

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

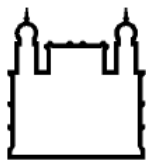
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

PAPEL REGULATÓRIO DA ANEXINA-1 E DE SEU DERIVADO Ac2-26 NO
MODELO MURINO DE SILICOSE AGUDA

PATRÍCIA GONÇALVES TRENTIN

Rio de Janeiro

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Patrícia Gonçalves Trentin

Papel regulatório da Anexina-1 e de seu derivado Ac2-26 no modelo murino de silicose aguda

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadores: Dra. Patrícia Rodrigues Machado e Silva Martins.

Dr. Marco Aurélio Martins

RIO DE JANEIRO

2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

T723

Trentin, Patrícia Gonçalves.

Papel regulatório da Anexina-1 e de seu derivado Ac2-26 no modelo murino de silicose aguda. / Patrícia Gonçalves Trentin. – Rio de Janeiro, 2011.

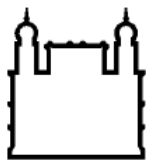
vii, 109 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.

Bibliografia: f. 69-76

1. Silicose. 2. Anexina-1. 3. Peptídeo Ac2-26. 4. Camundongo. 5. Inflamação pulmonar. 6. Fibrose. I. Título.

CDD 616.244



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Autora: Patrícia Gonçalves Trentin

PAPEL REGULATÓRIO DA ANEXINA-1 E DE SEU DERIVADO Ac2-26 NO MODELO MURINO DE SILICOSE AGUDA

Orientadores: Dra. Patrícia Rodrigues Machado e Silva Martins

Dr. Marco Aurélio Martins

Aprovada em: 07/04/2011

Examinadores:

Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto (Presidente)

Dra. Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério

Dra. Cláudia Farias Benjamim

Dra. Patrícia Dias Fernandes

Dr. Vinicius de Frias Carvalho

Rio de Janeiro, 07 de abril de 2011.

*À Deus
Pela vida e por tudo conquistado
nela.*

*Aos meus pais, Avelino e Liene, pelos seus
valorosos princípios, guiados pelo eterno
carinho e amor.*

*Aos meus irmãos, Andréa, Marcelo, Ricardo,
Robson e Márcia (in memoriam), pelo imenso
apoio.*

*Ao Igor, namorado e amigo, pela força
incondicional, paciência, compreensão e amor.*

Agradecimentos

- ✓ À minha família por todos os momentos de apoio;
- ✓ Ao meu namorado, Igor, pela enorme paciência, amor e carinho, tornando esse momento mais “leve” e mais fácil de ser conduzido;
- ✓ À minha orientadora, Dra. Patrícia M. R. e Silva, por aceitar o desafio da minha orientação e permitir essa grande oportunidade que proporcionou o meu crescimento científico;
- ✓ Ao chefe de laboratório e co-orientador, Dr. Marco Aurélio Martins, e ao pesquisador Dr. Renato Cordeiro, pela honra de poder fazer parte de seu grupo e por todos os conhecimentos transmitidos;
- ✓ Aos pesquisadores Dr. Mauro Perretti e Dr. Roderick Flower pela grande oportunidade concedida para a realização do estágio (doutorado – sanduíche) em seu laboratório e pela cessão dos animais ANX1^{-/-} para realização desse trabalho;
- ✓ Aos pesquisadores: Ana Lucia Pires, Dra. Edna Valotta, Dra. Luciana Pontes, Dra. Mágda Fráguas, Dra. Patrícia Jurgilas, Dra. Sandra Aurora e Dr. Vinícius Frias pelo conhecimento a ajuda sempre prestada;
- ✓ À Tatiana Paula, Ana Carolina, Aline, Amanda, Adriano, Caio, Camila, Daniela Insuela, Gina, Rodrigo e Rafaelle pela grande ajuda e amizade;
- ✓ Aos colegas de laboratório, mas principalmente grandes amigos: Bianca, Diana, Davidson, Priscilla, Thiago, Rafael, Suzana e Mariana.
- ✓ As minhas eternas alunas e amigas: Andressa, Danielle Matheus e Vanessa Mendes, que ao contrário do que possam imaginar me ensinaram muito mais que eu a elas;

- ✓ A todas as amizades que conquistei neste período e que não estão mais no laboratório e aos que estão chegando;
- ✓ Um enorme e especial agradecimento à Osirene (Dadá) por todo apoio e assistência incondicional;
- ✓ A todos os integrantes do Laboratório de Inflamação/IOC;
- ✓ À equipe do biotério setorial e do CECAL por toda a ajuda e cuidados com os animais, peças fundamentais para a realização desse trabalho aos quais também expresseo o meu agradecimento;
- ✓ À Daniele Lobato e todos os funcionários do PGBCM por toda ajuda prestada;
- ✓ Ao apoio financeiro do CNPq e CAPES para realização deste trabalho.

*“Para realizar grandes conquistas,
devemos não apenas agir, mas
também sonhar; não apenas
planejar; mas também acreditar.”*

Anatole France

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

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

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

Índice

Lista de abreviações.....	i
Lista de figuras, esquemas e tabela.....	iv
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
1. Introdução	01
1.1. Sistema respiratório	01
1.2. Pneumoconioses	02
1.3. Silicose.....	02
1.3.1. Sílica.....	02
1.3.2. Epidemiologia	03
1.3.3. Classificação clínica e diagnóstico	04
1.3.4. Fisiopatologia	05
1.3.5. Prevenção e tratamento	07
1.4. Anexina-1 e Peptídeo Ac2-26	09
1.4.1. Receptores formilados (FPR)	11
2. Objetivos	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. Materiais e Métodos.....	14
3.1. Animais	14
3.2. Indução da silicose e tratamento	14
3.3. Avaliação da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas	15
3.4. Avaliação da contração de anéis de traquéia em banho de órgão isolado ..	16
3.5. Análise histopatológica	16
3.6. Análise Morfométrica	17
3.7. Imunohistoquímica.....	18

3.8. Quantificação de colágeno.....	19
3.9. Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA	19
3.10. Obtenção de macrófagos peritoneais	20
3.11. Cultura primária de fibroblastos pulmonares.....	20
3.12. Ensaio de proliferação celular	21
3.13. Quantificação de colágeno e MCP-1 no sobrenadante de fibroblastos	21
3.14. PCR em tempo real.....	22
3.15. Análise estatística	23
4. Resultados	24
4.1. Efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a resposta inflamatória pulmonar induzida por partículas de sílica em camundongos	24
4.1.1. Análise da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de camundongos silicóticos	24
4.1.2. Análise morfológica e morfométrica do pulmão de camundongos silicóticos.....	25
4.1.3. Análise da produção de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos silicóticos	32
4.1.4. Avaliação da expressão de F4/80 e α -SMA no pulmão de camundongos silicóticos	32
4.1.4.1. Efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a proliferação e a secreção de fibroblastos pulmonares <i>in vitro</i>	36
4.1.4.2. Envolvimento dos receptores FPR1 e FPR2 no efeito do peptídeo Ac2-26 sobre fibroblastos <i>in vitro</i>	39
4.2. Avaliação do papel da proteína anti-inflamatória anexina-1 na resposta inflamatória induzida por partículas de sílica.....	46
4.2.1. Função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas em animais silicóticos.....	46
4.2.2. Análise morfológica e morfométrica do pulmão de camundongos silicóticos.....	50
4.2.3. Análise da produção de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos silicóticos	51

4.2.3.1. Influência da anexina-1 sobre a produção de citocinas por macrófagos peritoneais de camundongo	55
4.2.3.2. Papel da anexina-1 sobre fibroblastos pulmonares.....	55
5. Discussão.....	59
6. Conclusão	68
7. Referências Bibliográficas.....	69
Anexo	77

Lista de abreviações

ng	Nanograma
nm	Nanometro
α SMA	α - Actina de músculo liso
pg	picograma
μ M	Micromolar
μ m	Micrometro
ALX	Lipoxina A4
ANX1 ^{-/-}	Nocaut para a proteína anexina-1
AP-1	Proteína Ativadora - 1
BSA	Albumina Sérica Bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CEUA	Comitê de Ética e Uso de Animais
DNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Concentração efetiva 50%
EDTA	Etileno diamino tricloro acético
Emáx	Concentração efetiva máxima
EPI	Equipamento de Proteção Individual
EPM	Erro Padrão da Média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
fMLP	n-formil-metionil-fenilalanina
FPR	Receptor formilado
FPR1 ^{-/-}	Nocaut para o receptor FPR1
FPR2 ^{-/-}	Nocaut para o receptor FPR2

HE	Hematoxilina e Eosina
HRP	Neutravidin-horseradish peroxidase
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
IFN γ	Interferon gama
IL	Interleucina
kDa	Quilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MARCO	Receptor de Macrófago com estrutura colágena
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos – 1
MIP	Proteína inflamatória de macrófago
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase de matriz
NF-kB	Fator Nuclear kappa de aumento de cadeia leve de linfócitos B ativados
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação de cadeia de polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PKC	Proteína quinase C
PMN	Polimorfonucleares
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SAA	Proteína soro amilóide

SFB	Soro fetal bovino
TGF β	Fator transformador de crescimento beta
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa

Lista de figuras, esquemas e tabela

Esquema 1.1: Esquema do processo inflamatório induzido pela inalação de partículas de sílica.....	08
Esquema 1.2: Mobilização da anexina-1 em células ativadas e seu modo de ação	10
Esquema 3.1: Esquema de indução da silicose, tratamento e análise de parâmetros inflamatórios	15
Esquema 3.2: Esquema do retículo de 50 linhas e 100 pontos utilizado para a análise morfométrica	18
Figura 4.1: Análise da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de camundongos instilados com salina e sílica.....	26
Figura 4.2: Análise morfológica de pulmões de camundongos instilados com salina e sílica, submetidos ao tratamento com dexametasona e peptídeo Ac 2-26	27
Figura 4.3: Análise morfométrica de pulmões de camundongos instilados com salina e sílica, submetidos ao tratamento com dexametasona e com peptídeo Ac 2-26....	28
Figura 4.4: Marcação de fibras de colágeno em pulmões de camundongos instilados com salina e sílica, submetidos ao tratamento com dexametasona e peptídeo Ac 2-26	30
Figura 4.5: Quantificação do conteúdo de colágeno em pulmões de camundongos instilados com salina e sílica, submetidos ao tratamento com dexametasona e com peptídeo Ac 2-26	31
Figura 4.6: Quantificação de quimiocinas e citocinas em pulmões de camundongos instilados com salina e sílica	33
Figura 4.7: Análise da presença de macrófagos (F4/80) no parênquima pulmonar de camundongos instilados com salina e sílica, submetidos ao tratamento com dexametasona e peptídeo Ac2-26.....	34
Figura 4.8: Análise da presença de miofibroblastos (α -SMA) no parênquima pulmonar de camundongos instilados com salina e sílica, submetidos ao tratamento com dexametasona e peptídeo Ac2-26.....	35
Figura 4.9: Efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a proliferação de fibroblastos provenientes do pulmão de camundongos Swiss-Webster.....	37
Figura 4.10: Efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a produção de colágeno e MCP-1 a partir de fibroblastos provenientes do pulmão de camundongos Swiss-Webster.....	38

Tabela 4.1: Efeito da estimulação com IL-13 ou TGF β sobre a expressão de RNAm para receptores FPR1 e FPR2 em fibroblastos pulmonares de camundongos C57BL6	40
Figura 4.11: Produção de colágeno e MCP-1 por fibroblastos pulmonares de camundongos FPR1 ^{+/+} e FPR1 ^{-/-}	41
Figura 4.12: Efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a produção de colágeno e MCP-1 por fibroblastos pulmonares de camundongos FPR1 ^{+/+} e FPR1 ^{-/-}	42
Figura 4.13: Produção de colágeno e MCP-1 por fibroblastos pulmonares de camundongos FPR2 ^{+/+} e FPR2 ^{-/-}	44
Figura 4.14: Efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a produção de colágeno e MCP-1 por fibroblastos pulmonares de camundongos FPR2 ^{+/+} (A, C) e FPR2 ^{-/-}	45
Figura 4.15: Análise da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de camundongos ANX1 ^{+/+} e ANX1 ^{-/-} instilados com sílica.....	47
Figura 4.16: Análise da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de camundongos ANX1 ^{+/+} e ANX1 ^{-/-} avaliados na condição de aerolização com PBS e serotonina.....	48
Figura 4.17: Análise da contração de anéis de traquéias de camundongos ANX1 ^{+/+} e ANX1 ^{-/-}	49
Figura 4.18: Análise morfológica e morfométrica de pulmões de camundongos ANX1 ^{+/+} e ANX1 ^{-/-} instilados com salina e sílica.....	52
Figura 4.19: Análise de fibras de colágeno em pulmões de camundongos ANX1 ^{+/+} e ANX1 ^{-/-} instilados com salina e sílica.....	53
Figura 4.20: Quantificação de citocinas em pulmões de camundongos ANX1 ^{+/+} e ANX1 ^{-/-} instilados com salina e sílica.....	54
Figura 4.21: Avaliação da produção de TNF α e IL-6 por macrófagos peritoneais de camundongos ANX1 ^{+/+} e ANX1 ^{-/-}	56
Figura 4.22: Avaliação da proliferação de fibroblastos pulmonares de camundongos ANX1 ^{+/+} e ANX1 ^{-/-}	57
Figura 4.23: Avaliação da produção de MCP-1 por fibroblastos pulmonares de camundongos ANX1 ^{+/+} e ANX1 ^{-/-}	58

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

PAPEL REGULATÓRIO DA ANEXINA-1 E DE SEU DERIVADO Ac2-26 SOBRE A SILICOSE EXPERIMENTAL MURINA

Resumo

A silicose, uma doença ocupacional causada pela inalação de partículas de sílica cristalina, é caracterizada por intensa resposta inflamatória seguida de fibrose e formação de granulomas, e até o momento permanece sem tratamento efetivo. O processo inflamatório é regulado fisiologicamente por agentes antiinflamatórios endógenos que são capazes impedir a sua exacerbação. Glicocorticóides endógenos, cuja parte de suas ações antiinflamatórias são mediadas pela proteína anexina-1 (ANX-1), fazem parte desse contexto. No presente estudo, investigamos o papel da proteína ANX-1, e de seu derivado peptídico Ac2-26 (50 - 200 µg), na fase aguda da silicose. O esteróide clássico, dexametasona (25 µg; Dexa), foi utilizado como controle. A instilação intranasal de sílica (10 mg) em camundogno Swiss-Webster desencadeou a ocorrência de aumento no nível basal de resistência e elastância pulmonar, e hiperreatividade das vias aéreas ao agente colinérgico metacolina. Este quadro mostrou-se associado um intenso infiltrado inflamatório e deposição de colágeno, com formação de granulomas. O tratamento com Ac2-26 inibiu acentuadamente o infiltrado leucocitário, a deposição de colágeno e a formação de granulomas nos animais silicóticos, condições que foram apenas parcialmente afetadas pela Dexa. A geração de citocinas (TNF α e TGF β) e quimiocinas (KC e MCP-1) foi reduzida pelo peptídeo, porém não pela Dexa. O aumento da resistência e da elastância pulmonar, assim como a hiperreatividade à metacolina, foram inibidos tanto pelo peptídeo como pela Dexa. *In vitro*, os fibroblastos pulmonares estimulados com IL-13 e TGF β tiveram a produção de colágeno e MCP-1 inibida pelo peptídeo Ac 2-26, resposta dependente de sua ação em receptores FPR1 e FPR2. A proliferação celular não foi afetada pelo peptídeo. De forma paralela, vimos que os animais nocautes para a proteína ANX-1 e silicóticos apresentaram intensificação do infiltrado inflamatório, deposição de colágeno e produção de citocinas (KC, MIP-2 e TNF α) no parênquima pulmonar. A deficiência da ANX-1 não alterou a resistência pulmonar de animais silicóticos, porém a elastância mostrou-se exacerbada. Verificamos, ainda, que os animais nocautes para ANX-1 controles mostraram-se mais responsivos à estimulação com metacolina, porém não à serotonina, fenômeno verificado também quando da avaliação da resposta contrátil de anéis de traquéia *ex-vivo*. Em conjunto, nossos resultados mostram, de forma original, que o peptídeo Ac 2-26 foi capaz de inibir o componente inflamatório e fibrótico da fase aguda da silicose, indicando ser este um composto promissor para utilização no tratamento de doenças inflamatórias fibróticas como a silicose. Além disso, demonstramos que a ausência da ANX-1 exacerbou a fase aguda da silicose, reforçando achados prévios que apontam para a atividade antiinflamatória desta proteína também ao nível de fisiopatologias pulmonares.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

THE REGULATORY ROLE OF ANNEXIN-1 AND DERIVED Ac2-26 ON MURINE
MODEL OF ACUTE SILICOSIS

Abstract

Silicosis is an occupational disease caused by inhalation of crystalline silica particles and is characterized by an intense inflammatory response followed by fibrosis and granuloma formation. There is no effective treatment for silicosis until now. The inflammatory process is physiologically regulated by endogenous antiinflammatory agents that are able to prevent its exacerbation. Endogenous glucocorticoids, which have part of their antiinflammatory actions mediated by the protein annexin-1 (ANX1), are very important in that context. We investigated the role of ANX1, and its derived peptide, Ac2-26 (50 - 200 µg) on the acute silicosis. The classical steroid dexamethasone (25 µg; Dexa) was used as a control. The intranasal instillation of silica (10 mg) in mice induced an increase of the baseline of pulmonary resistance and elastance and airways hyperreactivity to bronchoconstrictor methacholine, associated with an intense inflammation and collagen deposition with granuloma formation. Treatment with Ac2-26 inhibited markedly leukocyte infiltration, collagen deposition and granuloma in silicotic Swiss-Webster mice, phenomena partially affected by Dexa. The generation of cytokines (TNF α and TGF β) and chemokines (KC and MCP-1) was inhibited by Ac2-26 but not by Dexa. Increased lung resistance and elastance as well as airways hyperreactivity to methacholine were abolished by Dexa and Ac2-26. *In vitro*, incubation of lung fibroblasts with Ac2-26 inhibited IL-13 and TGF β collagen and MCP-1 production, a response mediated by FPR1 and FPR2 receptors. Cell proliferation was not affected by the peptide. In parallel, we found that silicotic ANX1 knockout mice showed more intense inflammatory infiltrate, collagen deposition and mediator production (KC, MIP-2 and TNF α) in the lung parenchyma. ANX1 deficient mice showed exacerbation of elastance, but not of pulmonary resistance. Airways hyperreactivity in silicotic mice was more intense under condition of stimulation with methacholine. Interestingly, we showed that the ANX1 knockout mice were more responsive to methacholine stimulation, but not to serotonin, a phenomenon also observed in the system of tracheal ring contraction *ex vivo*. Taken together, our results show that the Ac2-26 peptide was able to inhibit the inflammatory and fibrotic components of the acute phase of silicosis, indicating that this compound is a promising tool for future use in the treatment of inflammatory diseases such as silicosis. Furthermore, we demonstrated that the absence of ANX1 exacerbated the acute phase of silicosis, reinforcing previous findings and showing that the antiinflammatory activity of this protein is also extended to the respiratory system. A potential regulatory role of ANX1 of the contractile response of the airways was also proposed.

1. Introdução

A maioria das doenças, de modo geral, é desencadeada pelo estabelecimento de um processo inflamatório, acompanhado pelo fenômeno fisiológico de reparo tecidual. À reparação tecidual está associado ao desenvolvimento da fibrose, a qual se caracteriza pela exacerbação da produção de matriz extracelular e proliferação de células mesenquimatosas, o que acarreta muitas vezes na perda da função tecidual. Neste contexto se enquadram diversas doenças pulmonares caracterizadas pela alteração da função pulmonar, devido a mudanças na arquitetura do tecido e consequentemente da troca gasosa.

1.1. Sistema respiratório

O sistema respiratório desempenha importante papel na manutenção do organismo vivo através da realização da troca gasosa entre o ar inspirado e o sangue. Este sistema garante a manutenção dos demais tecidos permitindo a oxigenação dos mesmos e mantendo o equilíbrio ácido - base. Outras funções também são atribuídas ao sistema respiratório como a fonação, produção de sons pela passagem de ar através das pregas vocais, além de importante ação na defesa do organismo, com a participação de macrófagos alveolares, células epiteliais ciliadas e a produção de muco (Levitzky MG, 2004).

O sistema respiratório é subdividido em duas regiões: (I) zona de condução e (Montes, II) zona respiratória. A primeira é constituída pela traquéia, brônquios, bronquíolos e bronquíolos terminais e tem como função levar o ar inspirado até as regiões de troca gasosa. A zona respiratória é composta pelos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e sacos alveolares, e corresponde a área onde ocorre a troca gasosa entre o sangue e o ar (West J, 2002).

Por possuir contato direto com o meio externo através da entrada de ar pelas vias de condução, o sistema respiratório é susceptível a inúmeras doenças desencadeadas pela inalação de partículas e agentes estranhos, entre eles diversos antígenos e partículas de poeira contendo minerais, como a sílica. A intensa exposição dos pulmões a corpos estranhos carregados pela inspiração de ar contaminado pode induzir diversas patologias. Estas podem variar de acordo o tipo de estímulo externo, a quantidade de partículas inspiradas e o tempo de exposição. Muitas das doenças do trato respiratório são de caráter ocupacional, devido a

exposição contínua do trabalhador a poeira, e são classificadas como pneumoconioses (Levitzky MG, 2004).

1.2. Pneumoconioses

O termo pneumoconiose foi inicialmente cunhado para caracterizar as alterações pulmonares parenquimatosas consequentes da inalação de poeira contendo partículas minerais. Atualmente, esse termo engloba doenças ocasionadas por partículas orgânicas e inorgânicas, além de fumos e vapores químicos (Lido AV, 2008; Robbins S, 2005). As alterações patogênicas observadas nas pneumoconioses variam de acordo com a quantidade de poeira inalada e retida no pulmão e nas vias aéreas, o tamanho, a solubilidade e a reatividade físico-química das partículas, além de depender de efeitos adicionais de outros irritantes como o tabaco. São conhecidas diversas pneumoconioses, dentre elas se destacam a antracose, lesão pulmonar induzida por pó de carvão, a asbestose, ocasionada pela inalação de asbesto, e a silicose causada por partículas de sílica. Esta última é a doença ocupacional crônica mais prevalente no mundo (Robbins S, 2005).

1.3. Silicose

1.3.1. Sílica

A sílica, também denominada dióxido de silício (SiO_2), é um composto natural encontrado em grande proporção na crosta terrestre. Sua molécula é formada pelos elementos químicos oxigênio e silício, podendo ser encontrada principalmente nas formas amorfa e cristalina, sendo a primeira a menos tóxica (Terra Filho M, 2006). A inalação contínua de poeira contendo partículas de sílica cristalina recém geradas em operações como jateamento de areia, perfuração de rochas, escavação de túneis e moagem, induz grande toxicidade para as células do pulmão. Esse dano se dá inicialmente devido a geração de radicais de oxigênio na superfície da partícula, tais como ânion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$) que são altamente reativos na presença do cátion ferro bivalente (Fe^{2+}) e traços de outros metais (Fubini B, 2003; Terra Filho M, 2006). A sílica cristalina tem a sua molécula arranjada na forma de um cristal tetraédrico tridimensional com radicais dispostos em sua superfície, os quais são capazes de interagir com oxigênio e nitrogênio

presentes nas membranas celulares. Essa interação resulta na perda da integridade das membranas levando a lesão tecidual. Assim, o dano contínuo promovido pela inalação de partículas de sílica cristalina acarreta no desenvolvimento da silicose (Castranova V, 2004).

1.3.2. Epidemiologia

A silicose é uma das mais antigas doenças ocupacionais. Há relatos da ocorrência dessa doença pulmonar desde a Antiguidade, no Egito, Grécia e Roma, em indivíduos envolvidos em atividades de mineração, construção e produção de peças decorativas. No entanto, o risco de exposição à sílica aumentou com o advento da industrialização no século XVII. Durante a segunda guerra mundial houve um acréscimo no número dos casos de silicose, devido à intensificação dos trabalhos em estaleiros. O brusco aumento no número de casos de silicose ao longo do tempo resultou na criação de leis que visavam o cuidado com a saúde do trabalhador, tanto na Europa quanto nos Estados Unidos (Greenberg MI, 2007; Terra Filho M, 2006).

A exposição à sílica ainda continua sendo de grande incidência, tanto em países em desenvolvimento como nos desenvolvidos. Nos Estados Unidos, por exemplo, cerca de 1,7 milhões de trabalhadores são potencialmente expostos à sílica. Enquanto que em países como Índia e China cerca de 3 milhões de indivíduos são expostos (Rees D, 2007). No Brasil não há um estudo epidemiológico conclusivo a respeito da incidência da silicose, mas estima-se que cerca de 6 milhões de trabalhadores brasileiros são expostos à sílica (Algranti E, 1998).

Segundo estudo de Ribeiro e colaboradores (2008), as atividades econômicas no Brasil de maior prevalência de exposição a partículas de sílica são a construção civil com 62% de expostos; extração mineral com 61%; indústria de minerais não metálicos, como cerâmica, vidro e cimento, com 55% e a metalúrgica com 23% de expostos. De acordo com esse estudo a prevalência total de trabalhadores expostos foi de 5,3%, considerando uma situação mais grave quando comparado a da União Européia que foi de 3,9% na Finlândia e 3,5% na República Checa.

Como a silicose é uma doença de desenvolvimento lento e pode progredir independente da exposição continuada, boa parte dos casos é diagnosticada somente anos após o trabalhador estar afastado da exposição. Em 1978 estimou-se

que o número de casos de silicose no país seria próximo a 30.000 casos, através de uma busca ativa de casos de silicose em sanatórios de tuberculose (Mendes R, 1979). Foram descritos inúmeros casos graves de silicose em escavação de poços e jateamento de areia na indústria naval (Holanda MA, 1995).

1.3.3. Classificação clínica e diagnóstico

A silicose é uma doença pulmonar restritiva caracterizada por um processo inflamatório granulomatoso e fibrose nodular. A gravidade e a progressão da doença estão associadas com o tempo de exposição e a quantidade de partículas as quais o indivíduo é exposto. Desta forma a silicose é classificada em três formas clínicas: a silicose aguda, acelerada e crônica (Ding M, 2002). A forma aguda ocorre, em geral, após meses ou poucos anos de exposição a elevadas quantidades de partículas de sílica recentemente divididas, como ocorre nas atividades de jateamento de areia e perfuração de rochas. Nesta forma clínica, o indivíduo apresenta intensa dispnéia, astenia, perda de peso e hipóxia. É observado através de radiografia infiltrado alveolar bilateral difuso, podendo haver ou não a formação de granuloma (Terra Filho M, 2006). A silicose acelerada desenvolve-se de maneira mais lenta que a forma aguda, porém apresenta alguns aspectos semelhantes a esta forma. Ocorre o desenvolvimento de lipoproteinose alveolar exsudativa associado com inflamação crônica. Além disso, há a formação de granulomas com a presença de células mononucleares, fibroblastos e acúmulo de fibras de colágeno com orientação circular (Castranova V, 2004). A forma crônica é a manifestação mais comum e se desenvolve após longos períodos de exposição, mais de dez anos. Nesta forma é observada a formação clássica de granulomas com presença concêntrica de colágeno e região central hialinizada (Terra Filho M, 2006).

O diagnóstico da silicose tem como base a observação de alterações radiológicas juntamente com a história de exposição do indivíduo à sílica. O raio x de tórax revela normalmente a presença de opacidades e, dependendo da gravidade da silicose, a presença de nódulos na região apical do pulmão. A tomografia computadorizada também constitui um importante auxílio no diagnóstico da silicose, permitindo avaliar a evolução dos nódulos e a detecção de regiões enfisematosas. Testes de função pulmonar também auxiliam no diagnóstico, principalmente nas formas mais graves e avançadas da doença (Terra Filho M, 2006).

1.3.4. Fisiopatologia

Embora a patogênese da silicose seja complexa e não totalmente esclarecida, acredita-se que a doença resulte de um ciclo de lesão celular, geração de oxidantes, inflamação e fibrose. Essa proposta envolve a citotoxicidade direta da partícula de sílica sobre células residentes como macrófagos alveolares e células epiteliais do tipo II. A ativação desses dois tipos celulares resulta na produção e liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias. Como resultado ocorre a ativação e a migração de leucócitos para o local da lesão, que acarreta na intensificação da lesão devido a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio no parênquima pulmonar (Castranova V, 2004; Fubini B, 2003).

Devido às propriedades de superfície, a sílica cristalina induz a ativação de macrófagos alveolares através de sua atuação em receptores do tipo “scavengers”, como MARCO (2008; Hamilton RF, Jr., 2006). A partícula de sílica ao ser fagocitada promove a ativação da cascata de sinalização envolvendo a estimulação da proteína quinase C (PKC) e subsequente fosforilação de MAPK, ERK-1 e ERK-2 e ativação do fator de transcrição AP-1. As espécies reativas de oxigênio, produzidas em resposta a fagocitose da partícula de sílica, também levam a estimulação de vias de sinalização para ativação de NF- κ B com consequente indução da síntese de TNF α (Castranova V, 2004). Além disso, a sílica estimula outros tipos celulares como células epiteliais e fibroblastos induzindo a ativação da via de sinalização do NF- κ B (Fubini B, 2003; Huaux F, 2007).

Recentemente, foi descrito a importante participação do inflamossoma NALP3 no desenvolvimento da silicose. O NALP3 constitui um receptor citoplasmático pertencente a família dos receptores NOD similar. Estes sofrem o processo de oligomerização quando ativados e se transformam no inflamossoma NALP3, que promove a ativação da caspase-1 e consequente clivagem de próIL-1 β e próIL-18 a IL-1 β e IL-18, respectivamente (Petrilli V, 2007). Os cristais de sílica, quando fagocitados, induzem dano ao lisossoma resultando na desestabilização da membrana, levando a consequente ativação do inflamossoma NALP3 (Cassel SL, 2008; Hornung V, 2008).

A inflamação granulomatosa induzida pela sílica é caracterizada pelo acúmulo de macrófagos com partículas minerais nos nódulos. A resposta inflamatória é seguida por um processo fibrótico com proliferação de fibroblastos e acúmulo de

matriz extracelular, incluindo colágeno intersticial e elastina insolúvel (Corbel M, 2002; Perez-Ramos J, 1999).

