FERREIRA, F.O; LACERDA, A.C.R; MIRANDA, A.S; TEIXEIRA, M.M; TEIXEIRA, A.L; MENDONÇA, V.A. Association Between Inflammatory Biomarkers in Plasma, Radiological Severity and Duration of Exposure in Patients with Silicosis. **Journal of Occupational and Environmental Medicine.**

ANEXO IV- Artigo aceito para publicação.

AMORIM, M.R; CARNEIRO, A.P.S; BRAZ, N.F.T; SILVA, K.C.C; TEIXEIRA, A.L; MENDONÇA, V.A. Biomarcadores Inflamatórios na Silicose Pulmonar. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR.** v.16, n.2, 2014.

1 INTRODUÇÃO

A silicose é causada pela inalação da poeira de sílica cristalina livre e é uma doença ocupacional prevenível, mas sem cura. A doença consiste na inflamação dos tecidos do sistema respiratório que causa fibrose e redução da função pulmonar, gerando, principalmente, dispnéia até mesmo aos pequenos esforços. A exposição à sílica também aumenta o risco de desenvolvimento de tuberculose e outras doenças respiratórias e contribui para doenças renais e respiratórias autoimunes. Além disso, a *International Agency for Research on Cancer* caracterizou a sílica cristalina como carcinógeno humano classe I (*International Agency for Research on Cancer*, 1997; Rees & Murray, 2007; Ehrlich et al., 2011; Makol et al., 2011). Está associada à alta taxa de morbidade e mortalidade e à limitação funcional para o trabalho que gera um número elevado de dias perdidos por licença médica (Mesa & Kaempffer, 2004; Giuseppe et al., 2009). Além disso, a doença afeta diretamente a qualidade de vida dos pacientes, em função dos sintomas gerados e do impacto social e nas atividades de vida diária (AVD) (Liu et al., 2011). A silicose tem sido muito estudada, porém ainda pouco se sabe sobre os principais mecanismos celulares e moleculares que iniciam e propagam o processo da inflamação e cicatrização do tecido pulmonar. Algumas evidências sugerem que a patogênese da silicose envolve a desregulação do sistema imunológico com liberação de citocinas e quimiocinas (Liu et al., 2010).

A silicose é diagnosticada com base na história de exposição à sílica, em características radiológicas e exclusão de outras condições através da história clínica. Exames médicos periódicos, como a radiografia de pulmão e a espirometria, devem ser fornecidos aos trabalhadores expostos à sílica (Rees & Murray, 2007). Além dos métodos diagnósticos citados, a determinação de biomarcadores biológicos associados à fisiopatologia da silicose tem se mostrado uma alternativa para identificação precoce da doença e instituição de medidas de controle e tratamento efetivos (Borm & Schins, 2001).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CONCEITO DE SILICOSE

O dióxido de silício (SiO_2), segundo componente mais encontrado na crosta terrestre, constitui a sílica, substância responsável pela etiologia da pneumoconiose denominada silicose (*Silicosis and Silicate Disease Comittee*, 1988). A silicose é uma doença pulmonar fibrótica progressiva e irreversível causada pela inalação da poeira de sílica cristalina livre. Ela inicia-se nas vias aéreas periféricas e pode progredir mesmo após a cessação da exposição à sílica (*American Thoracic Society*, 1997). Apesar dos avanços nas medidas de prevenção e segurança do trabalho, a silicose é a doença ocupacional mais prevalente no mundo e está presente principalmente nos países em desenvolvimento (*International Labour Office*, 2011).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA SILICOSE

No Brasil, é a pneumoconiose mais prevalente e a principal causa de invalidez entre as doenças respiratórias. Ocorre em várias indústrias e ocupações, como mineração, indústria cerâmica, indústria metalúrgica, atividades em pedreiras, construção civil pesada, jateamento de areia e perfuração de poços (Carneiro et al., 2002). Estima-se que no país são mais de 6 milhões de trabalhadores expostos à poeira de sílica, sendo Minas Gerais o estado com maior número de casos registrados e a mineração subterrânea de ouro, a principal atividade causadora da doença (Ministério da Saúde, 2010). Entre 1978 e 1998 foram relatados mais de 4500 casos de silicose em mineradores de ouro (Carneiro et al., 2006). Neste Estado, além da mineração, estão presentes atividades como o garimpo e a lapidação de pedras preciosas e semipreciosas, em sua maioria com inserção informal no mercado de trabalho, em oficinas de base familiar, utilização de processos rudimentares e precárias condições e geralmente sem cobertura previdenciária/trabalhista (Carneiro et al., 2002). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a cidade de Corinto, Minas Gerais, tem uma população de 23.914 habitantes e economia baseada em pecuária e extração, processamento e comércio de quartzo (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010) (Figura 1). Não foram feitas medidas quantitativas da concentração de poeira de sílica em Corinto, mas segundo Chiavegatto e cols., (2010), estima-se que essa medida seja de 2,4 à 26,2 vezes maior que o limite de $0,05 \text{ mg/m}^3$ (quartzo como poeira respirável) para 40 horas de trabalho semanais, recomendado pela *American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)* (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*, 2004).



FIGURA 1- Lapidários de Corinto, Minas Gerais.

2.3 PREVENÇÃO E CONTROLE DA SILICOSE

A Organização Internacional do Trabalho e a Organização Mundial da Saúde lançaram, em 1995, um programa conjunto de erradicação global da silicose, com a ambiciosa intenção de diminuir drasticamente a sua prevalência e a erradicação dessa doença até 2030. As medidas recomendadas internacionalmente visam evitar o aparecimento da silicose e

baseiam-se em evitar a exposição e a inalação de poeiras finas e respiráveis contendo a sílica livre e cristalina, utilizando-se de tecnologias apropriadas (Goelzer et al., 2000). Segundo o Ministério da Saúde, as medidas de controle incluem: evitar o uso de materiais que contenham sílica livre e cristalina; substituir matéria prima ou processos que utilizem ou demandem sílica; eliminar ou prevenir a formação de poeiras; evitar ou controlar a disseminação de poeiras no local de trabalho; evitar que os trabalhadores inalem a poeira; substituição da areia como abrasivo por materiais menos perigosos; modificação de processos para produzir menos poeira e utilização de métodos úmidos (Ministério da Saúde, 2010).

2.4 COMORBIDADES ASSOCIADAS À SILICOSE

A silicose está associada a várias comorbidades pulmonares, tais como, tuberculose, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e câncer de pulmão (*International Agency for Research on Cancer*, 1997; Rees & Murray, 2007; Ehrlich et al., 2011). Notavelmente, a sílica cristalina foi classificada como carcinógeno humano classe I pela *International Agency for Research on Cancer* em 1997. Além das doenças pulmonares, sabe-se que esses pacientes também podem desenvolver doenças autoimunes secundárias, como artrite reumatoide, esclerodermia, lúpus eritematoso sistêmico e doença renal crônica (Makol et al., 2011).

2.5 DIAGNÓSTICO DA SILICOSE

O diagnóstico da silicose é dado pela associação de história ocupacional de exposição à poeira de sílica, com a história clínica e alterações radiológicas compatíveis. A Organização Internacional do Trabalho publicou uma diretriz que permite a classificação radiológica para pneumoconioses (*International Labour Office*, 2011). Na silicose simples, a radiografia de tórax geralmente mostra pequenas opacidades redondas, distribuídas de forma simétrica com predominância nas zonas superiores. Alguns pacientes têm padrão de fibrose intersticial difusa sem as opacidades nodulares típicas. Na fibrose maciça progressiva as opacidades são maiores que 1 cm. Ao longo do tempo, elas aumentam em tamanho e tornam-se confluentes e as pequenas opacidades podem desaparecer. Com a contração das grandes massas fibróticas, as estruturas hilares são puxadas para cima deixando as zonas periféricas e inferiores do pulmão hipertranslucentes, muitas vezes com várias bolhas. Os linfonodos hilares e mediastinais podem aumentar e também se calcificar, às vezes apresentando característica de “casca de ovo” (Arakawa et al., 2008).

Apesar de a avaliação radiológica constituir um importante instrumento diagnóstico para silicose, cerca de 9,6 a 18,1% dos indivíduos com evidência patológica de doença

intersticial apresentam radiografias torácicas normais (Gaensler & Carrington, 1980). A tomografia computadorizada de alta resolução possui sensibilidade superior para o diagnóstico da silicose comparado à radiografia convencional, mas não é um exame usado rotineiramente no serviço público de saúde no Brasil (Lopes et al., 2008).

2.6 FORMAS CLÍNICAS DA SILICOSE

A silicose pode apresentar-se clinicamente como um quadro agudo, acelerado ou crônico. A forma aguda, ou proteinose alveolar silicótica, ocorre em até cinco anos de exposição a altas concentrações de sílica cristalina respirável, e normalmente, ocorre rápida evolução para o óbito. Já a forma acelerada se desenvolve entre cinco e dez anos após a exposição inicial e apresenta características clínicas semelhantes à forma crônica, porém tende a progredir rapidamente. A forma crônica é a mais comum e se desenvolve após dez anos de exposição a baixas concentrações de sílica. Alguns pacientes com silicose simples, presente na forma crônica, podem ser assintomáticos e, por isso, diagnosticados somente após exame radiológico (*National Institute for Occupational Safety and Health, 2002*).

2.7 TRATAMENTO DA SILICOSE

Como não tem cura, o tratamento dos pacientes com silicose visa aliviar os sintomas e manter as habilidades funcionais. Dentre os sintomas relatados pelos pacientes, estão: tosse, dor torácica, sibilância, expectoração, dispneia, fadiga e perda de peso (Liu et al., 2011). O transplante pulmonar é uma alternativa para os pacientes com silicose, no entanto, estudos mostram que a sobrevida desses pacientes pós-transplante é curta, se comparada aos transplantados com outras doenças pulmonares, como a fibrose pulmonar idiopática (Giuseppe et al., 2009).

2.8 FISIOPATOLOGIA DA SILICOSE E BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS

As alterações patológicas na silicose são representadas pela presença de granulomas ou nódulos inflamatórios de células mononucleares nos locais onde as partículas se acumulam, acometendo, inicialmente, as regiões peribronquiolares, com infiltração de células no parênquima pulmonar, seguida de ativação e proliferação de células residentes. Com a evolução da doença, ocorre proliferação de fibroblastos e deposição de grande quantidade de colágeno. O colágeno central torna-se concêntrico e o número de células inflamatórias periféricas diminuem. Posteriormente, os nódulos se coalescem, destruindo o tecido pulmonar adjacente (Giuseppe et al., 2009; Leung et al., 2012).

No estudo de Guiseppe e cols. (2009) foi descrita a presença de aglomerados de células inflamatórias e nódulos silicóticos no pulmão de sujeitos expostos à sílica, observados durante o transplante pulmonar. As células inflamatórias mononucleares que desempenham importante papel na patogênese da silicose incluem os macrófagos alveolares, monócitos, neutrófilos e células dendríticas. Estas células produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-13, IL-18, TNF- α , CCL2/MCP-1 (Zhai et al., 2002; Inoshima et al., 2004; Cassel et al., 2008; Lee et al., 2010; Tripathi et al., 2010; Zou et al., 2011; Sauni et al., 2012); fatores de crescimento como fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento derivado de fibroblasto (FGF) (Meloni et al., 1996) e fator transformador de crescimento (TGF) (Liu et al., 2010); e mediadores citotóxicos como o óxido nítrico (Sauni et al., 2012).

O fator de necrose tumoral alfa desempenha importante papel na patogênese da silicose e sua sinalização é mediada pelo fator de transcrição NF-kB que faz o controle gênico de vários processos fisiológicos, incluindo a resposta imune inata, a apoptose e a inflamação (Guiseppe et al., 2009). Muitas mudanças observadas no pulmão após a exposição à sílica podem ser explicadas por aumento da atividade de TNF- α , incluindo o recrutamento de células polimorfonucleares e ativação de macrófagos alveolares. O TNF- α pode também ser responsável pela indução de quimiocinas no pulmão em resposta à sílica. O estudo de Barrett e cols. (1999) demonstrou que numa linhagem de células epiteliais pulmonares, o aumento da expressão de quimiocinas induzida pela sílica foi bloqueado pela presença de anticorpos anti-TNF- α , sugerindo que a resposta das quimiocinas não é devido à oxidação direta, mas que nessas células ela é mediada pelo TNF- α .

As respostas ao TNF- α são desencadeadas pela ligação a um dos seus receptores solúveis, sTNFR1 e sTNFR2 também conhecidos como p55 e p75, respectivamente. Eles são diferentemente regulados nos vários tipos celulares, em tecidos normais e lesados (Bradley, 2008). Estudos mostraram associação entre as concentrações de sTNFR1 e sTNFR2 e a presença de pneumoconiose do carvão (Zhai et al., 2002) e que esses receptores participam do efeito fibrogênico da sílica (Ortiz et al., 2001).

Vários estudos já demonstraram que a citocina pró-inflamatória IL-1 β está relacionada com a silicose e é secretada por macrófagos alveolares quando expostos à sílica. Além disso, sabe-se que camundongos *knockout* para IL-1 β e para o receptor de IL-1 β , são mais resistentes ao desenvolvimento da silicose (Srivastava et al., 2002).

A interleucina 6 é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica que tem sido associada com doenças pulmonares como silicose e asbestose. Foi encontrado aumento nos níveis de IL-6 no soro e lavado broncoalveolar de sujeitos expostos à sílica (Sauni et al., 2012).

A interleucina 10 possui funções imunossupressoras e anti-inflamatórias, através da redução da produção de mediadores pró-inflamatórios por monócitos e macrófagos e do controle da inflamação em diferentes modelos animais. No entanto, ela tem sido identificada como citocina do tipo Th2 que, quando superexpressada no pulmão de camundongos, exacerba a lesão fibrótica causada pela inalação de sílica e promove a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-4 e IL-13 (Barbarin et al., 2004).

As quimiocinas são citocinas de baixo peso molecular responsáveis pela quimiotaxia de leucócitos até os tecidos inflamados (Gerard & Rollins, 2001). Elas são importantes mediadores na patogênese de diversas doenças pulmonares. A proteína quimiotática de monócitos 1 (CCL2/MCP-1) é uma quimiocina pró-inflamatória produzida por diversos tipos celulares. Tem sido relatado que CCL2 é fortemente expressa em células epiteliais, macrófagos e células endoteliais de pacientes com fibrose pulmonar idiopática. Os níveis de CCL2 no soro e no lavado broncoalveolar são significativamente mais elevados em pacientes com fibrose pulmonar idiopática do que em voluntários saudáveis (Car et al., 1994). Sellamuthu e cols. (2011) observaram que ratos expostos à sílica apresentam maior nível de CCL2 no lavado broncoalveolar que os ratos não expostos.

CCL3/MIP-1 α é quimioatraente de monócitos e linfócitos e tem sido relacionada com a inflamação e lesão pulmonar em modelos animais de silicose, e contribui com a resposta celular inflamatória observada na sarcoidose e fibrose pulmonar idiopática em humanos (Driscoll, 1994). No estudo de Yang e cols. (2011) observou-se que CCL3/MIP-1 α medeia a inflamação e a fibrose pulmonar de ratos que receberam radiação torácica.

A CCL11 (eotaxina 1) é constitutivamente expressa no pulmão, e sua concentração é elevada no lavado broncoalveolar, na expectoração e na parede da via aérea em resposta à asma. Os seus efeitos biológicos são mediados pelo receptor CCR3 que é altamente expresso pelos eosinófilos e outras células, incluindo linfócitos Th2 (Puxeddu et al., 2006). No estudo de Komai e cols. (2010) foi observado que o antagonista de CCR3, receptor das quimiocinas CCL11, CCL24 (eotaxina 2) e CCL26 (eotaxina 3), previne a infiltração de eosinófilos nas vias aéreas e o desenvolvimento de fibrose subepitelial e peribronquial, eventos característicos da asma. Kohan e cols. (2010) mostraram que CCL24 estimula a proliferação de fibroblastos pulmonares humanos e a síntese de colágeno e CCL26 a migração do fibroblasto, contribuindo para o remodelamento aéreo na asma.

O mecanismo da lesão pulmonar causada pela inalação de sílica ainda não está totalmente compreendido. Cassel e cols. (2008) mostraram que a fagocitose da partícula de sílica pelos macrófagos alveolares ativa o complexo do inflamassoma Nalp3 que leva à ativação e liberação da pro-caspase 1 que causa a clivagem e secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 nas suas formas ativas. Peeters e cols. (2013) mostraram a presença da ativação do inflamassoma Nalp3 em células epiteliais pulmonares humanas expostas à sílica cristalina e que essa ativação prolonga o sinal inflamatório e estimula a proliferação de fibroblastos.

A sílica pode se apresentar na forma não cristalina (amorfa) e na forma cristalina. A forma amorfa é biologicamente menos ativa que a forma cristalina, que desempenha maior papel na patogênese da silicose. Perkins e cols. (2012) observaram mais alterações na expressão genética de células epiteliais bronquiais humanas expostas à sílica cristalina comparada às células que foram expostas à forma amorfa. Além disso, eles observaram que a sílica cristalina induziu a secreção das citocinas e quimiocinas IL-6, IL-8, IL-12(p70), IL-13, IL-15, MCAF, RANTES, G-CSF e FGF, o que não ocorreu após a exposição à forma amorfa.

Além das anormalidades imunológicas descritas anteriormente, a silicose é caracterizada pelo surgimento de autoanticorpos que desregulam a apoptose celular através da via da proteína transmembrana FAS e do ligante da FAS. Em estudo de Hamzaoui e cols. (2003), observou-se que os linfócitos do lavado broncoalveolar de pacientes com silicose expressam mais FAS e FASL que indivíduos saudáveis.

2.9 FUNÇÃO PULMONAR, GRAU DE DISPNEIA, CAPACIDADE FUNCIONAL E QUALIDADE DE VIDA DE SUJEITOS EXPOSTOS À SÍLICA

A espirometria é o teste fisiológico da medida do volume de ar inalado e exalado em função do tempo, o que traduz a função pulmonar. É um teste que auxilia na prevenção e permite o diagnóstico e a quantificação dos distúrbios ventilatórios (Pereira, 2002). No estudo de Zou e cols. (2011) observou-se que a função pulmonar, avaliada através dos valores de CVF, VEF₁, FEF₅₀, FEF₇₅, FEF₂₅₋₇₅, está reduzida em pacientes com pneumoconiose do carvão comparada a mineiros saudáveis (Zou et al., 2011). A redução da função pulmonar interfere no dia-a-dia dos pacientes, que são muitas vezes, incapazes de trabalhar, afetando até mesmo suas atividades de vida diária (AVD). Como consequência, a qualidade de vida desses pacientes torna-se prejudicada. São poucos os estudos sobre a qualidade de vida dos pacientes com silicose e não há nenhum questionário de saúde específico para essa doença. Liu e cols. (2011) observaram que pacientes com silicose apresentam qualidade de vida moderada

utilizando o *Saint George's Respiratory Questionnaire* (SGRQ). O SGRQ é amplamente utilizado para estimar a saúde respiratória dos pacientes com DPOC (Camelier et al., 2006).