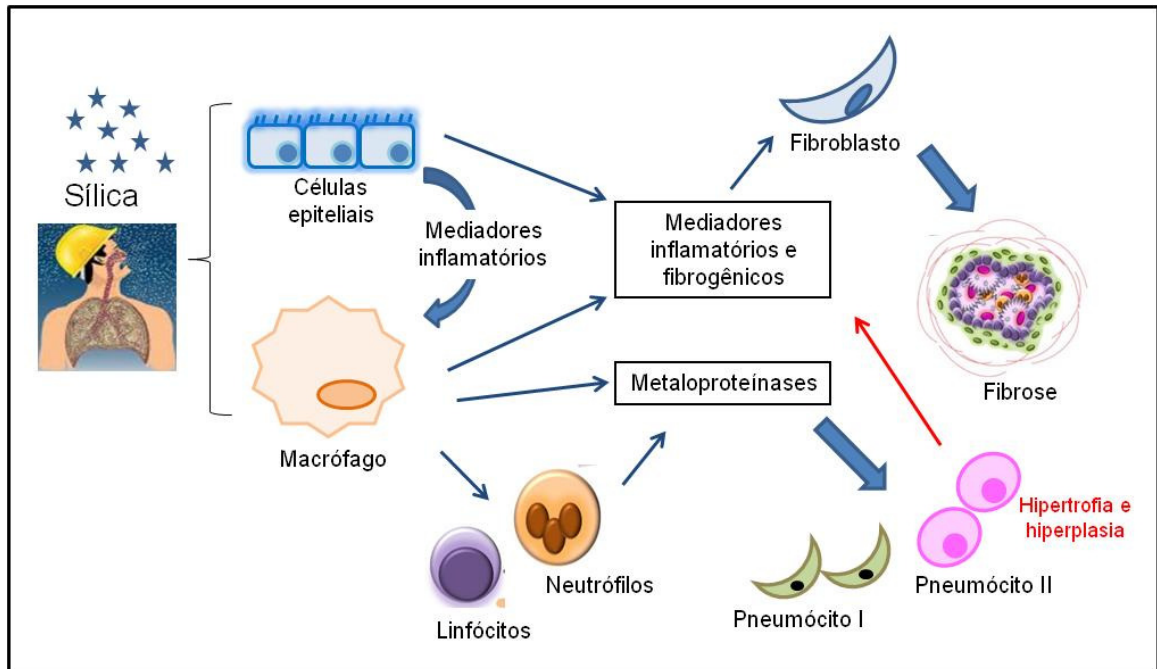
Os macrófagos alveolares exercem uma importante ação no desenvolvimento e progressão da silicose através da liberação de diversos produtos, tais como: enzimas e espécies reativas do oxigênio, que promovem dano pulmonar; citocinas e quimiocinas capazes de ativar e recrutar células inflamatórias, como neutrófilos, monócitos e linfócitos; e fatores fibrogênicos, os quais induzem a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (Castranova V, 2000; Huaux F, 2007; Rimal B, 2005). Os mecanismos que levam ao acúmulo de colágeno e a proliferação da matriz extracelular no modelo de silicose ainda não estão totalmente esclarecidos. Algumas citocinas fibrogênicas têm importante ação em modelos de silicose e na doença em humanos. Foi demonstrado que o fator de necrose tumoral α (TNF α) tem sua expressão aumentada em macrófagos alveolares na fibrose induzida por sílica (Gossart S, 1996), e que o anticorpo anti-TNF α é capaz de prevenir o desenvolvimento da fibrose (Piguet PF, 1990). O fator transformador de crescimento β (TGF β) também tem sua expressão aumentada e associada com populações de células dispersas no granuloma, principalmente em macrófagos, fibroblastos e epitélio alveolar hiperplásico (Jagirdar J, 1996; Mariani TJ, 1996). Neutrófilos também se encontram associados aos macrófagos, e constituem a primeira etapa da fase aguda da inflamação. Além disso, exercem importante ação no processo fibrótico, uma vez que são capazes de liberar espécies ativas do oxigênio e metaloproteinases de matriz (MMPs), principalmente MMP-2 e MMP-9, que participam do remodelamento da matriz extracelular promovendo a sua degradação (2002; Corbel M, 2003). As MMPs promovem a lesão de células endoteliais e pneumócitos tipo I e hipertrofia e hiperplasia de pneumócitos tipo II. Estas células juntamente com células epiteliais e macrófagos produzem citocinas fibrogênicas, como TGF β , IL-13 e TNF α , que promovem a ativação de fibroblastos, resultando na produção de liberação de colágeno, e assim, contribuindo para a formação de granulomas (Fubini B, 2003; Hamilton RF, Jr., 2008). A sílica cristalina também apresenta capacidade de ativar diretamente fibroblastos pulmonares, promovendo o aumento da proliferação dos mesmos, além de promover a ativação dessas células, permitindo o aumento da produção de colágeno e citocinas através da ação de

citocinas provenientes de macrófagos, como $TNF\alpha$ e $TGF\beta$ (Arcangeli G, 2001) (Esquema 1.1).

1.3.5. Prevenção e tratamento

Atualmente o controle e a regulamentação da exposição de profissionais a partículas minerais como a sílica, constituem as principais medidas de prevenção a silicose. Dentre essas medidas destaca-se o controle da fonte de poeira através da eliminação ou substituição de materiais, processos e equipamentos e a utilização de métodos úmidos. Além disso, a utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs), como capacetes e óculos de proteção, constituem medidas para amenizar a exposição e o risco do trabalhador às partículas de sílica e conseqüentemente ao desenvolvimento da doença (Greenberg MI, 2007; Terra Filho M, 2006).

No entanto, até o momento poucos avanços ocorreram com a intenção de obter estratégias terapêuticas para a cura da silicose. Na clínica é empregado no tratamento o uso de corticóides e imunossupressores, porém sem muito sucesso. Nos casos de silicose crônica, na tentativa de melhorar o quadro clínico do paciente, é realizada a lavagem broncoalveolar, para a remoção de partículas de sílica depositadas nas vias aéreas e tecido pulmonar. Em situações mais extremas é sugerido o transplante pulmonar (Terra Filho M, 2006). Entretanto, alguns trabalhos utilizando modelos animais têm sugerido algumas abordagens terapêuticas e de prevenção da doença, como o uso de antioxidantes, inibição da produção de $TNF\alpha$ e IL-1, além da inibição de fosfolipases (Mossman BT, 1998). Tendo em vista a ausência de tratamento efetivo e a necessidade de garantir melhor qualidade de vida a indivíduos afetados pela silicose, mais estudos são necessários para entender a fisiopatologia da doença.



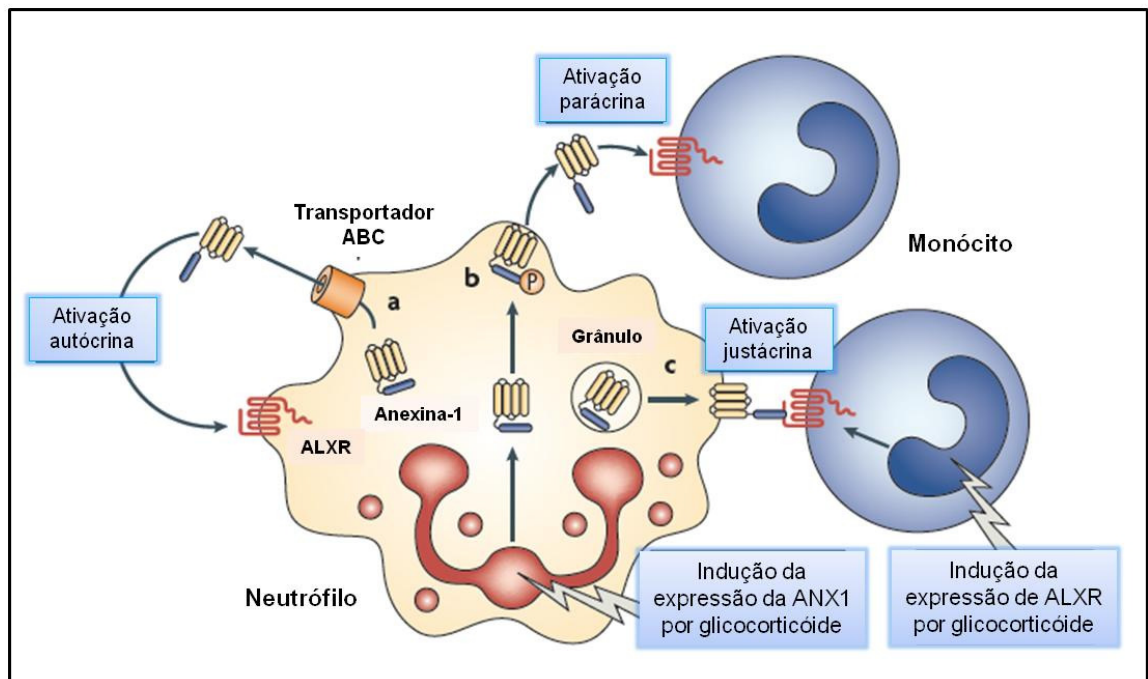
Esquema 1.1: Esquema do processo inflamatório induzido pela inalação de partículas de sílica. Está representada a ativação de células residentes (células epiteliais e macrófagos alveolares) por partículas de sílica. Essas células ativadas liberam mediadores inflamatórios e fibrogênicos que induzem o recrutamento de leucócitos para o local da lesão e a ativação de fibroblastos pulmonares. A produção metaloproteínas pelos leucócitos induz a hipertrofia e hiperplasia de pneumócitos do tipo I e II, que por sua vez liberam citocinas fibrogênicas, resultando na indução da fibrose.

1.4. Anexina-1 e Peptídeo Ac2-26

A resposta inflamatória possui uma fina regulação e controle que impede a sua exacerbação e perpetuação. Nesse sentido, mediadores pró-inflamatórios atuam em paralelo com agentes anti-inflamatórios, o que permite o início, manutenção e fim do processo inflamatório (Dufton N, 2010). Os mediadores anti-inflamatórios exercem seus efeitos em diversos estágios da inflamação, como a estimulação da apoptose e da fagocitose de células apoptóticas. Dentre esses mediadores se destacam os glicocorticóides que constituem a primeira classe de anti-inflamatórios endógenos utilizados com sucesso na terapêutica (Perretti M, 2009). Estudos mostraram que parte das ações anti-inflamatórias dos glicocorticóides é mediada por uma proteína endógena de 37 kDa denominada anexina-1 (Kamal AM, 2005; Perretti M, 2003).

A anexina-1 é o primeiro membro caracterizado da família das anexinas, as quais são proteínas capazes de se ligarem aos fosfolipídeos de membrana, através de um modo dependente de cálcio, e de promover a inibição da PLA₂ e da síntese de eicosanóides. Embora não seja detectada no plasma, a anexina-1 é encontrada constitutivamente em altas concentrações no citoplasma de diversas células, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, além de tecidos (pulmão, intestino e medula óssea) (Lim LH, 2007; Perretti M, 2009). Em resposta a ativação celular, a anexina-1 é mobilizada para a membrana celular e posteriormente liberada. O mecanismo de secreção da anexina-1 varia de acordo o tipo celular. Em macrófagos o sistema transportador ABC (“ATP-binding cassette transporter”) é responsável pela secreção da proteína, enquanto que em neutrófilos, nos quais grande parte da anexina-1 (> 60%) é estocada em grânulos de gelatinase, a liberação ocorre através da fusão dos grânulos com a membrana celular em resposta a estímulos quimiotáticos ou a adesão às células endoteliais. Além disso, a anexina-1 também pode ser translocada para a membrana celular após a fosforilação da serina 27 no resíduo amino-terminal em células da pituitária (Perretti M, 2009) (Esquema 1.2). O processo de translocação da anexina-1 para a membrana celular também depende da concentração de cálcio. O cálcio (Ca²⁺) intracelular promove uma mudança conformacional da molécula protéica, permitindo que a região N-terminal seja exposta, gerando a forma ativa da anexina-1 (Gerke V, 2005).

Após a sua exposição na superfície celular ou secreção, a anexina-1 pode exercer sua função de três formas: (I) atuando de modo autócrino, no qual a anexina-1 atua na própria célula de onde é liberada; (Montes, II) modo parácrino, atuando em outra célula alvo após a sua secreção; e (III) justácrino, o qual corresponde a interação da anexina-1, ligada a membrana celular da célula da qual foi sintetizada, com a célula alvo (Esquema 1.2) (Perretti M, 2009).



Esquema 1.2: Mobilização da anexina-1 em células ativadas e seu modo de ação. Após a ativação celular a anexina-1 é mobilizada para a membrana celular através de três mecanismos diferentes, dependendo do tipo celular: (a) através do transportados ABC; (b) pela fosforilação do resíduo de serina N-terminal; (c) pela fusão de grânulos com a membrana celular. Após sua liberação a anexina-1 pode atuar de modo autócrino, parácrino e justácrino (Adptado de Perretti M, 2009).

Estudos utilizando modelos experimentais de inflamação em camundongos mostraram que a anexina-1 inibe o recrutamento de neutrófilos. Esse efeito está associado com o desprendimento de neutrófilos aderidos ao endotélio, resultando na redução do número de células que migram para o local da lesão. Essas ações são reproduzidas por peptídeos derivados da região N-terminal da proteína, dentre eles o peptídeo Ac2-26 (Lim LH, 1998).

Além dos efeitos sobre a migração leucocitária, a anexina-1 também promove a inibição de vias de transdução de sinal que leva a proliferação de fibroblastos pulmonares, bem como da fagocitose de imunocomplexos por macrófagos, além de induzir a apoptose de células inflamatórias (Croxtall JD, 2003; Kamal AM, 2005). Em adição, foi demonstrado que a anexina-1 e derivados peptídicos são liberados por células apoptóticas atuando como um sinal para a fagocitose dessas células promovendo a depuração das mesmas, e desta forma auxiliando no processo de resolução da inflamação (Scannell M, 2007). Foi demonstrado que a anexina-1 e seus derivados peptídicos exercem suas ações através da sua interação com receptores formilados (FPR) (Ernst S, 2004; Walther A, 2000).

1.4.1. Receptores formilados (FPR)

Os receptores formilados pertencem a uma pequena família de receptores acoplados a proteína G, especialmente Gi, cujos membros são: FPR1, FPR2/ALX e FPR3. Esta família de receptores foi caracterizada nos anos 80 como sendo capaz de se ligar a sequências altamente conservadas de peptídeos contendo N-formil metionina que ocorrem naturalmente, como produtos bacterianos, ou peptídeos sintetizados (n-formil-metionil-fenilalanina - fMLP) (Ye RD, 2009). A interação entre receptores FPR e seus ligantes resulta na ativação de diversas vias de sinalização, dentre elas: influxo de cálcio, cascata de proteínas quinases e polarização da membrana (Dufton N, 2010; Perretti M, 2009).

O FPR1 foi o primeiro receptor da família a ser identificado e clonado. É caracterizado pela alta afinidade pelo peptídeo sintético fMLP (n-formyl-metionil-fenilalanina), e está associado com a defesa do hospedeiro, promovendo a migração leucocitária, produção de citocinas e íons superóxido e a degranulação de células fagocíticas (Dufton N, 2010). O receptor FPR2 é capaz de interagir com diversos produtos naturais incluindo a lipoxina A₄ (ALXA₄), anexina-1, proteína soro amilóide

(SAA) e peptídeos do HIV, além de peptídeos sintéticos (peptídeo-W) e compostos químicos (composto C43). Assim como o FPR1, o receptor FPR2 também está implicado na defesa do organismo, porém apresenta importante papel na via anti-inflamatória. A sua expressão é induzida tanto por estímulos pró-inflamatórios (TNF α) como anti-inflamatórios (glicocorticóides) (Dufton N, 2010; Sawmynaden P, 2006). O último membro caracterizado da família é o receptor FPR3. Este não é expresso em neutrófilos, porém é encontrado em monócitos, macrófagos e células dendríticas. Diferente dos demais receptores, o FPR3 não responde a peptídeos formilados, possuindo um único ligante endógeno conhecido, o peptídeo F2L (Dufton N, 2010; Perretti M, 2009).

Walther e colaboradores (2000) associaram os efeitos da anexina-1 aos receptores da família FPR. Posteriormente, foi observado que a anexina-1 apresentava co-localização com receptores FPR2/ALX na superfície de neutrófilos de humanos (Perretti M, 2002). Em adição, estudos de “binding” competitivo utilizando anexina-1 e derivados peptídicos mostraram a preferência da proteína íntegra pelo receptor FPR2/ALX, enquanto o peptídeo Ac2-26 ativou tanto o receptor FPR1 como o FPR2 (Hayhoe RP, 2006).

Após a interação com seus receptores, a anexina-1 e o peptídeo Ac2-26 são capazes de induzir a ativação da cascata de sinalização da MAPK, induzindo a fosforilação de ERK-1 e ERK-2 (Hayhoe RP, 2006), o que resulta em mudanças no cálcio intracelular e no “shedding” de L-selectina em neutrófilos, promovendo desta maneira alteração da migração celular e consequente redução da resposta inflamatória (Solito E, 2003).

Estudos têm demonstrado o possível envolvimento de receptores FPR em diversas doenças, como Alzheimer, asma, artrite reumatóide, periodontites e câncer (Dufton N, 2010). Estas evidências fortalecem a importância dessa família de receptores como possíveis alvos na terapêutica desses distúrbios. Tendo em vista a significativa participação desses receptores no contexto da inflamação, juntamente com a anexina-1 e o derivado peptídico Ac2-26, verificamos nesse estudo o papel desse sistema sobre a doença pulmonar induzida por partículas de sílica. Destacando o fato de que a silicose constitui uma doença de grande abrangência mundial que permanece sem cura e sem tratamento eficaz.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Tendo em vista as ações anti-inflamatórias da anexina-1, neste estudo investigamos o papel da ANX1 na resposta inflamatória pulmonar crônica induzida por partículas de sílica em camundongos. Buscando atender à necessidade da identificação de um agente eficaz no tratamento da silicose, em paralelo investigamos o efeito do peptídeo Ac2-26, derivado da porção N-terminal da anexina-1 sobre o modelo de silicose experimental.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar o efeito do tratamento com derivado da anexina-1, peptídeo Ac2-26, na função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de animais silicóticos;
- Investigar o efeito do peptídeo Ac2-26 sobre o infiltrado inflamatório e formação de granulomas no pulmão de animais silicóticos, através da análise histológica;
- Investigar o efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas;
- Avaliar a expressão de F4/80 e α -SMA no pulmão de animais silicóticos tratados com peptídeo Ac2-26;
- Verificar o efeito do peptídeo Ac2-26 sobre proliferação e ativação de fibroblastos pulmonares *in vitro*, bem como caracterizar o envolvimento dos receptores FPR1 e FPR2 nessa resposta;
- Avaliar o papel da anexina-1 endógena na função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de camundongos silicóticos;
- Avaliar o papel da anexina-1 endógena sobre o infiltrado inflamatório, deposição de colágeno e formação de granulomas no pulmão de camundongos silicóticos;
- Avaliar o papel da anexina-1 endógena na produção de mediadores inflamatórios e pró-fibróticos no tecido pulmonar de animais silicóticos e sobre a produção de citocinas por macrófagos peritoneais *in vitro*, bem como sobre fibroblastos pulmonares de camundongos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

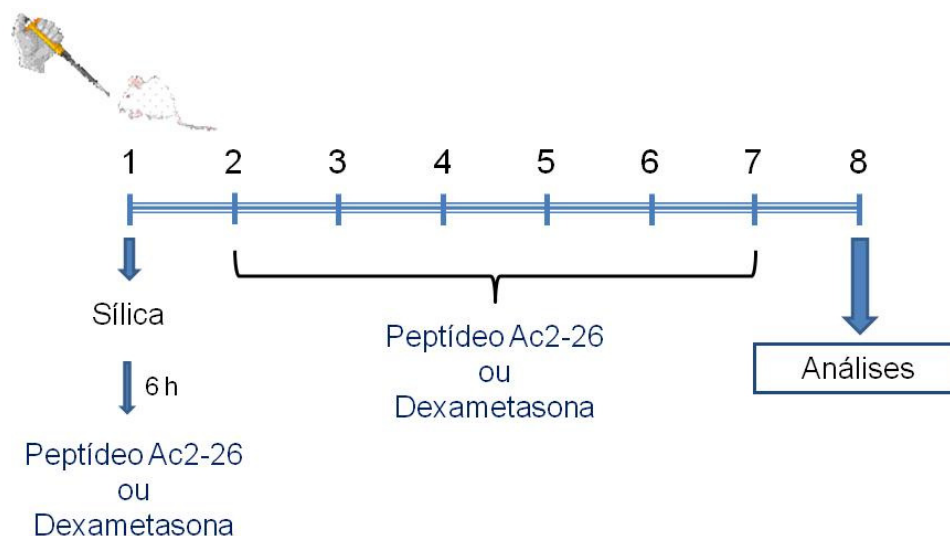
Foram utilizados camundongos (18 – 20 g), machos e fêmeas, das cepas Swiss-Webster, BALBc (ANX^{+/+}) e nocautes para o gene da anexina 1 (ANX1^{-/-}) provenientes do Centro de Criação de Animais (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz, além das cepas C57BL6 (FPR1^{+/+} e FPR2^{+/+}) e nocautes para o gene dos receptores FPR1 (FPR1^{-/-}) e FPR2 (FPR2^{-/-}), do biotério do The William Harvey Institute, Londres, UK. Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA; L-034/09) e de acordo com as regras estabelecidas pelo Home Office (Guidance on the Operation of Animals, Scientific Procedures Act, 1986) e diretrizes da União Européia. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura entre 25 e 28°C, ciclo de luz definido em 12 h de claro e 12 h de escuro e livre acesso à ração e água.

3.2. Indução da silicose e tratamento

Os animais foram submetidos à anestesia inalatória com halotano (0,5%) (Tanohalo, Cristália, São Paulo) até sedação completa. Em seguida, foram instilados por via intranasal, com 10 mg sílica (SiO₂; S-5631 Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA, tamanho de partícula: 0,5 -10 µm) diluídos em 50 µl de salina estéril. Os animais do grupo controle receberam igual volume de salina estéril intranasal. As análises foram realizadas 7 dias após a instilação.

Para verificação do efeito do peptídeo Ac2-26 (Cambridge Research Biochemicals, UK) sobre a resposta inflamatória induzida por partículas de sílica, os animais foram divididos em seis grupos: salina, sílica, sílica + dexametasona (25 µg), sílica + peptídeo Ac2-26 (50 µg), sílica + peptídeo Ac2-26 (100 µg) e sílica + peptídeo Ac2-26 (200 µg) por via intranasal. Foram utilizados doses crescentes de peptídeo Ac2-26 (50, 100 e 200 µg/animal), enquanto a dexametasona foi utilizada na dose de 25 µg/animal, considerada eficaz em outros modelos experimentais (Bandeira-Melo C, 2005). O peptídeo Ac2-26 e a dexametasona foram diluídos em 50 e 25 µl de salina, respectivamente, imediatamente antes do uso. A administração

dos fármacos foi realizada diariamente, durante 7 dias consecutivos, iniciando 6 h após a instilação de sílica, conforme demonstrado no esquema 3.1.



Esquema 3.1: Esquema de indução da silicose, tratamento e análise de parâmetros inflamatórios.

3.3. Avaliação da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas

Para avaliação da função pulmonar foram utilizados seis camundongos por grupo. Os animais foram submetidos à análise através de um plestimógrafo de corpo inteiro invasivo (Sistema Buxco, UK), permitindo a análise dos parâmetros de resistência das vias aéreas ($\text{cmH}_2\text{O}/\text{mL}/\text{s}$) e elastância pulmonar ($\text{mL}/\text{cmH}_2\text{O}$). Os animais foram anestesiados com 60 mg/kg de pentobarbital (i.p.) e curarizados com brometo de pancurônio (Pavulon®, 1 mg/kg). Em seguida os animais foram traqueostomizados para introdução de uma cânula e posteriormente posicionados em uma cama aquecida, para manutenção da temperatura corporal. A cânula traqueal foi conectada a um ventilador respiratório, onde parâmetros, como fluxo (200 μL) e volume corrente (2 - 5 mL), foram mantidos constantes. Foi introduzido, por via oral, um cateter preenchido com água para captura da pressão esofágica. O pneumotacógrafo acoplado à câmara do plestimógrafo coletou o fluxo respiratório e um transdutor ligado à câmara permitiu que os dados de pressão esofágica e

pressão resultante do fluxo fossem transferidos para um computador. Através do “software” BioSystem XA foram processados os sinais de fluxo e pressão, permitindo o registro dos parâmetros de resistência e elastância.

Para avaliação da hiperreatividade das vias aéreas foi realizada aerolização de concentrações crescentes e cumulativas do agente broncoconstritor metacolina (3 - 27 mg/mL) por um período de 5 minutos para cada dose. Em camundongos ANX1^{-/-} também foi verificada a hiperreatividade das vias aéreas induzida pela serotonina (5 – 50 mg/mL).

3.4. Avaliação da contração de anéis de traquéia em banho de órgão isolado

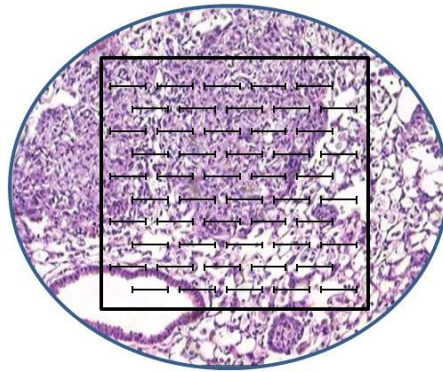
Camundongos ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-} foram sacrificados em câmara de CO₂ para retirada da traquéia. O tórax foi aberto para cuidadosa remoção do pulmão e posterior isolamento da traquéia, a qual foi rapidamente imersa em solução nutritiva de Krebs (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,17 mM MgSO₄, 2,5 mM CaCl₂.6H₂O, 1,2 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 5,5 mM glicose). Foram introduzidas 2 hastes de sustentação na luz do anel da traquéia que, em seguida, foi transferido para uma cubeta de 10 mL contendo solução de Krebs mantida a 37°C e aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Uma das hastes fixou a traquéia na base da cuba e a outra a ligou ao transdutor isométrico (Ugo Basile) que foi conectado a um sistema de amplificação, digitalização e registro de dados (LETICA, “Software” Proto 5, versão 7.33). A preparação permaneceu em repouso por cerca de 30 min antes da estimulação com 2,5 μM de carbacol para estabilização da sua linha de base. Os anéis de traquéias foram inicialmente contraídos com 2,5 μM de carbacol para que a viabilidade destes anéis fosse verificada. Quando as contrações atingiram um platô, cada segmento foi lavado até o total relaxamento da musculatura lisa. Após foram adicionadas concentrações crescentes de carbacol (10⁻⁸ a 10⁻⁴ M) ou serotonina (10⁻⁸ a 10⁻⁴ M). Todos os resultados foram expressos como percentual de contração produzida por 2,5 μM de carbacol.

3.5. Análise histopatológica

Após a análise da função pulmonar os animais foram eutanasiados com tiopental de sódico (500 mg/kg, i.p). A perfusão foi realizada por meio de uma cânula intracardíaca com solução de salina e EDTA (10 mM) para a retirada do sangue. O pulmão direito foi então retirado, fragmentado, congelado e armazenado em freezer -80°C para posterior quantificação de mediadores inflamatórios e colágeno. O pulmão esquerdo foi perfundido com uma solução de paraformaldeído tamponado a 4% e fixado em formol tamponado a 10% (24 h), desidratado em soluções crescentes de etanol, clarificado em xileno e incluído em parafina. Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram realizados utilizando-se blocos de parafina contendo fragmentos do tecido pulmonar, e submetidos à coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) para análise da estrutura do tecido pulmonar, Picrus sirius para avaliação da deposição de colágeno e imunohistoquímica. Os cortes foram observados em microscópio de luz (Olympus U-TV1X) acoplado a uma câmera (Olympus Q Color 3 – 0044C-194) e a captura da imagem feita mediante o uso de um “software” de análise (Q Capture).

3.6. Análise Morfométrica

A análise morfométrica foi realizada através da técnica de contagem de linhas e pontos (Cruz-Orive LM, 1990; Sakae RS, 1994). Para isso foi utilizado um retículo contendo 100 pontos e 50 linhas paralelas (Figura 3.2) fixado na ocular do microscópio. Em aumento de 200x, foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. Em seguida o número de pontos contados foi dividido pelo número total de pontos do retículo, obtendo-se assim a fração da área do tecido pulmonar ocupado por granuloma, sendo o resultado expresso sob a forma de percentual.



Esquema 3.2: Esquema do retículo de 50 linhas e 100 pontos utilizado para a análise morfométrica.

3.7. Imunohistoquímica

Para verificar a expressão das proteínas F4/80 de macrófagos e α -SMA para marcação de miofibroblastos utilizamos a técnica de imunohistoquímica. Após a desparafinização, os cortes foram hidratados com TBS (Tris/HCl 0,05M + NaCl 0,5M, pH 7,6), bloqueados com H₂O₂ a 3% em metanol por 15 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas 3 vezes com TBS e bloqueadas com Tris-HCl + BSA 5% por 1 h. Os anticorpos primários anti-F4/80 (MCAP497, Serotec, USA) ou anti- α -SMA (A2547, Sigma, USA) foram diluídos com Tris-HCl + BSA 1% na proporção de 1:100 e 1:400, respectivamente. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário por 12 h a 4°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes com TBS. O anticorpo secundário, anti-IgG conjugado com HRP (anti-IgG de cabra - STAT72, Serotec, USA - para F4/80 e anti-IgG de camundongo - HAF007, R&D, USA - para α -SMA), foi diluído em Tris-HCl na proporção de 1:80 e incubado por 2 h. A revelação foi feita com 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) por aproximadamente 15 min. Posteriormente as lâminas foram lavadas com água destilada, contra-coradas com hematoxilina de Mayer e montadas em meio aquoso contendo gelatina.

3.8. Quantificação de colágeno

Para a análise quantitativa de colágeno foi utilizada a técnica de Sircol (Kit Biocolor, UK), a qual foi utilizada para quantificação em tecido pulmonar e sobrenadante de cultura celular. Para a determinação de colágeno no tecido, os pulmões foram processados em solução de Tris (0,05 M) + NaCl (1 M). O material foi centrifugado a 15000 xg por 1 h a 4°C, em seguida, retirado uma alíquota do sobrenadante e a esta foi adicionado, o reagente Sirius Red. Após 30 min, o material foi novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e ao “pellet” foi adicionado o reagente Alkaline. As amostras foram colocadas em placas de 96 poços e a absorbância determinada no comprimento de 590 nm, sendo o resultado expresso como μg de colágeno/pulmão direito ou μg de colágeno/mL (sobrenadante de cultura celular).

3.9. Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA

Foram utilizadas placas de 96 poços, às quais foram adicionados 100 μL /poço do anticorpo de captura diluído em tampão (NaCl 1,5 M, H_3BO_4 0,5 M e NaOH 1 N) durante 12 h a 4°C. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes (200 μL /poço) com tampão 1 (timerosal, KPO_4 1 M e Tween 20 0,005%). Após esta etapa, para bloqueio de sítios inespecíficos, a placa foi preenchida (250 μL /poço) com PBS/albumina sérica bovina (BSA, 1%) por 1 h à 20°C. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com tampão 1 (200 μL /poço). As amostras e os padrões foram diluídos em tampão 2 (2% de soro fetal bovino - SFB em PBS) e adicionados aos poços (100 μL /poço). Após o período de incubação (2 h a 37°C), procedeu-se a nova seqüência de 3 lavagens (200 μL /poço) com tampão 1. A seguir foi acrescentado (100 μL /poço) o anticorpo detector biotilado (50 $\mu g/mL$), sendo mantida a incubação por 1 h a 20°C. Os poços foram lavados com o tampão 1 (200 μL /poço), seguindo-se a etapa de incubação por 1 h a 20 °C (50 μL /poço) com a mistura neutravidina-*horseradish peroxidase* (HRP) diluído no tampão 2. Após a última lavagem com tampão 1 (200 μL /poço), foi feita a adição do substrato (K-Blue®) (50 μL /poço) para o desenvolvimento da reação colorimétrica (aproximadamente 5 a 30 min), que foi interrompida após o acréscimo de 50 μL /poço de H_2SO_4 (0,19 M). A análise espectrofotométrica foi realizada em leitora de placa no comprimento de onda de

450 nm. Os resultados obtidos foram expressos em quantidade de mediador (μg) por mililitro (mL).

A quantificação dos mediadores inflamatórios incluiu as citocinas ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$, $\text{INF}\gamma$) e quimiocinas (KC, MCP-1, MIP-2). Foram utilizados kits comerciais (R&D System, Estados Unidos), sendo seguidas as recomendações do fabricante. As amostras analisadas foram provenientes de sobrenadante de cultura celular e de tecido pulmonar. Este último passou pelo processo de homogeneização em 1 mL de PBS contendo um coquetel de inibidores de proteases (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suíça), seguido de centrifugação a 2019 xg por 15 min e o sobrenadante foi recuperado para posterior quantificação de mediadores.

3.10. Obtenção de macrófagos peritoneais

Após a eutanásia de camundongos $\text{ANX1}^{+/+}$ e $\text{ANX1}^{-/-}$ em câmara de CO_2 , foi removida a pele da região abdominal, mantendo-se intacto o peritônio. Com o auxílio de seringa e agulha foi realizada a lavagem da cavidade peritoneal com 3 ml de PBS e EDTA (10 mM), massageando suavemente o abdômem. Em seguida, toda solução injetada foi recolhida com pipeta Pasteur e, então, colocada em tubo estéril. O lavado peritoneal obtido foi centrifugado a 504 xg durante 10 min à 4°C . O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” de células ressuspensas em 1 ml de meio RPMI sem soro para a contagem das células em câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 por poço, utilizando placas de 24 poços. Foram feitas quadruplicatas para cada grupo experimental, sendo as células incubadas com meio RPMI sem soro no volume final de 500 μL , em atmosfera de 5% de CO_2 à 37°C . Após 1 h as células foram estimuladas com LPS (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e sílica (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Passadas 6 h, foi recolhido o sobrenadante para posterior quantificação de citocinas ($\text{TNF}\alpha$ e IL-6) por ELISA.

3.11. Cultura primária de fibroblastos pulmonares

Após a eutanásia em câmara de CO_2 , os animais foram perfundidos com PBS estéril e os pulmões retirados. Para a obtenção de cultura primária de fibroblastos pulmonares foi realizada a digestão enzimática dos pulmões utilizando colagenase tipo I (1 mg/ml) durante período de 2 horas. O digerido obtido foi centrifugado a 504

xg, à 4°C durante 10 min. O “pellet” foi ressuspensão e plaqueado em garrafas médias com meio Iscoves suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB).

3.12. Ensaio de proliferação celular

Para análise da proliferação de fibroblastos pulmonares foi utilizado a técnica de incorporação de timidina-³H. Para tanto foram plaqueadas 5 x 10⁴ células por poço, utilizando placas de 24 poços. Vinte e quatro horas após, as células foram incubadas com diferentes concentrações de peptídeo Ac2-26 (7,5 - 60 µM) e depois de 1 h estimuladas com IL-13 (40 ng/ml) e TGFβ (10 ng/ml). Passadas 20 h foi adicionado a cada poço 0,5 µCi de timidina-³H (Methyl-³H-Thymidine; Amershan). Após 4 h as placas foram lavadas com PBS (3 vezes), para retirada do excesso de timidina-³H. Em seguida foi adicionado 1 ml de triton (1%) à cada poço e recolhido todo o volume para “vials” contendo 3 ml de líquido de cintilação para posterior leitura em contador beta (Beckman, Série LS-6500).

Para a verificação da taxa proliferativa de fibroblastos pulmonares de camundongos ANX1^{-/-}, seguiu-se o protocolo conforme descrito acima, no entanto, as células receberam apenas as estimulações com IL-13 (40 ng/ml) e TGFβ (10 ng/ml).

3.13. Quantificação de colágeno e MCP-1 no sobrenadante de fibroblastos

Fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos Swiss-Webster foram plaqueados na densidade de 25 x 10⁴ células por poço, em placas de 6 poços. Vinte e quatro horas após, as células foram incubadas com diferentes concentrações de, C peptídeo Ac2-26 (1 - 30 µM) e depois de 1 h estimuladas com IL-13 (40 ng/ml) e TGFβ (10 ng/ml). O sobrenadante foi recolhido 24 h após a estimulação para quantificação de colágeno e da quimiocina MCP-1, através de protocolos descritos anteriormente (Sicol e ELISA).

Para os ensaios com fibroblastos provenientes de camundongos FPR1^{-/-} e FPR2^{-/-} foi seguido o protocolo acima descrito. Em um primeiro momento essas células foram estimuladas com concentrações crescentes de IL-13 (20 – 80 ng/mL) e TGFβ (5 – 20 ng/mL), verificando-se posteriormente a produção de MCP-1 e

colágeno. Em outro bloco de experimentos, os fibroblastos FPR1^{-/-} e FPR2^{-/-} foram tratados com peptídeo Ac2-26 (15 e 30 µM) e, após 1 h, estimulados com IL-13 (40 ng/ml) e TGFβ (10 ng/ml), recolhendo-se o sobrenadante 24 h depois.

Para verificação do papel da anexina-1 endógena sobre a produção de MCP-1 em fibroblastos pulmonares, células de animais ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-} foram plaqueadas conforme descrito e estimuladas com IL-13 (40 ng/ml) e TGFβ (10 ng/ml).

3.14. PCR em tempo real

O RNA total foi extraído de fibroblastos pulmonares (2,5 x 10⁵ células/poço) provenientes de camundongos C57BL6, utilizando reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies). Em seguida, foi adicionado às amostras clorofórmio e realizada a centrifugação das mesmas formando duas fases (uma aquosa e outra orgânica). À fase aquosa, contendo o RNA, foi adicionado álcool isopropílico resultando na precipitação do RNA, o qual foi tratado com DNase I (Turbo DNase Treatment, Ambion[®], Applied Biosystems). Cerca de 3 a 5 µg de RNA tratado foi incubado com oligo dT (50 µM; Invitrogen) e dNTP (10 mM; Biolina) à 65°C por 5 min e em seguida em gelo por 1 min. Posteriormente, o RNA foi incubado com a solução Mastermix (Fisrt Strand Buffer 5x – Invitrogen; DTT 0,1 M – Invitrogen; RNase out e SuperScript III – Invitrogen) à 50°C por 15 min e em seguida à 70°C por 15 min. Utilizando o produto da transcriptase reversa, o PCR foi conduzido utilizando os seguintes *primers* para determinar níveis de RNAm em fibroblastos pulmonares: para FPR1, *sense* (5'-CAGAATTCCAGCCATGGACACCAACATGTCTC-3') e *anti-sense* (5'-GCGAATTCTTTACATTGCATTTAAAGTG-3'); e para FPR2, *sense* (5'-GTCAAGATCAACAGAAGAAACC-3') e *anti-sense* (5'-GGGCTCTCTCAAGACTATAAGG-3'). Todas as condições de PCR foram conduzidas à 94°C por 2 min e 30 s, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 60 s e 72°C por 60 s, com uma extensão final de 72°C por 15 min. A expressão da quantificação do RNAm para ambos receptores foi calculada e normalizada de acordo com a expressão do RNAm de α-actina.

3.15. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de Newman-Keuls-Student. Para comparação entre dois grupos experimentais, foi utilizado o teste t de Student para amostras não-pareadas. No caso da análise da área de granuloma os parâmetros apresentados em forma percentual foram submetidos à transformação arcoseno, a fim de tornar sua distribuição próxima ao normal, permitindo, assim, a realização dos testes de variância descritos acima. Foram considerados, nos testes acima citados, valores significantes quando $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1. Efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a resposta inflamatória pulmonar induzida por partículas de sílica em camundongos

4.1.1. Análise da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de camundongos silicóticos

O atividade anti-inflamatória da proteína anexina-1 está associada à região N-terminal da molécula. No presente estudo investigamos o efeito do peptídeo Ac 2-26, composto derivado dessa porção da proteína e com reconhecida propriedade anti-inflamatória, utilizando o modelo de silicose experimental. Inicialmente avaliamos a função pulmonar com foco sobre os parâmetros de resistência e elastância pulmonar. Verificamos que camundongos Swiss-Webster tornados silicóticos, mediante instilação intranasal de partículas de sílica (10 mg), apresentaram nível basal de resistência pulmonar aumentado quando comparados aos animais do grupo controle instilado com salina (Figura 4.1 A). Ao serem submetidos à aerolização com concentrações crescentes do agente broncoconstrictor metacolina (3 - 27 mg/mL), tanto os animais controles como aqueles silicóticos apresentaram aumento da resistência pulmonar, sendo que estes últimos mostraram-se claramente mais reativos frente à estimulação (Figura 4.1 A). O tratamento diário com o corticóide dexametasona (25 µg) não interferiu com o aumento no nível basal de resistência pulmonar nem com a resposta de hiperreatividade das vias aéreas observados nos camundongos silicóticos (Figura 4.1 A). Na condição de tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50, 100 e 200 µg) verificamos que o nível basal de resistência pulmonar dos animais silicóticos estava próximo ao do grupo controle, assim como foi detectada clara diminuição da hiperreatividade das vias aéreas, resposta evidenciada de forma mais acentuada quando foram utilizadas as menores concentrações de metacolina.

Ao analisarmos o parâmetro de elastância pulmonar, verificamos que os camundongos silicóticos apresentaram também nível basal mais elevado, em comparação ao grupo controle, assim como uma resposta mais intensa quando submetidos à estimulação com a metacolina, reforçando de forma clara a condição de hiperreatividade das vias aéreas na silicose (Figura 4.1 B). O tratamento dos

camundongos silicóticos com dexametasona reduziu apenas a resposta produzida pela maior concentração de metacolina (Figura 4.1 B), enquanto que o peptídeo Ac2-26 apresentou efeito inibitório nas doses de 100 e 200 µg.

4.1.2. Análise morfológica e morfométrica do pulmão de camundongos silicóticos

A silicose é reconhecidamente uma doença de caráter inflamatório restritivo. Dessa forma, como próximo passo avaliamos a morfologia dos pulmões dos camundongos silicóticos tratados ou não com o corticóide e o peptídeo Ac2-26.

Com base na coloração por HE, verificamos que os pulmões dos animais controles (salina) apresentaram parênquima com arquitetura preservada e íntegra, septos alveolares bem definidos, sem espessamento ou qualquer indício da presença de processo inflamatório (Figura 4.2 A). Ao analisarmos os pulmões dos animais silicóticos detectamos a presença de um infiltrado inflamatório acompanhado de marcada resposta fibrótica granulomatosa (Figura 4.3 B), fenômeno comumente observado na fase aguda da silicose. O tratamento com dexametasona diminuiu o componente inflamatório e a formação de granulomas (Figura 4.2 C). Ao tratarmos os animais silicóticos com o peptídeo Ac2-26 observamos, com as doses de 100 e 200 µg, uma importante redução do infiltrado inflamatório e da formação de granulomas pulmonares. A dose de 50 µg não se mostrou eficaz em interferir com o tamanho dos granulomas (Figura 4.2 D, E, F), porém granulomas apresentando-se com menor densidade e presença de infiltrado celular foram observados.

De forma a confirmar os achados acima descritos, partimos para a realização de uma avaliação morfométrica, que tem como base a quantificação da porcentagem da área de parênquima pulmonar ocupada por granulomas. Verificamos que os animais silicóticos mostraram possuir 30% da área do parênquima pulmonar ocupado por granulomas. Na condição do tratamento com dexametasona verificamos redução deste quadro (Figura 4.3). Efeito inibitório foi também observado na condição do tratamento com o peptídeo Ac2-26, nas concentrações de 100 e 200 µg. De forma coerente ao anteriormente visto, a dose de 50 µg do peptídeo foi destituída de atividade (Figura 4.3).

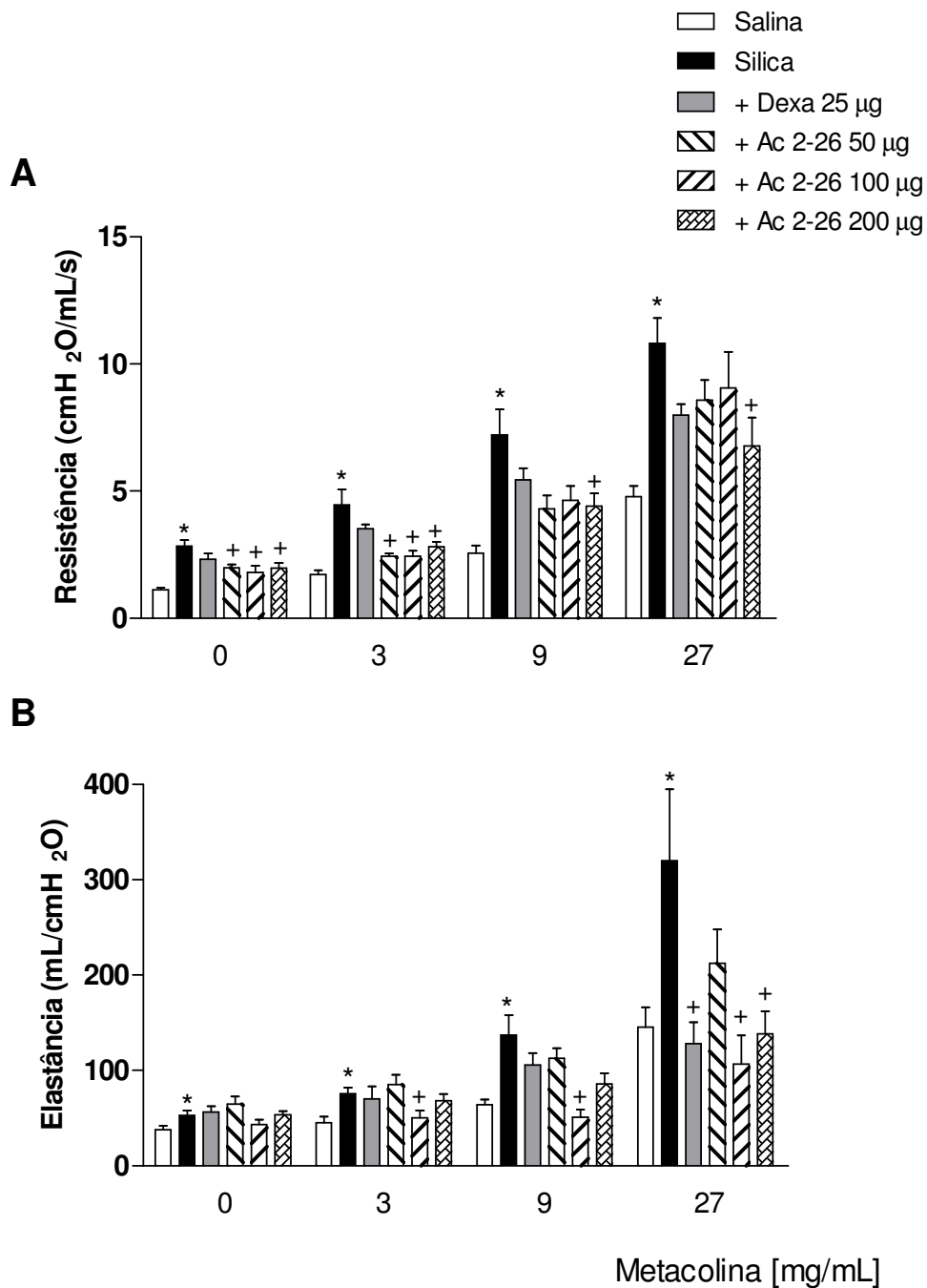


Figura 4.1: Análise da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de camundongos instilados com salina e sílica (10 mg). Os parâmetros de resistência (A) e elastância (B) pulmonar foram avaliados na condição de aerolização com PBS e metacolina (3 - 27 mg/mL), 7 dias após a provocação com sílica. Os animais foram tratados por 7 dias consecutivos com dexametasona (Dexa; 25 μ g) e o peptídeo Ac2-26 (50 - 200 μ g). As colunas representam a média \pm erro padrão da média de no mínimo 5 animais por grupo. Os símbolos * e + indicam $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina e sílica, respectivamente.

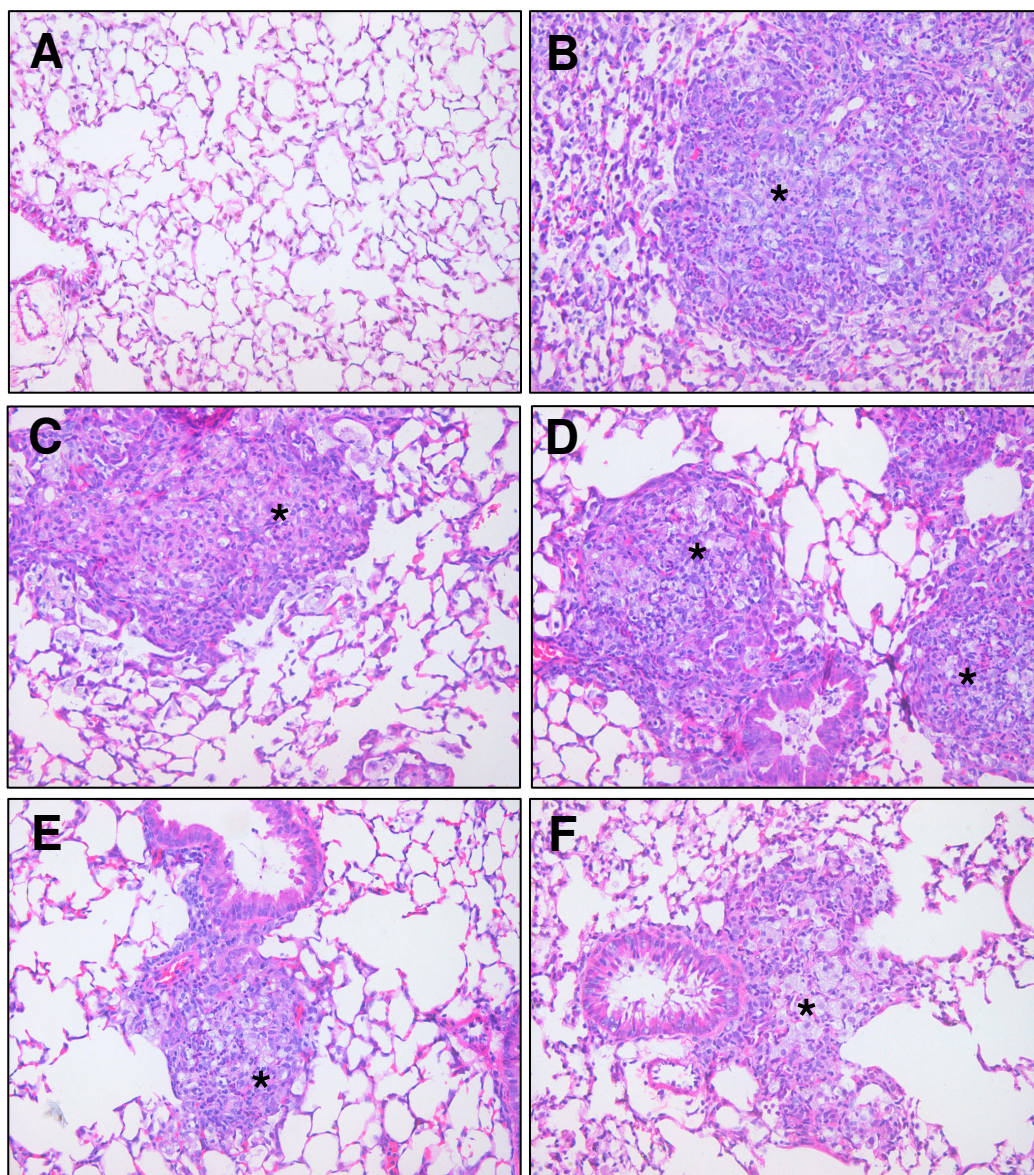


Figura 4.2: Análise morfológica de pulmões de camundongos instilados com salina e sílica (10 mg), submetidos ao tratamento com dexametasona (25 µg) e peptídeo Ac 2-26 (50 – 200 µg) por 7 dias consecutivos. Os grupos incluem salina (A), sílica (B), dexametasona (C), e o peptídeo Ac2-26 50 µg (D) 100 µg (E) e 200 µg (F). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. O * indica o granuloma. Foram utilizados no mínimo 6 animais por grupo. Aumento de 200 x.

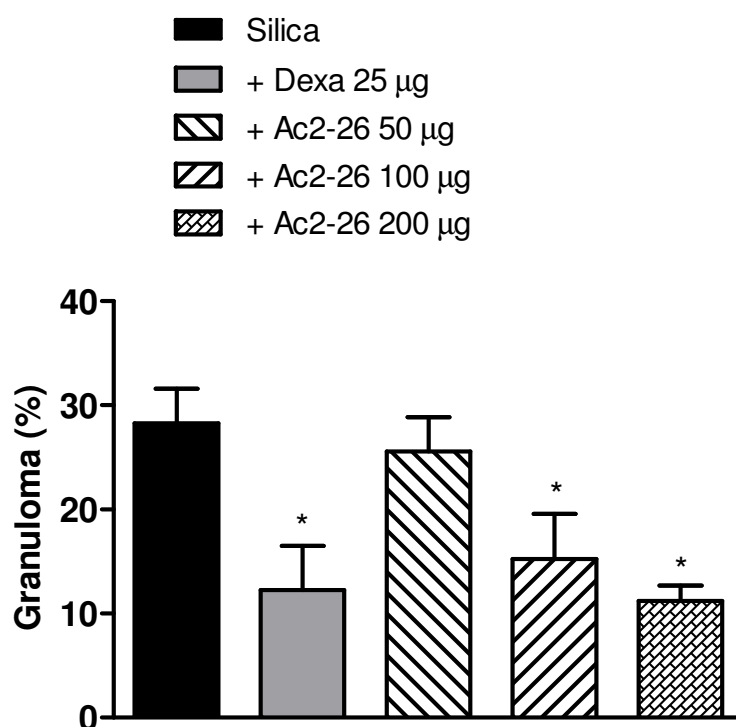


Figura 4.3: Análise morfométrica de pulmões de camundongos instilados com salina e sílica (10 mg), submetidos ao tratamento com dexametasona (Dexa, 25 µg) e com peptídeo Ac 2-26 (50 - 200 µg) por 7 dias consecutivos. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. Aumento de 200 x. Os valores representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. O símbolo * denota $p < 0,05$ em comparação ao grupo sílica.

Considerando ser a silicose uma doença fibrótica na qual se verifica intensa deposição de componentes da matriz extracelular, de forma prioritária na região correspondente à resposta granulomatosa, partimos para investigar o efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a deposição de colágeno. Para isso cortes dos pulmões foram submetidos à coloração com picrus sirius, corante marcador de fibras colágenas.

Verificamos que o grupo controle salina apresentou parênquima pulmonar com aspecto normal, evidenciando-se apenas a marcação basal associada à presença de colágeno constitutiva nos vasos sanguíneos e nas vias aéreas (Figura 4.4 A). Por outro lado, uma intensa marcação de fibras colágenas foi evidenciada nos pulmões silicóticos, sendo essa marcação predominante nas áreas de granuloma (Figura 4.4 B). O tratamento com dexametasona reduziu a intensidade de marcação no pulmão dos animais silicóticos (Figura 4.4 C). O peptídeo Ac2-26 reduziu de forma significativa a intensidade de marcação com o corante nas três doses (Figura 4.4 D, E e F). Estes achados foram confirmados quando da quantificação do conteúdo de colágeno pelo método colorimétrico de Sircol. Vimos um marcado aumento na quantidade de colágeno no pulmão dos animais silicóticos em comparação com os controles, conforme esperado (Figura 4.5). A dexametasona inibiu a deposição de colágeno, assim como o peptídeo Ac2-26, sendo que este último mostrou-se mais eficaz. Todas as três doses testadas foram efetivas. Em conjunto estes resultados revelam de forma clara a propriedade do peptídeo Ac2-26 em modular negativamente o componente inflamatório e fibrótico da silicose experimental murina.

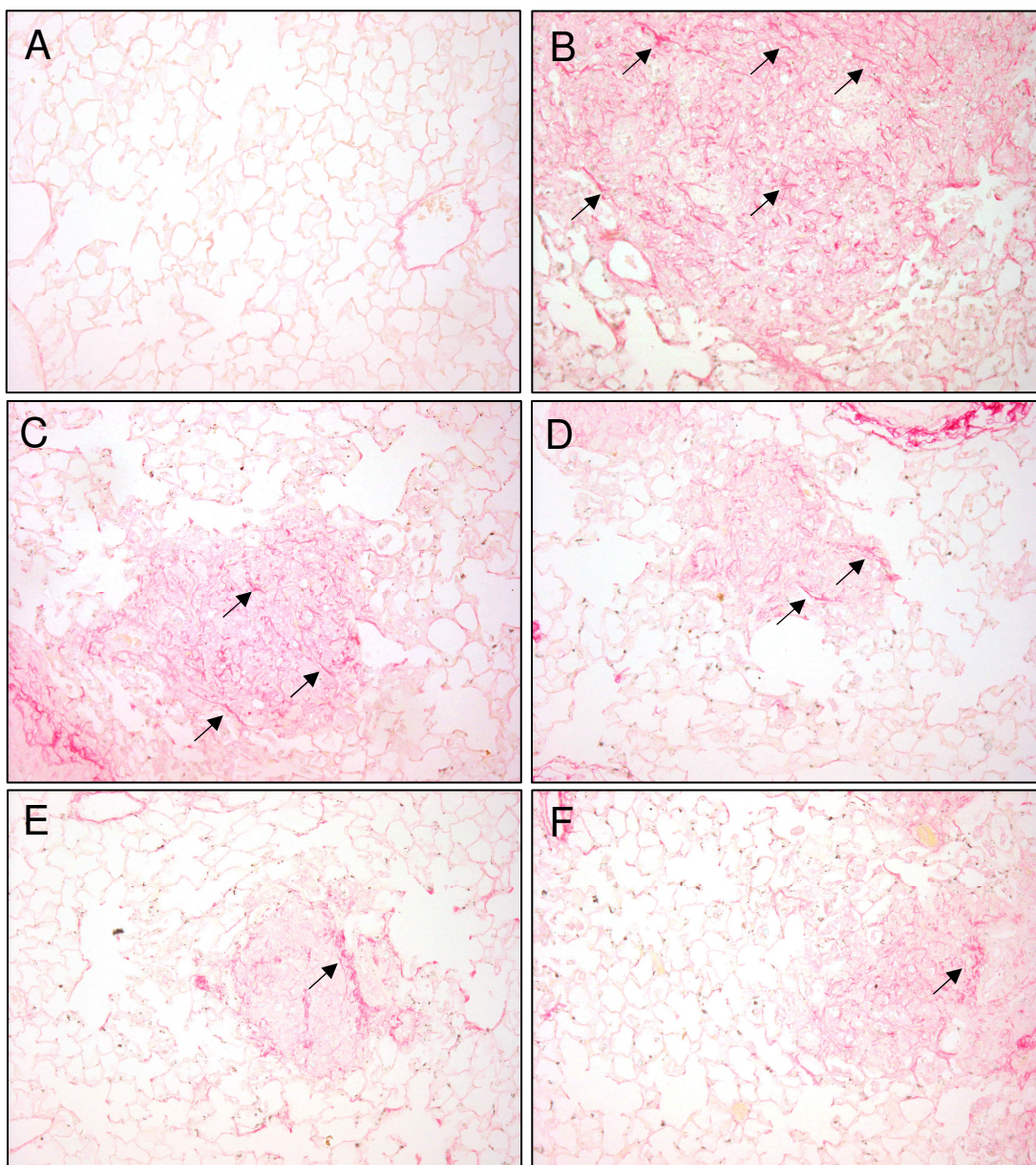


Figura 4.4: Marcação de fibras de colágeno em pulmões de camundongos instilados com salina e sílica (10 mg), submetidos ao tratamento com dexametasona (25 µg) e peptídeo Ac 2-26 (50 – 200 µg) por 7 dias consecutivos. Os grupos incluem salina (A), sílica (B), dexametasona (C), e o peptídeo Ac2-26 50 µg (D) 100 µg (E) e 200 µg (F). Os cortes foram corados com picrus sirius e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. As setas indicam a marcação de fibras de colágeno em vermelho. Foram utilizados no mínimo 6 animais por grupo. Aumento de 200 x.

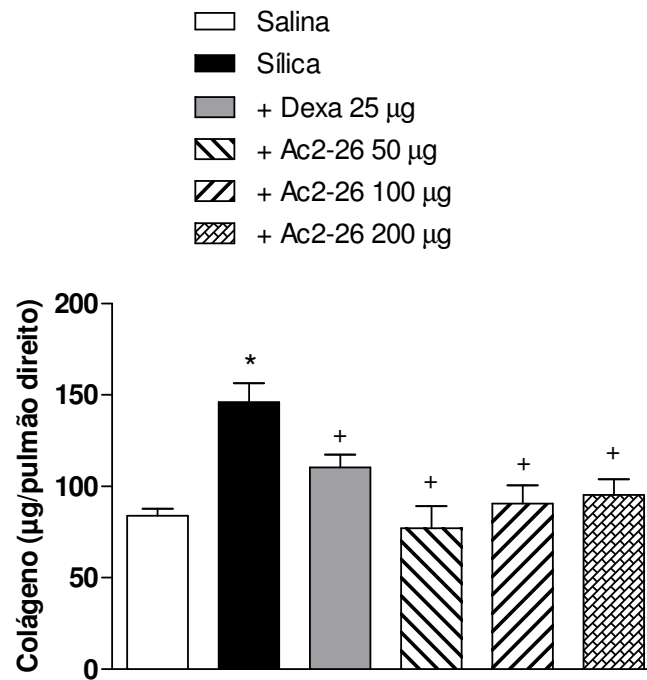


Figura 4.5: Quantificação do conteúdo de colágeno em pulmões de camundongos instilados com salina e sílica (10 mg), submetidos ao tratamento com dexametasona (Dexa, 25 µg) e com peptídeo Ac 2-26 (50 - 200 µg) por 7 dias consecutivos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. Os símbolos * e + denotam $p < 0,05$ em comparação aos grupos salina e sílica, respectivamente.