Alguns testes físicos são muito usados para discriminar e quantificar problemas na função corporal e o Teste de Caminhada de Seis Minutos (TC6) é o teste mais utilizado para avaliar a capacidade funcional do indivíduo. É um teste de fácil aplicação, é seguro e de baixo custo. É aplicável em várias doenças, como DPOC, fibrose pulmonar, silicose, entre outras (Rejbi et al., 2010; Bois et al., 2011; Han et al., 2013).

A dispneia é uma sensação subjetiva com base fisiopatológica complexa. Entre seus contribuintes estão fadiga diafragmática, sinalização fisiológica e mais comumente, obstrução brônquica. A obstrução das vias aéreas, medida por meio de testes de função pulmonar como a espirometria, permanece a base de classificação da deficiência respiratória em pacientes com pneumoconiose, embora métodos mais complexos tenham sido propostos (Bauer et al., 2001). A dispneia pode ser analisada para escala do *Medical Research Council* (MRC) que avalia a limitação imposta pela dispneia nas AVD. A escala do MRC foi validada no Brasil em pacientes com DPOC por Kovelis e cols. em 2008.

No presente estudo investigamos as concentrações plasmáticas das seguintes citocinas e quimiocinas: IL-1 β , IL-6, IL-10, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL11/eotaxina-1, CCL24/eotaxina-2, TNF- α e dos receptores solúveis de TNF- α : sTNFR1 e sTNFR2, em sujeitos não expostos à poeira de sílica, e em indivíduos expostos, garimpeiros e lapidários de quartzo, com e sem a silicose. Além disso, avaliamos a função pulmonar, a capacidade funcional, o grau de dispnéia e a qualidade de vida desses trabalhadores expostos à poeira de sílica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as concentrações plasmáticas das citocinas e quimiocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, CCL2, CCL3, CCL11, CCL24, TNF- α e dos receptores solúveis sTNFR1 e sTNFR2, em sujeitos exposto à poeira de sílica, com e sem a silicose, e em sujeitos não expostos à poeira de sílica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se existe associação entre os biomarcadores inflamatórios do plasma com a gravidade da silicose, avaliada pela radiografia de tórax;
- Verificar se existe associação entre os biomarcadores inflamatórios do plasma com o questionário de qualidade de vida do *Saint George's Respiratory Questionnaire*, com o Teste de Caminhada de Seis Minutos e com a escala de dispneia do *Medical Research Council*;
- Verificar se existe associação entre os biomarcadores inflamatórios do plasma com o tempo de exposição à sílica;
- Verificar se existe associação entre o tempo de exposição à sílica e a gravidade da silicose.

4 MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG (ETIC 183/08) e o consentimento livre e esclarecido foi assinado por cada participante. Este foi um estudo transversal observacional de casuística de demanda espontânea, que consistiu de dois grupos de sujeitos expostos à sílica (SES), sem e com silicose e de um grupo controle (GC), cujos voluntários não eram expostos à sílica. Os voluntários com história de exposição à sílica foram atendidos no Serviço Especializado em Saúde do Trabalhador (SEST) do Hospital das Clínicas da UFMG, em Belo Horizonte, Minas Gerais. Foram incluídos apenas voluntários do sexo masculino, lapidários e garimpeiros de quartzo, da cidade de Corinto.

Os critérios de exclusão foram: presença de infecções respiratórias do trato superior ou inferior nas últimas seis semanas, tuberculose pleuro pulmonar ativa ou previamente tratada, presença de doenças cardiovasculares ou metabólicas instáveis, comorbidades agudas, uso de corticoides orais ou anti-inflamatórios não esteroides nas seis últimas semanas.

4.1 DESENHO DO PRIMEIRO ESTUDO

Os voluntários com história de exposição à sílica foram submetidos à propedêutica usual do SEST para investigação de pneumoconioses que incluiu: anamnese clínica e ocupacional e radiografia de tórax nos padrões da Organização Internacional do Trabalho (OIT) (*International Labour Office*, 2011). As consultas foram realizadas nas segunda ou quarta-feiras pela manhã ou na terça-feira à tarde. Em seguida, esses sujeitos foram avaliados por um único pesquisador previamente treinado, sendo coletados os seguintes dados: características antropométricas [idade, história de tabagismo (nunca fumou, ex-tabagista ou tabagista atual) e tempo de exposição e de afastamento da poeira de sílica].

Foram investigadas as concentrações plasmáticas de CCL2, CCL3, CCL11, CCL24, TNF- α , sTNFR1 e sTNFR2 em indivíduos expostos à sílica e suas relações com a gravidade radiológica e duração da exposição à poeira de sílica. O estudo incluiu 57 SES, garimpeiros e lapidários de quartzo, sendo que 36 indivíduos tinham diagnóstico de silicose. O GC foi constituído por 22 indivíduos da cidade de Diamantina, Minas Gerais, sem história de exposição à sílica, pareados pela idade e pela história de tabagismo.

4.2 RADIOGRAFIA DE TÓRAX

O diagnóstico e a gravidade da silicose foram baseados na avaliação clínica e radiológica. Os exames radiológicos foram avaliados independentemente por três médicos qualificados de acordo com a classificação da OIT. Os expostos à sílica foram classificados em 4 categorias principais de acordo com a profusão radiológica: 0, 1, 2 ou 3 e de acordo com a ausência ou tamanho de grandes opacidades: 0, A, B ou C (*International Labour Office*, 2011). A mediana das três leituras foi utilizada no estudo.

4.3 PREPARO DO PLASMA

Foram coletados 10 ml de sangue periférico dos participantes, no dia da consulta médica, em tubo contendo heparina sódica, por um profissional qualificado, para análise dos biomarcadores mencionados. Os tubos foram codificados, as amostras foram centrifugadas e em seguida, o plasma foi separado e armazenado em *Eppendorfs* estéreis e estocado em freezer a -70°C .

4.4 ANÁLISE DOS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS

Para análise das quimiocinas as amostras foram descongeladas e o excesso de proteínas foi removido por precipitação de ácido e sal. Resumidamente, um volume de plasma e 1,2% ácido trifluoroacético/ 1.35M de NaCl foi misturado e deixado à temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm e os sobrenadantes foram ajustados para teor de sal (0,14 M cloreto de sódio e 0,01M de fosfato de sódio) e pH (7,4), para determinação da concentração de quimiocina pelo método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

Para análise das citocinas e dos receptores solúveis as amostras foram descongeladas e posteriormente, foram mensuradas pelo ELISA. A leitura da intensidade de marcação foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 490 nm (SOFTmaxPro – versão 2.2.1). Todas as amostras foram ensaiadas em duplicata. Os limites de detecção para estes ensaios foram de 10 pg/ml para CCL2, CCL3, CCL11, CCL24, sTNFR1 e sTNFR2 e 5 pg/ml para TNF- α .

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov para análise de normalidade dos dados. Para a comparação entre as concentrações plasmáticas dos biomarcadores inflamatórios entre os

grupos foi utilizado o teste t para as análises paramétricas e o teste Mann-Whitney para as não paramétricas. Para comparação de variáveis categóricas foi realizado o teste qui-quadrado. Para a comparação das concentrações dos biomarcadores inflamatórios entre os SES que desenvolveram a silicose, os que não desenvolveram a doença e os controles, foi realizado o teste Kruskal-Wallis. Foi utilizada a correlação de Spearman para as variáveis tempo de exposição, gravidade radiológica e os biomarcadores. A Curva ROC é uma ferramenta poderosa para medir e especificar problemas no desempenho do diagnóstico em medicina por permitir estudar a variação da sensibilidade e especificidade para diferentes valores de corte. A curva ROC foi utilizada para analisar a sensibilidade dos biomarcadores inflamatórios na discriminação entre controles e pacientes com silicose. Na análise ROC, uma área abaixo da curva de 1.0 indica discriminação perfeita, enquanto a área de 0.5 indica que o teste discrimina ao acaso, não apresentando sensibilidade adequada na discriminação entre os grupos. Com o objetivo de verificar se os biomarcadores sTNFR1 e sTNFR2 estavam associados com a gravidade radiológica, considerando o grau 0 como referência, foi realizada regressão logística multinomial univariada. A regressão logística multinomial univariada é um modelo de análise que generaliza a regressão logística permitindo variáveis dependentes com mais de dois resultados discretos. Assim, buscou-se verificar se os biomarcadores estavam associados com a profusão radiológica graus 3, 2 e 1, em comparação com o grau 0, considerando o *Odds Ratio* e o intervalo de confiança. O intervalo de confiança utilizado foi de 95% ($p < 0,05$). Para a análise estatística usaram-se os *softwares* SPSS versão 20.0 para Windows e GraphPad Prism versão 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO DO PRIMEIRO ESTUDO

5.1 SUJEITOS

O grupo SES apresentou a média da idade de 35,44 anos ($\pm 11,79$ anos) e o GC de 37 anos ($\pm 5,39$ anos). O grupo SES incluiu 38 lapidários, 10 garimpeiros e 9 indivíduos que exerceram as duas funções. Após a estratificação dos SES, 36 tinham silicose e 21 não tinham silicose. A duração da exposição e o tempo de afastamento da exposição foram significativamente maiores no grupo com silicose comparados com aqueles sem silicose ($p = 0,002$ e $p = 0,02$, respectivamente). Não foram observadas diferenças de tabagismo entre os três grupos ($p = 0,341$). A gravidade radiológica e as características gerais dos sujeitos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Características gerais dos sujeitos do primeiro estudo.

Grupos	GC (n=22)	SES sem silicose (n=21)	SES com silicose (n=36)	<i>p</i>
Tempo de exposição (anos)*	-	10,59 (6.15)	16,80 (7.15)	0.002 ^a
Tempo de afastamento (anos)*	-	0.66 (1.59)	2.32 (4.04)	0.02 ^b
n° de ativos [#]	-	17	18	
n° de inativos [#]	-	4	18	0.02 ^c
Tabagismo				
nunca fumou [#]	17	13	23	
ex tabagista [#]	0	3	5	
tabagista [#]	5	5	8	0.988 ^c
anos-maço*	2.65(6.52)	4.14(6.11)	4.31(8.62)	0.341 ^c
Profusão radiológica				
categoria 0 [#]	-	21	-	
categoria 1 [#]	-	-	13	
categoria 2 [#]	-	-	7	
categoria 3 [#]	-	-	16	0.0001 ^c
Grandes opacidades				
Ausente	-	21	22	-
A	-	-	1	-
B	-	-	10	-
C	-	-	3	-

*valor médio, [#] valor absoluto, a: Teste *t Student*, b: *Mann-Whitney Test*, c: Teste qui-quadrado.

5.2 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DOS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS

Primeiramente comparamos as concentrações dos biomarcadores inflamatórios entre os SES e o GC. As concentrações de CCL3 ($p = 0,007$), CCL24 ($p = 0,005$), sTNFR1 ($p = 0,0001$) e sTNFR2 ($p = 0,0001$) foram maiores em SES que no GC. Não foi verificada diferenças nas concentrações de CCL2 ($p = 0,97$), CCL11 ($p = 0,22$) ou TNF- α ($p = 0,25$) entre os dois grupos (dados não apresentados).

Quando os SES com ou sem silicose foram considerados separadamente, as concentrações plasmáticas de CCL3 ($p < 0,05$), CCL24 ($p = 0,001$), sTNFR1 ($p = 0,001$) e sTNFR2 ($p = 0,001$), foram superiores nos SES com silicose em relação ao GC. As concentrações de sTNFR1 ($p = 0,001$) e sTNFR2 ($p = 0,037$), mas não CCL3 ou CCL24, diferiu entre os SES sem silicose e o GC. Além disso, as concentrações de sTNFR2 foi maior nos pacientes com silicose comparados aos sem silicose (Figura 1).

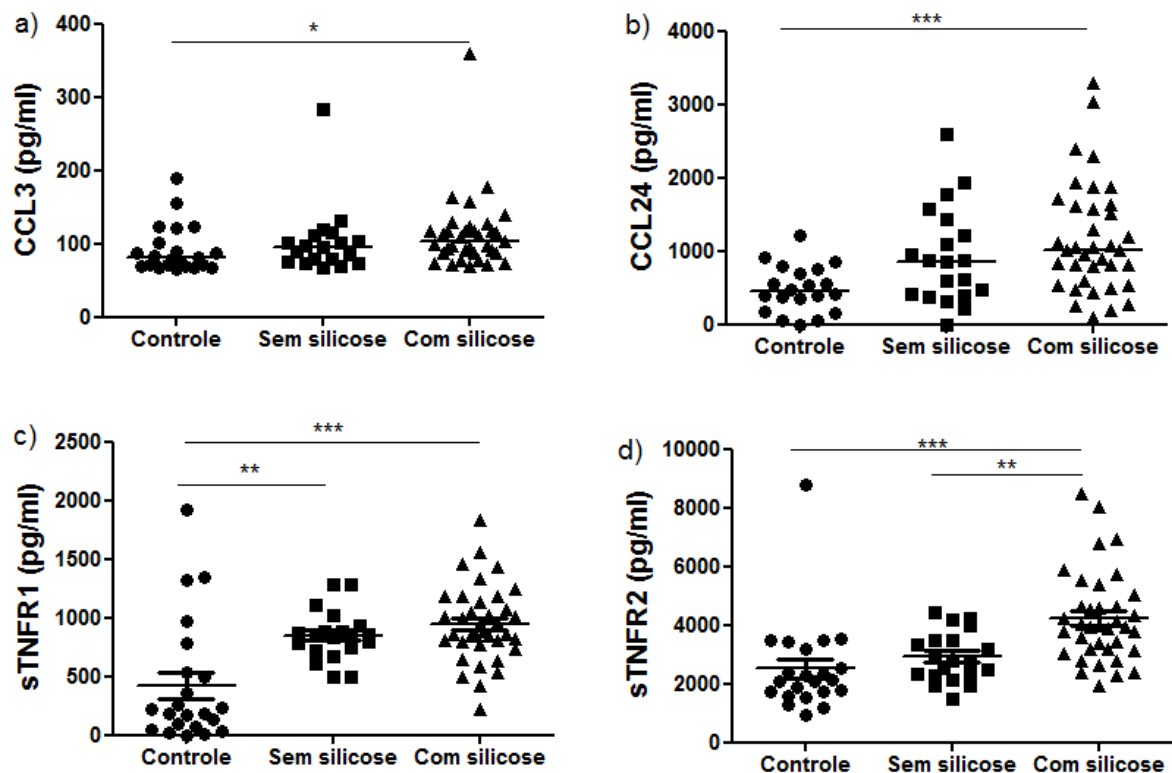


Figura 2- Concentrações plasmáticas de CCL3 (a), CCL24 (b), sTNFR1 (c) e sTNFR2 (d) (em pg/ml) apresentadas pelos grupos controle, SES sem silicose e SES com silicose. As linhas horizontais representam a mediana (*Kruskal-Wallis Test* e *Mann-Whitney Test*). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.3 ANÁLISE DA RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC (ROC) PARA AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE sTNFR1 E sTNFR2

Curvas ROC foram plotadas para investigar a sensibilidade de CCL3, CCL24, sTNFR1 e sTNFR2 em discriminar sujeitos com silicose. Os valores da área abaixo das curvas ROC dos biomarcadores avaliados comparando os SES com silicose e o GC foram 0,727 para CCL3 (IC 95% 0,584-0,870, $p = 0,004$), 0,735 para CCL24 (IC 95% 0,596-0,874, $p = 0,003$), 0,829 para sTNFR1 (IC 95% 0,692-0,966, $p < 0,001$) (Figura 2a) e 0,872 para sTNFR2 (IC 95% 0,768-0,977, $p < 0,001$) (Figura 2b), indicando boa sensibilidade para sTNFR1 e sTNFR2. No entanto, os valores obtidos para CCL3 e CCL24 indicaram baixa sensibilidade para discriminar os grupos já que o limite inferior do intervalo de confiança foi próximo de 0,5, então optou-se por explorar mais detalhadamente neste estudo, os dados de sTNFR1 e sTNFR2.

Quando se comparou os SES com e sem silicose, o valor da área abaixo da curva ROC foi de 0,615 para sTNFR1 (IC 95% 0,467-0,763, $p = 0,150$), não mostrando precisão importante na discriminação entre os dois grupos (dados não mostrados), e 0,791 para sTNFR2 (IC 95% 0,672-0,910, $p < 0,000$) (Figura 2c), o que indica que este receptor discrimina bem os dois grupos.

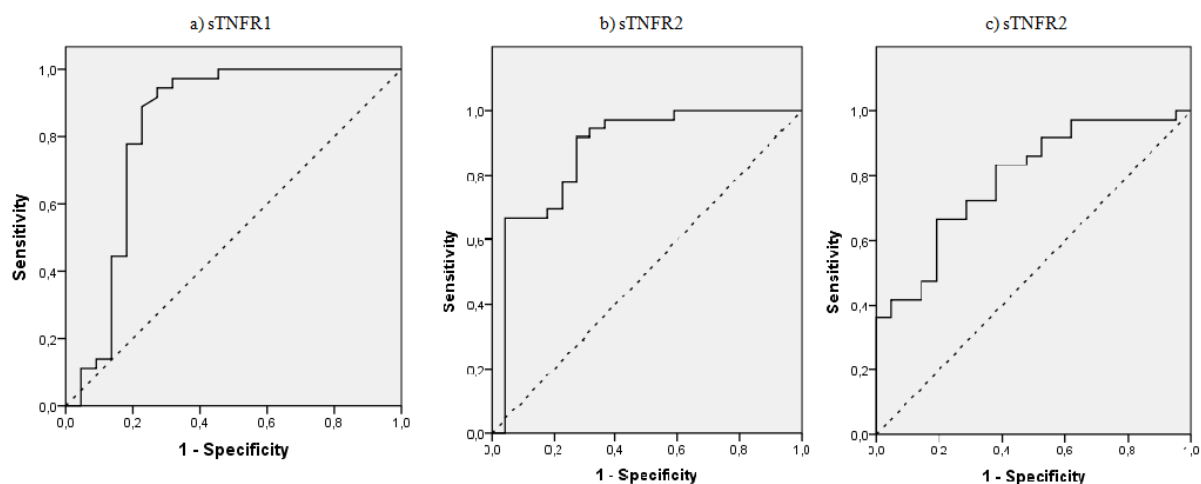


Figura 3- Curva ROC da concentração plasmática de sTNFR1 (a) e sTNFR2 (b) para os sujeitos com silicose e o grupo controle e sTNFR2 (c) para os sujeitos com e sem silicose.