4.1.3. Análise da produção de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos silicóticos

Tomando por base os achados acima descritos, evidenciamos que a maior dose do peptídeo Ac2-26 (200 µg) foi a mais eficaz em reduzir todas as alterações do quadro inflamatório gerado pela instilação de partículas de sílica. Dessa maneira, esta foi a dose de escolha para as análises futuras.

Para investigar o mecanismo de ação potencialmente envolvido no efeito inibitório do peptídeo Ac2-26, partimos para análise de algumas citocinas e quimiocinas relevantes na silicose. Foram avaliadas as quimiocinas KC (Figura 4.6 A) e MCP-1 (Figura 4.6 B), assim como das citocinas TNF α (Figura 4.6 C), TGF β (Figura 4.6 D) e IFN γ (Figura 4.6 E). Os níveis de todas as proteínas apresentaram-se elevados no pulmão de camundongos silicóticos em comparação com aqueles verificados nos controles (Figura 4.6 C). Conforme pode ser observado na figura 4.6, o tratamento dos animais silicóticos com dexametasona diminuiu parcialmente apenas a geração de MCP-1, enquanto que o peptídeo Ac2-26 inibiu a produção de KC, MCP-1, TNF α e TGF β , porém não de IFN γ .

4.1.4. Avaliação da expressão de F4/80 e α -SMA no pulmão de camundongos silicóticos

Durante o processo inflamatório pulmonar desencadeado pelas partículas de sílica há a participação de dois importantes tipos celulares, os macrófagos alveolares e os fibroblastos. Estes últimos quando ativados passam a expressar a proteína α -actina de músculo liso (α -SMA), recebendo a denominação de miofibroblastos. Nesta etapa foi utilizada a técnica de imunohistoquímica, sendo realizada a identificação dos antígenos F4/80 e α -SMA para macrófagos ativados e miofibroblastos, respectivamente.

Analisando os pulmões do grupo controle, verificamos uma marcação praticamente inexistente para macrófagos (Figura 4.7 A), enquanto que os animais silicóticos mostraram intensa resposta, principalmente nas áreas de formação de granuloma e regiões adjacentes, onde há intenso infiltrado inflamatório (Figura 4.7 B).

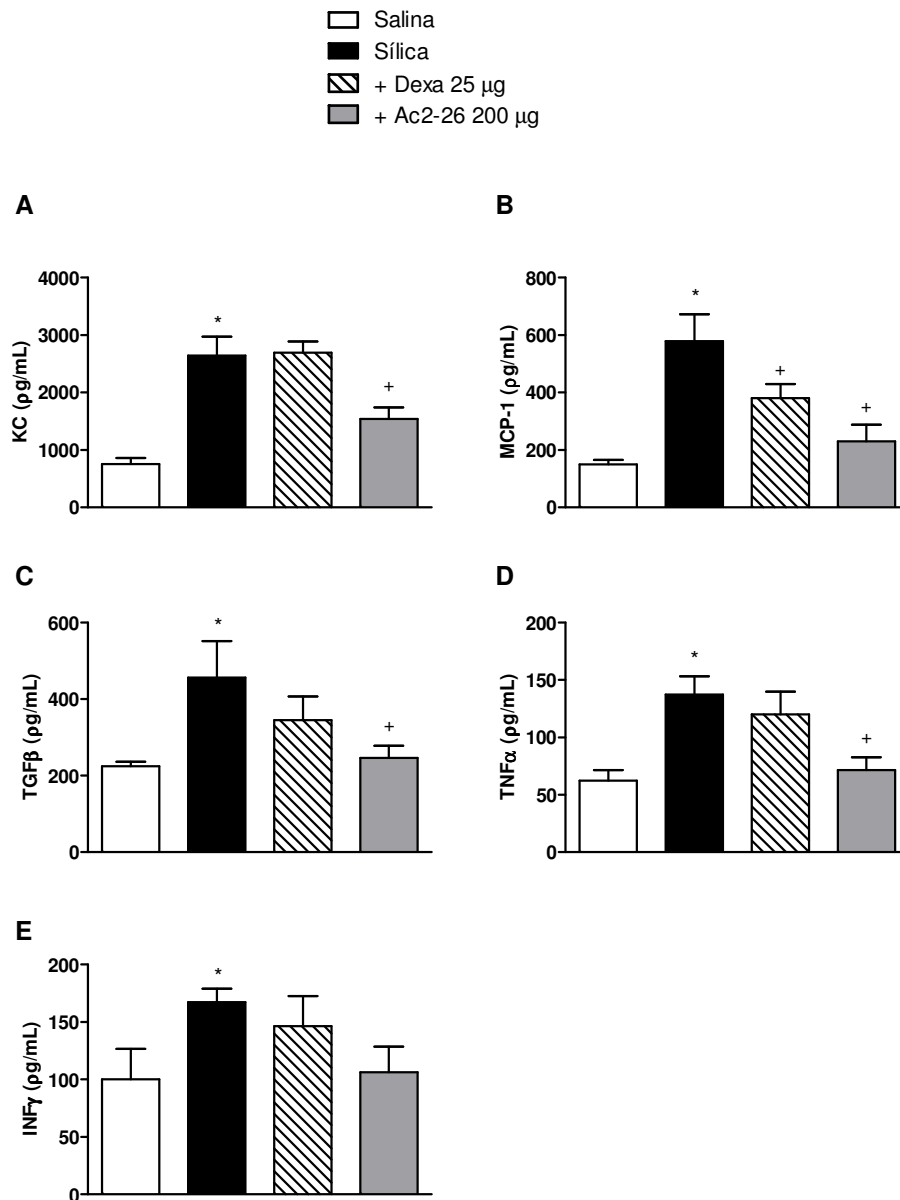


Figura 4.6: Quantificação de quimiocinas e citocinas em pulmões de camundongos instilados com salina e sílica (10 mg). Os animais foram tratados com dexametasona (Dexa; 25 µg) e com peptídeo Ac2-26 (200 µg) por 7 dias consecutivos. Foram avaliadas KC (A), MCP-1 (B), TNFα (C), TGFβ (F) e INFγ (D). Os valores representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 6 animais por grupo. Os símbolos * e + denotam $p < 0,05$ em comparação aos grupos salina e sílica, respectivamente.

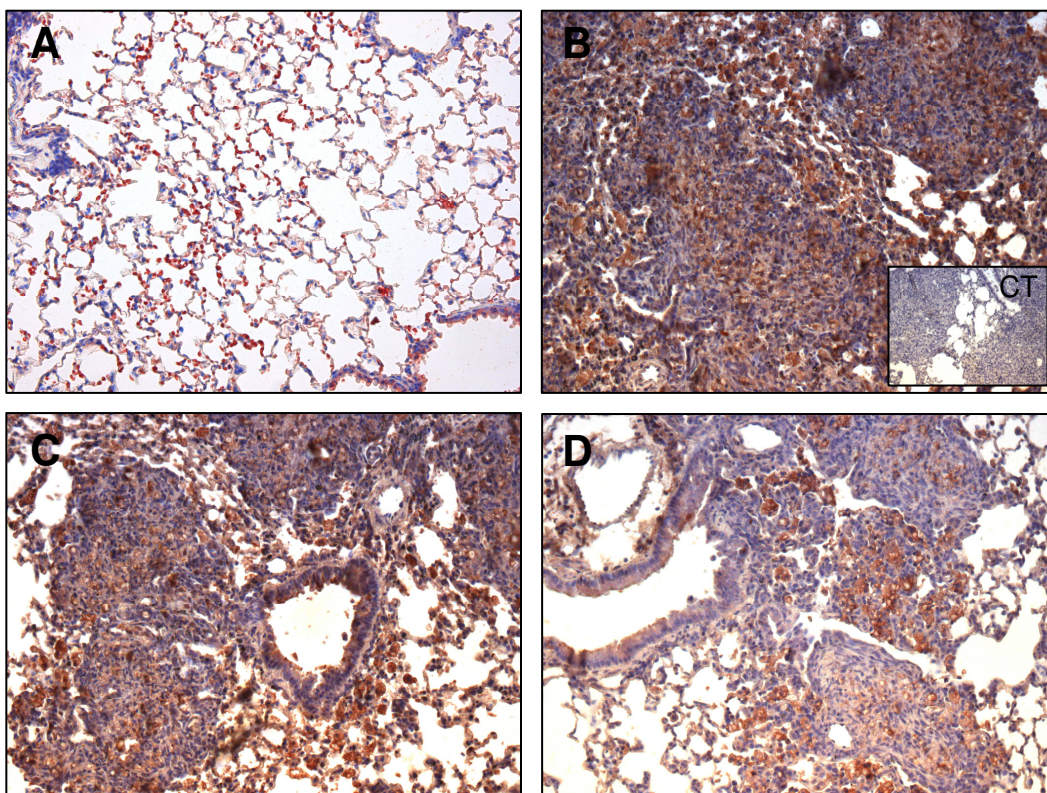


Figura 4.7: Análise da presença de macrófagos (F4/80) no parênquima pulmonar de camundongos instilados com salina e sílica (10 mg), submetidos ao tratamento com dexametasona (25 μ g) e peptídeo Ac2-26 (200 μ g) por 7 dias consecutivos. Os grupos incluem salina (A), sílica (B), dexametasona (C) e peptídeo Ac2-26 200 μ g (D). A técnica utilizada foi de imunohistoquímica, tendo como controle negativo a omissão do anticorpo primário (figura inserida - CT). Foram utilizados no mínimo 6 animais por grupo. Aumento de 200 x.

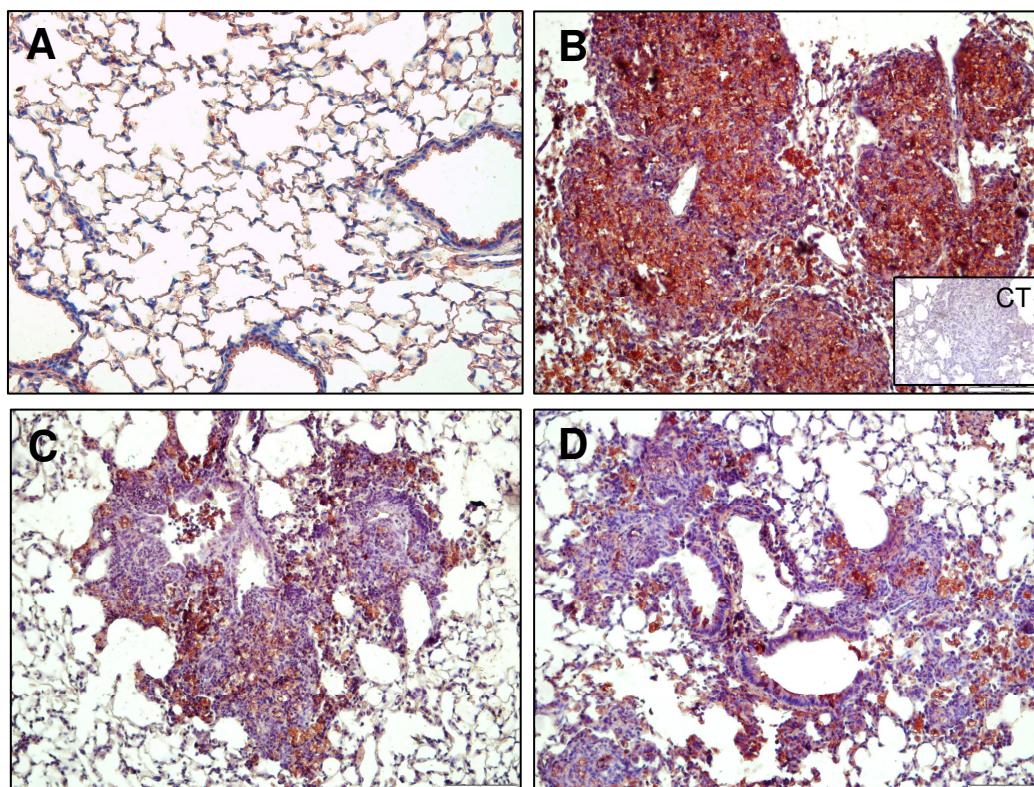


Figura 4.8: Análise da presença de miofibroblastos (α -SMA) no parênquima pulmonar de camundongos instilados com salina e sílica (10 mg), submetidos ao tratamento com dexametasona (25 μ g) e peptídeo Ac2-26 (200 μ g) por 7 dias consecutivos. Os grupos incluem salina (A), sílica (B), dexametasona (C) e peptídeo Ac2-26 200 μ g (D). A técnica utilizada foi de imunohistoquímica, tendo como controle negativo a omissão do anticorpo primário (figura inserida - CT). Foram utilizados no mínimo 6 animais por grupo. Aumento de 200 x.

O tratamento com dexametasona demonstrou ser capaz de inibir, pelo menos em parte, a marcação para F4/80 (Figura 4.7 C). Por outro lado, verificamos que o peptídeo Ac2-26, em sua maior dose (200 µg), promoveu redução de forma acentuada de macrófagos no pulmão dos animais silicóticos (Figura 4.7 D). Na análise dos miofibroblastos, que os animais silicóticos apresentaram intensa marcação de α -SMA (Figura 4.8 B) em comparação aos animais controles. Semelhante ao observado no caso da avaliação de macrófagos, o tratamento com dexametasona foi capaz de reduzir a marcação para α -SMA (Figura 4.8 C). Essa resposta mostrou-se marcadamente inibida pelo tratamento com o peptídeo Ac2-26 (Figura 4.8 D).

4.1.4.1. Efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a proliferação e a secreção de fibroblastos pulmonares *in vitro*

Para investigar melhor o efeito do tratamento com o peptídeo Ac2-26 sobre fibroblastos pulmonares, nosso próximo passo foi avaliar a potencial ação direta do composto sobre estas células em sistema de cultura primária em monocamada.

Inicialmente, avaliamos a resposta de proliferação celular induzida pelas citocinas pró-fibróticas IL-13 e TGF β . Observamos que tanto a IL-13 (40 ng/mL) (Figura 4.9 A) como o TGF β (10 ng/mL) (Figura 4.9 B) induziram uma resposta proliferativa em comparação ao grupo controle (incubado com meio). A incubação dos fibroblastos com o peptídeo Ac2-26 (7,5 a 30 µM) não foi capaz de interferir com a resposta proliferativa induzida por ambas as citocinas (Figura 4.9 A e B).

Sabendo que fibroblastos são células de extrema importância no processo de fibrose, uma vez que produzem e liberam colágeno, além de citocinas pró-fibróticas, como a MCP-1, nosso próximo passo foi verificar o efeito do tratamento com peptídeo Ac2-26 sobre a produção de colágeno e MCP-1. Quando os fibroblastos foram estimulados com IL-13 (Figura 4.10 A) e TGF β (Figura 4.10 B), observamos aumento significativo da quantidade de colágeno liberado. Essa resposta foi inibida de forma concentração-dependente pelo pré-tratamento com peptídeo Ac2-26, a partir de 5 µM, verificando-se uma importante redução com as maiores concentrações.

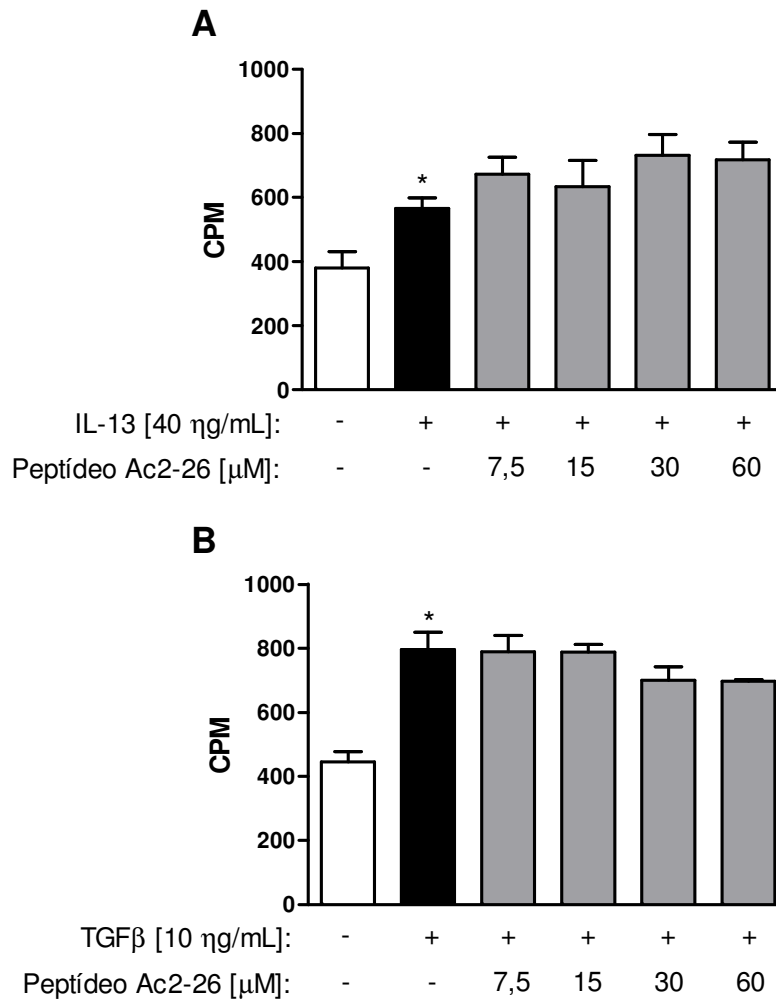


Figura 4.9: Efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a proliferação de fibroblastos provenientes do pulmão de camundongos Swiss-Webster. As células foram incubadas com peptídeo o Ac2-26 (7,5 - 60 μ M), 1 h antes da estimulação com IL-13 (40 η g/ml) (A) e TGF β (10 η g/ml) (B). O símbolo * denota $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não estimulado. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de triplicatas. $n=3$.

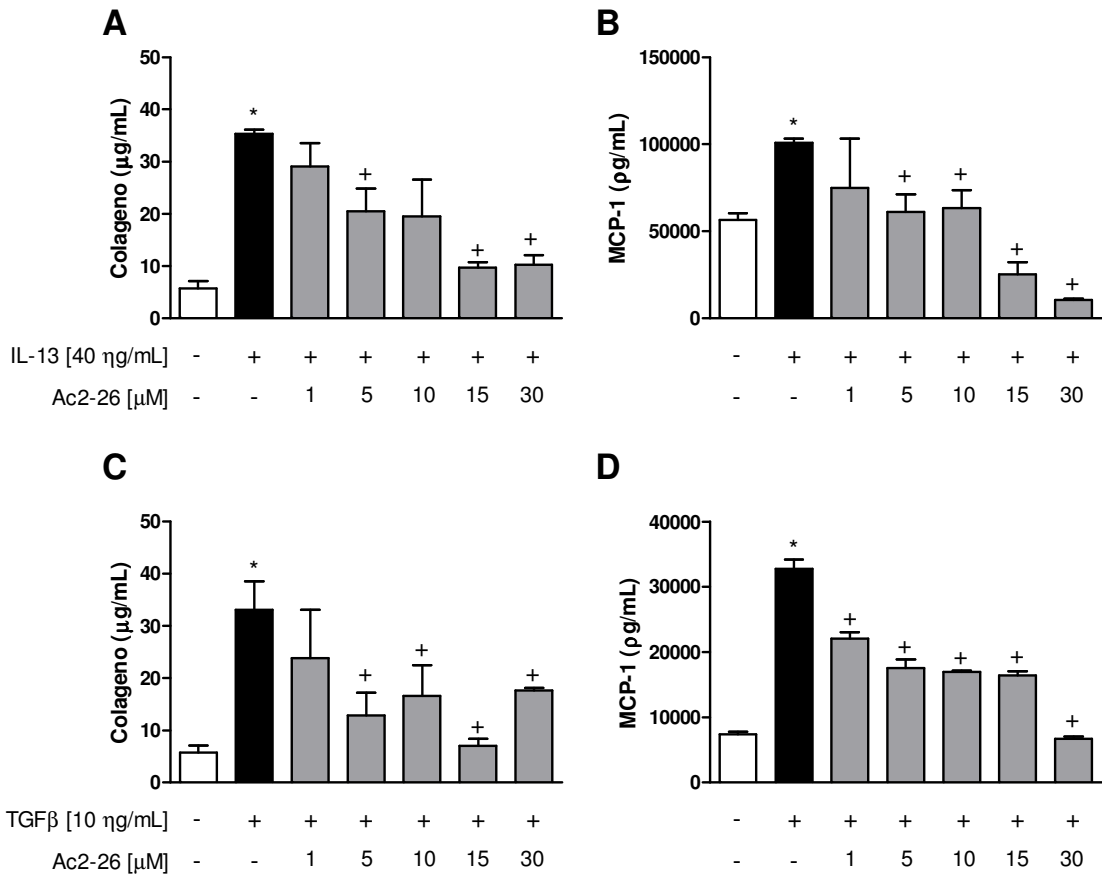


Figura 4.10: Efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a produção de colágeno (A, C) e MCP-1 (B, D) a partir de fibroblastos provenientes do pulmão de camundongos Swiss-Webster. As células foram incubadas com peptídeo Ac2-26 (1 - 30 μ M) 1 h antes da estimulação com IL-13 (40 ng/ml) (A e B) ou TGF β (10 ng/ml) (C e D). Os valores representam a média \pm erro padrão da média de triplicatas. n=3. Os símbolos * e + denotam $p < 0,05$, quando comparado ao grupo não estimulado e estimulado não tratado com peptídeo Ac2-26, respectivamente.

Posteriormente, avaliamos o efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a produção de MCP-1. Verificamos um aumento na produção desta quimiocina induzido pela IL-13 (Figura 4.10 C) e TGF β (Figura 4.10 D). Assim como verificado no caso do colágeno, o peptídeo também foi capaz de reduzir a produção de MCP-1 de maneira dependente de concentração (Figura 4.10 C, D). Em conjunto esses achados indicam que embora o peptídeo não seja ativo em interferir com a proliferação dos fibroblastos, este apresenta importante efeito direto sobre a ativação dessas células.

4.1.4.2. Envolvimento dos receptores FPR1 e FPR2 no efeito do peptídeo Ac2-26 sobre fibroblastos *in vitro*

O peptídeo Ac2-26 exerce seus efeitos anti-inflamatórios através da ligação aos receptores FPR1 e FPR2, que são acoplados à proteína G e estão expressos na superfície da membrana celular. Em um primeiro momento, através da técnica de PCR em tempo real, verificamos a expressão do RNAm para ambos os subtipos de receptores em fibroblastos estimulados ou não com IL-13 e TGF β . Conforme pode ser observado na tabela 4.1, a expressão do RNAm para os receptores FPR1 e FPR2 mostrou-se significativamente aumentada quando da estimulação dos fibroblastos com a IL-13 (40 η g/ml), porém não com TGF β (10 η g/ml).

Na sequência, utilizamos como ferramenta de estudo camundongos nocautes para os genes determinantes dos receptores FPR1 (FPR1^{-/-}) e FPR2 (FPR2^{-/-}). Ao estimular fibroblastos provenientes de animais FPR1^{-/-}, com diferentes concentrações de IL-13 (20 a 80 η g/mL) e de TGF β (5 a 20 η g/mL), verificamos aumento na produção de colágeno e MCP-1 de forma concentração-dependente, assim como observado com as células dos animais FPR1^{+/+} (Figura 4.11). Quando fibroblastos de animais FPR1^{+/+} foram incubadas com o peptídeo Ac2-26 (15 e 30 μ M), observamos inibição da produção de colágeno e de MCP-1, de forma concentração dependente. Na condição das células provenientes de animais FPR1^{-/-}, vimos que o tratamento com o peptídeo não interferiu com a geração de colágeno e MCP-1 (Figura 4.12).

Tabela 4.1: Efeito da estimulação com IL-13 ou TGF β sobre a expressão de RNAm para receptores FPR1 e FPR2 em fibroblastos pulmonares de camundongos C57BL6.

	$\Delta\Delta\text{Ct}$ (real time – PCR)	
	Fpr1	Fpr2
Controle	25,789 \pm 0,042	28,531 \pm 0,235
IL-13 [40 ng/mL]	27,754 \pm 0,100*	30,982 \pm 0,338*
TGF β [10 ng/mL]	25,982 \pm 0,040	29,144 \pm 0,250

Os valores representam a média \pm erro padrão da média de triplicatas. n=4. O símbolo * denota $p < 0.05$ em comparação ao grupo não estimulado.

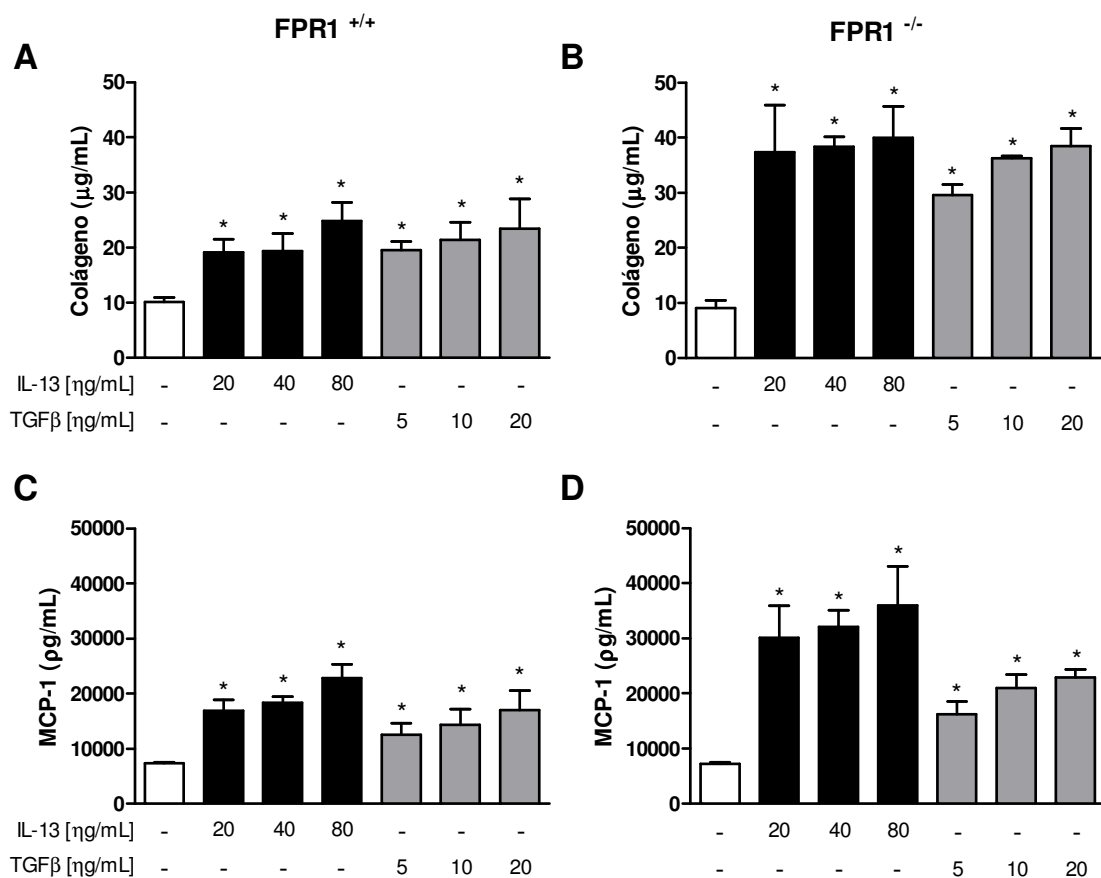


Figura 4.11: Produção de colágeno e MCP-1 por fibroblastos pulmonares de camundongos FPR1^{+/+} e FPR1^{-/-}. O colágeno (A, B) e MCP-1 (C, D) foram quantificados a partir do sobrenadante recolhido 24 h após a estimulação com IL-13 (20 - 80 ng/mL) e TGFβ (5 - 20 ng/mL). Os valores representam a média ± erro padrão da média de triplicatas. n=4. O símbolo * denota p<0.05 em comparação ao grupo não estimulado.

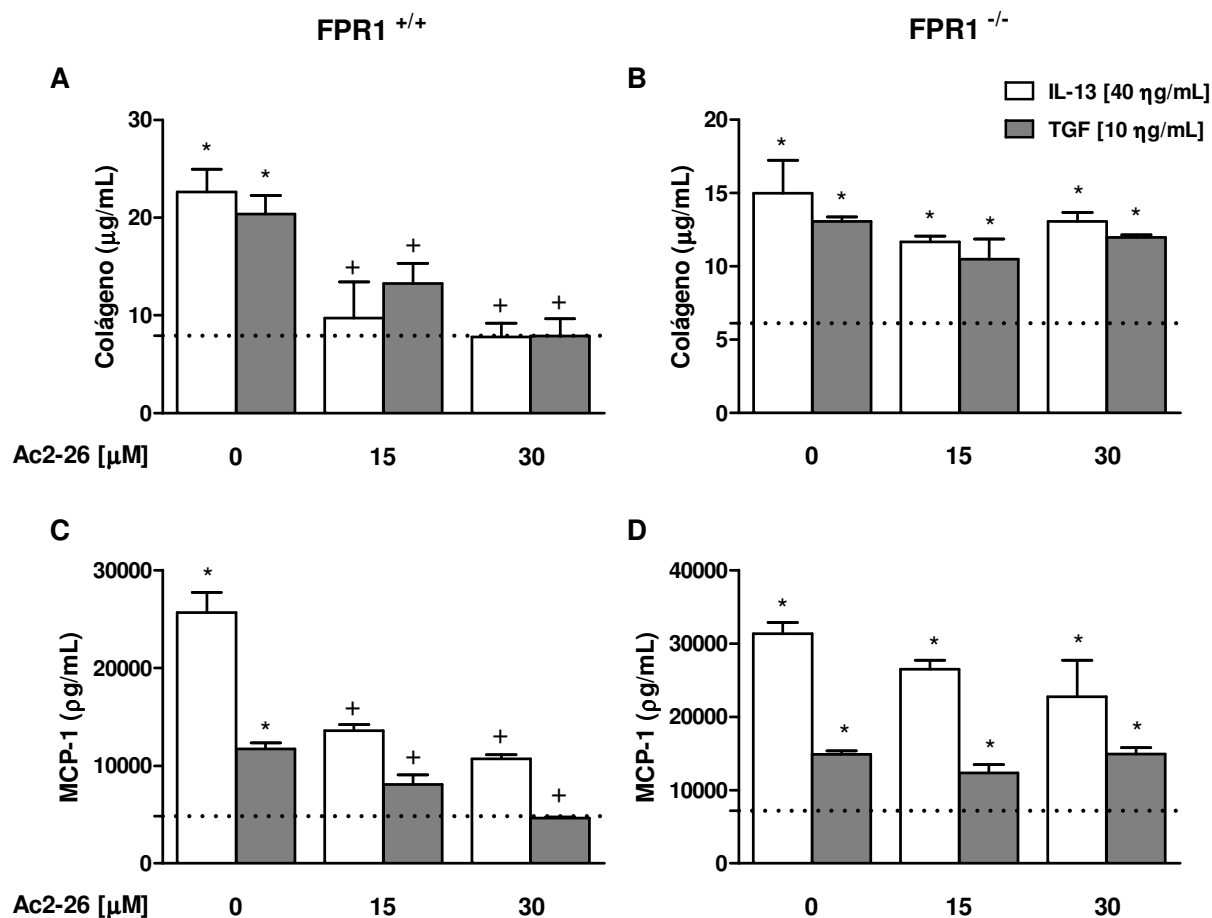


Figura 4.12: Efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a produção de colágeno e MCP-1 por fibroblastos pulmonares de camundongos $\text{FPR1}^{+/+}$ (A, C) e $\text{FPR1}^{-/-}$ (B, D) estimulados com IL-13 (40 $\eta\text{g/mL}$) e $\text{TGF}\beta$ (10 $\eta\text{g/mL}$). Os valores representam a média \pm erro padrão da média de triplicatas. $n=4$. O símbolo * denota $p < 0,05$ em comparação ao grupo não estimulado (linha pontilhada), enquanto + representa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo estimulado na ausência do peptídeo Ac2-26.

Posteriormente, avaliamos o envolvimento do receptor FPR2. Observamos que a estimulação fibroblastos pulmonares de animais FPR2^{+/+} com diferentes concentrações de IL-13 e TGFβ induziu um significativo aumento na produção de colágeno e de MCP-1, resposta mantida quando as células foram provenientes de camundongos FPR2^{-/-} (Figura 4.13).

Fibroblastos de animais FPR2^{+/+} tratados com peptídeo Ac2-26 mostraram redução dos níveis de colágeno, bem como de MCP-1, tanto frente à estimulação com IL-13 como com TGFβ, sendo essa inibição dependente da concentração do composto. Por outro lado, as células de animais FPR2^{-/-} não tiveram a produção de colágeno afetada pelo peptídeo, permanecendo os níveis próximos àqueles do grupo estimulado com IL-13 e TGFβ). Contudo, a produção de MCP-1 foi sensível ao peptídeo, sendo detectados valores próximos ao do grupo controle não estimulado (Figura 4.14). Esses resultados sugerem o envolvimento do receptor FPR1 na resposta inibitória promovida pelo peptídeo Ac2-26 sobre a produção de colágeno e MCP-1 por fibroblastos pulmonares estimulados com IL-13 ou TGFβ. Enquanto que o receptor FPR2 parece ser apenas importante na produção de colágeno por essas células, mas não de MCP-1.

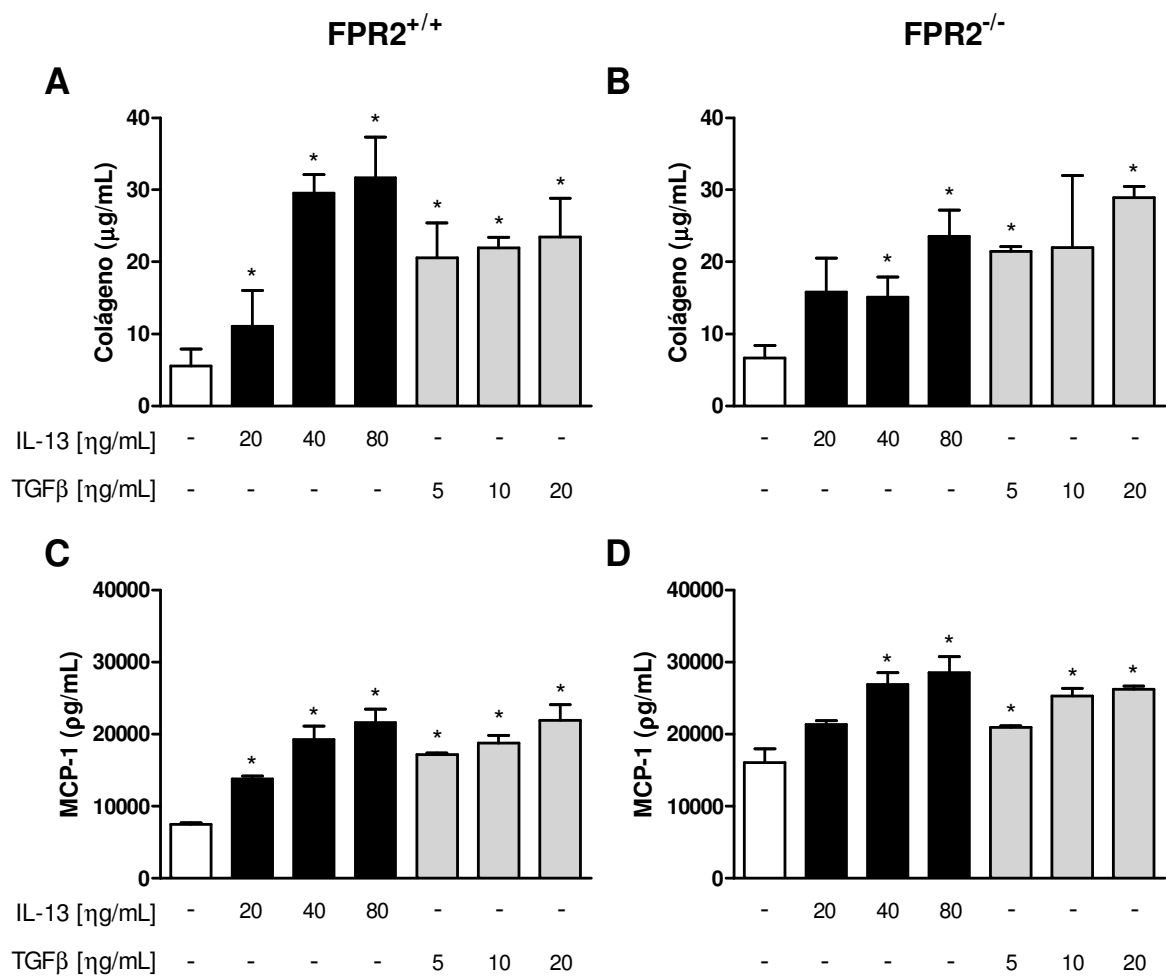


Figura 4.13: Produção de colágeno e MCP-1 por fibroblastos pulmonares de camundongos FPR2^{+/+} e FPR2^{-/-}. O colágeno (A, B) e MCP-1 (C, D) foram quantificados a partir do sobrenadante recolhido 24 h após a estimulação com IL-13 (20 - 80 ηg/mL) e TGFβ (5 - 20 ηg/mL). Os valores representam a média ± erro padrão da média de triplicatas. n=4. O símbolo * denota p<0.05 em comparação ao grupo não estimulado.

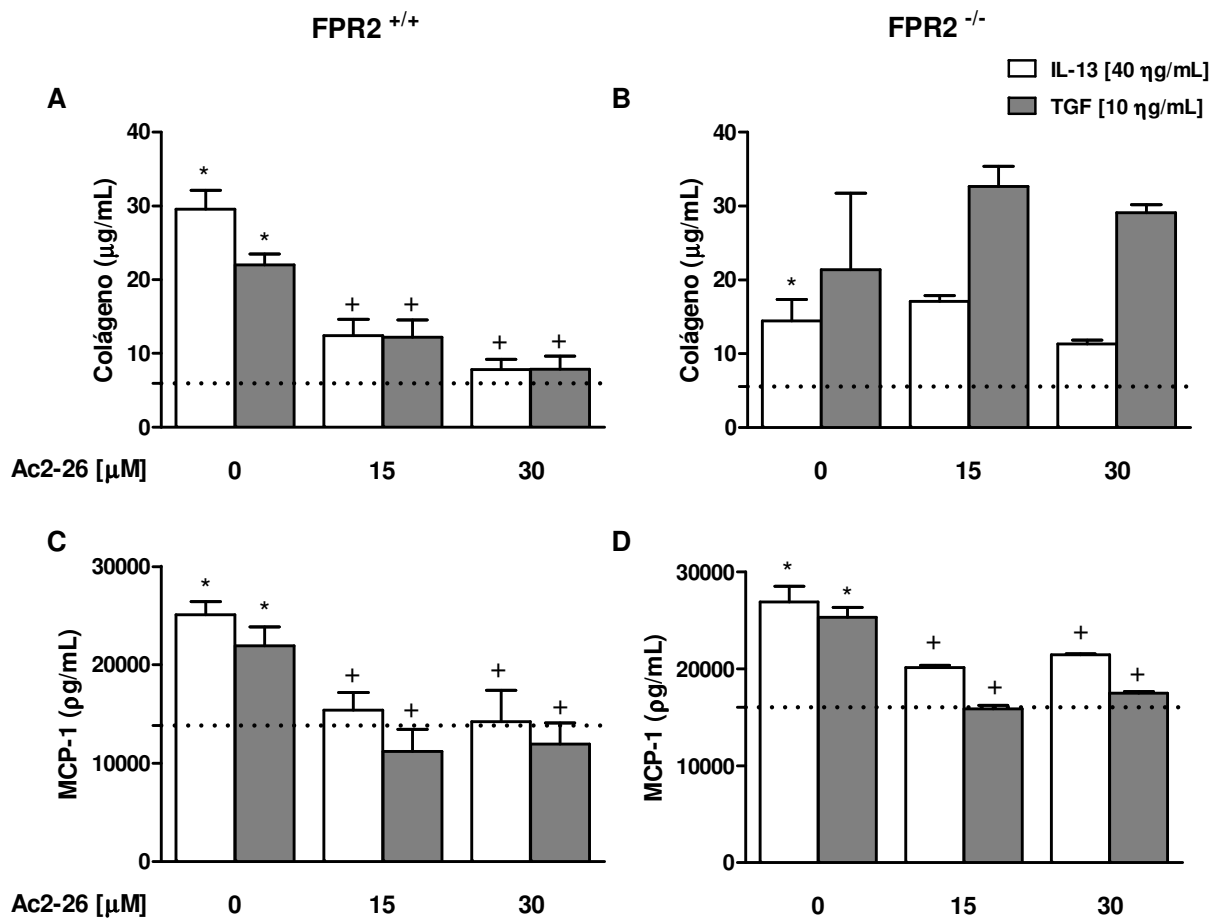


Figura 4.14: Efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a produção de colágeno e MCP-1 por fibroblastos pulmonares de camundongos FPR2^{+/+} (A, C) e FPR2^{-/-} (B, D) estimulados com IL-13 (40 ng/mL) e TGFβ (10 ng/mL). Os valores representam a média ± erro padrão da média de triplicatas. n=4. O símbolo * denota p<0,05 em comparação ao grupo não estimulado (linha pontilhada); + representa p<0,05 quando comparado ao grupo estimulado na ausência do peptídeo Ac2-26.

4.2. Avaliação do papel da proteína anti-inflamatória anexina-1 na resposta inflamatória induzida por partículas de sílica

4.2.1. Função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas em animais silicóticos

Tomando por base o efeito supressor verificado na condição do tratamento de animais silicóticos com o peptídeo Ac2-26, em uma segunda parte deste trabalho tivemos por interesse investigar o papel da anexina-1 no contexto da silicose experimental murina. Para tanto foram utilizados camundongos nocauteados para o gene codificante da anexina-1. Conforme ilustrado na figura 4.15, confirmamos achados prévios de que camundongos selvagens silicóticos (ANX1^{+/+}) apresentaram níveis de resistência (painel A) e elastância (painel B) basais superiores aos dos controles. Resposta similar foi observada no caso dos camundongos nocautes para anexina-1 (ANX1^{-/-}) silicóticos em relação a seus respectivos controles. Após provocação com metacolina, os animais ANX1^{+/+} silicóticos responderam de forma exacerbada tanto para resistência como elastância, fenômeno também verificado com os animais ANX1^{-/-} silicóticos comparados a seus controles normais. Verificamos, ainda, que os camundongos nocautes silicóticos apresentaram resposta de resistência pulmonar similar a dos selvagens, porém mostraram níveis mais elevados de elastância basal e mais reativos à metacolina em sua menor concentração. Além disso, foi evidenciado que muito embora os animais ANX1^{-/-} não tenham apresentado diferença significativa no basal de resistência e elastância, estes se mostraram claramente mais reativos quando da estimulação com a metacolina (Figura 4.15).

Na tentativa de compreender melhor o fenômeno de maior reatividade dos camundongos ANX1^{-/-} ao agonista colinérgico metacolina, avaliamos a reatividade destes animais à serotonina. Os animais ANX1^{-/-} apresentaram resposta similar a dos ANX1^{+/+} para ambas resistência e elastância (Figura 4.16). Utilizando o sistema *ex vivo* de órgão isolado, verificamos que anéis de traquéia de camundongos ANX1^{-/-}, quando provocadas com concentrações crescentes do agonista colinérgico carbacol (10^{-8} - 10^{-4} M), apresentaram maior sensibilidade conforme atestado pelo deslocamento da curva para direita e por valores menores de EC₅₀ ($0,26 \pm 0,1$ mM) em comparação aos ANX1^{+/+} (EC₅₀: $0,3 \pm 0,07$ mM). Foram detectados valores de

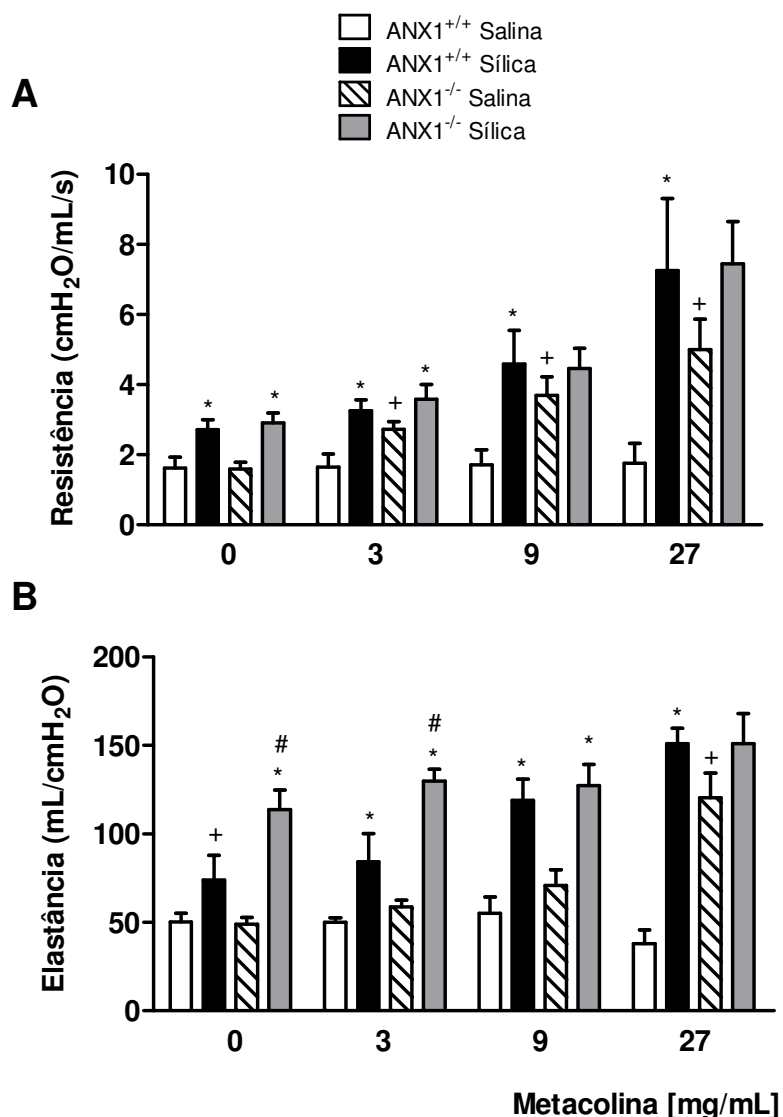


Figura 4.15: Análise da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de camundongos ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-} instilados com salina e sílica (10 mg). Os parâmetros de resistência (A) e elastância (B) pulmonar foram avaliados na condição de aerolização com PBS e metacolina (3 - 27 mg/mL), 7 dias após a provocação com sílica. As colunas representam a média \pm erro padrão da média de no mínimo 5 animais por grupo. O símbolo * denota $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina, enquanto + e # representam $p < 0,05$ quando comparado ao grupo ANX1^{+/+} salina e ANX1^{+/+} sílica, respectivamente.

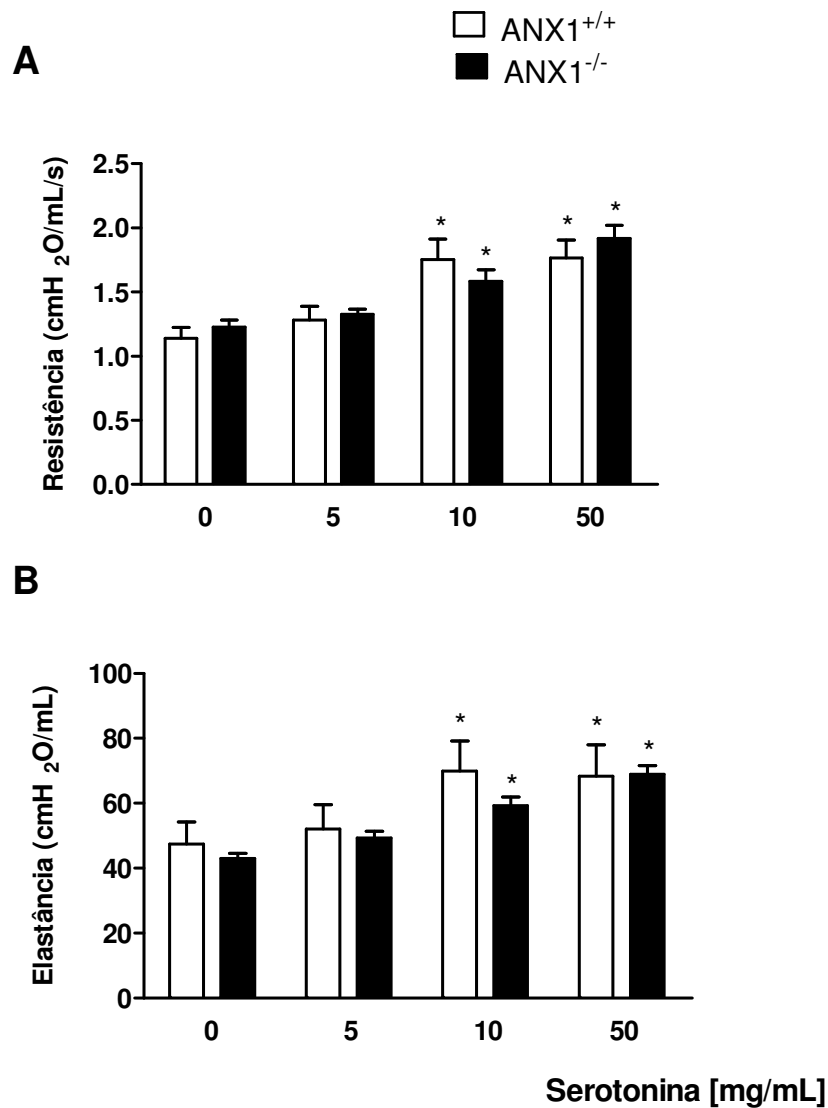


Figura 4.16: Análise da função pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas de camundongos ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-}. Os parâmetros de resistência (A) e elastância (B) pulmonar foram avaliados na condição de aerolização com PBS e serotonina (5 - 50 mg/mL). Os valores representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 7 animais por grupo. O símbolo * denota p<0,05 em comparação ao basal do grupo controle.

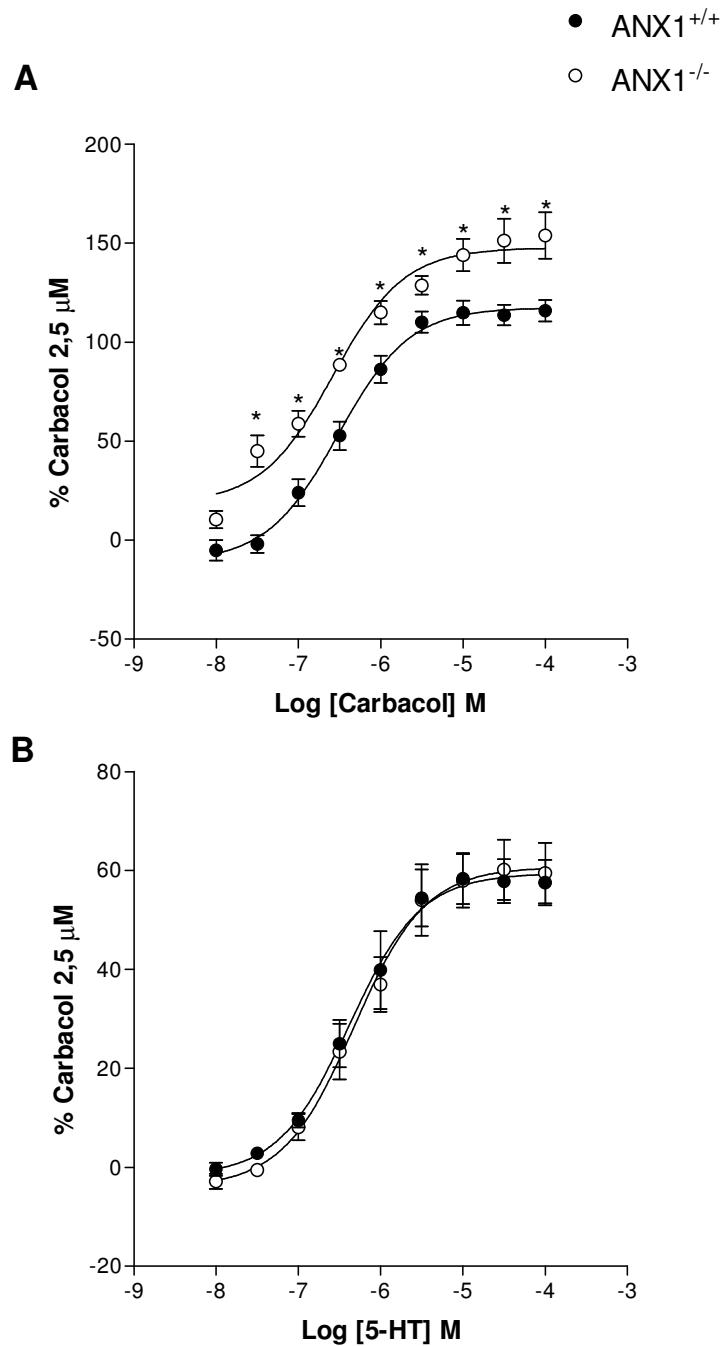


Figura 4.17: Análise da contração de anéis de traquéias de camundongos ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-}. Os anéis de traquéia foram provocados com carbacol (10^{-8} - 10^{-4} M) (A) e serotonina (10^{-8} - 3×10^{-5} M) (B). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (n=4) do percentual de contração produzida por 2,5 μ M de carbacol. O símbolo * denota $p < 0,05$ em comparação ao grupo ANX1^{+/+}.

efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) superiores no caso de animais nocautes ($154,02 \pm 11,7$) do que nos controles ($116,08 \pm 5,4$) (Figura 4.17 A). De forma coerente com o observado *in vivo*, traquéias de animais ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-} apresentaram nível de resposta similar, com valores de EC_{50} de $0,42 \pm 0,13$ e $0,47 \pm 0,13$ μM , respectivamente, quando provocadas com concentrações crescentes de serotonina (10^{-8} - 10^{-4} M) (Figura 4.17 B).

4.2.2. Análise morfológica e morfométrica do pulmão de camundongos silicóticos

Para a verificação da arquitetura do parênquima pulmonar foi realizada a análise histológica dos animais selvagens e nocautes, instilados ou não com partículas de sílica (Figura 4.18). Utilizando a coloração de hematoxilina e eosina observamos ter o parênquima pulmonar dos animais selvagens controles a presença de arquitetura preservada septos alveolares bem definidos e ausência de espessamento (Figura 4.8 A). Por outro lado, a histologia dos pulmões de animais ANX1^{+/+} silicóticos revelou a presença de intenso infiltrado inflamatório com a formação de granulomas característicos da silicose (Figura 4.18 B). Os pulmões dos animais ANX1^{-/-} salina, assim como os dos selvagens, apresentaram arquitetura normal sem alterações (Figura 4.18 C), enquanto que os pulmões dos animais ANX1^{-/-} silicóticos mostraram intensa resposta inflamatória com presença de granulomas (Figura 4.18 D). Ao realizar a análise morfométrica dos pulmões dos animais ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-} silicóticos, não observamos diferença na porcentagem de área do parênquima pulmonar ocupada por granulomas entre os dois grupos (Figura 4.18 E). No entanto, apesar de não haver diferença quanto à formação de granulomas, entre camundongos nocautes e selvagens silicóticos, observamos que os animais ANX1^{-/-} apresentaram maior infiltrado celular no parênquima pulmonar.

Para avaliação mais específica do conteúdo de colágeno, partimos para a análise histológica de cortes de pulmão submetidos à coloração com Picrus sirius. Verificamos que os pulmões dos animais ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-} salina mostraram uma marcação de colágeno, devido a presença dessa proteína na membrana basal de vasos sanguíneos e de vias aéreas, permanecendo o parênquima sem alterações (Figura 4.19 A e C). Nos pulmões dos camundongos ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-} silicóticos

(Figura 4.19 B e D, respectivamente) notamos intensa marcação das fibras de colágeno presente, principalmente, nas regiões dos granulomas, sendo que na ausência da anexina-1 observamos um discreto aumento da marcação. Para confirmação desse dado foi realizada avaliação quantitativa através da determinação do conteúdo de colágeno no tecido pulmonar pela técnica colorimétrica de sircol. Com isso, verificamos o aumento na quantidade de colágeno no parênquima pulmonar de animais ANX1^{+/+} silicóticos em comparação ao seu respectivo controle. O grupo ANX1^{-/-} sílica mostrou aumento mais acentuado do colágeno em relação aos animais selvagens. Níveis de colágeno do grupo ANX1^{-/-} salina permaneceram iguais aos do grupo selvagem (Figura 4.19 E). Esses dados sugerem um importante papel da anexina-1 endógena no processo de deposição de colágeno no tecido pulmonar induzido por partículas de sílica cristalina.

4.2.3. Análise da produção de mediadores inflamatórios no pulmão de camundongos silicóticos

Avaliando a geração das quimiocinas KC e MIP-2, verificamos que os camundongos ANX1^{-/-} apresentaram aumento nos níveis desses mediadores em comparação com os animais ANX1^{+/+} sílica (Figura 4.20 A e B). O grupo ANX1^{+/+} silicótico também apresentou níveis elevados da quimiocina MCP-1, quimiotática para monócitos, sendo este aumento observado de maneira similar nos pulmões de animais ANX1^{-/-} silicóticos (Figura 4.20 C). Quando quantificamos TNF α e INF γ , verificamos também o aumento dos níveis dessas citocinas no grupo ANX1^{+/+} sílica, enquanto que nos pulmões dos animais nocautes silicóticos observamos um aumento mais expressivo dessas citocinas (Figura 4.20 D e E). Desta forma, verificamos que a proteína anti-inflamatória anexina-1 exerce importante papel na regulação da produção de citocinas durante o processo inflamatório pulmonar induzido por partículas de sílica em camundongos.

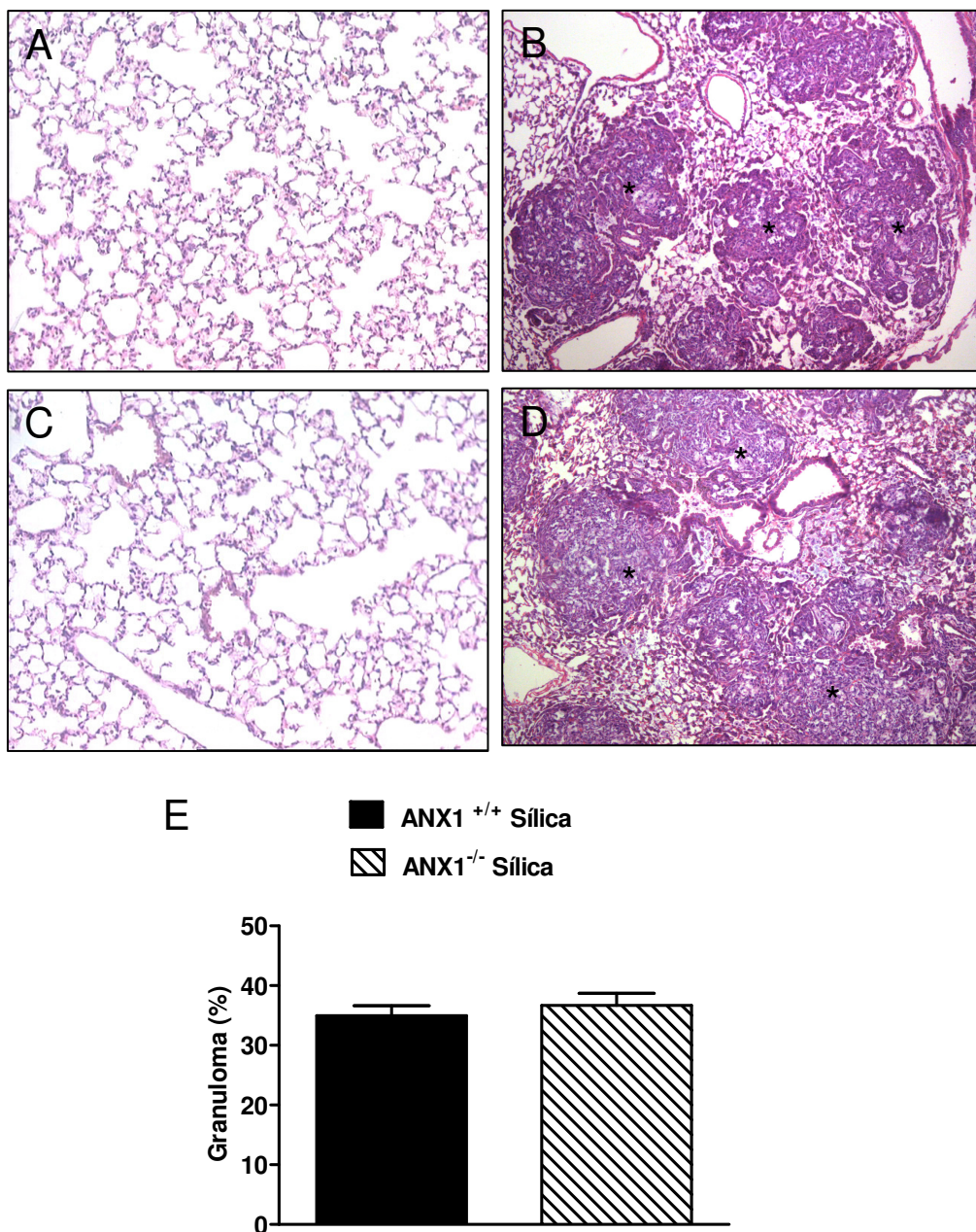


Figura 4.18: Análise morfológica e morfométrica de pulmões de camundongos ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-} instilados com salina e sílica (10 mg). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. Aumento 100x. Os grupos incluem ANX1^{+/+} salina (A), ANX1^{+/+} sílica (B), ANX1^{-/-} salina (C) e ANX1^{-/-} sílica (D). A análise morfométrica está representada (E). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. O * indica o granuloma. Valores representam a média ± erro padrão da média de no mínimo 8 animais.