5.4 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO

Foram encontradas correlações positivas significativas entre sTNFR1 ($r = 0,281$, $p = 0,03$), sTNFR2 ($r = 0,432$, $p = 0,001$) e o tempo de exposição e entre sTNFR1 ($r = 0,337$, $p = 0,01$), sTNFR2 ($r = 0,491$, $p < 0,0001$) e a gravidade radiológica. Além disso, houve correlação positiva significativa entre o tempo de exposição e a gravidade radiológica ($r = 0,439$, $p = 0,001$).

5.5 REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTINOMIAL UNIVARIADA DOS RECEPTORES SOLÚVEIS DE TNF- α E A PROFUSÃO RADIOLÓGICA

Foi realizada a regressão logística multinomial univariada com sTNFR1 e sTNFR2 como variáveis independentes e profusão radiológica como variável dependente. Os resultados indicam que sTNFR1 foi associado ($p = 0,031$) ao grau 3 da profusão radiológica comparado ao grau 0 (OR = 1,003). Nas outras categorias, sTNFR1 não foi associado ($p = 0,875$ e $p = 0,347$, nos graus 1 e 2, respectivamente). A tabela 2 mostra que sTNFR2 foi associado aos graus 1 ($p = 0,006$), 2 ($p = 0,003$) e 3 ($p = 0,003$) em comparação com o grau 0.

Tabela 2- Regressão logística multinomial, considerando sTNFR2 como variável independente e profusão radiológica como variável dependente.

	<i>P</i>	OR	IC
Categoria 1			
sTNFR2	0.006	1.001	1.000-1.002
Categoria 2			
sTNFR2	0.003	1.001	1.000-1.002
Categoria 3			
sTNFR2	0.003	1.001	1.000-1.002

Categoria 0 foi considerada referência. OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança.

Os principais resultados deste estudo podem ser assim resumidos: 1) as concentrações plasmáticas das quimiocinas CCL3 e CCL24 e dos receptores solúveis sTNFR1 e sTNFR2 estão aumentados em indivíduos expostos à sílica em comparação com controles saudáveis; 2) apenas os receptores solúveis estavam elevados antes do desenvolvimento da silicose, sendo

capazes de discriminar o grupo exposto do controle, o que foi confirmado pela análise da curva ROC; 3) em indivíduos expostos à sílica, sTNFR2 foi sensível em discriminar a presença e ausência de silicose; 4) Além disso, as concentrações de sTNFR2 foram associadas à todas as categorias da gravidade radiológica.

As concentrações plasmáticas de citocinas têm sido investigadas em trabalhadores expostos à sílica com e sem silicose. Por exemplo, a concentração de IFN- γ pode aumentar inicialmente em resposta a sílica e que os baixos níveis de IFN- γ em fases posteriores podem ser considerados fator de risco para a silicose (Polatli et al., 2008). Além disso, a exposição à sílica foi associada a maiores níveis de óxido nítrico alveolar e da citocina plasmática IL-6 e adipocinas (adipsina, adiponectina e resistina) em trabalhadores expostos (Sauni et al., 2012).

Um estudo experimental mostrou que, em resposta à inalação de sílica, há um período inicial de controle da inflamação e lesão tecidual sem fibrose, seguido por um período de aumento na inflamação e nos danos teciduais durante o qual a fibrose se desenvolve (Porter et al., 2002). Outro estudo em pacientes com silicose e indivíduos saudáveis expostos à poeira de sílica mostrou que os níveis séricos elevados de TNF- α estão associados com a exposição às partículas de sílica (Slavov et al., 2010).

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas que recrutam grupos específicos de leucócitos, e estão envolvidos em muitos processos inflamatórios e doenças pulmonares crônicas (Driscoll, 1994; Charo & Ransohoff, 2006; Kohan et al., 2010). A quimiocina CCL3 é quimioatraente para monócitos e linfócitos e medeia a defesa pulmonar em modelos animais de inflamação pulmonar na silicose. Estudos em seres humanos indicam que CCL3 contribui para a resposta celular inflamatória associada à fibrose pulmonar idiopática (Driscoll, 1994). Um estudo prévio revelou que a administração preventiva ou terapêutica de evasina-1, uma proteína de ligação de CCL3, reduziu a inflamação pulmonar e fibrose induzida por bleomicina em ratos (Russo et al., 2011). Além disso, os níveis séricos de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL4/MIP-1 β e suas produções espontâneas por PBMCs estavam significativamente elevados em pacientes com esclerose sistêmica, uma doença do tecido conjuntivo caracterizada por fibrose e alterações vasculares na pele e outros órgãos viscerais em comparação com controles normais. Os níveis séricos elevados de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α estavam significativamente correlacionados com a presença de fibrose pulmonar (Hasegawa et al., 1999). Assim como em outros estudos com doenças pulmonares que causam fibrose, nós observamos que os níveis plasmáticos de CCL3 estavam significativamente maiores no SES com silicose em comparação com o GC.

CCL24/eotaxina-2 e CCL26/eotaxina-3 pró-fibrogênicas têm efeitos diferentes sobre os fibroblastos de pulmão humanos. Por conseguinte, estas quimiocinas CC podem contribuir para a remodelação das vias aéreas na asma (Kohan et al., 2010). No presente estudo, a concentração de CCL24 foi significativamente maior no plasma de SES com silicose em relação ao GC, sugerindo que CCL24 desempenha um papel na patogênese dessa doença pulmonar. É importante salientar, que algumas doenças, tais como a asma, estão associados com o aumento dos níveis plasmáticos de CCL24 (Min et al., 2005), o que reforça a idéia de que esta quimiocina não é específica para a silicose, mas sim um marcador inflamatório.

Lee e cols. (2010) mostraram que os níveis elevados de IL-8 estão associados com a presença de pneumoconiose dos mineiros de carvão, e que as concentrações de TNF- α estão associadas com a progressão radiológica da doença. No entanto, outro estudo relatou uma associação entre o TNF- α e exposição à sílica e que a elevação de ambos TNF- α e IL-12p40 estava associada com o desenvolvimento e a gravidade da doença em mineiros (Lee et al., 2010). Nós não encontramos alteração nos níveis plasmáticos de TNF- α , embora tenha sido demonstrado que ele desempenha um papel-chave na silicose. Este achado pode estar relacionado com a instabilidade desta citocina, que tem uma meia-vida curta que pode variar ao longo do dia (Penninx et al., 2004). Vale ressaltar que TNF- α parece ser menos estável que seus receptores solúveis (Kronfol & Remick, 2000).

Estudos experimentais têm sugerido que os potenciais tóxicos e fibrogênicos da poeira de sílica de várias fontes são diferentes (Donaldson & Borm, 1998; Bruch et al., 2004). Poucos estudos avaliaram as concentrações de sTNFR1 e sTNFR2 em mineiros de carvão com pneumoconiose (Schins & Borm, 1995; Zhai et al., 2002). Até o presente momento, nenhum outro estudo investigou essas moléculas no plasma de garimpeiros e lapidários com e sem silicose. Neste estudo encontramos concentrações elevadas de sTNFR1 e sTNFR2 no plasma de SES com e sem silicose em relação ao GC. Similarmente, outro estudo relatou concentrações mais elevadas de sTNFR2 em indivíduos com a pneumoconiose dos mineiros de carvão em comparação com os controles não expostos e de sTNFR1 em mineiros comparados com os sujeitos de referência (Schins & Borm, 1995). Também foi encontrado que, as concentrações séricas médias de sTNFR1, sTNFR2 e IL-6 estavam significativamente maiores em mineiros com pneumoconiose do carvão do que em controles (Zhai et al., 2002). Além disso, no presente estudo, sTNFR2 estava aumentado nos SES com silicose comparado aos SES sem silicose. Um estudo anterior relatou associação entre as concentrações de sTNFR1 e sTNFR2 e a presença de pneumoconiose do carvão (Zhai et al., 2002). Na análise da curva ROC, a medida de sTNFR1 e sTNFR2 foi significativamente sensível para

discriminar sujeitos com silicose. Mostramos que sTNFR2 está associado significativamente à todas as categorias da gravidade radiológica da doença. Zhai e cols. (2002) demonstraram que a gravidade radiológica da pneumoconiose dos mineiros de carvão (pelos critérios OIT) estava significativamente correlacionado com as concentrações séricas de sTNFR1 e TNFR2.

6 DESENHO DO SEGUNDO ESTUDO

Os voluntários com história de exposição à sílica foram submetidos à propedêutica usual do SEST para investigação de pneumoconioses que incluiu: anamnese clínica e ocupacional e radiografia do tórax nos padrões da Organização Internacional do Trabalho (OIT) (*International Labour Office*, 2011). Além disso, alguns voluntários realizaram a espirometria completa ou a miniespirometria para análise do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1).

Em seguida, esses sujeitos foram avaliados por um único pesquisador previamente treinado, sendo coletados os seguintes dados: características antropométricas [idade, índice de massa corporal (IMC) e relação cintura-quadril (RCQ)], história de tabagismo (nunca fumou, ex-tabagista ou tabagista atual) e tempo de exposição e de afastamento da poeira de sílica. Além disso, foi realizada a coleta da amostra de sangue periférico e aplicados o questionário SGRQ e a escala de dispneia MRC. Em seguida, o voluntário realizou o TC6. Foram investigadas as concentrações plasmáticas de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , sTNFR1 e sTNFR2, de 30 SES, garimpeiros e lapidários de quartzo, sendo 23 indivíduos silicóticos e 7 sem silicose. O GC foi composto por 24 homens saudáveis da comunidade e não expostos à sílica pareados pela idade e pela história de tabagismo. Nesta fase compararam-se as concentrações plasmáticas dos biomarcadores supracitados entre os grupos e também foram avaliadas, a função pulmonar, o grau de dispneia, a capacidade funcional e a qualidade de vida dos voluntários.

6.1 RADIOGRAFIA DE TÓRAX

O diagnóstico e a gravidade da silicose foram baseados na avaliação clínica e radiológica. Os exames radiológicos foram avaliados independentemente por três leitores qualificados de acordo com a classificação da OIT. Os expostos à sílica foram classificados em 4 categorias principais de acordo com a profusão radiológica: 0, 1, 2 ou 3 e de acordo com a ausência ou tamanho de grandes opacidades: 0, A, B ou C (*International Labour Office*, 2011). A mediana das três leituras foi utilizada no estudo.

6.2 FUNÇÃO PULMONAR

A função pulmonar foi avaliada através da espirometria realizada no laboratório de Função Pulmonar do Hospital das Clínicas da UFMG, e interpretada de acordo com o I Consenso Brasileiro de Espirometria (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia,

2002). Para os voluntários que não realizaram espirometria completa foi realizada a miniespirometria com miniespirômetro da marca *Vitalograph*, modelo COPD-6, para análise no VEF₁. O miniespirômetro é um equipamento desenvolvido com o objetivo de se realizar os testes básicos da espirometria em diversos ambientes. É um equipamento com sensor de fluxo, que possibilita conhecer valores da capacidade vital forçada (CVF), volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁) e pico de fluxo expiratório (PFE) (Bastian et al., 2002).

6.3 QUALIDADE DE VIDA RELACIONADA À RESPIRAÇÃO

A qualidade de vida relacionada à respiração foi avaliada pelo *Saint George's Respiratory Questionnaire* (SGRQ), um instrumento validado no Brasil para a DPOC, e já validado para outras doenças respiratórias em outros países, como bronquiectasia, asma e doença intersticial pulmonar (Chang et al., 1999; Camelier et al., 2006; Liu et al., 2011). Contêm 7 seções divididas em 3 domínios: sintomas, atividade e impacto na função social e emocional. Um score total é calculado, o qual resume o impacto da doença no status da saúde. Cada score varia de 0 a 100, sendo 0 o melhor status em saúde e 100, o pior (Souza et al., 2000). Devido a pouca escolaridade de alguns voluntários, o questionário foi aplicado em forma de entrevista pelo mesmo pesquisador treinado e experiente que registrou todas as respostas fornecidas pelos pacientes. Todos os voluntários foram entrevistados numa sala individualmente.

6.4 DISPNEIA

A dispneia foi analisada para escala do *Medical Research Council* (MRC) que avalia a limitação imposta pela dispneia nas atividades de vida diária. Foi validada no Brasil em pacientes com DPOC por Kovelis e cols. em 2008. É de fácil aplicação e compreensão e é composta por apenas cinco itens, sendo que o paciente escolhe o item que corresponde a quanto a dispneia limita suas AVD. O paciente relata seu grau subjetivo de dispneia escolhendo um valor entre 1 e 5, sendo 1 (só sofre de falta de ar durante exercícios intensos), 2 (sofre de falta de ar quando andando apressadamente ou subindo uma rampa leve), 3 (anda mais devagar do que pessoas da mesma idade por causa de falta de ar ou tem que parar para respirar mesmo quando andando devagar), 4 (para para respirar depois de andar menos de 100 metros ou após alguns minutos) e 5 (sente tanta falta de ar que não sai mais de casa, ou sente falta de ar quando está se vestindo) (Kovelis et al., 2008).

6.5 CAPACIDADE FUNCIONAL SUBMÁXIMA

A capacidade funcional submáxima foi avaliada pelo Teste de Caminhada de Seis Minutos (TC6) que mensura a distância que o paciente pode caminhar rapidamente numa superfície plana, num período de seis minutos. Como a maioria das AVD é realizada em níveis submáximos de esforço, o TC6 pode refletir bem o nível de exercício funcional para as atividades físicas diárias.

O teste foi realizado no grupo de sujeitos expostos à sílica num corredor de 25 metros, livre de obstáculos, após 10 minutos de repouso sentado. Antes da sua execução, o voluntário foi informado sobre a forma de execução do teste de acordo com as normas da *American Thoracic Society* (American Thoracic Society, 2002). Antes e após o teste foram coletados os seguintes dados: pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC), taxa de dispneia basal e fadiga geral utilizando a escala de Borg e saturação de oxigênio pela oximetria de pulso. Após 30 minutos de repouso, o teste foi realizado novamente e foram utilizados os dados do teste com a maior distância percorrida.

6.6 PREPARO DO PLASMA

Foram coletados 10 ml de sangue periférico dos participantes em tubo contendo heparina sódica, por um profissional qualificado, para análise dos biomarcadores mencionados. As amostras foram centrifugadas e em seguida, o plasma foi separado e armazenado em *Eppendorfs* estéreis e estocado em freezer a -70°C .

6.7 ANÁLISE DAS CITOCINAS E DOS RECEPTORES SOLÚVEIS DO TNF-A

Para análise das citocinas e dos receptores solúveis as amostras foram descongeladas e posteriormente, foram mensuradas usando a técnica ELISA. A leitura da intensidade de marcação foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 490 nm (SOFTmaxPro – versão 2.2.1). Todas as amostras foram ensaiadas em duplicata. Os limites de detecção para estes ensaios foram de 10 pg/ml para IL-1 β , IL-6, IL-10, sTNFR1, sTNFR2 e 5 pg/ml para TNF- α .

6.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados os testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para análise de normalidade dos dados. Para a comparação entre as concentrações plasmáticas das citocinas e dos receptores solúveis do TNF- α entre os dois grupos foi utilizado o teste t para as análises paramétricas e o teste de Mann-Whitney para as não paramétricas. Para a comparação das concentrações das citocinas e dos receptores solúveis do TNF- α entre os três grupos foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Foi utilizada a correlação de Spearman para as variáveis, gravidade radiológica, biomarcadores, distância percorrida no TC6, valor de VEF₁, resultado do SGRQ e escala MRC. O intervalo de confiança utilizado foi de 95% ($p < 0.05$). Para a análise estatística usaram-se os *softwares* SPSS versão 20.0 para Windows e GraphPad Prism versão 5.0.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO DO SEGUNDO ESTUDO

7.1 SUJEITOS

O grupo SES apresentou a média da idade de 44,23 anos ($\pm 10,39$ anos), e o GC apresentou a média da idade de 40,42 anos ($\pm 5,72$ anos) ($p = 0,177$). O grupo SES foi composto por 15 lapidários, 13 garimpeiros e 2 trabalhadores que desempenharam as duas profissões. Após a estratificação dos SES, foram encontrados 23 pacientes silicóticos e 07 sem silicose. Não foi observada diferença de história de tabagismo (anos-maço) entre os três grupos ($p = 0,375$). As características gerais dos sujeitos com e sem silicose estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3- Características gerais dos sujeitos expostos à sílica, com e sem silicose, do segundo estudo.

Grupos	SES com silicose	SES sem silicose	P
Tempo de exposição (anos)*	17,30 ($\pm 7,11$)	20,57 ($\pm 13,07$)	0,96 ^b
Tempo de afastamento (anos)*	6,01 ($\pm 5,31$)	4,14 ($\pm 7,35$)	0,11 ^b
Idade*	43,47 ($\pm 9,72$)	46,71 ($\pm 12,85$)	0,48 ^a
IMC*	23,82 ($\pm 3,77$)	26,42 ($\pm 7,29$)	0,44 ^b
RCQ*	0,85 ($\pm 0,20$)	0,94 ($\pm 0,09$)	0,56 ^b
Profusão radiológica			
categoria 0 [#]	-	7	-
categoria 1 [#]	10	-	-
categoria 2 [#]	4	-	-
categoria 3 [#]	9	-	-
VEF₁ (litros)*	2,62 ($\pm 0,97$)	3,23 ($\pm 0,32$)	<u>0,027</u> ^a
Distância TC6 (metros)*	496,06 ($\pm 128,01$)	533,85 ($\pm 150,99$)	0,21 ^b
SGHQ[°]			
Sintomas	32,5 ($\pm 22,56$)	16,14 ($\pm 10,94$)	0,07 ^a
Atividade	48,22 ($\pm 27,23$)	38,14 ($\pm 34,32$)	0,42 ^a
Impacto	35,52 ($\pm 25,02$)	12,57 ($\pm 15,18$)	<u>0,02</u> ^b
Total	38,83 ($\pm 23,38$)	20,95 ($\pm 18,40$)	0,07 ^a
MRC*	1,83 ($\pm 1,30$)	1,28 ($\pm 0,75$)	0,46 ^b

*valor médio, [#]valor absoluto, \pm desvio padrão, ° porcentagem; ^a Student's T Test; ^b Mann-Whitney Test.

7.2 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DAS CITOCINAS E DOS RECEPTORES SOLÚVEIS DE TNF- α

Inicialmente foram comparadas as concentrações plasmáticas das citocinas e dos receptores solúveis do TNF- α dos SES e do GC e observou-se diferença significativa nas concentrações plasmáticas de IL-6 ($p = 0,0008$) (Figura 3a). Não houve diferença estatística entre os dois grupos nas concentrações plasmáticas de IL-1 β ($p = 0,752$), IL-10 ($p = 0,554$), TNF- α ($p = 0,073$), sTNFR1 ($p = 0,210$) e sTNFR2 ($p = 0,118$).