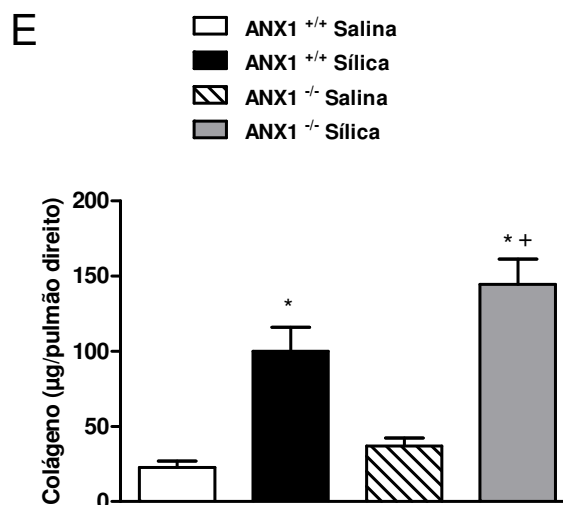
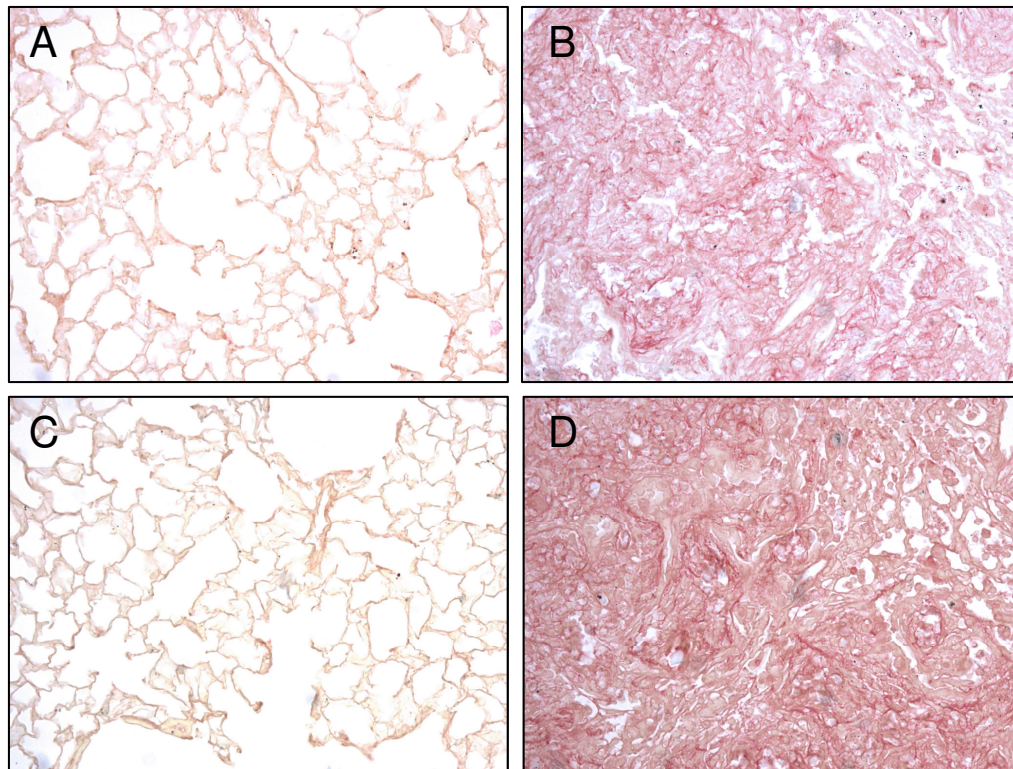


Figura 4.19: Análise de fibras de colágeno em pulmões de camundongos ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-} instilados com salina e sílica (10 mg). Os grupos incluem ANX1^{+/+} salina (A), ANX1^{+/+} sílica (B), ANX1^{-/-} salina (C) e ANX1^{-/-} sílica (D). Os cortes foram corados com picrus sirius e as imagens capturadas e analisadas em microscópio de luz. Aumento 200x. A quantificação de colágeno (E) está representada como média \pm erro padrão da média de no mínimo 8 animais. Os símbolos * e + denotam $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina e ANX1^{+/+} sílica, respectivamente.

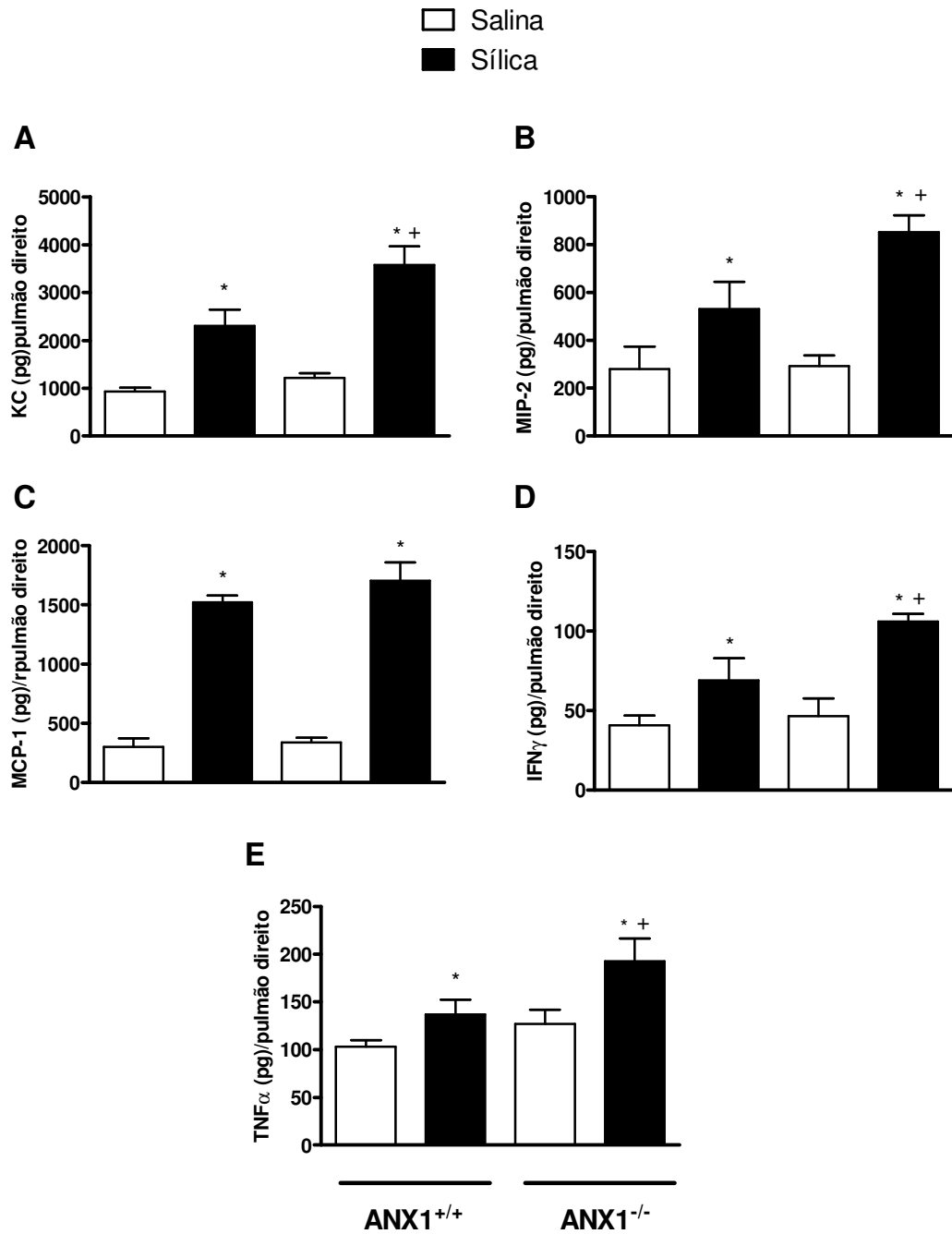


Figura 4.20: Quantificação de citocinas em pulmões de camundongos ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-} instilados com salina e sílica (10 mg). Foram avaliadas KC (A), MIP-2 (B), MCP-1 (C), INF γ (D), TNF α (E) e TGF β (F). Os valores representam a média \pm erro padrão da média de no mínimo 8 animais por grupo. Os símbolos * e + indicam $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina e ANX1^{+/+} sílica, respectivamente.

4.2.3.1. Influência da anexina-1 sobre a produção de citocinas por macrófagos peritoneais de camundongo

Verificando o papel da anexina-1 endógena sobre a produção de citocinas inflamatórias produzidas por macrófagos peritoneais de camundongos, observamos aumento na liberação das citocinas TNF α (Figura 4.21 A) e IL-6 (Figura 4.21 B) por células de animais ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-}, estimuladas com LPS (1 μ g/mL) e sílica (50 μ g/mL) em comparação ao grupo não estimulado. No entanto, macrófagos de animais ANX1^{-/-} produziram níveis de TNF α e IL-6 mais acentuados que as células ANX1^{+/+} (Figura 4.21). Esses dados mostram a importante participação da anexina-1 endógena como agente regulador da liberação de TNF α e IL-6 por macrófagos quando estimulados por LPS ou sílica.

4.2.3.2. Papel da anexina-1 sobre fibroblastos pulmonares

Analisando o efeito da anexina-1 endógena sobre fibroblastos pulmonares, verificamos que células ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-} estimuladas com as citocinas fibrogênicas, IL-13 (40 η g/mL) e TGF β (10 η g/mL), apresentaram taxa proliferativa mais acentuada que o grupo não estimulado (Figura 4.22). No entanto, fibroblastos ANX1^{-/-} proliferaram significativamente menos que as células ANX1^{+/+}, quando estimuladas com IL-13. Além disso, observamos que fibroblastos pulmonares ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-} estimulados com IL-13 produziram altas concentrações de MCP-1 em comparação ao grupo não estimulado, não havendo diferença nos níveis dessa quimiocina entre os dois tipos celulares (Figura 4.23). Esses dados mostram que a anexina-1 endógena parece exercer importante papel na regulação da proliferação de fibroblastos pulmonares, mas não sobre a produção de MCP-1 por essas células, quando estes foram estimulados com IL-13.

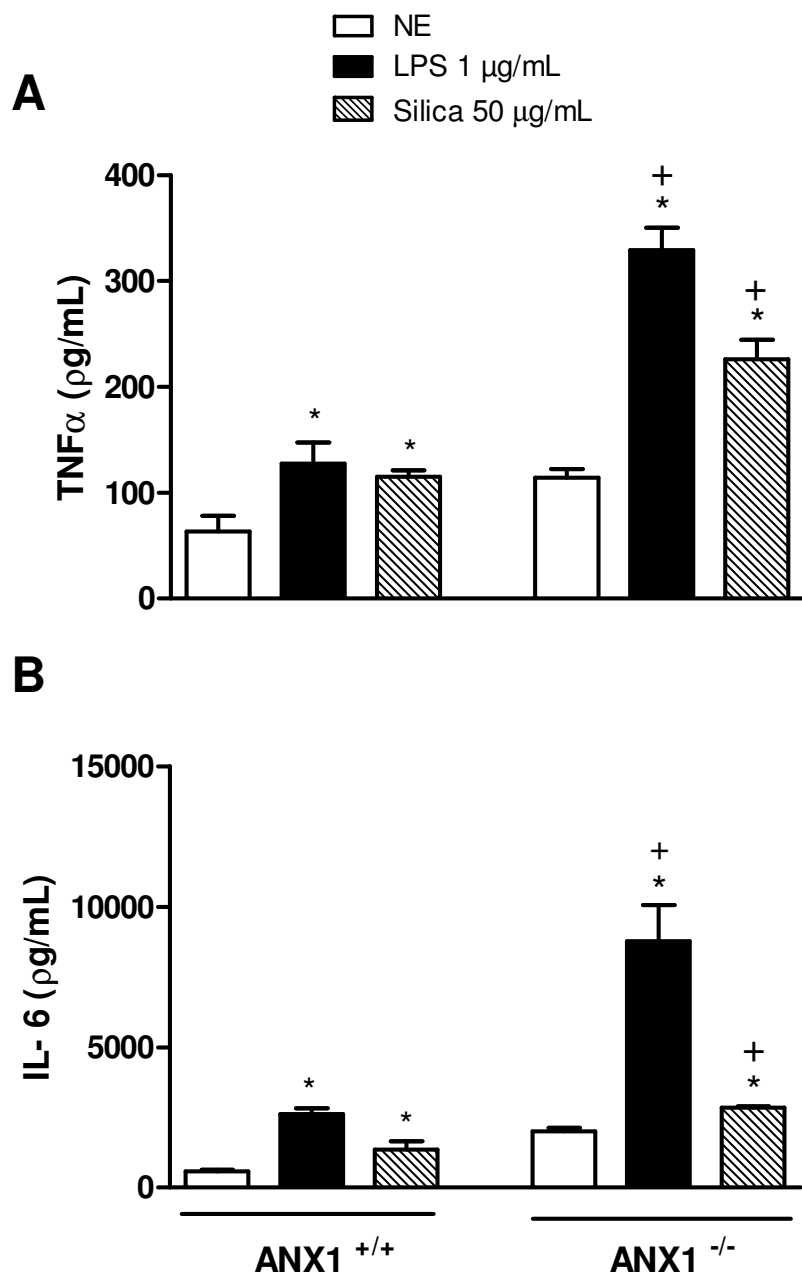


Figura 4.21: Avaliação da produção de TNF α e IL-6 por macrófagos peritoneais de camundongos ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-}. O TNF α (A) e IL-6 (B) foram quantificados a partir do sobrenadante recolhido 6 h após a estimulação com LPS (1 μ g/mL) e sílica (50 μ g/mL). Os valores representam a média \pm erro padrão da média de triplicatas. n=3. Os símbolos * e + denotam p<0,05 quando comparado ao grupo não estimulado (NE) e ANX1^{+/+} estimulado, respectivamente.

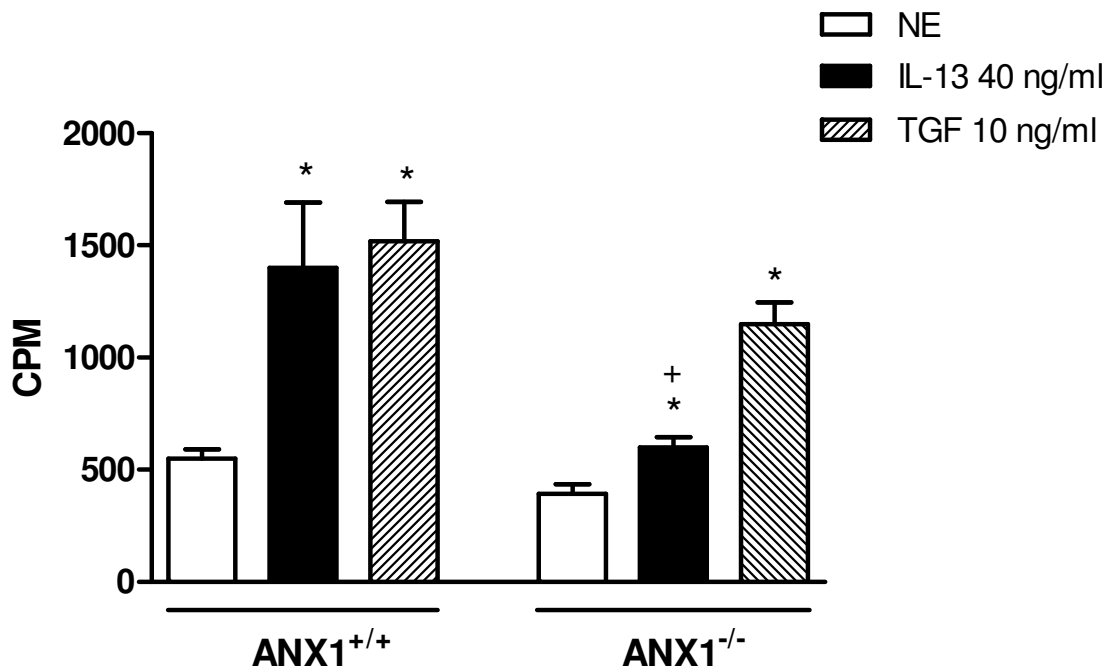


Figura 4.22: Avaliação da proliferação de fibroblastos pulmonares de camundongos ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-}. A taxa proliferativa dos fibroblastos foi determinada 24 h após a estimulação com IL-13 (40 ng/ml) e TGFβ (10 ng/ml). Os valores representam a média ± erro padrão da média de triplicatas. n=3. Os símbolos * e + denotam p<0,05 quando comparado ao grupo não estimulado (NE) e ANX1^{+/+} estimulado, respectivamente.

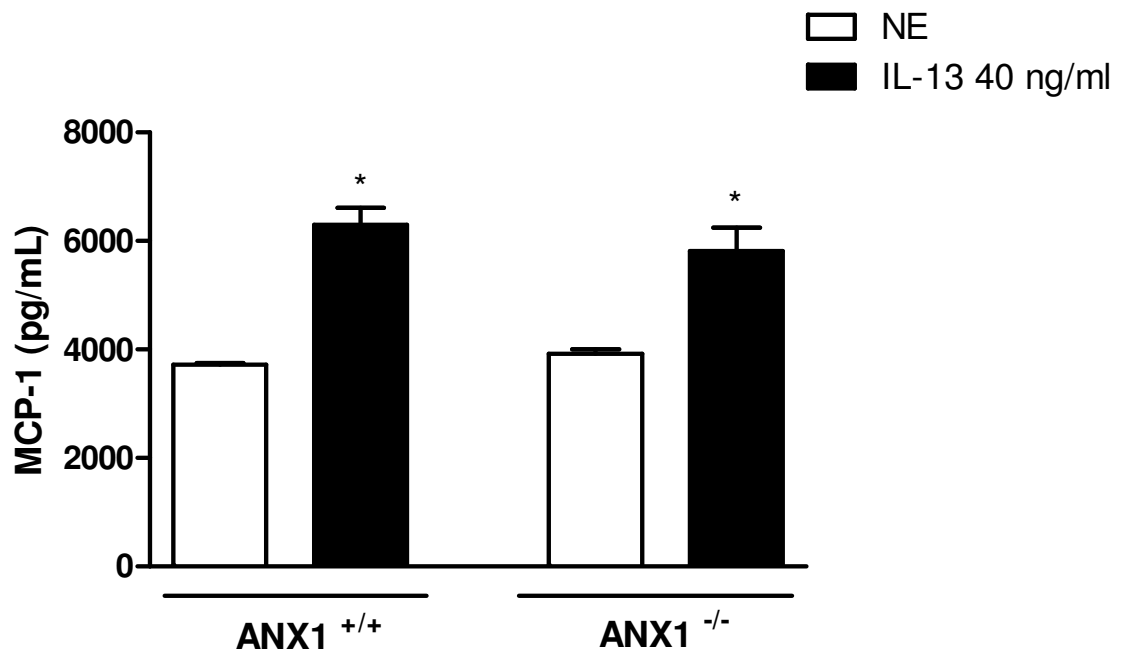


Figura 4.23: Avaliação da produção de MCP-1 por fibroblastos pulmonares de camundongos ANX1^{+/+} e ANX1^{-/-}. A quantificação de MCP-1 foi realizada a partir do sobrenadante recolhido 24 h após a estimulação com IL-13 (40 ng/ml). Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média de triplicatas. n=3. O símbolo * denota $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo não estimulado.

5. Discussão

Nossos dados mostram que os animais silicóticos apresentaram alteração nos parâmetros de mecânica respiratória expressa por aumento de resistência e elastância pulmonares, e por uma resposta de hiperreatividade das vias aéreas quando estimulados com aerossol do agente broncoconstritor colinérgico metacolina. Esses resultados ratificam achados prévios de nosso grupo que revelaram a ocorrência de alterações obstrutivas e restritivas nos animais silicóticos. A resposta de hiperreatividade apresenta-se de forma interessante e em concordância com o verificado em pacientes silicóticos (Forastiere F, 2002; Montes, II, 2004). Entretanto, devido ao reduzido número de estudos, mais ensaios são necessários no sentido de elucidar o mecanismo envolvido neste processo. Trabalhos mostram que a exposição a altas concentrações de sílica cristalina promove uma intensa resposta inflamatória acompanhada de proliferação celular e excessiva deposição de colágeno e demais componentes da matriz extracelular acarretando no desenvolvimento da fibrose (Mossman BT, 1998). Desta maneira, a alteração da função pulmonar observada nos animais silicóticos está diretamente relacionada com as alterações morfológicas observadas no parênquima pulmonar desses animais, que por sua vez reflete a presença de um intenso infiltrado inflamatório e formação de granulomas.

Controlar a exposição às partículas de sílica e remover indivíduos sintomáticos do local de trabalho ainda constituem as principais medidas para a prevenção da silicose. No entanto, até o presente momento poucos foram os avanços para se obter uma estratégia terapêutica para a silicose. Conhecendo o potencial anti-inflamatório do peptídeo derivado da proteína anexina-1, Ac2-26, analisamos o efeito do mesmo sobre a inflamação pulmonar induzida por partículas de sílica. Em adição, verificamos o possível efeito anti-fibrótico do peptídeo sobre a fibrose pulmonar induzida pela sílica, evento este ainda não investigado.

Neste trabalho verificamos que o peptídeo Ac2-26 foi capaz de reduzir de maneira muito importante a inflamação pulmonar induzida por partículas de sílica em camundongos. Observamos com o tratamento a melhora da função pulmonar de animais silicóticos, bem como a reversão do quadro inflamatório com redução da formação dos granulomas, da deposição de colágeno e produção de citocinas. Em adição, através de experimentos *in vitro*, verificamos que o peptídeo Ac2-26 exerce

um importante papel inibitório sobre a reatividade de fibroblastos pulmonares, células de grande relevância no contexto da fibrose, reduzindo a produção de colágeno e da quimiocina MCP-1. Além disso, verificamos a participação dos receptores FPR1 e FPR2 na resposta inibitória promovida pelo peptídeo Ac2-26 em fibroblastos.

O peptídeo Ac2-26 é um derivado da porção N-terminal da proteína anexina-1, região à qual está associada a ação anti-inflamatória da mesma na sua forma íntegra. Considerando o fato de que parte das ações anti-inflamatórias dos glicocorticóides é mediada pela anexina-1 (Parente L, 2003), utilizamos o tratamento com o corticóide clássico dexametasona como droga controle nos experimentos realizados *in vivo*.

Inicialmente avaliamos a função pulmonar dos animais silicóticos tratados com o peptídeo Ac2-26, por via intranasal, e observamos redução da resistência pulmonar basal e da elastância, bem como marcada supressão da resposta de hiperreatividade das vias aéreas à metacolina em ambos os casos. No entanto, o tratamento com dexametasona reduziu apenas parcialmente esses parâmetros. A análise histológica revelou que o tratamento com peptídeo Ac2-26 foi capaz de reduzir de maneira eficaz a infiltração de células inflamatórias, bem como a formação de granulomas, enquanto que o glicocorticóide reduziu apenas parcialmente essas respostas. A melhora da condição do parênquima, devido a redução da infiltração celular e da formação de granulomas, promovida pelo peptídeo, e parcialmente pela dexametasona, pode ter contribuído para o restabelecimento da função pulmonar dos animais silicóticos tratados. Getting e colaboradores (1998) demonstraram que a dexametasona é capaz de inibir a infiltração de neutrófilos e monócitos no modelo de inflamação aguda induzida por zimosan através de um mecanismo mediado pela proteína anexina-1. Além disso, o mesmo estudo demonstrou que o peptídeo Ac2-26 exerce importante papel anti-inflamatório também inibindo a migração de neutrófilos e monócitos. Desta maneira, acredita-se que parte do efeito inibitório desencadeado pela dexametasona nos animais silicóticos pode ser mediado pela anexina-1.

Em nosso estudo também observamos que o tratamento com o peptídeo Ac2-26 reduziu de forma significativa a produção das quimiocinas KC e MCP-1 e da citocina INF γ no pulmão dos animais silicóticos. Esta resposta pode estar contribuindo para diminuição da resposta inflamatória verificada na condição do

tratamento com o peptídeo Ac2-26, uma vez que as quimiocinas KC e MCP-1 são importantes no recrutamento de neutrófilos e monócitos, respectivamente. Estes dados também justificam a reduzida marcação para macrófagos (F4/80) nos pulmões dos animais tratados com o peptídeo, devido a redução da migração e ativação dessas células para o local da lesão. Entretanto, o tratamento local com dexametasona não interferiu com a produção de KC e afetou apenas em parte a de MCP-1, inibindo parcialmente a presença de neutrófilos e de macrófagos no tecido pulmonar. Além disso, verificamos que o peptídeo Ac2-26 mostrou-se eficaz em inibir a deposição de colágeno, bem como a marcação de α - SMA, no pulmão de animais silicóticos, fato este que se relaciona com a inibição da geração de citocinas pró-fibróticas $\text{TNF}\alpha$ e $\text{TGF}\beta$, observadas no trabalho. Estudos anteriores demonstraram que a proteína íntegra da anexina-1 e o peptídeo derivado da mesma mostraram ser eficazes em inibir a proliferação de células epiteliais humanas, A 549 (Croxtall JD, 1998).

Partículas de sílica são capazes de estimular diretamente fibroblastos pulmonares (Arcangeli G, 2001; Baroni T, 2001), que atuam como importante fonte de colágeno e de quimiocinas como MCP-1 (Galindo M, 2001; Hao L, 2003). Tendo em vista a grande relevância dos fibroblastos pulmonares no desencadeamento da fibrose induzida por partículas de sílica, verificamos a ação direta do peptídeo Ac2-26 sobre os fibroblastos pulmonares. Ao contrário do esperado, o tratamento com o peptídeo não alterou a taxa proliferativa dessas células quando estas foram estimuladas com IL-13 ou $\text{TGF}\beta$, porém inibiu de modo dependente de concentração a produção de colágeno e MCP-1 por estas células. Estes resultados entram em acordo com os dados obtidos de ensaios *in vivo*, onde verificamos redução de ambos, colágeno e MCP-1, no tecido pulmonar. Os dados obtidos sugerem que o peptídeo exerce maior efeito sobre a ativação dos fibroblastos pulmonares, do que sobre a proliferação, levando a inibição da produção de mediadores inflamatórios e componentes de matriz extracelular, contribuindo desta forma para a redução do processo fibrótico induzido pela sílica.

A anexina-1 exerce seus efeitos através da sua interação física com receptores acoplados a proteína G pertencentes a família dos receptores formilados (FPR), os quais estão presentes na superfície celular de leucócitos (Perretti M, 2002). Assim como a proteína íntegra, o peptídeo Ac2-26 exerce seu efeito inibitório

sobre a migração de leucócitos através da sua ligação aos receptores FPR, colaborando com a melhora do quadro inflamatório (Hayhoe RP, 2006; Walther A, 2000). A anexina-1, bem como seus receptores, tem sua expressão aumentada em leucócitos polimorfonucleares e monócitos quando estes são tratados com glicocorticóides (Damazo AS, 2006; Goulding NJ, 1990; Sawmynaden P, 2006). Observando a importante ação inibitória do peptídeo Ac2-26 sobre a produção de colágeno e MCP-1 por fibroblastos pulmonares, quando estimulados pelas citocinas IL-13 e TGF β , nosso próximo passo foi verificar o envolvimento dos receptores FPR1 e FPR2 nessa resposta. Inicialmente, verificamos a expressão do RNAm para esses receptores em fibroblastos pulmonares de camundongos. Pela primeira vez relatamos a expressão do RNAm para os mesmos neste tipo celular. Em adição, observamos o aumento da expressão do RNAm para os receptores FPR1 e FPR2 quando as células foram estimuladas com IL-13, mas não pelo TGF β . Fato este que precisa ser melhor investigado.

Posteriormente, utilizando fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos deficientes do gene para receptores FPR1 e FPR2, verificamos a produção de colágeno e MCP-1 por essas células quando estimuladas com IL-13 e TGF β . Os dados obtidos mostram que células deficientes de receptor FPR1 quando tratadas com o peptídeo Ac2-26 não apresentaram redução da produção de colágeno e MCP-1, diferente do observado nas células de animais selvagens. No entanto, o peptídeo foi capaz de inibir a produção de MCP-1 por fibroblastos provenientes de animais nocautes para FPR2, mas não a de colágeno. Esses dados mostram que ambos receptores, FPR1 e FPR2, medeiam a resposta inibitória promovida pelo peptídeo Ac2-26 sobre a produção e liberação de colágeno por fibroblastos pulmonares. Porém, apenas o receptor FPR1 parece mediar o efeito inibitório induzido pelo peptídeo sobre a produção da quimiocina MCP-1. Os resultados indicam haver mecanismos distintos para a inibição induzida pelo peptídeo sobre a produção de colágeno e MCP-1 em fibroblastos pulmonares estimulados com IL-13 ou TGF β .

No presente estudo, em outro bloco de experimentos observamos que a deleção do gene codificante para a proteína anexina-1 não modificou a resposta de aumento da resistência pulmonar e da hiperreatividade das vias aéreas verificadas nos animais silicóticos. Entretanto, de forma bastante interessante, notamos que

muito embora os camundongos nocautes tenham apresentado níveis basais de resistência pulmonar equivalentes aos dos animais selvagens, um quadro de exacerbação da resposta brococonstritora frente à estimulação com o agente colinérgico metacolina foi notada. Estes resultados sugerem que a proteína anexina-1 possa exercer uma regulação importante sobre o sistema colinérgico ao nível pulmonar, dado que será discutido mais a frente. Por outro lado, ao analisarmos a elastância pulmonar, verificamos uma resposta basal exacerbada nos animais deficientes de anexina-1 silicóticos, em comparação a dos selvagens, fenômeno este que se manteve presente na condição da aerolização com a metacolina. Assim como observado no grupo ANX1^{+/+} sílica, a análise histológica dos pulmões dos animais ANX1^{-/-} silicóticos revelou a presença de granulomas característicos do quadro de fase aguda da silicose. Não foi detectada alteração na área de ocupação do parênquima pelos granulomas entre ambos os grupos experimentais. Porém, verificamos um maior acúmulo de células inflamatórias no parênquima pulmonar dos animais ANX1^{-/-} silicóticos quando comparado ao grupo ANX1^{+/+} sílica. Essa resposta indica que a ausência da anexina-1 pode determinar a exacerbação do processo inflamatório induzido pela sílica. Anteriormente foi relatado que o efeito anti-inflamatório da anexina-1 se dá em parte pela inibição do recrutamento de leucócitos, principalmente neutrófilos, para o local da lesão (Perretti M, 1998). Corroborando com estes achados, em nosso estudo verificamos que a ausência dessa proteína proporcionou um aumento na produção das citocinas quimiotáticas para neutrófilos, KC e MIP-2, o que poderia estar contribuindo para o aumento do infiltrado inflamatório verificado no pulmão dos animais nocautes.

Em uma análise complementar, observamos que a anexina-1 também parece influenciar de forma importante na resposta fibrótica associada ao quadro silicótico, uma vez que a sua ausência proporcionou exacerbação da deposição de colágeno nos pulmões de animais silicóticos. Estes resultados são suportados por estudos anteriores que demonstraram o importante papel da anexina-1 sobre a ativação de fibroblastos pulmonares mediando os efeitos de glicocorticóides e também controlando o metabolismo lipídico dessas células (Croxtall JD, 2003; Kamal AM, 2005). Entretanto, embora tenhamos visto um aumento na deposição de colágeno no caso dos animais nocautes silicóticos, não foi detectada alteração no tamanho dos granulomas, o que indica uma interferência com a reatividade dos fibroblastos, proporcionando um aumento na síntese e liberação de colágeno, porém não na

atividade proliferativa destas células. Na tentativa de responder melhor essa questão realizamos experimentos *in vitro* utilizando cultura primária de fibroblastos pulmonares de animais nocautes para anexina-1. Observamos nesses ensaios que a ausência da anexina-1 não interferiu com a proliferação dessas células quando estas foram estimuladas com TGF β . No entanto, a resposta proliferativa foi menor nas células ANX1^{-/-} quando estimuladas com IL-13. Esses dados sugerem que a proliferação de fibroblastos induzida por IL-13 ocorre por mecanismo dependente de anexina-1, enquanto que o efeito proliferativo induzido pelo TGF β não parece ser mediado exclusivamente pela anexina-1. Por outro lado, ao investigar a reatividade dos fibroblastos pulmonares frente a estimulação com IL-13, não observamos alteração na liberação de MCP-1 na ausência de anexina-1. Esses dados diferem daqueles que observamos com o tratamento de fibroblastos com peptídeo Ac2-26, onde verificamos a redução de MCP-1, sem alteração da taxa proliferativa. Porém alguns autores demonstraram que o peptídeo Ac2-26 parece exercer efeitos mais pronunciados que a proteína íntegra anexina-1 (Hayhoe RP, 2006; Perretti M, 2001), o que poderia justificar em parte essa divergência de dados. Contudo, mais ensaios são necessários para investigar a real influência da anexina-1 endógena sobre os fibroblastos pulmonares.

A sílica cristalina através da indução da geração de citocinas pró-fibróticas como PDGF, IL-1, TNF α e TGF β , a partir de macrófagos ativados, estimula o recrutamento e proliferação de fibroblastos pulmonares, que passam a sintetizar mais colágeno acarretando o desenvolvimento da resposta fibrótica (Fujimura N, 2000; Rimal B, 2005). Observamos que na condição de ausência da anexina-1 houve um aumento da produção da citocina pró-fibrótica TNF α no tecido pulmonar de animais silicóticos. Utilizando macrófagos peritoneais, também mostramos aumento da produção de TNF α na ausência de anexina-1 quando as células foram estimuladas com LPS ou sílica, estando de acordo com os dados *in vivo*. Em adição, verificamos aumento da secreção de IL-6 pelos macrófagos peritoneais deficientes de anexina-1 em resposta aos mesmos estímulos. Esses dados estão de acordo com os observados por Yona S e colaboradores (2006) que ao utilizar macrófagos derivados de medula óssea de camundongos ANX1^{-/-} estimulados com LPS, liberaram significativamente mais TNF α e IL-6 em comparação as células dos camundongos ANX1^{+/+}. Esse conjunto de dados sugere que a maior disponibilidade

de $\text{TNF}\alpha$, e possivelmente IL-6, nos pulmões de animais silicóticos, pode contribuir para a maior estimulação de fibroblastos e conseqüente aumento na deposição de colágeno no pulmão dos animais nocautes.

Entretanto, não foi observada alteração na produção da quimiocina MCP-1, agente quimiotático de monócitos, no grupo $\text{ANX1}^{-/-}$ sílica. Porém, houve aumento na produção de $\text{INF}\gamma$, citocina pró-inflamatória envolvida na indução da fagocitose em macrófagos, nos pulmões dos animais $\text{ANX1}^{-/-}$ silicóticos. Estudos demonstraram que mediadores derivados de macrófagos, como $\text{TNF}\alpha$, PGE2 e óxido nítrico, podem ser inibidos por glicocorticóides através de uma ação mediada pela anexina-1 (Kamal AM, 2005). Além disso, essa proteína também parece atuar inibindo a fagocitose de imunocomplexos por macrófagos (Perretti M, 1998).

Em conjunto, os dados obtidos com o peptídeo Ac2-26 e animais $\text{ANX1}^{-/-}$ reforçam a relevância da anexina-1 no contexto da inflamação pulmonar induzida pela sílica, bem com a ativação de fibroblastos e conseqüentemente a processos envolvendo resposta de fibrose. No caso do tratamento com a dexametasona, vimos apenas uma inibição parcial da resposta inflamatória e fibrótica causadas pela sílica, efeito que poderia ser, em parte, mediado pela anexina-1. O glicocorticóide não foi capaz de interferir com a produção das citocinas inflamatórias analisadas, o que sugere menor eficiência, em comparação ao peptídeo Ac2-26, na redução do processo inflamatório induzido pela sílica.

Em paralelo aos estudos com peptídeo Ac2-26 e camundongos nocautes para anexina-1 no modelo da silicose, investigamos a alteração na função pulmonar observada nos animais nocautes para anexina-1 após receberem a aerolização do agente broncoconstritor colinérgico metacolina. Verificamos que o grupo de camundongos $\text{ANX1}^{-/-}$ não silicóticos respondeu de maneira exacerbada a metacolina quando comparado ao grupo selvagem. Esta resposta mostrou ser específica ao estímulo colinérgico, uma vez que não se observou diferença entre animais $\text{ANX1}^{+/+}$ e $\text{ANX1}^{-/-}$ quando estes foram submetidos à aerolização com serotonina. Para melhor investigar essa resposta submetemos anéis de traquéia a concentrações crescentes de carbacol em sistema de órgão isolado. Observamos que os anéis de traquéia de animais $\text{ANX1}^{-/-}$ foram mais sensíveis ao agente colinérgico que os de camundongos $\text{ANX1}^{+/+}$. No entanto, não se verificou diferença entre os dois grupos quando submetidos a provocações com serotonina. Esses

dados em conjunto com o observado anteriormente na função pulmonar *in vivo* sugerem um importante papel regulatório da anexina-1 sobre o sistema colinérgico, pelo menos ao nível pulmonar. Até o momento não há relatos na literatura a respeito de uma interação entre a proteína anexina-1 e o sistema colinérgico.

Em estudos preliminares não mostrados neste trabalho, verificamos, assim como observado com anéis de traquéias, que brônquios isolados de camundongos ANX1^{-/-} responderam de maneira mais exacerbada ao carbacol, mas não à serotonina. Tendo em vista a importante interação entre mastócitos e sistema parassimpático colinérgico nas vias aéreas, em um estudo inicial investigamos o possível envolvimento dessas células na contração de traquéias e brônquios dos animais ANX1^{-/-}. Observamos que ao pré-tratar traquéias e brônquios de animais deficientes de anexina-1 com o estabilizador de mastócitos, cromoglicato, a contratilidade exacerbada das vias aéreas ao carbacol foi revertida para valores próximos dos camundongos selvagens. Além disso, traquéias de camundongos ANX1^{-/-} apresentaram uma tendência a ter maior número de mastócitos que as de animais ANX1^{+/+} (dados não mostrados). Esses dados preliminares sugerem que a anexina-1 atua como reguladora do sistema colinérgico nas vias aéreas de camundongos, cujo mecanismo parece ter o importante envolvimento mastócitos.

Na patogênese de doenças inflamatórias crônicas e na fibrose há o importante envolvimento de mastócitos. Estas células estão localizadas na mucosa das vias aéreas próximas a membrana basal e superfície epitelial, posição estratégica que permite a ativação das mesmas por antígenos ou outros agentes inalados (Reinheimer T, 2000). Devido a sua posição justaposta aos nervos pós-ganglionares parassimpáticos, os mastócitos ativados liberam diversos mediadores (como serotonina e leucotrienos) que interagem diretamente com os neurônios parassimpáticos, estes por sua vez liberam acetilcolina que conseqüentemente induz a contração das vias aéreas (Kajekar R, 2003; Myers AC, 1991; Weigand LA, 2009). Em adição, mastócitos de mucosa de vias aéreas de humanos também expressam em sua superfície receptores muscarínicos do tipo M1, os quais medeiam uma via inibitória limitando a liberação de mediadores pró-inflamatórios(Kajekar R, 2003; Reinheimer T, 2000).

Com a intenção de melhor caracterizar o possível papel regulatório exercido pela anexina-1 sobre o sistema colinérgico ao nível pulmonar, os estudos acima mencionados, relacionando a participação de mastócitos, precisam ainda ser

concluídos. Em adição, estudos de "binding" para receptores muscarínicos presentes no parênquima pulmonar e vias aéreas (traquéia e brônquios) também estão sendo realizados para contribuir para o esclarecimento dessa resposta, verificando-se a possível ocorrência de alteração no número de receptores e da afinidade dos mesmos ao agente colinérgico.

Este trabalho mostra o importante papel regulatório exercido pela proteína anexina-1 na resposta inflamatória induzida por partículas de sílica no pulmão de camundongos. Os dados obtidos sugerem ainda que o peptídeo Ac2-26, possivelmente através da atuação em receptores FPR1 e FPR2, leva a redução da produção de citocinas quimiotáticas e fibróticas, o que acarreta na inibição da migração de leucócitos e da deposição de colágeno no parênquima pulmonar. Desta forma, há melhora no quadro fibrótico e inflamatório que conseqüentemente resulta no restabelecimento da função pulmonar desses animais, o que indica uma correlação farmacológica que possibilita o desenvolvimento de um agente terapêutico para a silicose.

Em paralelo a esses achados, observamos que na ausência da anexina-1 os animais apresentaram resposta muito mais acentuada ao estímulo colinérgico, ao receberem aerolizações de metacolina. Esta resposta foi comprovada com ensaios em sistema de órgão isolado utilizando anéis de traquéias. Estudos preliminares sugerem o possível envolvimento de mastócitos nessa resposta, porém ainda necessitando de comprovações. Com isso, verificamos que a proteína anexina-1 pode estar atuando com reguladora do sistema colinérgico em vias aéreas de camundongos através de um mecanismo ainda não esclarecido. Para tanto, mais estudos se fazem necessários para o melhor entendimento e caracterização desse fenômeno.

7. Conclusão

Esse conjunto de resultados mostra que:

✓ O peptídeo Ac2-26 foi capaz de reduzir de maneira importante a inflamação pulmonar induzida por partículas de sílica em camundongos, promovendo melhora do comprometimento da função pulmonar, bem como a reversão do quadro inflamatório e da fibrogênese além da diminuição da produção de citocinas. Em adição, o peptídeo Ac2-26 apresentou efeito inibitório sobre a reatividade de fibroblastos pulmonares através de um mecanismo mediado pelos receptores FPR1 e FPR2;

✓ A proteína anexina-1 mostrou-se participante na regulação negativa da inflamação e fibrose verificadas na silicose, atuando através da inibição da produção de mediadores inflamatórios e fibróticos. De forma interessante, evidências apontam para um papel regulatório da anexina-1 sobre a resposta contrátil associada à estimulação colinérgica das vias aéreas de camundongos;

Em conjunto, nossos dados mostram que o peptídeo Ac2-26 se coloca como uma estratégia promissora para utilização no tratamento de doenças pulmonares fibróticas como a silicose, demonstrando maior eficiência que o clássico glicocorticóide dexametasona. De forma original demonstramos que a anexina-1 apresenta papel supressor sobre a resposta inflamatória pulmonar causada pela sílica. Evidências preliminares indicam, ainda, que a anexina-1 parece exercer papel no processo de regulação da resposta contrátil da musculatura lisa pulmonar na condição da estimulação colinérgica. Esse conjunto de resultados mostra que:

8. Referências Bibliográficas

- Algranti E. Occupational lung diseases in Brazil. Occupational Lung Disease - An International Perspective. Banks DE. London, Chapman & Hall Medical.(1998). 105 - 115.
- Arcangeli G, Cupelli V and Giuliano G. Effects of silica on human lung fibroblast in culture. Sci Total Environ. (2001). 270(1-3): 135-139.
- Bandeira-Melo C, Bonavita AG, Diaz BL, E Silva PM, Carvalho VF, Jose PJ, Flower RJ, Perretti M, Martins MA. A novel effect for annexin 1-derived peptide ac2-26: reduction of allergic inflammation in the rat. J Pharmacol Exp Ther. (2005). 313(3):1416-22.
- Baroni T, Bodo M, D'Alessandro A, Conte C, Calvitti M, Muzi G, Lumare A, Bellocchio S and Abbritti G. Silica and its antagonistic effects on transforming growth factor-beta in lung fibroblast extracellular matrix production. J Investig Med. (2001). 49(2): 146-156.
- Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, Carter AB, Rothman PB, Flavell RA and Sutterwala FS. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. Proc Natl Acad Sci U S A. (2008). 105(26): 9035-9040.
- Castranova V. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. Free Radic Biol Med. (2004). 37(7): 916-925.
- Castranova V and Vallyathan V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. Environ Health Perspect. (2000). 108 Suppl 4: 675-684.
- Corbel M, Belleguic C, Boichot E and Lagente V. Involvement of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. Cell Biol Toxicol. (2002). 18(1): 51-61.

- Corbel M, Caulet-Maugendre S, Germain N, Lagente V and Boichot E. Enhancement of gelatinase activity during development of subepithelial fibrosis in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy*. (2003). 33(5): 696-704.
- Croxtall JD, Choudhury Q and Flower RJ. Inhibitory effect of peptides derived from the N-terminus of lipocortin 1 on arachidonic acid release and proliferation in the A549 cell line: identification of E-Q-E-Y-V as a crucial component. *Br J Pharmacol*. (1998). 123(5): 975-983.
- Croxtall JD, Gilroy DW, Solito E, Choudhury Q, Ward BJ, Buckingham JC and Flower RJ. Attenuation of glucocorticoid functions in an Anx-A1^{-/-} cell line. *Biochem J*. (2003). 371(Pt 3): 927-935.
- Cruz-Orive LM and Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol*. (1990). 258(4 Pt 1): L148-156.
- Damazo AS, Yona S, Flower RJ, Perretti M and Oliani SM. Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis. *J Immunol*. (2006). 176(7): 4410-4418.
- Ding M, Chen F, Shi X, Yucesoy B, Mossman B and Vallyathan V. Diseases caused by silica: mechanisms of injury and disease development. *Int Immunopharmacol*. (2002). 2(2-3): 173-182.
- Dufton N and Perretti M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. *Pharmacol Ther*. (2010). 127(2): 175-188.
- Ernst S, Lange C, Wilbers A, Goebeler V, Gerke V and Rescher U. An annexin 1 N-terminal peptide activates leukocytes by triggering different members of the formyl peptide receptor family. *J Immunol*. (2004). 172(12): 7669-7676.
- Forastiere F, Goldsmith DF, Sperati A, Rapiti E, Miceli M, Cavariani F and Perucci CA. Silicosis and lung function decrements among female ceramic workers in Italy. *Am J Epidemiol*. (2002). 156(9): 851-856.

- Fubini B and Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med.* (2003). 34(12): 1507-1516.
- Fujimura N. Pathology and pathophysiology of pneumoconiosis. *Curr Opin Pulm Med.* (2000). 6(2): 140-144.
- Galindo M, Santiago B, Alcami J, Rivero M, Martin-Serrano J and Pablos JL. Hypoxia induces expression of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and IL-8 in human dermal fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* (2001). 123(1): 36-41.
- Gerke V, Creutz CE and Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2005). 6(6): 449-461.
- Gettings SD, Lordo RA, Feder PI and Hintze KL. A comparison of low volume, Draize and in vitro eye irritation test data. III. Surfactant-based formulations. *Food Chem Toxicol.* (1998). 36(3): 209-231.
- Gossart S, Cambon C, Orfila C, Seguelas MH, Lepert JC, Rami J, Carre P and Pipy B. Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF-alpha production in rat lung inflammation induced by silica. *J Immunol.* (1996). 156(4): 1540-1548.
- Goulding NJ, Godolphin JL, Sharland PR, Peers SH, Sampson M, Maddison PJ and Flower RJ. Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. *Lancet.* (1990). 335(8703): 1416-1418.
- Greenberg MI, Waksman J and Curtis J. Silicosis: a review. *Dis Mon.* (2007). 53(8): 394-416.
- Hamilton RF, Jr., Thakur SA and Holian A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med.* (2008). 44(7): 1246-1258.
- Hamilton RF, Jr., Thakur SA, Mayfair JK and Holian A. MARCO mediates silica uptake and toxicity in alveolar macrophages from C57BL/6 mice. *J Biol Chem.* (2006). 281(45): 34218-34226.

- Hao L, Okada H, Kanno Y, Inoue T, Kobayashi T, Watanabe Y, Strutz F, Muller GA and Suzuki H. Direct contact between human peripheral blood mononuclear cells and renal fibroblasts facilitates the expression of monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Nephrol.* (2003). 23(4): 208-213.
- Hayhoe RP, Kamal AM, Solito E, Flower RJ, Cooper D and Perretti M. Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. *Blood.* (2006). 107(5): 2123-2130.
- Holanda MA, Martins MP, Felismino PH and Pinheiro VG. Silicosis in Brazilian pit diggers: relationship between dust exposure and radiologic findings. *Am J Ind Med.* (1995). 27(3): 367-378.
- Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA and Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* (2008). 9(8): 847-856.
- Huax F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* (2007). 7(2): 168-173.
- Jagirdar J, Begin R, Dufresne A, Goswami S, Lee TC and Rom WN. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* (1996). 154(4 Pt 1): 1076-1081.
- Kajekar R, Udem BJ and Myers AC. Role of cyclooxygenase activation and prostaglandins in antigen-induced excitability changes of bronchial parasympathetic ganglia neurons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2003). 284(4): L581-587.
- Kamal AM, Flower RJ and Perretti M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2005). 100 Suppl 1: 39-47.
- Levitzky MG. *Fisiologia Pulmonar.* Barueri (SP), Manole.(2004).

- Lido AV, Kitamura S, Oliveira JI, Lucca SR, Azevedo VA and Bagatin E. [Occupational exposure and occurrence of pneumoconioses in Campinas, Brazil, 1978-2003]. *J Bras Pneumol.* (2008). 34(6): 367-372.
- Lim LH and Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J.* (2007). 21(4): 968-975.
- Lim LH, Solito E, Russo-Marie F, Flower RJ and Perretti M. Promoting detachment of neutrophils adherent to murine postcapillary venules to control inflammation: effect of lipocortin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1998). 95(24): 14535-14539.
- Mariani TJ, Roby JD, Mecham RP, Parks WC, Crouch E and Pierce RA. Localization of type I procollagen gene expression in silica-induced granulomatous lung disease and implication of transforming growth factor-beta as a mediator of fibrosis. *Am J Pathol.* (1996). 148(1): 151-164.
- Mendes R. Estudo epidemiológico sobre a silicose pulmonar na região sudeste do Brasil, através de inquérito em pacientes internados em hospitais de fisiologia. *Revista de Saúde Pública de São Paulo.* (1979). 13: 7-19.
- Montes, II, Rego G, Cambor C, Quero A, Gonzalez A and Rodriguez C. Respiratory disease in aggregate quarry workers related to risk factors and Pi phenotype. *J Occup Environ Med.* (2004). 46(11): 1150-1157.
- Mossman BT and Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* (1998). 157(5 Pt 1): 1666-1680.
- Myers AC and Udem BJ. Analysis of preganglionic nerve evoked cholinergic contractions of the guinea pig bronchus. *J Auton Nerv Syst.* (1991). 35(3): 175-184.
- Parente L and Perretti M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem Pharmacol.* (2003). 65(2): 153-159.
- Perez-Ramos J, de Lourdes Segura-Valdez M, Vanda B, Selman M and Pardo A. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of

- metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* (1999). 160(4): 1274-1282.
- Perretti M. Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation. *Gen Pharmacol.* (1998). 31(4): 545-552.
- Perretti M, Chiang N, La M, Fierro IM, Marullo S, Getting SJ, Solito E and Serhan CN. Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. *Nat Med.* (2002). 8(11): 1296-1302.
- Perretti M and D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* (2009). 9(1): 62-70.
- Perretti M and Dalli J. Exploiting the Annexin A1 pathway for the development of novel anti-inflammatory therapeutics. *Br J Pharmacol.* (2009). 158(4): 936-946.
- Perretti M and Gavins FN. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News Physiol Sci.* (2003). 18: 60-64.
- Perretti M, Getting SJ, Solito E, Murphy PM and Gao JL. Involvement of the receptor for formylated peptides in the in vivo anti-migratory actions of annexin 1 and its mimetics. *Am J Pathol.* (2001). 158(6): 1969-1973.
- Petrilli V, Dostert C, Muruve DA and Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol.* (2007). 19(6): 615-622.
- Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Sappino AP and Vassalli P. Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature.* (1990). 344(6263): 245-247.
- Rees D and Murray J. Silica, silicosis and tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* (2007). 11(5): 474-484.

- Reinheimer T, Mohlig T, Zimmermann S, Hohle KD and Wessler I. Muscarinic control of histamine release from airways. Inhibitory M1-receptors in human bronchi but absence in rat trachea. *Am J Respir Crit Care Med.* (2000). 162(2 Pt 1): 534-538.
- Ribeiro FSN. Exposição ocupacional à sílica no Brasil no ano de 2001. *Rev Bras Epidemiol.* (2008). 11(1): 89-96.
- Rimal B, Greenberg AK and Rom WN. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Curr Opin Pulm Med.* (2005). 11(2): 169-173.
- Robbins S. *Patologia Estrutural e Funcional.* Rio de Janeiro (RJ), Elsevier Editora (2005).
- Sakae RS, Leme AS, Dolhnikoff M, Pereira PM, do Patrocínio M, Warth TN, Zin WA, Saldiva PH and Martins MA. Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacholine. *Am J Physiol.* (1994). 266(1 Pt 1): L23-29.
- Sawmynaden P and Perretti M. Glucocorticoid upregulation of the annexin-A1 receptor in leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* (2006). 349(4): 1351-1355.
- Scannell M, Flanagan MB, deStefani A, Wynne KJ, Cagney G, Godson C and Maderna P. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol.* (2007). 178(7): 4595-4605.
- Solito E, Kamal A, Russo-Marie F, Buckingham JC, Marullo S and Perretti M. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *FASEB J.* (2003). 17(11): 1544-1546.
- Terra Filho M and Santos Ude P. [Silicosis]. *J Bras Pneumol.* (2006). 32 Suppl 2: S41-47.

- Walther A, Riehemann K and Gerke V. A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. *Mol Cell.* (2000). 5(5): 831-840.
- Weigand LA, Myers AC, Meeker S and Udem BJ. Mast cell-cholinergic nerve interaction in mouse airways. *J Physiol.* (2009). 587(Pt 13): 3355-3362.
- West J. *Fisiologia respiratória.* Barueri/SP, Manole.(2002).
- Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, Serhan CN and Murphy PM. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev.* (2009). 61(2): 119-161.
- Yona S, Heinsbroek SE, Peiser L, Gordon S, Perretti M and Flower RJ. Impaired phagocytic mechanism in annexin 1 null macrophages. *Br J Pharmacol.* (2006). 148(4): 469-477.

ANEXO

Parte desses resultados integram um trabalho científico a ser publicado que se encontra na versão preliminar em anexo.

PRELIMINARY VERSION

Inhibitory effect of Ac2-26 peptide on inflammatory and fibrotic responses induced by silica particles in mice

Patrícia Gonçalves Trentin*, Daniele Matheus de Souza*, Tatiana Paula Ferreira Teixeira*, Ana Carolina Arantes*, Ana Lucia de Aguiar Pires*, Roderick Flower[§], Mauro Perretti[§], Marco Aurélio Martins* and Patrícia Machado Rodrigues e Silva*.

*Laboratory of Inflammation, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil and [§]Department of Biochemical Pharmacology, The William Harvey Research Institute, Queen Mary University of London, Charterhouse Square, London, United Kingdom.

Corresponding author:

Patrícia M. R. e Silva, PhD

Tel: +55.21.25621333 or 25730844

Fax: +55.21.25621410

Mail: patmar@ioc.fiocruz.br

A ser submetido para American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine

Abstract

Silicosis is an occupational lung disease caused by inhalation of crystalline silica particles, which remains without an effective treatment. It is characterized by intense inflammatory response followed by fibrosis and granuloma formation. The inflammatory response is regulated by endogenous antiinflammatory agents, which prevent the exacerbation of this response. Endogenous glucocorticoids are an example of these agents, whose antiinflammatory actions are in part mediated by annexin-1. In this study it was investigated the antiinflammatory and antifibrotic effect of annexin-1 derived peptide, Ac2-26, in acute silicosis. The classical steroid, dexamethasone, was used as control. For induction of silicosis, swiss-webster mice were instilled (intranasally) with silica (10 mg). The treatment with Ac2-26 peptide (50 - 200 μ g; Ac2-26) or dexamethasone (25 μ g; Dexa) was giving intranasally for 7 consecutive days, starting 6 h after instillation of silica. The analysis was initiated on the 7th day after silica. Lung function (resistance and elastance) and hyperreactivity of airways to methacholine (3 - 27 mg/ml) were obtained from whole-body plethysmograph invasive. The morphological changes were analyzed by histological techniques including hematoxylin-eosin and picrus sirius to assess granuloma and collagen deposition, respectively. Cytokines and chemokines were quantified by ELISA and collagen by sircol method. In *in vitro* experiments lung fibroblasts from FPR1^{-/-} and FPR2^{-/-} mice were incubated with IL-13 and TGF β , after treatment with Ac2-26 to assess the Collagen and MCP-1 production by these cells. Silicotic animals showed increased baseline of airway resistance and elastance, as well as hyperreactivity to bronchoconstrictor methacholine. These responses were abolished by Ac2-26 and Dexa. Local treatment with Ac2-26 also inhibited markedly the leukocyte infiltrate, collagen deposition and granuloma formation in silicotic mice, conditions that were partially affected by Dexa. The generation of cytokines (TNF α and TGF β) and chemokines (KC and MCP-1) was inhibited by Ac2-26 but not by Dexa. Lung fibroblasts incubated with Ac2-26 showed a reduction on production of collagen and MCP-1, but not on cell proliferation, induced by stimulation with IL-13 and TGF β . It was showed that FPR1 and FPR2 receptors mediate the effect of Ac2-26 on collagen and MCP-1 production. This set of results shows that the Ac2-26 peptide was able to inhibit the inflammatory and fibrotic component of the acute phase of silicosis, showing to be a promising compound for the treatment of silicosis.

Introduction

Silica, also known as silicon dioxide (SiO_2), is the most abundant compound on earth. It is found mainly in the amorphous and crystalline forms, the first one is less toxic form. The crystalline silica particles have on their surface oxygen free radicals that result in toxicity. Inhalation of these particles leads to the development of a severe lung disease, which is known as silicosis (Terra Filho M, 2006). It is an occupational disease that affects mainly workers in the ceramic industry, glass, metals, metal casting and sandblasting (Lido AV, 2008). Silicosis is a disease characterized by a granulomatous inflammatory process followed by fibrosis. Even though the pathogenesis of silicosis is complex and not completely understood, it has been known that due to surface properties, crystalline silica leads to activation of alveolar macrophages (acting on "scavengers" receptors as MARCO), epithelial cells and fibroblasts (Fubini B, 2003; 2008; Hamilton RF, Jr., 2006; Huaux F, 2007). The granulomatous inflammation induced by silica is characterized by accumulation of macrophages with mineral particles in the nodules. The inflammatory response is followed by a fibrosis with the important participation of lung fibroblasts, which proliferate and produce extracellular matrix, including interstitial collagen and insoluble elastin (Corbel M, 2002; Perez-Ramos J, 1999).

It has been known that during inflammation there are some antiinflammatory pathways that act regulating this response allowing the initiation, maintenance and end. The anti-inflammatory mediators may exert their effects at different stages of inflammation, and stimulating apoptosis and phagocytosis of apoptotic cells. There are several examples of anti-inflammatory agents, and the endogenous glucocorticoids are an example of these compounds. Studies have shown that part of the anti-inflammatory actions of glucocorticoids is mediated by an endogenous protein of 37 kDa named annexin-1 (Kamal AM, 2005; Perretti M, 2003). This protein is the first characterized member of the family of annexins, which are proteins that bind to phospholipid membrane through a calcium-dependent manner, and to promote the inhibition of PLA_2 and eicosanoid synthesis. The annexin-1 is found in many cells and tissues (lung, intestine and bone marrow) and corresponds to about 4% of total protein in the cytoplasm of neutrophils, which is also found in their granules of gelatinase(Lim LH, 2007).

The antiinflammatory actions of annexin-1 are reproduced by peptides derived from the N-terminal region of the protein, including the peptide Ac2-26. This peptide, as well as the whole protein, exerts their effects through the activation of formylated receptor, FPR1 and FPR2 (Ernst S, 2004; Walther A, 2000). Besides the effects on leukocyte migration, the annexin-1 and its derivatives promote the inhibition of proliferation of fibroblasts and epithelial cells as well as phagocytosis of immune complexes by macrophages, and induce apoptosis of inflammatory cells (Kamal AM, 2005).

In this study we verified the effect of Ac2-26 peptide on pulmonary inflammatory response induced by silica particles, *in vivo*, and the effect of peptide on lung fibroblasts *in vitro*. We observed that annexin-1 derived peptide was able to relief the lung function of silicotic mice, as well reduced the granuloma formation and collagen accumulation in the lung parenchyma. To verify the effect of Ac2-26 peptide on fibrosis response we evaluated the role of peptide on fibroblasts primary culture from lungs of mice. The peptide reduced the production of collagen and MCP-1 from these cells, although did not affect the proliferation. Besides we observed the participation of FPR1 and FPR2 receptors on response induced by Ac2-26 peptide in lung fibroblasts.