Posteriormente, o grupo SES foi estratificado em SES com silicose e SES sem silicose. Assim, fez-se a comparação entre os três grupos e houve diferença significativa da concentração de IL-6 ($p = 0,0032$) (Figura 3b). No entanto, não houve diferença nas concentrações plasmáticas de IL-1 β ($p = 0,950$), IL-10 ($p = 0,216$), TNF- α ($p = 0,074$), sTNFR1 ($p = 0,405$) e sTNFR2 ($p = 0,625$).

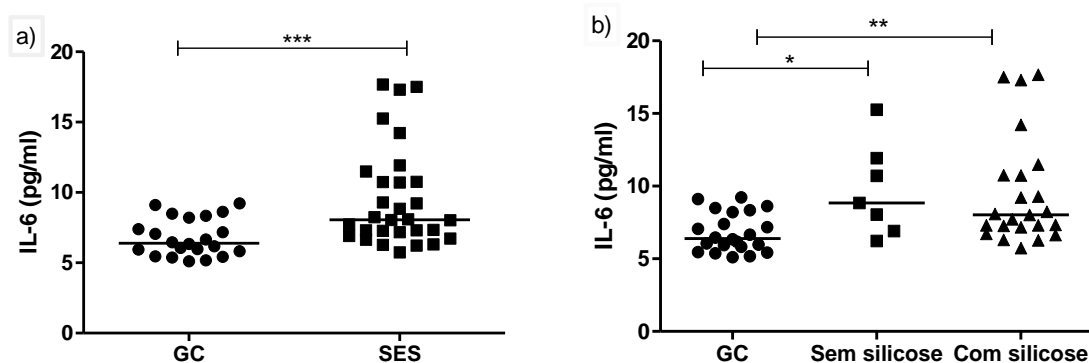


Figura 4- Concentração plasmática de IL-6 do GC e dos SES (a) e do GC, do grupo SES sem silicose e do grupo SES com silicose (b). As linhas horizontais representam a média.

a) *Student's t Test*; b) *Kruskal-Wallis Test*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Quando os SES com e sem silicose foram considerados separadamente, não houve diferença significativa nas concentrações plasmáticas de IL-1 β ($p = 0,595$), IL-10 ($p = 0,100$), TNF- α ($p = 0,148$), sTNFR1 ($p = 0,789$) e sTNFR2 ($p = 0,771$).

7.3 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO

Para as análises de correlação, o grupo SES foi estratificado nas 4 categorias da profusão radiológica: 0 ($n = 7$), 1 ($n = 10$), 2 ($n = 4$) e 3 ($n = 9$). Observou-se correlação positiva entre a gravidade radiológica e o escore total do SGRQ ($r = 0,459$; $p = 0,01$), ou seja, quanto mais grave radiologicamente maior o impacto da doença na qualidade de vida do

indivíduo. Houve correlação negativa entre as 4 categorias e o VEF_1 ($r = -0,544$; $p = 0,002$), ou seja, quanto mais grave radiologicamente, pior é a função pulmonar. No entanto, não houve correlação entre as 4 categorias de profusão radiológica e as citocinas e os receptores solúveis do $TNF-\alpha$: $IL-1\beta$ ($r = 0,055$; $p = 0,773$), $IL-6$ ($r = 0,174$; $p = 0,358$), $IL-10$ ($r = -0,304$; $p = 0,102$), $TNF-\alpha$ ($r = -0,029$; $p = 0,880$), $sTNFR1$ ($r = 0,083$; $p = 0,663$) e $sTNFR2$ ($r = 0,029$; $p = 0,879$); a distância percorrida no TC6 ($r = -0,327$; $p = 0,078$) e a escala MRC ($r = 0,298$; $p = 0,110$).

Fez-se análise de correlação entre as citocinas e os receptores solúveis do $TNF-\alpha$, e as variáveis funcionais e a qualidade de vida. Foi encontrada correlação negativa entre $sTNFR1$ e a distância percorrida no TC6 ($r = -0,405$; $p = 0,027$) e entre $IL-10$ e o escore total no SGRQ ($r = -0,373$; $p = 0,042$) (quanto menor a concentração de $IL-10$, maior a pontuação no SGRQ). No entanto, $IL-10$ correlacionou-se positivamente com a distância percorrida no TC6 ($r = 0,422$; $p = 0,02$) e com o VEF_1 ($r = 0,396$; $p = 0,030$).

Não houve correlação entre os demais biomarcadores e as variáveis funcionais. Os resultados da correlação entre a distância percorrida no TC6 e os biomarcadores foram: $IL-1\beta$ ($r = -0,005$; $p = 0,980$), $IL-6$ ($r = -0,037$; $p = 0,847$), $TNF-\alpha$ ($r = 0,270$; $p = 0,149$) e $sTNFR2$ ($r = -0,196$; $p = 0,300$).

Os resultados da correlação entre a escala de dispneia MRC e os biomarcadores foram: $IL-1\beta$ ($r = -0,135$; $p = 0,475$), $IL-6$ ($r = 0,261$; $p = 0,164$), $IL-10$ ($r = -0,057$; $p = 0,765$), $TNF-\alpha$ ($r = -0,177$; $p = 0,350$), $sTNFR1$ ($r = 0,308$; $p = 0,098$) e $sTNFR2$ ($r = 0,274$; $p = 0,142$).

Os resultados da correlação entre o escore total no SGRQ e os biomarcadores foram: $IL-1\beta$ ($r = -0,010$; $p = 0,960$), $IL-6$ ($r = 0,248$; $p = 0,187$), $TNF-\alpha$ ($r = -0,349$; $p = 0,058$), $sTNFR1$ ($r = 0,224$; $p = 0,234$) e $sTNFR2$ ($r = 0,138$; $p = 0,466$).

Os resultados da correlação entre VEF_1 e os biomarcadores foram: $IL-1\beta$ ($r = -0,109$; $p = 0,568$), $IL-6$ ($r = -0,319$; $p = 0,086$), $TNF-\alpha$ ($r = 0,299$; $p = 0,109$), $sTNFR1$ ($r = -0,049$; $p = 0,799$) e $sTNFR2$ ($r = -0,120$; $p = 0,529$).

Os principais achados do segundo momento do estudo podem ser resumidos em: 1) $IL-6$ estava aumentada em trabalhadores expostos à poeira de sílica comparada ao GC; 2) as concentrações plasmáticas de $IL-6$ estavam elevadas nos pacientes com e sem silicose comparados ao GC; 3) houve correlação positiva entre a gravidade radiológica e o escore total

do SGRQ; 4) houve correlação negativa entre a gravidade radiológica e o VEF₁; 5) observou-se correlação negativa entre a concentração plasmática de sTNFR1 e a distância percorrida no TC6; 6) IL-10 correlacionou-se negativamente com o escore total no SGRQ; 7) IL-10 correlacionou-se positivamente com a distância percorrida no TC6 e com o VEF₁.

Diversas citocinas tem sido relacionados à fisiopatogenia da silicose. Alguns estudos relatam que as concentrações plasmáticas de alguns biomarcadores inflamatórios estão aumentados em indivíduos expostos à poeira de sílica cristalina livre (Zhai et al., 2002; Sauni et al., 2012). A IL-6 é uma citocina inflamatória, que tem sido associada à silicose. No estudo de Ulker e cols. (2008) observou-se que as concentrações plasmáticas e do lavado broncoalveolar, de IL-6, IL-1 β e TNF- α estão elevados em pacientes com pneumoconiose, sendo maior nos pacientes com fibrose maciça progressiva. Sauni e cols. (2012) encontraram elevadas concentrações plasmáticas de IL-6 em trabalhadores da construção civil expostos à sílica. Em nosso estudo, encontramos concentrações plasmáticas elevadas de IL-6 em garimpeiros e lapidários de quartzo que foram expostos à poeira de sílica e que tinham silicose.

No presente trabalho, a qualidade de vida de pacientes com silicose foi avaliada pelo SGRQ e o domínio “atividade” obteve maior pontuação (48,22% \pm 27,23%), indicando que as atividades de vida diária, como higiene pessoal, trabalhos domésticos e atividades físicas causam ou são mais afetadas pela dispneia. Além disso, observamos que os pacientes mais graves radiologicamente apresentaram maior escore total (38,83% \pm 23,38%) no SGRQ, ou seja, esses indivíduos sofrem maior impacto na qualidade de vida. Liu e cols. (2011) observaram que chineses com silicose apresentam moderada qualidade de vida relacionada à respiração, de acordo com o escore total do SGRQ, e também obtiveram maior pontuação no domínio “atividade”.

A silicose é uma doença caracterizada pela presença de opacidade nodular pulmonar na radiografia de tórax, e na sua forma crônica as opacidades predominam nas zonas pulmonares superiores. É uma doença que causa dispneia e distúrbio obstrutivo, restritivo ou misto na ventilação, (Leung et al., 2012). Hnizdo (1992) atribuiu a perda de 10 ml de VEF₁ por ano em mineradores de ouro expostos à poeira de sílica. Em nosso estudo observamos que os pacientes mais graves apresentam menor VEF₁, ou seja, pior função pulmonar.

O teste de caminhada de seis minutos avalia a capacidade funcional do indivíduo e em nosso estudo, observamos que os sujeitos que percorreram maior distância no teste, apresentaram menor concentração plasmática de sTNFR1. Esse é o receptor solúvel de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória e relacionada à patogênese da silicose. Alguns estudos

avaliaram as concentrações de sTNFR1 e sTNFR2 em mineiros de carvão com pneumoconiose (Schins e Borm, 1995; Zhai et al., 2002). Schins e Borm (1995), encontraram elevadas concentrações de sTNFR2 em mineiros de carvão com pneumoconiose comparados aos indivíduos não expostos e, de sTNFR1, em mineiros comparados ao grupo controle. No estudo de Zhai e cols. (2002) observou-se que os níveis plasmáticos de IL-6 e dos receptores de TNF- α estão elevados em mineiros de carvão com pneumoconiose e que esses biomarcadores estão associados com o processo fibrótico da doença. Em nosso estudo, TNF- α correlacionou-se negativamente com o SGRQ, ($p = 0,058$), ou seja, quanto menor a concentração plasmática dessa citocina pró-inflamatória, melhor a qualidade de vida.

Observou-se também que a concentração plasmática de IL-10, dos trabalhadores expostos à sílica, correlaciona-se negativamente com a qualidade de vida relacionada à respiração e positivamente com a distância percorrida no TC6 e com o VEF₁. Assim, pode-se dizer que quanto maior a concentração plasmática de IL-10, maior é a capacidade funcional e função pulmonar desse indivíduo e, melhor é sua qualidade de vida. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida por uma variedade de células, incluindo monócitos e macrófagos. Ela desempenha várias funções, tais como, recrutamento de células inflamatórias no pulmão com concomitante redução de citocinas pró-inflamatórias com subsequente controle da fibrose pulmonar (Opal & DePalo, 2000; Liu et al., 2010; Liu et al., 2011).

Existem algumas limitações no presente estudo. As concentrações das citocinas, quimiocinas e receptores solúveis do TNF- α não foram avaliadas no pulmão (pelo LBA ou ar exalado condensado) e não foram feitas análises quantitativas de poeira respirável do ambiente.

8 CONCLUSÃO FINAL

Foi observado que os indivíduos expostos à poeira de sílica apresentam elevadas concentrações plasmáticas de IL-6, CCL3, CCL24, sTNFR1 e sTNFR2. Os receptores solúveis de TNF- α estão associados com a silicose e em indivíduos expostos antes mesmo das alterações radiológicas surgirem. sTNFR2 foi associado à gravidade radiológica e à exposição precoce à poeira de sílica. A qualidade de vida relacionada à respiração foi afetada negativamente pela gravidade da doença, que, por sua vez, prejudicou a função pulmonar. Elevadas concentrações plasmáticas de sTNFR1 foram relacionadas com uma menor capacidade funcional. Além disso, concentrações elevadas de IL-10, citocina anti-inflamatória, indicaram maior capacidade funcional e pulmonar e melhor qualidade de vida. Em conclusão, a exposição à poeira de sílica levou ao surgimento de indicação de inflamação sistêmica, com prejuízo da função pulmonar, da capacidade funcional e da qualidade de vida da população avaliada.

Perspectivas futuras

Seria interessante a realização de um estudo longitudinal a fim de monitorar esses sujeitos expostos à sílica com objetivo de verificar se as concentrações plasmáticas mais elevadas foram determinantes no desenvolvimento da silicose. Além disso, a comparação dos níveis plasmáticos de biomarcadores inflamatórios de pacientes com outras doenças pulmonares seria importante para tentar buscar um marcador que seja específico para a silicose.

REFERÊNCIAS

- American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati: ACGIH; 2004/2005.
- American Thoracic Society. Adverse effects of crystalline silica exposure. **Am J Respir Crit Care Med.** v.155, p.761-65, 1997.
- American Thoracic Society Statement: Guidelines for the Six-Minute Walk Test. **Am J Respir Crit Care Med.** v.166, p.111-117, 2002.
- ARAKAWA, H; FUJIMOTO, K; HONMA, K; et al. Progression from near-normal to end-stage lungs in chronic interstitial pneumonia related to silica exposure: long-term CT observations. **Am J Roentgenol.** v.191, p.1040-45, 2008.
- BARBARIN, V; XING, Z; DELOS, M; et al. Pulmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v.288, p.841-848, 2005.
- BARRETT E.G; JOHNSTON C; OBERDORSTER G; et al. Silica-induced chemokine expression in alveolar type II cells is mediated by TNF- α -induced oxidant stress. **Am. J. Physiol.** v.276, p.979-988, 1999.
- BASTIAN-LEE Y; CAVASSE R; RICHTER H; et al. Assessment of a Low-Cost Home Monitoring Spirometer for children. **Pediatr Pulmonol.** v.33, p.388-94, 2002.
- BAUER, T.T; SCHULTZE-WERNINGHAUS, G; KOLLMEIER, J; et al. Functional variables associated with the clinical grade of dyspnoea in coal miners with pneumoconiosis and mild bronchial obstruction. **Occup Environ Med.** v.58, p.794-799, 2001.
- BOIS, R.M.D; WEYCKER, D; ALBERA, C; et al. Six-minute-walk test in idiopathic pulmonary fibrosis test validation and minimal clinically important difference. **Am J Respir Crit Care Med.** v.183, p.1232-1237, 2011.
- BORM, P.J.A; SCHINS, R.P.F. Genotype and phenotype in susceptibility to coal workers pneumoconiosis. The use of cytokines in perspective. **Eur Respir J.** v.18, n.32, p.127-33, 2001.
- BRADLEY, J.R; TNF-mediated inflammatory disease. **J. Pathol.** v.214, p.149-160, 2008.
- BRUCH, J; REHN, S; REHN, B; et al. Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by the vector model. **Int. J. Hyg. Env. Health.** v.207, p.203-216, 2004.
- CAMELIER, A; ROSA, F.W; SALMI, C; et al. Avaliação da qualidade de vida pelo Questionário do Hospital Saint George na Doença Respiratória em portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica: validação de uma nova versão para o Brasil. **J Bras Pneumol.** v.32, p.114-22, 2006.

CAR B.D; MELONI F; LUISETTI M; et al. Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. **Am J Respir Crit Care Med.** v.149, p.655-659, 1994.

CARNEIRO, A.P.S; CAMPOS, L.O; GOMES, M.F.C.F; et al. Perfil de 300 trabalhadores expostos à sílica atendidos ambulatorialmente em Belo Horizonte. **J Pneumol.** v.28, p.329-34, 2002.

CARNEIRO, A.P.S; BARRETO, S.M; SIQUEIRA, A.L; et al. Continued exposure to silica after diagnosis of silicosis in Brazilian gold miners. **Am J Ind Med.** v.49, p.811-18, 2006.

CASSEL, S.L; EISENBARTH, S.C; IYER, S.S. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v.105, n.26, p.9035-40, 2008.

Censo 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/painel/painel.php?codmun=311910>.

CHANG, J.A; CURTIS, J.R; PATRICK, D.L; et al. Assessment of health-related quality of life in patients with interstitial lung disease. **Chest.** v.116, p.1175-82, 1999.

CHARO I.F; RANSOHOFF R.M; The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. **N. Engl. J. Med.** v.354, p.610-621, 2006.

CHIAVEGATTO, C.V; CARNEIRO, A.P; DIAS, E.C; et al. Diagnosis of severe silicosis in young adults working in stone polishing and mining in Minas Gerais, Brazil. **Int J Occup Environ Health.** v.16, n.2, p.147-50, 2010.

DI GIUSEPPE, M; GAMBELLI, F; HOYLE, G.W; et al. Systemic Inhibition of NF- κ B Activation Protects from Silicosis. **PLoS ONE.** v.4, n.5, p.1-14, 2009.

DONALDSON, K; BORM, P.J; Quartz The hazard: a variable entity. **Ann. Occup. Hyg.** v.42, p.287-294, 1998.

DRISCOLL, K.E. Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. **Exp. Lung Res.** v.20, p.473-90, 1994.

EHRlich, R.I; MYERS, J.E; WATER, J.M. Lung function loss in relation to silica dust exposure in South African gold miners. **Occup Environ Med.** v.68, p.96-101, 2011.

GAENSLER, E.A; CARRINGTON, C.B. Open biopsy for chronic diffuse infiltrative lung disease: clinical, roentgenographic, and physiological correlations in 502 patients. **Ann Thorac Surg.** v.30; p.411-26, 1980.

GERARD, C; ROLLINS, B.J. Chemokines and disease. **Nat Immunol.** v.2, p.108–115, 2001.

GOELZER, B; HANDAR, Z. Programa nacional de eliminação da silicose. In: Seminário Internacional Sobre Exposição à Silica “Prevenção e Controle”; 2000 nov 06-10; Curitiba. Santa Catarina: Fundacentro; 2002.

HAMZAOUI, A; AMMAR, J; GRAI'RI, H; et al. Expression of Fas antigen and Fas ligand in bronchoalveolar lavage from silicosis patients. **Mediators of Inflammation**, v.12, n.4, p.209-214, 2003.

HAN, B; YAN, B; ZHAO, N; et al. The influence of the functional capacity on subjective well-being and quality of life of patients with silicosis. **Aging Ment Health**. p.1-7, 2013.

HASEGAWA, M; SATO, S; TAKEHARA, K. Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. **Clin. Exp. Immunol.** v.117, p.159-165, 1999.

HNIZDO E. Loss of lung function associated with exposure to silica dust and with smoking and its relation to disability and mortality in South African gold miners. **Br J Ind Med.** v.49, p.472-79, 1992.

International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 68: silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibers. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1997.

International Labour Office. Guidelines for the use of the ILO International Classification of Radiographs of pneumoconiosis. Revised Edition, Geneva, 2011.

KOHAN, M; PUXEDDU, I; REICH, R; et al. Eotaxin-2/CCL24 and eotaxin-3/CCL26 exert differential profibrogenic effects on human lung fibroblasts. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology.** v.104, n.1, p.66-72. 2010.

KOMAI, M; TANAKA, H; NAGAO, K. A Novel CC-Chemokine Receptor 3 Antagonist, Ki19003, Inhibits Airway Eosinophilia and Subepithelial/Peribronchial Fibrosis Induced by Repeated Antigen Challenge in Mice. **Journal of Pharmacological Sciences.** v.112, n.2, p.203-213, 2010.

KOVELIS, D; SEGRETTO, N.O; PROBST, V.S. Validação do Modified Pulmonary Functional Status and Dyspnea Questionnaire e da escala do Medical Research Council para o uso em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica no Brasil. **J Bras Pneumol.** v.34, p.1008-1018, 2008.

KRONFOL, Z; REMICK, D.G. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. **Am. J. Psychiatry.** v.157, p.683-694, 2000.

LEE, J.S; SHIN, J.H; LEE, J.O. Serum levels of interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in coal workers' pneumoconiosis: one-year follow-up study. **Saf. Health Work.** v.1, p.69-79, 2010.

LIU, F; LIU, J; WENG, D; et al. CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells Depletion May Attenuate the Development of Silica-Induced Lung Fibrosis in Mice. **Plos One.** v.5, n.11, p.1-11, 2010.

LIU, H; YAN, B; HAN, B; et al. Assessment of respiration-related quality of life of Chinese patients with silicosis and its influencing factors using the St. George's Respiratory Questionnaire (SGRQ). **J Clin Nurs.** v.21, p.1515-1523, 2011.

LOPES, A.J; MOGAMI, R; CAPONE, D; et al. High-resolution computed tomography in silicosis: correlation with chest radiography and pulmonary function tests. **J Bras Pneumol.** v.34, p.264-72, 2008.

MAKOL, A; REILLY, M.J; ROSENMAN, K.D. Prevalence of Connective Tissue Disease In Silicosis (1985-2006)- A Report From the State of Michigan Surveillance System for Silicosis. **American Journal of Industrial Medicine.** v.54, p.255-262, 2011.

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

MESA, F.R; KAEMPFER, A.M. Work absenteeism in Chile according to the type of work place. **Rev Med Chil.** v.132, n.9, p.1100-8, 2004.

MIN, J.W; LEE, J.H; PARK, C.S; et al. Association of eotaxin-2 gene polymorphisms with plasma eotaxin-2 concentration. **Journal of Human Genetics.** v.50; p.118-123, 2005.

Ministério da Saúde/UERJ. Mapa da Exposição à Sílica no Brasil. Rio de Janeiro 2010.

National Institute for Occupational Safety and Health. Health effects of occupational exposure to respirable crystalline silica. Cincinnati, OH: Department of Health and Human Services, 2002.

OPAL, S.M; DEPALO, V.A. Anti-Inflammatory Cytokines. **Chest.** v.17, n.4, p.1162-1172, 2000.

ORTIZ, L.A; LASKY, J; GOZAL, E; et al. Tumor necrosis factor receptor deficiency alters matrix metalloproteinase 13/tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression in murine silicosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v.163, p.244-252, 2001.

PEETERS, P.M; PERKINS, T.N; WOUTERS, E.F.M; et al. Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells. **Particle and Fibre Toxicology.** v.10, n.3, p.1-11, 2013.

PENNINX, B.W; ABBAS, H; AMBROSIUS, W; et al. Inflammatory markers and physical function among older adults with knee osteoarthritis. **J. Rheumatol.** v.31, p.2027-2031, 2004.

PEREIRA C.A.C. Espirometria. **J Pneumol.** v.28, p.1-82, 2002.

PERKINS, T.N; SHUKLA, A; PEETERS, P.M; et al. Differences in gene expression and cytokine production by crystalline vs. amorphous silica in human lung epithelial cells. **Particle and Fibre Toxicology.** v.9, n.6, p.2-18, 2012.

POLATLI, M; TUNA, H.T; YENISEY, C; et al. Lung function and IFN-gamma levels in the sera of silica-exposed workers. **J. Interferon Cytokine Res.** v.28, p.311-316, 2008.

PORTER, D.W; YE, J; MA, J; et al. Time course of pulmonary response of rats to inhalation of crystalline silica: NF-kappa B activation, inflammation, cytokine production, and damage. **Inhal. Toxicol.** v.14, p.349-367, 2002.

PUXEDDU I, BADER R, PILIPONSKY AM, et al. The CC chemokine eotaxin/CCL11 has a selective profibrogenic effect on human lung fibroblasts. **J Allergy Clin Immunol.** v.117, p.103-110, 2006.

REES, D; MURRAY, J. Silica, silicosis and tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis.** v.11, p. 474-84, 2007.

REJBI, I.B.C; TRABELSI, Y; CHOUCHE, A; et al. Changes in six-minute walking distance during pulmonary rehabilitation in patients with COPD and in healthy subjects. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.** v.5, p.209- 215, 2010.

RUSSO, R.C; ALESSANDRI, A.L; GARCIA, C.C; et al. Therapeutic effects of evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** v.45, p.72-80, 2011.

SAUNI, R; OKSA, P; LEHTIMÄKI, L; et al. Increased alveolar nitric oxide and systemic inflammation markers in silica-exposed workers. **Occup. Environ. Med.** v.69, p.256-260, 2012.

SCHINS, R.P.F; BORM, P.J.A. Plasma levels of soluble tumour necrosis factor receptors are increased in coal miners with pneumoconiosis. **Eur. Respir. J.** v.8, p.1658-1663, 1995.

SELLAMUTHU, R; UMBRIGHT, C; ROBERTS, J.R; et al. Blood gene expression profiling detects silica exposure and toxicity. **Toxicol Sciences.** v.122, n.2, p.253-264, 2011.

SILICOSIS AND SILICATE DISEASE COMMITTEE. Diseases associated with exposure to silica and nonfibrous silicate minerals. **Arch Pathol Lab Med.** v.112, p.673-720, 1988.

SLAVOV, E; MITEVA, L; PRAKOVA, G; et al. Correlation between TNF-alpha and IL-12p40-containing cytokines in Silicosis. **Toxicol Ind Health.** v.26, p.479-486, 2010.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Diretrizes para Testes de Função Pulmonar. Espirometria. **J Pneumol.** v.28, n.3, 2002.

SOUSA, T.C; JARDIM, J.R; JONES, P. Validação do Questionário do Hospital Saint George na Doença Respiratória (SGRQ) em pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica no Brasil. **J Pneumol.** v.26, n.3, p.119-128, 2000.

SRIVASTAVA, K.D; ROM, WN; JAGIRDAR, J; et al. Crucial role of interleukin-1beta and nitric oxide synthase in silica-induced inflammation and apoptosis in mice. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v.165, p.527-533, 2002.

SUN, Y; BOCHMANN, F; MORFELD, P; et al. Change of Exposure Response over Time and Long-Term Risk of Silicosis among a Cohort of Chinese Pottery Workers. **Int. J. Environ. Res. Public Health.** v.8, p.2923-2936, 2011.

THOMAS, C.R; KELLEY, T.R. A Brief Review of Silicosis in the United States. **Environmental Health Insights.** v.4, p.21-26, 2010.

TRIPATHI, S.S; MISHRA, V; SHUKLA, M; et al. IL-6 receptor-mediated lung Th2 cytokine networking in silica-induced pulmonary fibrosis. **Arch Toxicol.** v.84, p.947-955, 2010.

ULKER, O.C; YUCESAY, B; DEMIR, O. Serum and BAL cytokine and antioxidant enzyme levels at different stages of pneumoconiosis in coal workers. **Hum Exp Toxicol.** v.27, p.871–877, 2008.

YANG, X; WALTON, W; COOK, D.N; et al. The Chemokine, CCL3, and Its Receptor, CCR1, Mediate Thoracic Radiation–Induced Pulmonary Fibrosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.** v.45, n.1, p.127-135, 2011.

ZHAI, R; LIU, G; GE, X; et al. Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), and their soluble receptors in coal workers' pneumoconiosis. **Resp Med.** v.96, p.829–834, 2002.

ZOU, J; CARROLL, X.P; LIANG, X; et al. Alterations of serum biomarkers associated with lung ventilation function impairment in coal Workers: A cross-sectional study. **Environ Health.** v.10, n.83, p.2-8, 2011.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa “Marcadores Inflamatórios na Silicose”. A Silicose é uma doença que acomete os pulmões podendo ocasionar dificuldade para respirar. Sua causa é a inalação de poeira contendo sílica no ambiente de trabalho, como nas atividades de: cerâmicas, cristais, pedras em geral e mineração. A doença não tem cura, mas pode ser prevenida. O sistema imunológico (defesa) é muito importante no desenvolvimento da Silicose. Este estudo tem como objetivo avaliar substâncias (quimiocinas e citocinas) presentes no sangue das pessoas, na expectativa de melhor compreender os processos que levam ao desenvolvimento dessa doença.

A participação no estudo implica na coleta de sangue, para exames previstos na pesquisa, e para avaliar a sua tolerância ao exercício, a sua qualidade de vida e se você tem falta de ar serão realizados o Teste de Caminhada de Seis Minutos e a aplicação dos questionários de *Saint George's* e a escala do MMRC, respectivamente. Além disso, dados do seu prontuário, incluindo os resultados de exames feitos no protocolo de atendimento do Centro de Referência Estadual em Saúde do Trabalhador (CEREST) serão utilizados.

Serão colhidos 10 ml de sangue, por pessoal qualificado envolvido na pesquisa, seguindo normas e padrões de biosegurança, buscando o mínimo de desconforto possível. Serão coletadas duas amostras de sangue durante o seu acompanhamento no serviço do CEREST, sendo que em cada tubo será colocado o volume de 10 ml. Todo o material coletado que restar, será descartado logo após a conclusão do projeto.

Os resultados dos seus exames só poderão ser informados a você e poderão ser publicados em trabalhos científicos sem que o seu nome apareça.

Você é livre para escolher participar ou não da pesquisa e pode retirar o seu consentimento a qualquer hora, caso não queira continuar a fazer parte dela, sem que haja qualquer tipo de restrição ao seu tratamento. Caso decida não participar deste estudo, você tem garantido o direito de continuar sendo acompanhado pelos profissionais especializados envolvidos nesta pesquisa, se fez a escolha em ser examinado pelos mesmos.

Desta forma, eu consinto na minha participação nesta pesquisa e estou ciente que isto inclui a coleta de meu sangue para a realização de dosagem de quimiocinas e citocinas, (substâncias presentes no sistema de defesa), assim como a consulta aos meus dados no prontuário.

Nome do voluntário: _____

Registro: _____ Idade: _____ anos

Data de nascimento: ____/____/____ Estado civil: _____

Escolaridade completa: 1^o 2^o 3^o grau

Profissão: _____

Endereço residencial:

Rua (Avenida): _____ Bairro: _____

Cidade: _____ Tel.: _____

Endereço/Telefone de uma pessoa que possa localizá-lo: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

Responsável pela entrevista

SEST- Hospital das Clínicas/UFGM. Endereço: Alameda Álvaro Celso, 175/ 7º andar, Bairro Santa Efigênia. Telefone para contato: (31) 34099564. Pesquisadora Responsável: Ana Paula Scalia Carneiro. Comitê de Ética em Pesquisa – COEP UFGM. Av. Antônio Carlos, 6627- Unidade Administrativa II. 2º andar – Sala 2005 - Campus Pampulha. Belo Horizonte – Brasil 31270-901. Telefax: (31) 3409 4592.

ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 183/08

Interessado(a): Profa. Ana Paula Scalia Carneiro
Departamento de Medicina Preventiva e Social
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de junho de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "Estudo de marcadores inflamatórios na silicose" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

2ª via

Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO III

Association Between Inflammatory Biomarkers in Plasma, Radiological Severity and Duration of Exposure in Patients with Silicosis.

Nayara Felicidade Tomaz Braz^{1,2}; Ana Paula Scalia Carneiro³; Mateus Ramos Amorim⁴; Fernanda de Oliveira Ferreira⁵; Ana Cristina Rodrigues Lacerda¹; Aline Silva de Miranda⁶; Mauro Martins Teixeira⁶; Antonio Lucio Teixeira⁶; Vanessa Amaral Mendonça^{1,2}.

1. Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas- Sociedade Brasileira de Fisiologia – Brazil.
2. Laboratório de Inflamação e Metabolismo - UFVJM – Diamantina - Brazil.
3. Medical Doctor of State Reference Center in Occupational Health, the Clinics Hospital - UFMG – Belo Horizonte- Brazil.
4. Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto - USP- Ribeirão Preto - Brazil.
5. Department of Basic Sciences - UFVJM - Diamantina - Brazil.
6. Laboratório de Imunofarmacologia - ICB - UFMG – Belo Horizonte - Brazil.

Corresponding author: Vanessa Amaral Mendonça

Address: Campus JK - Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000 - Alto da Jacuba, Zip Code: 39100-000, Diamantina, MG, Brazil.

E-mail: vaafisio@hotmail.com

Phone: (55) 38-35321239

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

There's no conflict of interest.

Running title: Inflammatory Biomarkers and Silica Exposure.

Acknowledgments

The authors are grateful to the State Reference Center in Occupational Health, the Clinics Hospital, Belo Horizonte, Brazil.

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Abstract

Objective: To evaluate the plasma levels of CCL2, CCL3, CCL11, CCL24, TNF- α , sTNFR1 and sTNFR2 in subjects exposed to silica (SES) with and without silicosis compared to unexposed reference group (CG) and their associations with the radiological severity and duration of exposure to silica. **Methods:** 57 SES; 36 with silicosis and 22 subjects in CG. **Results:** CCL3, CCL24, sTNFR1 and sTNFR2 were increased in SES and in SES with silicosis than controls. There were no differences in the levels of CCL2, CCL11 or TNF- α . The sTNFR2 level was greater in SES with silicosis than in SES without silicosis. There was a positive correlation between sTNFR1 and sTNFR2 and the radiological severity and time of exposure to silica. sTNFR2 was associated with all categories of radiological severity. **Conclusion:** sTNFR2 is associated with silicosis severity and early exposure to silica.

Keywords: Silica dust-exposed workers; quartz; cytokine; chemokine; soluble tumor necrosis factor-alpha receptor; chest radiography.

Introduction

Silicosis is an occupational fibrotic lung disease resulting from the inhalation of free crystalline silica particles. In its chronic form, it presents a long latency period and typically takes 10 to 20 years to develop. The most important symptoms are dyspnea and coughing, but it may initially be asymptomatic.¹⁻³ Silicosis remains a great public health problem in developed and developing countries, although the reduction of its incidence has been reported in some developed countries.²

In Brazil, the identification of new cases is epidemic, and the main work activities involved include mining, drilling, extraction and processing of stone, polishing crystals and precious stones and metallurgy. Recent studies have shown a worrying occurrence of silicosis among crystal miners and stonemasons in the state of Minas Gerais, with a record of severe disease affecting young individuals.⁴

The diagnosis of silicosis requires the combination of silica exposure history, clinical data and characteristic findings on chest radiographs.³ In addition to the clinical and radiological findings, changes in the immune system have been described in the pathogenesis of silicosis.⁵ Alveolar macrophages play a key role in the development of silicosis by releasing a host of mediators, such as, cytokines and chemokines, which contribute to a complex network of interactions that result in the onset of lung injury, inflammation, and potentially fibrosis.⁶ The inflammatory mediators implicated in the etiology of silicosis include interleukin (IL)-1, IL-10⁶, IL-4⁷, IL-6⁸, IL-8⁹, tumor necrosis factor alpha (TNF- α)⁹⁻¹¹, transforming growth factor beta (TGF- β)¹², and the chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β and MIP-2.¹³ CCL3/MIP-1 α , CCL2/MCP1, and CCL5/RANTES are C-C chemokines, with no amino acid intervening between the first two conserved cysteines, which primarily attract monocytes and macrophages, induce IL-1, IL-6, and TNF- α and that modulate T-lymphocyte recruitment and type switching.¹⁴ Human lung fibroblasts express CCR-3 and eotaxin/CCL11 has selective profibrogenic properties on human lung fibroblasts.¹⁵ In particular, induction of inflammation and fibrosis in response to silica is closely tied to the activity of TNF- α and its receptors, TNFRI and TNFRII. Exposure of macrophages to silica induced TNF- α mRNA and protein.^{16,17}

Thus, it is believed that the identification of biomarkers in workers exposed to silica dust would allow early detection of silicosis, perhaps before irreversible pulmonary radiological changes occur. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the plasma levels of the inflammatory mediators (CCL2/MCP-1) monocyte chemotactic protein-1, (CCL3/MIP-1 α) macrophage inflammatory protein-1 α , (CCL11/eotaxin) eosinophil chemotactic protein, (CCL24/eotaxin-2) eosinophil chemotactic protein 2, TNF- α /tumor necrosis factors- α and its soluble receptors (sTNFR1 and sTNFR2) in individuals not exposed to silica and exposed workers with and without silicosis and evaluate their association with the radiological severity of silicosis and duration of exposure to silica.

Methods

This study was approved by the ethics committee of UFMG record (183/08), and consent was signed by each participant. This was an observational non-sample case series study that consisted of a group of subjects exposed to silica (SES) and a control group (CG), in which volunteers were not exposed to silica.

Subjects

The study included 57 silica-exposed workers in stone carving/polishing and/or quartz mining from the city of Corinto, Minas Gerais, who were followed at the State Reference Center in Occupational Health, the Clinics Hospital, Belo Horizonte, Brazil. Corinto has the economy based on quartz mining and polishing. Quantitative measurements of dust were not

taken in Corinto due to technical difficulties. However, a previous study in a neighboring town, with similar economic characteristics, showed excessive silica exposure in a variety of tasks performed during crystal polishing. Measurements taken were 2.4 to 26.2 times higher than ACGIH limits.¹⁸

The silica -exposed workers were selected by spontaneous demand when the workers were clinically assessed by taking a detailed history and careful medical examination. Diagnosis is established by clinical and occupational history of exposure to silica, in the presence of radiological changes. We stratified the SES group according the International Labour Organization (ILO) classification of radiographs of pneumoconiosis.¹⁹

We included only male subjects. At the time of inclusion in the present study, some participants were no longer exposed to silica. The exclusion criteria were the presence of upper or lower tract respiratory infections over the past six weeks, active pleural-pulmonary tuberculosis, presence of unstable cardiovascular or metabolic disease, acute comorbidities, and use of oral corticosteroids or non-steroidal anti-inflammatory drugs in the previous six weeks. The control group comprised 22 healthy men from the community who were not exposed to silica and were matched by age and smoking history.

The SES had a mean age of 35.44 years (\pm 11.79 years), and the CG had a mean age of 37 years (\pm 5.39 years). The SES included 38 stone carvers, 10 miners and 9 with both occupations. After stratification of the SES, 36 had silicosis and 21 did not have silicosis. The duration of exposure and the time since exposure were significantly greater in the silicosis group compared with those without silicosis ($p = 0.002$ and $p = 0.02$, respectively). No differences in smoking status were observed between the three groups ($p = 0.341$). The radiological severity and general characteristics of the subjects are shown in Table 1.

Table 1- General characteristics of subjects.

Groups	CG (n=22)	Not silicotics SES (n=21)	Silicotics SES (n=36)	p	
Exposure time (years)*	-	10,59 (6.15)	16,80 (7.15)	0.002 ^a	
Time off exposure (years)*	-		0.66 (1.59)	2.32 (4.04)	0.02 ^b
n° of active workers [#]	-	17	18		
n° of inactive workers [#]	-	4	18	0.02 ^c	
Smoking					
never [#]	17	13	23		
past [#]	0	3	5		
current [#]	5	5	8	0.988 ^c	
Cigarette pack years*	2.65(6.52)	4.14 (6.11)	4.31(8.62)	0.341 ^c	
Radiological profusion					
category 0 [#]	-	21	-		
category 1 [#]	-	-	13		
category 2 [#]	-	-	7		
category 3 [#]	-	-	16	0.0001 ^c	
Large opacities					
Absent	-	21	22	-	
A	-	-	1	-	
B	-	-	10	-	
C	-	-	3	-	

*average value, [#] absolute value, a: Student's T Test; b: Mann-Whitney Test; c: Chi-Square Test.

Clinical evaluation

Patients were evaluated according to a protocol for the investigation of health effects caused by mineral dust exposure that includes a clinical-occupational questionnaire and examination, spirometry and a standard chest radiograph with interpretation according to the International Labour Organization (ILO) classification of radiographs of pneumoconiosis.¹⁹

Chest radiography

Radiological examinations were independently evaluated by three readers (two qualified as "B" readers) according to the ILO classification of pneumoconiosis.¹⁹ The radiological severity of silicosis has been classified into 12 subcategories of small opacity profusion, determined by the median of the three readings. They were classified into four major categories: 0, 1, 2 and 3. When present, large opacities were classified as A, B or C.¹⁹ For this study, patients with large opacities were classified into major category 3, independent of the classification of small opacities. Patients whose chest x-rays revealed a median profusion (of the three readings) equal to or more than 1/0 were considered cases. Profusions of 0/1 were regarded as suspected cases.

Preparation of plasma

A qualified professional collected 10 ml of peripheral blood from participants into a tube containing sodium heparin for analysis of the biomarkers mentioned. Then, the plasma was transferred to sterile Eppendorf tubes and stored in a freezer at -70°C until analysis.

Analysis of inflammatory biomarkers

For the chemokine analysis, samples were thawed, and excess protein was removed by acid and salt precipitation.²⁰ Briefly, one volume of plasma and 1.2% trifluoroacetic acid / 1.35 M NaCl were mixed and incubated at room temperature for 10 minutes. The samples were centrifuged for 5 minutes at 3000 rpm, and the supernatants were adjusted for salt concentration (0.14 M sodium chloride and 0.01 M sodium phosphate) and pH (7.4) to determine the chemokine concentrations by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). To analyze the cytokines and soluble receptors present, the samples were thawed and tested shortly thereafter by ELISA. Reactions were read using a microplate reader at 490 nm (SoftMax Pro - version 2.2.1). All samples were assayed in duplicate. The detection limits for these assays were 10 pg/ml for CCL2, CCL3, CCL11, CCL24, sTNFR1 and sTNFR2 and 5 pg/ml for TNF- α .

Statistical Analysis

We used the Kolmogorov-Smirnov test to analyze the normality of the data. Student's t-test was used to compare plasma levels of biomarkers between groups for parametric analyses, while the Mann-Whitney test was used for nonparametric analyses. The chi-square test was used to compare categorical variables. The levels of inflammatory biomarkers among SES who developed silicosis, those who did not develop the disease and controls were compared using the Kruskal-Wallis test. We used the Spearman correlation for time of exposure, radiological severity and biomarkers. ROC curves were used to analyze the sensitivity of inflammatory biomarkers in discriminating between controls and patients with silicosis. In the ROC analysis, an area under the curve of 1.0 indicated perfect discrimination, while an area of 0.5 indicated that the test discriminated randomly, showing no adequate sensitivity in discriminating among the groups. With the objective of determining whether the biomarkers sTNFR1 and sTNFR2 were significant associated with radiological severity, considering the grade 0 as reference, a univariate multinomial logistic regression was conducted once this analysis is a model which generalizes logistic regression by allowing dependent variables with more than two discrete outcomes. Then, in this regression model it was verified if the biomarkers were associated with the radiological profusion 3, 2 and 1, in comparison with grade 0, considering the Odds Ratio and Confidence Interval.

The confidence interval used was 95% ($p < 0.05$). The statistical analyses were performed using SPSS version 20.0 for Windows and GraphPad Prism version 5.0.

Results

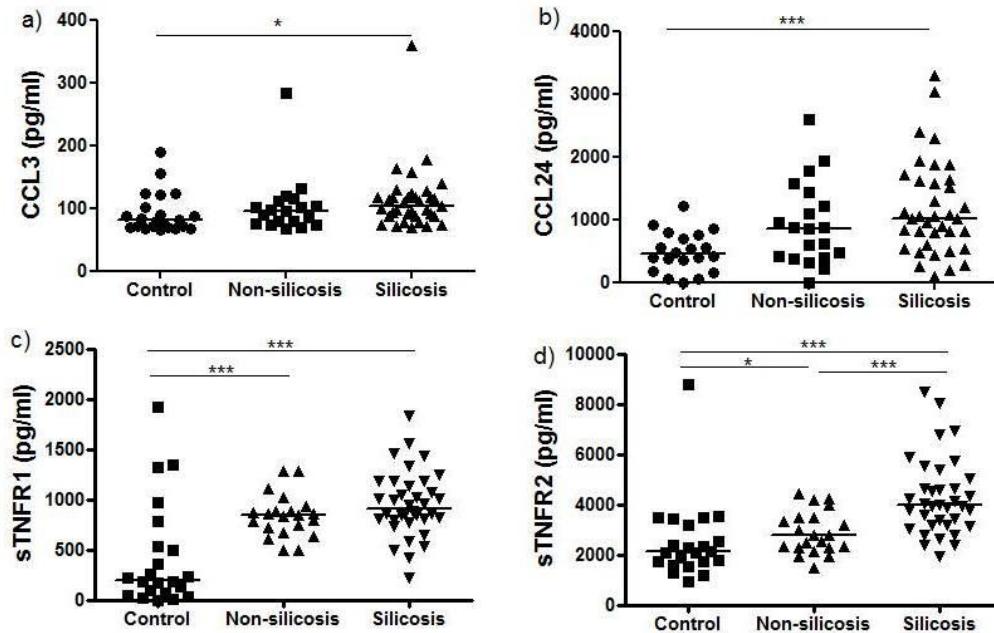
Plasma levels of inflammatory biomarkers

We first compared the levels of inflammatory biomarkers in SES and the CG. The levels of CCL3 ($p = 0.007$), CCL24 ($p = 0.005$), sTNFR1 ($p = 0.0001$) and sTNFR2 ($p = 0.0001$) were greater in SES than in the CG. There were no differences in the levels of CCL2, CCL11 or TNF- α between the two groups (data not shown).

When SES with or without silicosis were considered separately, the plasma levels of CCL3 ($p < 0.05$), CCL24 ($p = 0.001$), sTNFR1 ($p = 0.001$) and sTNFR2 ($p = 0.001$) were greater in SES with silicosis compared to the CG. The levels of sTNFR1 ($p = 0.001$) and sTNFR2 ($p = 0.037$), but not CCL3 or CCL24, differed between SES without silicosis and the CG.

Moreover, the levels of sTNFR2 could differentiate patients with silicosis from those without silicosis (Figure 1).

Figure 1- Concentrations of CCL3 (a), CCL24 (b), sTNFR1 (c) and sTNFR2 (d) (pg/ml) in the control group and in patients with and without silicosis. Horizontal lines represent the median. (Kruskal-Wallis Test).



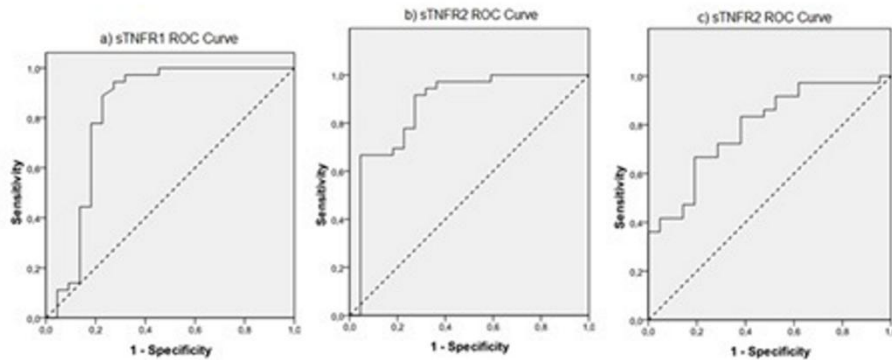
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Analysis of the receiver operating characteristic (ROC) curves for the plasma levels of sTNFR1 and sTNFR2

ROC curves were plotted to investigate the potential diagnostic value of CCL3, CCL24, sTNFR1 and sTNFR2. The values for the ROC curves of all the evaluated cytokines when SES with silicosis were compared to the CG were 0.727 for CCL3 (95% CI: 0.584-0.870, $p = 0.004$), 0.735 for CCL24 (95% CI: 0.596-0.874, $p = 0.003$), 0.829 for sTNFR1 (95% CI: 0.692-0.966, $p < 0.001$) (Figure 2a) and 0.872 for sTNFR2 (95% CI: 0.768-0.977, $p < 0.001$) (Figure 2b), indicating a good diagnostic performance for sTNFR1 and sTNFR2.

By contrast, the values obtained for CCL3 and CCL24 indicated low sensitivity for discriminating between groups because the lower limit of the confidence interval was close to 0.5. We chose to further explore the data of sTNFR1 and sTNFR2. When we compared SES with silicosis to the SES without silicosis, the value of the ROC curve was 0.615 for sTNFR1 (95% CI: 0.467-0.763, $p = 0.150$), showing no significant accuracy in discriminating between groups (data not shown), and 0.791 for sTNFR2 (95% CI: 0.672-0.910, $p < 0.000$) (Figure 2c), indicating that this receptor could discriminate the groups.

Figure 2- Receiver operating characteristic curve (ROC) of sTNFR1 (a) and sTNFR2 (b) for the diagnosis of patients with silicosis and sTNFR2 (c) for patients with and without silicosis.



Analysis of correlation

We found significant positive correlations between sTNFR1 ($r = 0.281$, $p = 0.03$), sTNFR2 ($r = 0.432$, $p = 0.001$) and length of exposure and between sTNFR1 ($r = 0.337$, $p = 0.01$), sTNFR2 ($r = 0.491$, $p < 0.0001$) and radiological severity. In addition, there was a significant positive correlation between the length of exposure and radiological severity ($r = 0.439$, $p = 0.001$).

Soluble TNF- α receptors and radiological profusion univariate multinomial logistic regression

A univariate multinomial logistic regression with sTNFR1 and sTNFR2 as independent variables and radiological profusion as a dependent variable was performed. The results indicated that sTNFR1 was associated with grade 3 radiological profusion compared with grade 0 ($p = 0.031$; OR = 1.003). In the other categories, sTNFR1 was not associated with radiological profusion (data not shown). Table 2 shows the sTNFR2 data, and this biomarker was associated with grades 1 ($p = 0.006$), 2 ($p = 0.003$) and 3 ($p = 0.003$) compared to grade 0.

Table 2: Multinomial logistic regression, considering sTNFR2 as the independent variable and radiological profusion as the dependent variable.

	P	OR	IC
Category 1			
sTNFR2	0.006	1.001	1.000-1.002
Category 2			
sTNFR2	0.003	1.001	1.000-1.002
Category 3			
sTNFR2	0.003	1.001	1.000-1.002

Discussion

The major findings of this study can be summarized as follows: 1) the levels of the chemokines CCL3 and CCL24 and the soluble receptors sTNFR1 and sTNFR2 were

increased in subjects exposed to silica compared with healthy controls; 2) only the soluble receptors were elevated early in the course of exposure and were therefore capable of discriminating the exposed group from the control group, a finding confirmed by the ROC analysis; 3) in silica-exposed individuals, only sTNFR2 could discriminate between the presence and absence of silicosis. Indeed, the levels of sTNFR2 correlated well with the radiological severity of disease. Altogether, these findings suggest that sTNFR1 and sTNFR2 are early markers of inflammatory activity after exposure to silica. Moreover, sTNFR2 was sensible to discriminating exposed individuals with silicosis from those without disease.

Chemokines are chemotactic cytokines that recruit specific groups of leukocytes, and they are involved in many inflammatory processes and chronic lung disease.²¹⁻²³ The chemokine CCL3 is a chemoattractant for monocytes and lymphocytes that has been shown to mediate pulmonary defense in animal models of pulmonary inflammation in silicosis. Studies in humans indicate that CCL3 contributes to the inflammatory cell response associated with idiopathic pulmonary fibrosis.²² A previous study found that preventive or therapeutic administration of evasin-1, a CCL3-binding protein, reduced pulmonary inflammation and bleomycin-induced fibrosis in mice.²⁴ In addition, the serum levels of MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, and MIP-1 β /CCL4 and their spontaneous production by PBMCs were significantly elevated in patients with systemic sclerosis, a connective tissue disorder characterized by fibrosis and vascular changes in the skin and other visceral organs compared to standard controls. Elevated serum levels of MCP-1/CCL2 and MIP-1 α /CCL3 significantly correlated with the presence of pulmonary fibrosis.²⁵ In agreement with other studies of fibrotic lung diseases, we observed that plasma levels of CCL3 were significantly greater in SES with silicosis compared to the CG.

Eotaxin-2/CCL24 and profibrogenic eotaxin-3/CCL26 have differential effects on human lung fibroblasts. Therefore, these CC chemokines may contribute to airway remodeling in asthma.²³ In the present study, the level of CCL24 was significantly increased in the plasma of SES with silicosis compared to the CG, suggesting that CCL24 plays a role in the pathogenesis of lung diseases. It is important to note, however, that some diseases, such as asthma, are associated with increased plasma levels of CCL24²⁶, which reinforces the view that this chemokine is not specific for silicosis but is an inflammatory marker.

Lee *et al.*⁹ have shown that high levels of IL-8 are associated with the presence of pneumoconiosis in coal workers and that the concentrations of TNF- α are associated with radiological progression of the disease. By contrast, another study reported an association between TNF- α and silica exposure and that the elevation of both TNF- α and IL-12p40 was associated with the development and severity of silicosis in miners.¹¹ We detected no change in the plasma levels of TNF- α , although it has been shown to play a key role in silicosis. This finding may be related to the instability of this cytokine, which has a short half-life that can vary over the course of the day.²⁷ It is worth mentioning that TNF- α appears to be less stable than the sTNFRs.²⁸

Experimental studies have also suggested that the toxic and fibrogenic potentials of silica dust from various sources are extremely different.^{29, 30} Few studies have evaluated the concentrations of sTNFR1 and sTNFR2 in coal miners with pneumoconiosis.^{31, 32} To our knowledge, no study has investigated these molecules in the plasma of SES with and without silicosis who are stone workers and miners. We observed elevated levels of sTNFR1 and sTNFR2 in the plasma of SES with and without silicosis compared to the CG. Similarly, another study has reported higher levels of sTNFR2 in subjects with coal workers' pneumoconiosis compared to unexposed controls and of sTNFR1 in miners compared to reference subjects.³¹ The mean serum levels of sTNFR1, sTNFR2 and IL-6 have been shown to be significantly higher in subjects with coal workers' pneumoconiosis than in controls.³² Moreover, in the present study, sTNFR2 was increased in SES with silicosis compared to SES

without silicosis. A previous study has reported similar associations between the soluble p55/sTNFR1 and p75/sTNFR2 levels and the presence of coal workers' pneumoconiosis.³² In the ROC curve analysis, the measurement of sTNFR1 and sTNFR2 was significantly useful for the diagnosis of silicosis. We found that sTNFR2 significantly associated with all categories of radiological severity of the disease. Zhai *et al.*³² have demonstrated that radiographic evidence of coal workers' pneumoconiosis (by the ILO criteria) was significantly correlated with the individual serum concentrations of p55/sTNFR1 and p75/sTNFR2.

There are some limitations in the present study. We did not evaluate biomarkers in the lung (by bronchoalveolar lavage or exhaled breath condensate), and quantitative analyses of environmental respirable dust were not performed. Further studies are needed to investigate these issues and the relationship between the types and levels of biomarkers in the lungs and plasma. However, our study indicates that the plasma levels of soluble receptors may be useful in the definition of exposure and disease in stone and mine workers.

In conclusion, our study showed that measurement of soluble TNFRs may be useful to detect exposure to silica. Moreover, measurement of sTNFR2 may be useful to detect disease in exposed individuals. Therefore, measurement of these molecules may be useful in the management of individuals exposed to silica dust, a hypothesis that needs to be addressed further in the general population exposed to silica dust. At this point, the longitudinal monitoring of patients would identify whether those with higher measurements of these biomarkers would be more likely to develop illness over the years.

References

1. American Thoracic Society. Adverse effects of crystalline silica exposure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997;155:761-65.
2. Nelson G, Girdler-Brown B, Ndlovu N, Murray J. Three Decades of Silicosis: Disease Trends at Autopsy in South African Gold Miners. *Environmental Health Perspectives.* 2010;118:421-426.
3. Silicosis and Silicate Disease Committee. Diseases associated with exposure to silica and nonfibrous silicate minerals. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1988;112:673-720.
4. Chiavegatto CV, Carneiro AP, Dias EC, Nascimento MS. Diagnosis of severe silicosis in young adults working in stone polishing and mining in Minas Gerais. *Brazil. Int. J. Occup. Environ. Health.* 2010;16:147-50.
5. Lee S, Hayashi H, Maeda M, et al. Environmental factors producing autoimmune dysregulation – Chronic activation of T cells caused by silica exposure. *Immunobiology.* 2012;217:743-748.
6. Tiwari RR. Biomarkers of silicosis: Potential candidates. *Ind. J. Occup. Envir. Med.* 2005;9:103-6.
7. Migliaccio CT, Buford MC, Jessop F, Holian A. The IL-4R_α pathway in macrophages and its potential role in silica-induced pulmonary fibrosis. *J. Leukoc. Biol.* 2008;83:630-639.
8. Tripathi SS, Mishra V, Shukla M, et al. IL-6 receptor-mediated lung Th2 cytokine networking in silica-induced pulmonary fibrosis. *Arch. Toxicol.* 2010;84:947-955.
9. Lee JS, Shin JH, Lee JO, Lee KM, Kim JH, Choi BS. Serum levels of interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in coal workers' pneumoconiosis: one-year follow-up study. *Saf. Health Work.* 2010;1:69-79.
10. Di Giuseppe M, Gambelli F, Hoyle GW, et al. Systemic Inhibition of NF-κB Activation Protects from Silicosis. *Plos One.* 2009;4:1-14.

11. Slavov E, Miteva L, Prakova G, Gidikova P, Stanilova S. Correlation between TNF- α and IL-12p40-containing cytokines in Silicosis. *Toxicol Ind Health*. 2010;26:479-486.
12. Wang X, Chen Y, Lv L, Chen J. Silencing CD36 gene expression results in the inhibition of latent-TGF- β 1 activation and suppression of silica-induced lung fibrosis in the rat. *Respiratory Research*. 2009;10:1-9.
13. Pryhuber GS, Huyck HL, Baggs R, Oberdörster G, Finkelstein JN. Induction of Chemokines by Low-Dose Intratracheal Silica Is Reduced in TNFR I (p55) Null Mice. *Toxicol. Sci*. 2003;72:150-157.
14. Olszewski MA, Huffnagle GB, McDonald RA, et al. The role of macrophage inflammatory protein-1 α /CCL3 in regulation of T-cell-mediated immunity to *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Immunol*. 2000;165:6429–6436.
15. Puxeddu I, Bader R, Piliponsky AM, Reich R, Levi-Schaffer F, Berkman N. The CC chemokine eotaxin/CCL11 has a selective profibrogenic effect on human lung fibroblasts. *J Allergy Clin. Immunol*. 2006;117:103–110.
16. Barrett EG, Johnston C, Oberdorster G, Finkelstein JN. Antioxidant treatment attenuates cytokine and chemokine levels in murine macrophages following silica exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1999;158:211–220.
17. Claudio E, Segade F, Wrobel K, Ramos S, Lazo PS. Activation of murine macrophages by silica particles *in vitro* is a process independent of silica-induced cell death. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 1995;13:547–554.
18. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati: ACGIH; 2004/2005.
19. International Labour Office. *Guidelines for the use of the ILO International Classification of Radiographs of pneumoconiosis*. Revised Edition. 2011; Geneva.
20. Alessandri AL, Souza AL, Oliveira SC, Macedo GC, Teixeira MM, Teixeira AL. Concentrations of CXCL8, CXCL9 and sTNFr1 in plasma of patients with pulmonary tuberculosis undergoing treatment. *Inflamm. Res*. 2006;55:528–533.
21. Charo IF, Ransohoff RM. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *N. Engl. J. Med*. 2006;354:610-621.
22. Driscoll KE. Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Exp. Lung Res*. 1994;20:473-90.
23. Kohan M, Puxeddu I, Reich R, Levi-Schaffer F, Berkman N. Eotaxin-2/CCL24 and eotaxin-3/CCL26 exert differential profibrogenic effects on human lung fibroblasts. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 2010;104:66-72.
24. Russo RC, Alessandri AL, Garcia CC, et al. Therapeutic effects of evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2011;45:72-80.
25. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and MIP-1 β) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1 α may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin. Exp. Immunol*. 1999;117:159-165.
26. Min JW, Lee JH, Park CS, et al. Association of eotaxin-2 gene polymorphisms with plasma eotaxin-2 concentration. *Journal of Human Genetics*. 2005;50:118-123.
27. Penninx BW, Abbas H, Ambrosius W, et al. Inflammatory markers and physical function among older adults with knee osteoarthritis. *J. Rheumatol*. 2004;31:2027-2031.

28. Kronfol Z, Remick DG. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am. J. Psychiatry.* 2000;157:683-694.
29. Bruch J, Rehn S, Rehn B, Borm PJ, Fubini B. Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by the vector model. *Int. J. Hyg. Env. Health.* 2004;207:203-216.
30. Donaldson K, Borm PJ. Quartz The hazard: a variable entity. *Ann. Occup. Hyg.* 1998;42:287-294.
31. Schins RPF, Borm PJA. Plasma levels of soluble tumour necrosis factor receptors are increased in coal miners with pneumoconiosis. *Eur. Respir. J.* 1995;8:1658-1663.
32. Zhai R, Liu G, Ge X, et al. Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), and their soluble receptors in coal workers' pneumoconiosis. *Resp. Med.* 2002;96:829-834.

ANEXO IV

Biomarcadores Inflamatórios na Silicose Pulmonar

Mateus Ramos Amorim⁽¹⁾; Nayara Felicidade Tomaz Braz⁽¹⁾; Ana Paula Scalia Carneiro⁽²⁾; Kátia Cristina Costa Silva⁽¹⁾; Antonio Lúcio Teixeira⁽³⁾; Vanessa Amaral Mendonça⁽¹⁾.

Mateus Ramos Amorim – Mestrando do Laboratório de Controle Autônomo e Respiratório/USP

Ana Paula Scalia Carneiro – Pneumologista CEREST/UFMG

Nayara Felicidade Tomaz Braz – Mestranda do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas/UFVJM

Kátia Cristina Costa Silva - Aluna de Iniciação Científica/FAPEMIG/UFVJM

Antonio Lúcio Teixeira – Professor Adjunto/UFMG

Vanessa Amaral Mendonça – Professora Adjunta/UFVJM

⁽¹⁾ Laboratório de Inflamação e Metabolismo - UFVJM; ⁽²⁾ Serviço Especializado em Saúde do Trabalhador –HC – UFMG; ⁽³⁾ Laboratório de Imunofarmacologia – ICB- UFMG.

Título Resumido: Silicose e biomarcadores inflamatórios

Autor correspondente: Vanessa A. Mendonça

e-mail: vaafisio@hotmail.com

Telefone: 38- 35321239

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000, Campus JK, Diamantina, MG.

Suporte financeiro / Financial funding: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Resumo

A silicose representa um importante problema de saúde pública em todo o mundo, sobretudo nos países em desenvolvimento, sendo a principal causa de invalidez entre as doenças respiratórias ocupacionais. É uma pneumoconiose fibrótica, irreversível e potencialmente fatal, causada pela inalação de poeira contendo sílica cristalina. O diagnóstico é estabelecido através da história clínica e ocupacional de exposição à sílica, na presença de alterações radiológicas. Estudos experimentais e clínicos sugerem que a inalação da poeira da sílica está associada a um processo inflamatório pulmonar e sistêmico, mesmo em indivíduos que não desenvolveram silicose. Até o momento não existem exames laboratoriais específicos para o diagnóstico da doença, de modo que o conhecimento de marcadores biológicos associados à imunopatologia da silicose pode ser importante na detecção precoce da instalação e desenvolvimento da doença. O presente artigo traz uma revisão de estudos que investigaram os possíveis biomarcadores inflamatórios da doença no sangue e no lavado bronco-alveolar de humanos e de modelos experimentais.

Palavras-chave: Silicose, Sistema Imunológico, Citocinas e Quimiocinas.

Abstract

Silicosis is an important public health problem worldwide, especially in developing countries and is the leading cause of disability among occupational respiratory diseases. It is a fibrotic disease irreversible and potentially fatal caused by inhaling dust containing crystalline silica, the most frequent type of pneumoconiosis. Diagnosis is established by clinical and occupational history of exposure to silica, in the presence of radiological changes. Experimental and clinical studies suggest that inhalation of silica dust is associated with pulmonary and systemic inflammation even in patients who did not develop silicosis. There are no specific tests for the routine laboratory diagnosis of the disease and the study of biological markers associated with the immunopathology of silicosis is important to understanding the establishment and development of silicosis. This article presents a review of studies investigating the possible inflammatory biomarkers of disease in blood and bronchoalveolar lavage from humans and experimental models.

Keywords: Silicosis, Immune System, Cytokines and Chemokines.

Introdução

A silicose é uma doença pulmonar fibrótica causada pela inalação da poeira de sílica cristalina que pode levar a morte. Evidências clínicas e experimentais mostram alterações inflamatórias significativas no pulmão e no sangue de pacientes e de animais expostos à poeira da sílica. O estudo dos biomarcadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da silicose é considerado um componente importante no diagnóstico e tratamento desta doença. O objetivo da presente revisão é apresentar estudos da literatura que avaliaram o perfil inflamatório de humanos e de modelos animais com silicose.

Conceito e etiologia

O dióxido de silício, composto natural mais encontrado na crosta terrestre, constitui a sílica (SiO_2), substância responsável pela etiologia da pneumoconiose denominada silicose. Trata-se de uma doença pulmonar ocupacional causada pela inalação da poeira da sílica cristalina, potencialmente progressiva, irreversível e que pode levar à incapacidade (SILICOSIS AND SILICATE DISEASE COMMITTEE, 1988). A sílica possui ainda potencial carcinogênico humano reconhecido desde o início da década de 90 (RAYMOND; WINTERMEYER, 2006).

Epidemiologia

Nos países em desenvolvimento, a maioria das doenças ocupacionais respiratórias é constituída pelas pneumoconioses, sendo a silicose a mais comum delas. A inalação da poeira de sílica ocorre em tarefas como as de corte, perfuração, trituração ou escavação de pedra, pedreiras e minas (SILICOSIS AND SILICATE DISEASE COMMITTEE, 1988; RAYMOND; WINTERMEYER, 2006). Estima-se que, anualmente, milhares de trabalhadores expostos à poeira de sílica em todo o mundo morrem de silicose e desde o fim da década de 90 a OMS (Organização Mundial da Saúde) em conjunto com a OIT (Organização Internacional do Trabalho), iniciaram o programa mundial de eliminação da silicose (FEDOTOV, 1997).

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, o número aproximado de trabalhadores potencialmente expostos a poeiras contendo sílica no país foi de aproximadamente seis milhões de pessoas em 2007, considerando apenas o mercado formal de trabalho (ALGRANTI et al., 2007). No entanto, dados sobre a epidemiologia da silicose no país permanecem escassos e o último trabalho que investigou a prevalência das doenças ocupacionais respiratórias no Brasil, foi feito há três décadas (MENDES, 1979). A maior parte dos casos diagnosticados é proveniente do estado de Minas Gerais, conhecido pelos seus

ricos depósitos de minério, e as atividades de mineração que começaram no século XVII e ainda têm grande importância para a economia da região. Estudos recentes mostraram a preocupante ocorrência de silicose dentre lapidários e garimpeiros, com registro de formas graves da doença acometendo indivíduos jovens com forte impacto sobre a função pulmonar (CHIAVEGATTO, 2010).

Diagnóstico

A inalação da poeira de sílica faz com que o pulmão reaja através de resposta imune, com proliferação de fibroblastos e deposição excessiva de colágeno. Em última instância, há o desenvolvimento de nódulos fibróticos e cicatrizes ao redor das partículas de sílica, resultando em fibrose intersticial nodular (SILICOSIS AND SILICATE DISEASE COMMITTEE, 1988; RAYMOND; WINTERMEYER, 2006).

A silicose é diagnosticada através da integração da história de exposição à sílica, das características das imagens radiológicas e da história clínica. A biópsia pulmonar raramente é necessária (SILICOSIS AND SILICATE DISEASE COMMITTEE, 1988; ALGRANTI et al., 2007). O desenvolvimento de novos métodos que auxiliem no diagnóstico precoce da doença justifica-se pelo alto número de trabalhadores expostos à sílica em países como os emergentes.

Biomarcadores da inflamação

A inflamação pulmonar causada pela sílica cristalina inalada é caracterizada por um infiltrado celular e acúmulo de quimiocinas e citocinas avaliados no lavado bronco-alveolar (LBA) e no plasma sanguíneo (SUN et al., 2010; SATO et al., 2008).

A inflamação induzida pela sílica é um processo complexo no qual a interação de partículas de sílica com as células do pulmão é seguida pela liberação de mediadores inflamatórios (SUN et al., 2010; GIUSEPPE et al., 2009). A doença inicialmente se desenvolve com o recrutamento de células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos, linfócitos) no pulmão, controladas por citocinas múltiplas como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina (IL)-6 (TRIPATHI et al., 2010).

Alguns estudos documentaram que citocinas como fator de crescimento tumoral (TGF)- β , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 são moléculas que participam do processo inflamatório na silicose pulmonar (TIWARI, 2005; CASTRO, 2000) e as concentrações séricas das quimiocinas proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa (MIP-1 α), proteína inflamatória de macrófagos-1 beta (MIP-1 β), proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2), quimiocinas CXC (CXCL-1, CXCL-2, CXCL-3, CXCL-5, CXCL-6) e CCL-8 também devem ser investigadas nessa condição (TRIPATHI et al., 2010; CHARO; RANSOHOFF, 2006). Entretanto, tais evidências apresentam restritas contribuições para caracterizar a resposta inflamatória sistêmica em geral, e não são utilizadas na rotina da prática clínica.

Uma das características da silicose é a disfunção imune sistêmica e pulmonar caracterizada em parte pela elevação das imunoglobulinas presentes no plasma e no LBA (HUANG et al., 2001). Para ilustrar os autores do presente estudo propõem a figura 1.

Como é bem conhecido, os macrófagos alveolares têm um papel central na evolução da silicose (FANNING, 2004). Os linfócitos CD4+ atuam em dois tipos de respostas imunes em duas subpopulações efetoras conhecidas como Th-1 ou Th-2. Dessa forma, o perfil de citocinas produzidas pelos macrófagos tem uma função principal na determinação do tipo e manutenção da resposta imune dos tipos Th-1 ou Th-2.

A resposta Th-1 domina a ativação de macrófagos, formação de granulomas e hipersensibilidade tardia, e atua como uma resposta primária essencial para patógenos intracelulares infecciosos. Ela é induzida por interferon-gama (IFN- γ), IL-12, e IL-18 e é suprimida por IL-4 e IL-6 (DIEHL et al., 2000). As células da resposta Th-1 produzem

principalmente as citocinas IL-2, IL-3, fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), TNF- α e IFN- γ . A resposta Th-2 é abundante nas alergias e infecções. As células Th-2 promovem respostas aos anticorpos imunoglobulinas (Ig)E e IgG1, são induzidas pela IL-4 e IL-6, suprimidas por IFN- γ , e produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-2. As citocinas IFN- γ e IL-4 podem servir como marcadores, respectivamente, para as respostas Th-1 e Th-2.

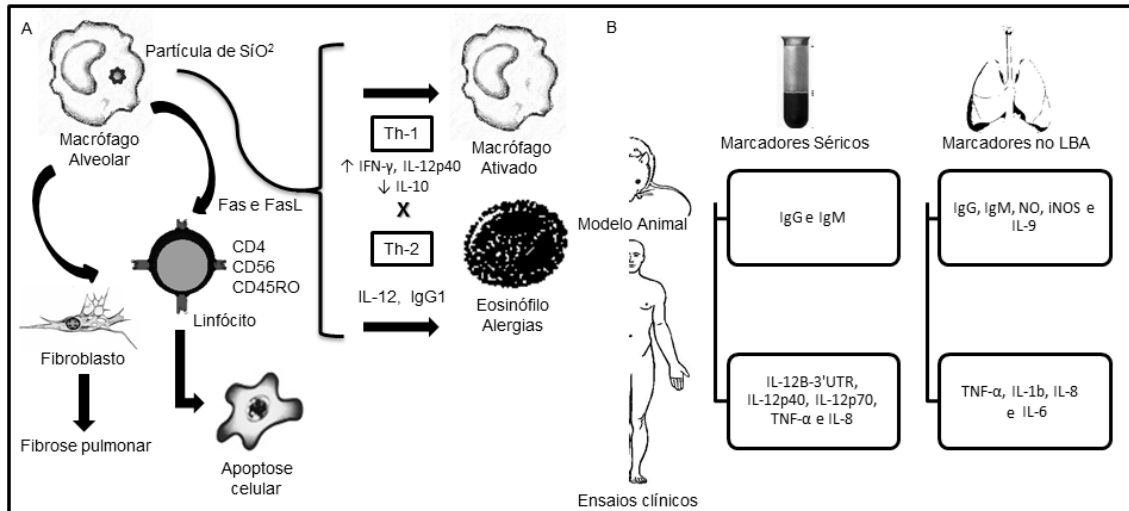


Figura 1 - Esquema da imunopatologia da silicose pulmonar (A) com representação dos marcadores inflamatórios séricos e do LBA de seres humanos e de modelos experimentais (B).

Estudos mostraram resultados contraditórios em relação às respostas imunes Th-1 e Th-2 envolvidas na fibrose pulmonar induzida por partículas de sílica (DOBREVA et al. 2010). Por exemplo, Huax et al. (1999) investigaram a expressão de proteínas do RNA mensageiro de IL-12 (p70) e de suas subunidades (p40 e p35) em homogenatos de pulmão, no LBA e culturas de células do LBA em camundongos com alveolite fibrosante induzidas por partículas inorgânicas. Os resultados deste estudo mostraram que a alveolite fibrosante induzida por sílica é acompanhada por um padrão de resposta imune Th-2 caracterizada por uma superprodução prolongada da subunidade p40 da IL-12 e IgG1 no pulmão. Em contraste, Garn et al. (2000) avaliaram a ativação das células T pela análise da expressão de citocinas nos linfonodos torácicos de ratos após exposição à sílica. Esses autores mostraram uma mudança na resposta do tipo Th-1 com aumento da expressão gênica de IFN- γ e IL-12p40 e diminuição da expressão do gene para a IL-10.

A citocina IL-12, uma citocina heterodimérica produzida por macrófagos, monócitos e células dendríticas (células apresentadoras de antígenos), é um dos principais atuantes no aumento da produção de IFN- γ nos linfócitos do pulmão e dos linfonodos torácicos na silicose (SCHOENHAULT et al., 1992; IWATSUBO et al., 1998). Esta citocina tem a capacidade de induzir a secreção de IFN- γ pelas células T e células *natural killer* (NK), e gerar respostas normais do tipo Th-1. Por outro lado também foi observado que o eixo de produção de IL-12 induzindo a produção de IFN- γ não foi essencial para a manifestação de silicose em camundongos expostos à sílica (DAVIS et al., 2006). Um estudo realizado por Huax et al. (2002) demonstrou que IL-12p40 tem uma produção aumentada durante o estabelecimento do processo de fibrose experimental. Sendo que este marcador, consiste em uma subunidade comum de duas citocinas heterodiméricas, IL-12p70 (p40/p35) e IL-23 (p40/19).

A associação positiva entre a quantidade de TNF- α e IL-12p70 e IL-23 em sujeitos expostos a sílica mostrou a ativação da resposta imune Th-1 após a exposição a sílica, mas

não esteve associada com o desenvolvimento da silicose. Também foi observado que a resposta imune do tipo Th-2 pode desempenhar um papel central no desenvolvimento da silicose. O equilíbrio entre citocinas contendo IL-12p40, que regem a resposta imune Th-1/Th-2, também pode contribuir para a progressão da doença (SLAVOV et al., 2010).

Outros mecanismos também parecem estar envolvidos na imunopatologia da silicose, dentre eles está a apoptose das células do epitélio alveolar induzida por partículas de sílica. Neste contexto, o receptor Fas é uma proteína que desempenha um papel fundamental no mecanismo de controle de morte celular. De fato, estudos pioneiros elucidaram claramente a contribuição da apoptose durante a silicose, mostrando que camundongos deficientes para Fas ligante (FasL) foram resistentes ao desenvolvimento da silicose e o tratamento com o anticorpo anti-FasL impediu completamente a extensão da fibrose pulmonar induzida por sílica nesses animais (BORGES et al., 2001). Em seres humanos, as concentrações séricas de FasL foram significativamente maiores em indivíduos silicóticos quando comparados a indivíduos saudáveis. A expressão reduzida de genes inibitórios para apoptose mediada pelo Fas e a expressão de mRNA de Fas solúvel em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com silicose foi demonstrada (TOMOKUNI et al., 1999) indicando o envolvimento de sinais apoptóticos nessas células. Da mesma forma, Hamzaoui et al. (2003) com o objetivo de compreender o papel da apoptose através da interação do Fas / FasL na patogênese da doença, avaliaram pacientes com silicose e encontram maior expressão de Fas e FasL nos pacientes quando comparados aos controles saudáveis. Em pacientes com silicose, FasL foi altamente expresso nos linfócitos CD4, CD56 e CD45RO nas células do LBA (CASTRANOVA et al., 2002).

Outro estudo relatou que a silicose experimental foi associada com elevadas concentrações de IgG e IgM no sangue e no LBA em relação ao grupo controle. Além disso, os linfonodos pulmonares foram os locais onde houve maior aumento de IgG e produção de IgM na silicose experimental, com os pulmões contribuindo em menor grau. (HUANG et al., 2001).

Tanto em seres humanos quanto em animais com silicose, existe o acúmulo de linfócitos próximo ao tecido pulmonar, como no caso do LBA. É importante ressaltar que foi observado, no LBA de pacientes com silicose, um aumento nas subpopulações de linfócitos T imaturos (CD4⁺ e CD8⁺) e um aumento na produção local de imunoglobulinas acompanhando a gravidade da doença (FERREIRA et al., 2000).

Por outro lado, a IL-9 é capaz de reduzir o processo pulmonar fibrótico induzido pelas partículas cristalinas de sílica em camundongos. Esta redução do processo de fibrose está associado com uma redução da resposta imune do tipo 2 induzida pela sílica e pela expansão dos linfócitos B no parênquima pulmonar (ARRAS et al., 2001).

O IFN- γ pode ser um sinal importante de condução da diferenciação de linfócitos e ativação de macrófagos para a silicose (DAVIS; PFEIFFER; HEMENWAY, 2000). Embora se tenha observado que, o eixo de IL-12 dirigindo a produção de IFN- γ não foi essencial para a manifestação plena de silicose em camundongos expostos à sílica (SUN et al., 2010).

Os macrófagos alveolares são a principal fonte do óxido nítrico (NO) produzido pelas células do LBA durante a resposta inflamatória pulmonar aguda de ratos expostos à sílica (HUFFMAN et al., 2003). A enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), derivada de NO pode estar envolvida na doença pulmonar provocada pela sílica e foi sugerido que os derivados da iNOS contribuem para a patogênese da doença em ratos (DAVIS; PFEIFFER; HEMENWAY, 2000). A geração de oxidantes e NO, em particular, foi associada ao desenvolvimento de dano pulmonar, inflamação, formação de granulomas e fibrose (ZEIDLER et al., 2004).

Pacientes com silicose apresentaram redução significativa dos linfócitos totais comparados aos controles. No LBA as concentrações das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6

foram significativamente maiores do que nos controles. Em pacientes com silicose, o percentual de macrófagos encontrava-se positivamente correlacionados com as concentrações de IL-1 β (HAMZAOUI et al., 2003).

Várias citocinas ativadas pela inalação da sílica cristalina mediam o processo inflamatório que causa dano ou fibrose ao tecido pulmonar, como ocorre na silicose. Além da fibrose pulmonar decorrente da proliferação de fibroblastos e deposição excessiva de colágeno, outra alteração presente na silicose é a disfunção imune sistêmica (DOBREVA et al., 2010).

Isso pode ser visto em um estudo (SLAVOV et al., 2010) que pesquisou o papel do polimorfismo do IL-12B-3'UTR na susceptibilidade e gravidade de silicose e sua influência sobre o nível sérico de IL-12p40 e IL-12p70. As concentrações séricas de IL-12p40 foram elevadas em um grupo de 62 pacientes com silicose em contraste com a IL-12p70. Em pacientes com silicose grave foi detectada concentração maior de IL-12p40 e menor nos pacientes com silicose moderada, enquanto que na silicose leve, as concentrações de IL-12p40 foram semelhantes aos indivíduos saudáveis. Também foi encontrado que a elevação das concentrações séricas de IL-12p40, independentemente das concentrações de IL-12p70, está associada com gravidade de silicose, o que permitiu sugerir que a atividade da IL-12p40 pode contribuir para a gravidade da silicose (STANILOVA; MITEVA; PRAKOVA, 2007).

Da mesma forma a concentração de TNF- α foi significativamente maior em indivíduos saudáveis expostos à sílica em comparação com indivíduos não expostos saudáveis e semelhantes ao dos pacientes com silicose. O grupo de pacientes com silicose apresentou concentração significativamente maior de IL-12p40 em comparação aos indivíduos saudáveis não expostos. Além disso, houve forte correlação positiva entre as concentrações de TNF- α e IL-23 e entre TNF- α e IL-12p70 no grupo dos indivíduos expostos sem silicose. Já os indivíduos com silicose, apresentaram uma correlação positiva significativa somente entre o TNF- α e IL-12p40 (SLAVOV et al., 2010).

Além do conhecido papel do TNF- α na fisiopatologia da silicose, Lee et al. (2010) analisaram as concentrações séricas de IL-8 e examinaram a relação entre as concentrações iniciais dessas citocinas e as mudanças progressivas em um ano na pneumoconiose de trabalhadores de minas de carvão. Dessa forma, puderam sugerir que as concentrações elevadas de IL-8 estão associadas com a presença de pneumoconiose nos mineradores de carvão e que o aumento de TNF- α sérico está associado com a progressão da doença, sendo que os indivíduos com pneumoconiose progressiva apresentaram maior concentração de TNF- α quando comparados com os indivíduos com pneumoconiose não progressiva.

A Tabela 1 enumera os principais achados encontrados em ensaios clínicos desenvolvidos com intuito de melhor esclarecer o componente imunopatológico da silicose.

Tabela I – Características dos ensaios clínicos. LBA: Lavado bronco alveolar

Referência	Sujeitos	Método	Principais resultados
Hamzaoui <i>et al</i> (2003)	10	LBA/Citometria	FasL foi expresso significativamente em células efectoras citotóxicas e células de memória. Fas/FasL foi associado ao processo inflamatório da silicose
Lee <i>et al</i> (2010)	88 (mineiros com pneumoconiose)	Soro/ELISA – Cytokine Array	Elevação de IL-8 foi associada à pneumoconiose nos mineiros de carvão e de TNF- α sérico à progressão da doença
Otsuki, <i>et al</i> (1998)	69	Sangue periférico / RT-PCR	A expressão do FAS mensageiro solúvel predominou nos casos com silicose inibindo a apoptose de clones que se auto-reconhecem. Estes clones podem sobreviver por décadas e serem responsáveis pelo aparecimento de doenças autoimunes.
Slavov <i>et al</i> (2010)	62 (silicose) e 24 (sujeitos expostos à sílica saudáveis)	Soro/ELISA	O aumento de TNF- α e IL-12p40 foi associado ao desenvolvimento e gravidade da silicose. As citocinas contendo IL-12p40 podem contribuir para a progressão da silicose.
Syslová <i>et al</i> (2009)	20	Exalado pulmonar condensado, plasma e urina/LC-ESI-MS/MS	Concentrações elevadas de marcadores de estresse oxidativo.
Tomokuni <i>et al</i> (1999)	82	Soro/ELISA	Não houve elevação sérica de sFasL em pacientes com silicose.
Zhai <i>et al</i> (2004)	16	LBA/ELISA	As células predominantes no LBA na silicose foram os macrófagos. Aumento de TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6. Foi encontrada relação entre IL-1 β e macrófagos.

Perspectivas futuras

Embora a silicose seja prevenível por meio de melhorias nos processos e ambientes de trabalho, esta doença continua sendo um grave problema de saúde no mundo, associada a um elevado índice de morbidade e mortalidade (RAYMOND; WINTERMEYER, 2006). A silicose não possui diagnóstico laboratorial disponível. O advento da tomografia computadorizada permitiu a identificação de alterações mais precoces do que o observado com o uso da radiografia convencional nos indivíduos expostos à sílica (RAYMOND; WINTERMEYER, 2006). Contudo, a realização de exames de alto custo na conduta diagnóstica de doenças como as crônicas não transmissíveis ainda permanece distante da realidade da saúde pública dos países como o Brasil.

Outras abordagens devem ser encorajadas para esclarecer o papel dos biomarcadores inflamatórios (principalmente as quimiocinas e citocinas) na imunopatologia da silicose, e desta forma espera-se a obtenção de novas abordagens que poderão auxiliar inclusive no tratamento dessa afecção.

Recentemente, foi verificado em modelo murino de silicose o aumento da expressão do mRNA no tecido pulmonar dos marcadores IL-1 β , IL-1 α , antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RN), TGF- β e caspase-3 no grupo com silicose em comparação ao controle. Sendo que, a terapia celular foi capaz de diminuir a expressão do mRNA destes marcadores no pulmão dos animais tratados atenuando os efeitos da fibrose pulmonar induzida pela sílica (MARON et al., 2011).

Considerações Finais

O papel da inflamação no desenvolvimento da silicose tem sido cada vez mais aceito como indispensável no entendimento da evolução dessa doença, embora não sejam conhecidos biomarcadores inflamatórios específicos a essa condição. Nessa perspectiva, muitos estudos foram realizados para esclarecer o componente imunopatológico da silicose. Tentativas essas que têm sido feitas por diferentes abordagens, seja pela coleta do LBA seja pela análise dos biomarcadores séricos, tanto em ensaios clínicos quanto em modelos experimentais. No entanto, há necessidade de estudos que busquem a relação entre os marcadores biológicos presentes no plasma e no LBA com a gravidade radiológica, funcional e a carga e o tempo de exposição à sílica. Acrescenta-se que nenhuma terapia específica está disponível (GIUSEPPE et al., 2009) fundamentada em ensaios clínicos (BANG; MAZUREK, 2005). Promissores tratamentos a serem investigados são os que utilizam terapia celular, inibidores de macrófagos ou substâncias que neutralizem os potenciais efeitos das citocinas e quimiocinas inflamatórias presentes nessa condição.

Referências

- ALGRANTI, E. et al. Sistema Respiratório. In: Mendes, R. **Patologia do Trabalho**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007. p. 1341-1354.
- ARRAS, M. et al. Interleukin-9 Reduces Lung Fibrosis and Type 2 Immune Polarization Induced by Silica Particles in a Murine Model. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 24, p. 368-375, 2001.
- BANG, K. M.; MAZUREK, J. M. Silicosis mortality, prevention, and control-United States, 1968–2002. **MMWR**, v. 54, n. 16, p. 401-5, 2005.
- BORGES, V. M. et al. Fas ligand triggers pulmonary silicosis. **J Exp Med**, v. 194, n. 2, p. 155-64, 2001.

CASTRANOVA, V. et al. Effect of inhaled crystalline silica in a rat model: Time course of pulmonary reactions. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 234, p. 177-184, 2002.

CASTRO, H. A. **Busca de Marcadores Inflamatórios IL-1 β , IL-6 e TNF α em trabalhadores expostos a poeiras minerais**. 2000. 145 f. Tese de Doutorado - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. **N Engl J Med**, v. 354, p. 610-621, 2006.

CHIAVEGATTO, C. V. et al. Diagnosis of severe silicosis in young adults working in stone polishing and mining in Minas Gerais, Brazil. **Int J Occup Environ Health**, v. 16, n. 2, p. 147-50, 2010.

DAVIS, G. S.; PFEIFFER, L. M.; HEMENWAY, D. R. Interferon- γ Production by Specific Lung Lymphocyte Phenotypes in Silicosis in Mice. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 22, p. 491-501, 2000.

DAVIS, G. S. et al. Interleukin-12 is not essential for silicosis in mice. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 3, n. 2, p. 1-16, 2006.

DIEHL, S. et al. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. **Immunity**, v. 13, p. 805-15, 2000.

DOBREVA, Z. G. et al. Changes of cytokine production and cell viability of peripheral blood mononuclear cells from silicosis patients: effect of in vitro treatment with acetylsalicylic acid. **Toxicol Ind Health**, v. 26, n. 1, p. 3-9, 2010.

FANNING, F. Hazards of crystalline silica. **Engineer**, v. 34, n. 3, p. 36-41, 2004.

FEDOTOV, I. A. Global Elimination of Silicosis: **The ILO/WHO International Programme**. Mineral dusts and prevention of silicosis, v. 4, n. 2, 1997.

FERREIRA, A. et al. Caracterização imunofenotípica das subpopulações de linfócitos do lavado broncoalveolar de pacientes com silicose. **J Bras Pneumol**, v. 26, n. 3, p. 107-12, 2000.

GARN, H. et al. Experimental silicosis: a shift to a preferential IFN- γ -based Th1 response in thoracic lymph nodes. **American Journal of Physiology, Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 278, p. 1221-30, 2000.

GIUSEPPE M. et al. Systemic Inhibition of NF- κ B Activation Protects from Silicosis. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. 5689, 2009.

HAMZAOUI, A. et al. Expression of Fas antigen and Fas ligand in bronchoalveolar lavage from silicosis patients. Silicosis, Inflammation, Fas, Fas ligand. **Mediators of Inflammation**, v. 12, n. 4, p. 209-14, 2003.

HUANG, S. H. et al. Immunoglobulin Responses to Experimental Silicosis. **Toxicol sci**, v.59, n. 1, p. 108-17, 2001.

HUAUX, F. et al. Lung fibrosis induced by silica particles in NMRI mice is associated with an upregulation of the p40 subunit of interleukin-12 and Th-2 manifestations. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 20, p. 561-72, 1999.

HUAUX, F. et al. A profibrotic function of IL-12p40 in experimental pulmonary fibrosis. **J Immunol**, v. 169, n. 5, p. 2653-61, 2002.

HUFFMAN, L. J. et al. Nitric oxide production by rat bronchoalveolar macrophages or polymorphonuclear leukocytes following intratracheal instillation of lipopolysaccharide or silica. **J. Biosci**, v. 28, n. 1, p. 29-37, 2003.

IWATSUBO, Y. et al. Pleural mesothelioma: dose-response relation at low levels of asbestos exposure in a French population-based case-control study. **Am J Epidemiol**, v. 148, p. 133-42, 1998.

LEE, J. S. et al. Serum Levels of Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor-alpha in Coal Workers' Pneumoconiosis: One-year Follow-up Study. **Saf Health Work**, v. 1, p. 69-79, 2010.

MARON, G. T. et al. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy attenuates silica induced lung fibrosis. **Eur Respir J**, v. 37, n. 5, p. 1217-25, 2011.

MENDES, R. Estudo epidemiológico sobre Silicose pulmonar na região Sudeste do Brasil através de inquérito em pacientes internados em hospitais de tisiologia. **Rev Saúde Pública**, v. 13, n. 7, p. 7-17, 1979.

OTSUKI, T. et al. Soluble Fas mRNA is dominantly expressed in cases with silicosis. **Immunology**, v. 94, n. 2, p. 258-62, 1998.

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

SATO T. et al. Suppressive Oligodeoxynucleotides Inhibit Silica-Induced Pulmonary Inflammation. **J Immunol**, v. 180, n. 11, p. 7648-54, 2008.

SCHOENHAULT, D. S. et al. Cloning and expression of murine IL-12. **J Immunol**, v. 148, p. 3433-40, 1992.

SILICOSIS AND SILICATE DISEASE COMMITTEE. Diseases associated with exposure to silica and nonfibrous silicate minerals. **Arch Pathol Lab Med**, v. 112, p. 673-720, 1988.

SLAVOV, E. et al. Correlation between TNF- α and IL-12p40-containing cytokines in silicosis. **Toxicol Ind Health**, v. 26, n. 8, p. 479-86, 2010.

STANILOVA, S.; MITEVA, L.; PRAKOVA, G. Interleukin-12B-3'UTR polymorphism in association with IL-12p40 and IL-12p70 serum levels and silicosis severity. **Journal**

Compilation Blackwell Publishing Ltd, International Journal of Immunogenetics, v. 34, p. 193-199, 2007.

SUN Y. et al. New anti-fibrotic mechanisms of n-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline in silicon dioxide-induced silicosis. **Life Sci**, v. 87, n. 7-8, p. 232-9, 2010.

SYSLOVÁ, K. et al. Rapid and easy method for monitoring oxidative stress markers in body fluids of patients with asbestos or silica-induced lung diseases. **J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 877, p. 2477–86, 2009.

TIWARI, R. R. Biomarkers of silicosis: Potential candidates. **Ind J Occup Envir Med**, v. 9, n. 3, p. 103-6, 2005.

TOMOKUNI, A. et al. Serum levels of soluble Fas ligand in patients with silicosis. **Clin Exp Immunol**, v. 118, p. 441-444, 1999.

TRIPATHI, S. S. et al. IL-6 receptor-mediated lung Th2 cytokine networking in silica-induced pulmonary fibrosis. **Arch Toxicol**, v. 84, n. 12, p. 947-55, 2010.

ZEIDLER, P.C. et al. Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 67, p. 1001-1026, 2004.

ZHAI, R. et al. Differences in Cellular and Inflammatory Cytokine Profiles in the Bronchoalveolar Lavage Fluid in Bagassosis and Silicosis. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 46, p. 338–344, 2004.

Em 29/08/2013, às 14:12, "Arquimedes Gasparotto Junior" <gasparotto@unipar.br> escreveu:

Prezados Autores,

Tenho o prazer de informá-los que o seu trabalho intitulado **BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NA SILICOSE PULMONAR** foi aceito para publicação na Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR.

Declaramos que o referido trabalho será publicado no volume 16, número 2, Maio-Agosto do ano de 2012.

Agradecemos por considerar nosso periódico para publicação.

Com os melhores cumprimentos.

Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior
 Editor - Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR
 + 55 (44) 3621 2828
 + 55 (44) 3621 2830
 e-mail: gasparotto@unipar.br