Materials and Methods

Animals

Swiss–Webster mice male weighing 28 to 30 g were obtained from the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil) breeding unit. And FPR1 and FPR2 null mice and wild -type littermate controls (C57BL6) were coming from The William Harvey Research Institute, Queen Mary University of London (London, UK). The animals were maintained on a 12-h light/dark cycle with water and food ad libitum until use. Animal work was performed in accordance with the U.K. Home Office regulations Animals (Scientific Procedures) and the Ethics Committee for Care and Use of Animals of the Oswaldo Cruz Foundation approved the experimental protocols employed in this study (License L-034/09).

Silicosis induction and Ac2-26 peptide treatment

Silicosis was induced in halothane (Tanohalo, Cristália, São Paulo) anesthetized mice. Animals were then instilled intranasally with silica particles (10 mg/ 50 μ L; Sigma – Aldrich, 0,5 -10 μ m) and the control group received similar volume of sterile saline. Analyses were performed 7 days after the instillation. The Ac2-26 peptide (50, 100 or 200 μ g/mouse; Cambrigde Research Biochemicals, UK) or dexamethasone (25 μ g/mouse; Sigma–Aldrich) were giving by intranasal route every day during 7 consecutive days, starting 6 h after silica provocation. Analyses were performed 24 h after the last treatment of drugs.

Lung function and airways hyperreactivity

The lung function was measured 24 h after the last treatment with drugs. The mice were anesthetized with pentobarbital sodium (60 mg/kg, i.p.) and tracheostomized and placed to a small ventilator in a whole body invasive plestimograph (Buxco system, UK). Airway hyperresponsiveness, resistance and elastance were assessed after aerosolization of methacholine (0, 3, 9 and 27 mg/ml; Sigma).

Histology and morphometric analyze

To perform the morphological analyze animals were perfused through an intracardiac cannula with saline solution supplemented with EDTA (20 mM). The left lung was separated and immersed in fixing solution of Milloning (48 h). Then the material was dehydrated in solutions of increasing concentrations of ethanol, clarified in xylene and embedded in paraffin. Histological sections of 5 μm thick were made and stained by haematoxylin-eosin and picrus sirius.

Morphometric analysis was performed a system consisting of a grid with 100 points and 50 lines (known length) coupled to a conventional light microscope (Olympus BX51, Olympus Latin America Inc., BRA) (Cruz-Orive LM, 1990; Sakae RS, 1994). The area of pulmonary parenchyma occupied by the granuloma was determined using the point-counting technique across 10 random non-coincident microscopic fields at a magnification of 200x.

Isolation of lung fibroblasts

FPR1 and FPR2 null mice and wild-type control were euthanized with CO_2 , and the lungs are perfused under aseptic conditions and subjected to enzymatic digestion by collagenase I at 37°C for 2 h. The cells obtained were maintained in DMEN medium supplemented with fetal bovine serum (20%) and penicillin and streptomycin. After reaching confluence state, it was made the passage of lung fibroblasts using trypsin/EDTA and the cells were transferred to new bottles until third passage.

Cell proliferation

The lung fibroblasts were obtained from 4 to 5 wild-type mice and FPR1 or FPR2 null mice. Were plated 5×10^4 cells per well, using 24-well plates. Twenty-four hours later, the cells were treated with different concentrations of Ac2-26 peptide (5, 10, 15 or 30 μM) and after 1 h fibroblasts were stimulated with IL-13 (40 ng/ml) or $\text{TGF}\beta$ (10 ng/ml). Twenty hours later it was added to each well 0.5 μCi of thymidine- ^3H (Amershan Biochemicals) and after 4 h the plates were washed with PBS (3 times) and it was added 1 ml of triton 1% to each well. The solution containing cells

were collected to vials with 3 ml of scintillation liquid and it was read in a beta counter (Beckman, LS-6500).

Real-Time PCR

To quantify specific mRNA levels, RNA was isolated from $2,5 \times 10^5$ wild type lung fibroblasts using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies). Contaminating genomic DNA was removed using DNase I (Turbo DNase treatment, Ambion[®], Applied Biosystems). The RNA was reverse-transcribed using oligo dT (50 μ M; Invitrogen) and dNTP (10 mM; Bioline) at 65°C for 5 min, then in ice for 1 min. The RNA was incubated with Mastermix solution (First Strand Buffer 5x – Invitrogen; DTT 0,1 M – Invitrogen; RNase out and SuperScript III – Invitrogen) at 50°C for 15 min and after at 70°C for 15 min. The synthesized cDNA was used for real-time PCR. The cDNA was amplified by real time PCR using primers specific for the receptor FPR1 and FPR2. FPR1, forward (5'-CAGAATTCCAGCCATGGACACCAACATGTCTC-3') and reverse (5'-GCGAATTCTTTACATTGCATTTAAAGTG-3'); and for FPR2, forward (5'-GTCAAGATCAACAGAAGAAACC-3') and reverse (5'-GGGCTCTCTCAAGACTATAAGG-3'). The PCR reaction was performed at 94°C for 2 min and 30 s followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 60 s, and 72°C for 60 s with a final extension of 72°C for 15 min. The mRNA expression for both receptor subtypes were calculated and normalized according to mRNA expression of α -actin.

Collagen and mediators quantification

To measure the collagen in mice lungs the tissue was macerated in Tris-NaCl solution (0.05 M: 1M) containing inhibitor of protease. After centrifugation, the supernatant obtained was used to quantify the collagen, which was performed using the colorimetric kit of Sircol (Kit Biocolor, UK).

The measure of cytokines (KC, MCP-1, TNF α , TGF β and INF γ) produced in lung tissue was performed by ELISA. Lungs were macerated in PBS containing inhibitors of protease and kept at 4°C overnight. Then the samples were centrifuged and the supernatant was separated for quantification by ELISA, which was realized according manufacturer's instructions (R&D System, USA).

To evaluate the generation of inflammatory mediator (MCP-1) and secretion of collagen by lung fibroblasts, it was collected the supernatant from these cells 24 h after stimulation with IL-13 or TGF β . The cells were treated with Ac2-26 peptide 1h before of each stimulus. The fibroblasts were plate on 6 wells plates at concentration of 25×10^4 cells in each well. Cytokines and chemokines quantitation was realized by ELISA system and collagen was measured by colorimetric method of Sircol.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM) and statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by multiple comparison test of Newman-Keuls-Student. The "t" Student test for unpaired samples was used to compare two experimental groups. The morphometric analysis was expressed as percentage of parenchyma occupation by the granuloma. These data were changed into arcoseno in order to make their distribution close to normal, allowing the test of variance. Values were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Inhibitory effect of Ac2-26 peptide on lung function and airway hyperreactivity of silicotic mice

The anti-inflammatory effect of annexin-1 is associated with the N-terminal region of molecule, in this study we used a derivative of that portion, the Ac2-26 peptide, whose anti-inflammatory activity has been demonstrated in several experimental models. We found that Swiss-Webster silicotic mice showed higher baseline pulmonary resistance when compared to saline group. After aerosolization of bronchoconstrictor agent methacholine, mice exhibited an increase in the airway resistance, which shows a higher reactivity of the silicotic animals to a cholinergic stimulus in comparison to saline animals. When a group of silicotic mice were treated with Ac2-26 peptide, it was observed a reduction in pulmonary resistance, which did not have difference between concentrations of peptide (50, 100 or 200 µg). This response was also evident in animals treated with dexamethasone (25 µg), however, the glucocorticoid reduced only partially the airways reactivity of silicotic animals, whereas the Ac2-26 peptide promoted a reduction close to saline group (Figure 1 A).

Looking to pulmonary elastance, we observed that silicotic mice had an increase in this basal response when compared to saline group. When the bronchoconstrictor agent was administered, the silicotic group showed an exacerbation of elastance. This response was reduced by treatment with Ac2-26 peptide at higher concentrations (100 and 200 µg). While the steroid showed an inhibitory effect only after aerosolization of higher concentration of bronchoconstrictor (Figure 1 B).

Morphological analysis of lungs from silicotic mice treated with Ac2-26 peptide

Our next step was to check the morphology of the fibrotic lungs of silicotic mice treated with peptide Ac2-26, in order to verify the effect of this drug on the inflammatory response induced by particles of silica. The saline group showed lungs with normal morphology with intact parenchyma and alveolar architecture well defined without any sign of inflammation (Figure 2 A). However, when we analyzed the lungs of silicotic animals, we observed the presence of intense inflammation with granuloma formation, commonly observed in acute silicosis (Figure 2 B). The

treatment with dexamethasone also reduced the granuloma (Figure 2 C). Similarly, the treatment with Ac2-26 peptide at highest concentrations (100 and 200 μg) reduced the inflammatory infiltrate and granuloma formation in pulmonary parenchyma of silicotic animals. While, the lowest peptide concentration (50 μg) did not cause any change in granuloma formation and cellular infiltration (Figure 2 D, E, F).

To confirm the morphological data observed by HE staining, we performed a morphometric analysis by checking the percentage of area of pulmonary parenchyma occupied by granuloma. We found that animals with silicosis have shown 30% of the lung parenchyma occupied by granulomas. In the condition of dexamethasone treatment it was noticed reduction of this response. An Inhibitory effect was also observed in the condition of treatment with Ac2-26 peptide at concentrations of 100 and 200 μg . In accordance with previously data, the dose of 50 μg of peptide was devoid of activity (Figure 2 G).

Silicosis is a fibrotic disease characterized by intense fibrosis and deposition of collagen, in which there is intense deposition of extracellular matrix components. We set out to investigate the effect of Ac2-26 peptide on collagen deposition. For that sections of lungs were stained with Picrus Sirius, which is a dye marker of collagen fibers. We found that the saline group showed lung parenchyma with normal appearance, showing only the markup associated with the basal constitutive presence of collagen in blood vessels and airways (Figure 3 A). However, an intense staining of collagen fibers was observed in silicotic lungs, predominantly in the areas of granuloma (Figure 3 B). Dexamethasone treatment reduced the intensity of staining in the lungs of silicotic mice (Figure 3 C). While, Ac2-26 peptide at higher doses (100 and 200 μg), significantly reduced the intensity of staining of Picrus Sirius (Figure 3 E and F). The effect observed with a dose of 50 mg was less pronounced (Figure 3 D). These findings were confirmed by quantification of collagen content using the colorimetric method of Sircol. We have seen a marked increase in the amount of collagen in the lungs of silicotic animals compared with controls, as expected (Figure 3 G). Dexamethasone inhibited the collagen deposition, as well as the peptide Ac2-26, but the latter proved more effective. All three doses tested were effective. Different from that observed with morphological analysis, the lowest dose of peptide was effective in inhibiting collagen deposition (Figure 3 G). Together these

results show clearly the property of Ac2-26 peptide in to modulate negatively the inflammatory and fibrotic components of murine experimental silicosis.

Analysis of production of inflammatory mediators in lungs from silicotic mice

Based on the findings described above, we proved that the highest dose of peptide Ac2-26 (200 µg) was more effective in reducing all of the inflammatory parameters generated by particles of silica. Thus, we choose this dose to next analysis.

To investigate the mechanism of action potentially involved in the inhibitory effect of Ac2-26 peptide, we analyzed some of cytokines and chemokines that are relevant in silicosis. We evaluated the chemokines KC (Figure 4 A) and MCP-1 (Figure 4 B), as well as the cytokines TNF α (Figure 4 C), TGF β (Figure 4 D) and IFN γ (Figure 4 E). All of these proteins shown to be elevated in the lung of silicotic mice compared to controls. The treatment of silicotic mice with dexamethasone induced only partially decreased on the generation of MCP-1, whereas the Ac2-26 peptide inhibited the production of KC, MCP-1, TNF α and TGF β , but not IFN γ .

Expression of F4/80 and α -SMA in mouse lung silicosis

During the development of pulmonary inflammatory process triggered by particles of silica there are the important participation of two cell, alveolar macrophages and lung fibroblasts. When the last ones are activated they start to express α -smooth muscle actin (α -SMA), receiving the name of myofibroblasts. At this stage we used immunohistochemistry, and we performed the identification of antigens F4/80 and α -SMA for macrophages and myofibroblasts, respectively. Analyzing the lungs of the control group, we found a virtually non-existent labeling to macrophages (Figure 5 A). While silicotic mice showed intense fibrotic response, especially in the areas of granuloma formation and adjacent regions, where there is intense inflammatory infiltrate (Figure 5 B).

Dexamethasone treatment has been shown to inhibit, at least in part, the labeling for F4/80 (Figure 5 C). In other hand, we found that the Ac2-26 peptide in its highest dose (200 µg), promoted an intense decrease of macrophages in the lungs of silicotic animals (Figure 5 D). Looking to myofibroblasts, the silicotic animals were highly positive to α -SMA (Figure 5 B) compared to controls. Similarly to what

observed in the assessment of macrophages, treatment with dexamethasone was able to reduce the labeling for α -SMA (Figure 5 C). This response was markedly inhibited by treatment with Ac2-26 peptide (Figure 5 D).

Effect of Ac2-26 peptide on proliferation and secretion of pulmonary fibroblasts in vitro

To further investigate the effect Ac2-26 peptide on lung fibroblasts, our next step was to evaluate the action of compound on these cells using a primary culture in monolayer. Initially, we evaluated the response of cell proliferation induced by profibrotic cytokines IL-13 and TGF β . We observed that both IL-13 (40 ng/mL) (Figure 6 A) and TGF β (10 ng/mL) (Figure 6 B) induced a proliferative response compared with the control group (incubated with medium). Incubation of fibroblasts with Ac2-26 peptide (7.5 to 30 nM) was unable to interfere with the proliferative response induced by both cytokines (Figure 6 A and B).

Fibroblasts are extremely important in the process of fibrosis, since they produce and release collagen, and pro-inflammatory cytokines such as MCP-1. Thus, we investigated the effect of treatment with Ac2-26 peptide on production of collagen and MCP-1. When fibroblasts were stimulated with IL-13 (Figure 7 A) and TGF β (Figure 7 C), we observed significant increase in the amount of collagen released. This response was inhibited in a concentration-dependent manner by pretreatment with Ac2-26 peptide from 5 μ M and there was a significant reduction with higher concentrations.

Subsequently, we assessed the effect of Ac2-26 peptide on production of MCP-1. We observed an increase in the production of this chemokine induced by IL-13 (Figure 7 B) and TGF β (Figure 7 D). As observed with collagen, the peptide was also able to reduce the production of MCP-1 in a concentration-dependent manner (Figure 4.10 B, D). Together these findings indicate that although the peptide is not active in interfering with the proliferation of lung fibroblasts, it has important direct effect on the activation of these cells.

Involvement of receptors FPR1 and FPR2 on the effect of Ac2-26 peptide on fibroblasts in vitro

Similarly to annexin-1, the Ac2-26 peptide exerts its anti-inflammatory effects by binding to FPR1 and FPR2 receptors, which are coupled to G protein and are expressed on the surface of cell membrane. By the first time, using real-time PCR, we detected expression of mRNA for both receptor in lung fibroblasts stimulated or not with IL-13 and TGF β . The mRNA expression for FPR1 and FPR2 receptors was significantly increased when the fibroblasts were stimulated with IL-13 (40 η g/ml), but not with TGF β (10 η g/ml) (Table 4.1).

Using knockout mice for genes that determine receptors FPR1 (FPR1^{-/-}) and FPR2 (FPR2^{-/-}) we studied the involvement of these receptors on effect of Ac2-26 peptide. Lung fibroblasts from FPR1^{-/-} mice stimulated with different concentrations of IL-13 (20 - 80 η g/mL) and TGF β (50 - 20 η g/mL) increased production of collagen and MCP-1 in a dose-dependent manner, as observed with cells from FPR1^{+/+} animals (data not shown). When fibroblasts from FPR1^{+/+} animals were incubated with Ac2-26 peptide (15 and 30 μ M), we observed inhibition of production of collagen and MCP-1, in a dose-dependent manner. In cells from FPR1^{-/-} mice, we found that treatment with the peptide did not interfere with the generation of collagen and MCP-1 (Figure 8).

Subsequently, we evaluated the involvement of receptor FPR2. We observed that stimulation of pulmonary fibroblasts from FPR2^{+/+} animals with different concentrations of IL-13 and TGF β induced a significant increase on production of collagen and MCP-1, this response was similar in cells from FPR2^{-/-} mice (data not shown). Fibroblasts from FPR2^{+/+} mice treated with Ac2-26 peptide showed reduced levels of collagen and MCP-1, both after stimulation with IL-13 and TGF β (Figure 9 A, C). However, the peptide had not affected the production of collagen by cells from FPR2^{-/-} mice, keeping the levels close to those observed in the group stimulated with IL-13 and TGF β (Figure 9 B). On the other hand, production of MCP-1 was sensitive to the peptide showing values close to those of non-stimulated control group (Figure 9 D). These results suggest the involvement of FPR1 receptor in inhibitory response promoted by Ac2-26 peptide on production of collagen and MCP-1 in lung fibroblasts stimulated with IL-13 or TGF β . While the receptor FPR2 seems to be only important in collagen production by these cells, but not MCP-1.

Discussion

Our data showed that the silicotic mice had changes in the parameters of respiratory mechanics, expressed by increased lung resistance and elastance, followed by airway hyperreactivity when stimulated with bronchoconstrictor cholinergic agent, methacholine. These results confirm previous findings from our group that revealed the occurrence of obstructive and restrictive changes in mice with silicosis. The response of hyperreactivity verified is in agreement with findings in patients with silicosis (Forastiere F, 2002; Montes, II, 2004). However, there are few studies about silicosis, thus more experiments are needed in order to elucidate the mechanism involved in this process. Studies show that exposure to high concentrations of crystalline silica promotes an intense inflammatory response accompanied by cell proliferation and excessive deposition of collagen and other extracellular matrix components, what result in the development of fibrosis (Mossman BT, 1998). Thus, the change in lung function observed in animals with silicosis is directly related to alterations in lung parenchyma of these animals, which in turn reflects the presence of an intense inflammatory infiltrate and granuloma formation.

Control the exposure to particles of silica and remove symptomatic individuals from the workplace are the main action for the prevention of silicosis. However, until now there are few advances to achieve a therapeutic strategy for silicosis. Knowing the potential anti-inflammatory of annexin-1 derived peptide, Ac2-26, we analyzed the effect of this compound on lung inflammation induced by particles of silica. Besides, we assessed the possible anti-fibrotic action of peptide on pulmonary fibrosis induced by silica, event that has not yet investigated.

In this study we found that the Ac2-26 peptide was able to reduce a very important pulmonary inflammation induced by particles of silica in mice. We observed that treatment improved lung function in animals with silicosis, as well as reversed the inflammatory response, formation of granuloma, collagen deposition and cytokine production. In addition, using *in vitro* experiments, we found that the Ac2-26 peptide plays an important inhibitory role on the reactivity of pulmonary fibroblasts, cells of great relevance in the context of fibrosis, reducing the production of collagen and the chemokine MCP-1. Besides, we verified the involvement of FPR1 and FPR2 receptors in the inhibition promoted by Ac2-26 peptide on fibroblasts.

The Ac2-26 peptide is derived from N-terminal region of annexin-1, which is associated with anti-inflammatory action of this protein. It was showed that part of anti-inflammatory actions of glucocorticoids is mediated by annexin-1 (Parente L, 2003), we used in this study the treatment with the corticosteroid dexamethasone as a classic drug control in the experiments conducted *in vivo*.

First, we evaluated the pulmonary function of silicotic mice treated with Ac2-26 peptide. It was observed a reduction of basal lung resistance and elastance, and pronounced suppression of airway hyperreactivity to methacholine in both cases. However, treatment with dexamethasone reduced only partially these parameters. Analysis histological revealed that treatment with Ac2-26 peptide was able to inhibit the infiltration of inflammatory cells and the formation of granuloma, whereas glucocorticoids reduced only partially these responses. The improvement in the pulmonary parenchyma due the reduction of cellular infiltration and granuloma formation, promoted by the peptide, and partially by dexamethasone, it may have contributed to the restoration of pulmonary function of silicotic animals. Getting SJ and colleagues (1998) demonstrated that dexamethasone is able to inhibit the infiltration of neutrophils and monocytes in an acute inflammation model induced by zymosan through a mechanism mediated by the annexin-1 protein. Moreover, the same study showed that Ac2-26 peptide has also an important anti-inflammatory role by inhibiting the migration of neutrophils and monocytes. Thus, it is believed that part of the inhibitory effect triggered by dexamethasone in silicotic mice could be mediated by annexin-1.

In our study, we also observed that treatment with Ac2-26 peptide significantly reduced the production of chemokines KC and MCP-1 and IFN γ in the lungs of silicotic animals. This effect may be contribute to reduction of inflammatory response observed in the condition of treatment with Ac2-26 peptide, since the chemokines KC and MCP-1 is important for recruitment of neutrophils and monocytes, respectively. These data also warrant a reduced labeling for macrophages (F4/80) in the lungs of mice treated with the peptide, due to reduced migration and activation of these cells to the injury site. However, local treatment with dexamethasone did not interfere with the production of KC and affected only in part the MCP-1, inhibiting partially the migration of neutrophils and macrophages to lung tissue. Furthermore, we found that the Ac2-26 peptide was effective in inhibit deposition of collagen, as well as labeling of α -SMA in the lungs of silicotic mice. This fact is related to the inhibition of

generation of pro-fibrotic cytokines TGF β and TNF α , which was observed previously. Previous studies have shown that the whole protein and the annexin-1 derived peptide were effective in to inhibit the proliferation of human epithelial cells line, A 549 (Croxtall JD, 1998).

Particles of silica are able to stimulate directly lung fibroblasts (Arcangeli G, 2001; Baroni T, 2001), which act as an important source of collagen and chemokines such as MCP-1 (Galindo M, 2001; Hao L, 2003). Considering the great importance of fibroblasts in lung fibrosis triggered by particles of silica, we assessed the direct action of Ac2-26 peptide on lung fibroblasts. Contrary to expectations, treatment with the peptide did not alter the proliferation rate of these cells when they were stimulated with IL-13 or TGF β , but inhibited in a concentration-dependent manner the production of collagen and MCP-1 by these cells. These results are in agreement with data obtained from *in vivo* experiments, which showed a reduction of both collagen and MCP-1 in lung tissue. The data suggest that the peptide exerts a greater effect on the activation of pulmonary fibroblasts, but on the proliferation, leading to inhibition of inflammatory mediators and extracellular matrix components, thereby it can contribute to reduction of fibrosis induced by silica.

Annexin-1 exerts its effects through physical interaction with G protein-coupled receptors belonging to the family of formylated receptor (FPR), which is present on the cell surface of leukocytes (Perretti M, 2002). As the whole protein, Ac2-26 peptide exerts its inhibitory effect on leukocyte migration by binding to receptors FPR, collaborating with the improvement of the inflammation (Hayhoe RP, 2006; Walther A, 2000). Annexin-1 and its receptors had their expression increased in polymorphonuclear leukocytes and monocytes when they were treated with glucocorticoids ((Damazo AS, 2006; Goulding NJ, 1990; Sawmynaden P, 2006). Noting the important inhibitory action of Ac2-26 peptide on production of collagen and MCP-1 by lung fibroblasts when stimulated by IL-13 and TGF β , our next step was to verify the involvement of FPR1 and FPR2 receptors in this response. Initially, we verified the mRNA expression for these receptors in lung fibroblasts of mice. For the first time, it was reported the mRNA expression for both receptors in pulmonary fibroblasts. In addition, we observed an increase of mRNA expression for FPR1 and FPR2 receptors when cells were stimulated with IL-13 but not by TGF β . However, further investigations are needed to understand this fact.

Using lung fibroblasts from mice deficient of gene for FPR1 and FPR2 receptors, we assessed the production of collagen and MCP-1 by these cells when stimulated with IL-13 and TGF β . These data suggest that deficient cells of FPR1 receptor treated with peptide Ac2-26 showed no reduction in the production of collagen and MCP-1, what was different from wild type cells. However, the peptide was able to inhibit the production of MCP-1 by fibroblasts from FPR2^{-/-} mice, but not the collagen. These data show that both receptors, FPR1 and FPR2, mediate the inhibitory response promoted by Ac2-26 peptide on the production and release of collagen by lung fibroblasts. But only the FPR1 receptor seems to mediate the inhibitory effect induced by the peptide on the production of chemokine MCP-1. The results indicate different mechanisms for the inhibition of production of collagen and MCP-1 induced by the peptide in lung fibroblasts when stimulated with IL-13 and TGF β .

The data suggest that the Ac2-26 peptide seems to act on receptors FPR1 and FPR2 leading to reduction of production of fibrotic and chemotactic cytokines. These effects result in inhibition of leukocyte migration and collagen deposition in the pulmonary parenchyma. Thus, there is improvement in the fibrosis and inflammation induced by inhalation of particles of silica, that will result in the restoration lung function of silicotic mice, which indicates a pharmacologic correlation that turn possible the development of a therapeutic agent for silicosis.

Acknowledgements

We thank Rodrigo Azevedo for skillful technical assistance and Vincenzo Brancaleone by technical assistance in real-time PCR assay. We thank the grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

References

- Algranti E. Occupational lung diseases in Brazil. *Occupational Lung Disease - An International Perspective*. Banks DE. London, Chapman & Hall Medical.(1998). 105 - 115.
- Arcangeli G, Cupelli V and Giuliano G. Effects of silica on human lung fibroblast in culture. *Sci Total Environ*. (2001). 270(1-3): 135-139.
- Bandeira-Melo C, Bonavita AG, Diaz BL, PM ES, Carvalho VF, Jose PJ, Flower RJ, Perretti M and Martins MA. A novel effect for annexin 1-derived peptide ac2-26: reduction of allergic inflammation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. (2005). 313(3): 1416-1422.
- Baroni T, Bodo M, D'Alessandro A, Conte C, Calvitti M, Muzi G, Lumare A, Bellocchio S and Abbritti G. Silica and its antagonistic effects on transforming growth factor-beta in lung fibroblast extracellular matrix production. *J Investig Med*. (2001). 49(2): 146-156.
- Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, Carter AB, Rothman PB, Flavell RA and Sutterwala FS. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2008). 105(26): 9035-9040.
- Castranova V. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic Biol Med*. (2004). 37(7): 916-925.
- Castranova V and Vallyathan V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environ Health Perspect*. (2000). 108 Suppl 4: 675-684.
- Corbel M, Belleguic C, Boichot E and Lagente V. Involvement of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. *Cell Biol Toxicol*. (2002). 18(1): 51-61.
- Corbel M, Caulet-Maugendre S, Germain N, Lagente V and Boichot E. Enhancement of gelatinase activity during development of subepithelial fibrosis in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy*. (2003). 33(5): 696-704.

- Croxtall JD, Choudhury Q and Flower RJ. Inhibitory effect of peptides derived from the N-terminus of lipocortin 1 on arachidonic acid release and proliferation in the A549 cell line: identification of E-Q-E-Y-V as a crucial component. *Br J Pharmacol.* (1998). 123(5): 975-983.
- Croxtall JD, Gilroy DW, Solito E, Choudhury Q, Ward BJ, Buckingham JC and Flower RJ. Attenuation of glucocorticoid functions in an Anx-A1^{-/-} cell line. *Biochem J.* (2003). 371(Pt 3): 927-935.
- Croxtall JD, Wu HL, Yang HY, Smith B, Sutton C, Chang BI, Shi GY and Flower R. Lipocortin 1 co-associates with cytokeratins 8 and 18 in A549 cells via the N-terminal domain. *Biochim Biophys Acta.* (1998). 1401(1): 39-51.
- Cruz-Orive LM and Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol.* (1990). 258(4 Pt 1): L148-156.
- Damazo AS, Yona S, Flower RJ, Perretti M and Oliani SM. Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis. *J Immunol.* (2006). 176(7): 4410-4418.
- Ding M, Chen F, Shi X, Yucesoy B, Mossman B and Vallyathan V. Diseases caused by silica: mechanisms of injury and disease development. *Int Immunopharmacol.* (2002). 2(2-3): 173-182.
- Dufton N and Perretti M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. *Pharmacol Ther.* (2010). 127(2): 175-188.
- Ernst S, Lange C, Wilbers A, Goebeler V, Gerke V and Rescher U. An annexin 1 N-terminal peptide activates leukocytes by triggering different members of the formyl peptide receptor family. *J Immunol.* (2004). 172(12): 7669-7676.
- Forastiere F, Goldsmith DF, Sperati A, Rapiti E, Miceli M, Cavariani F and Perucci CA. Silicosis and lung function decrements among female ceramic workers in Italy. *Am J Epidemiol.* (2002). 156(9): 851-856.

- Fubini B and Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med.* (2003). 34(12): 1507-1516.
- Fujimura N. Pathology and pathophysiology of pneumoconiosis. *Curr Opin Pulm Med.* (2000). 6(2): 140-144.
- Galindo M, Santiago B, Alcami J, Rivero M, Martin-Serrano J and Pablos JL. Hypoxia induces expression of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and IL-8 in human dermal fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* (2001). 123(1): 36-41.
- Gerke V, Creutz CE and Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2005). 6(6): 449-461.
- Gettings SD, Lordo RA, Feder PI and Hintze KL. A comparison of low volume, Draize and in vitro eye irritation test data. III. Surfactant-based formulations. *Food Chem Toxicol.* (1998). 36(3): 209-231.
- Gossart S, Cambon C, Orfila C, Seguelas MH, Lepert JC, Rami J, Carre P and Pipy B. Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF-alpha production in rat lung inflammation induced by silica. *J Immunol.* (1996). 156(4): 1540-1548.
- Goulding NJ, Godolphin JL, Sharland PR, Peers SH, Sampson M, Maddison PJ and Flower RJ. Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. *Lancet.* (1990). 335(8703): 1416-1418.
- Greenberg MI, Waksman J and Curtis J. Silicosis: a review. *Dis Mon.* (2007). 53(8): 394-416.
- Hamilton RF, Jr., Thakur SA and Holian A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med.* (2008). 44(7): 1246-1258.
- Hamilton RF, Jr., Thakur SA, Mayfair JK and Holian A. MARCO mediates silica uptake and toxicity in alveolar macrophages from C57BL/6 mice. *J Biol Chem.* (2006). 281(45): 34218-34226.

- Hao L, Okada H, Kanno Y, Inoue T, Kobayashi T, Watanabe Y, Strutz F, Muller GA and Suzuki H. Direct contact between human peripheral blood mononuclear cells and renal fibroblasts facilitates the expression of monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Nephrol.* (2003). 23(4): 208-213.
- Hayhoe RP, Kamal AM, Solito E, Flower RJ, Cooper D and Perretti M. Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. *Blood.* (2006). 107(5): 2123-2130.
- Holanda MA, Martins MP, Felismino PH and Pinheiro VG. Silicosis in Brazilian pit diggers: relationship between dust exposure and radiologic findings. *Am J Ind Med.* (1995). 27(3): 367-378.
- Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA and Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* (2008). 9(8): 847-856.
- Huax F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* (2007). 7(2): 168-173.
- Jagirdar J, Begin R, Dufresne A, Goswami S, Lee TC and Rom WN. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* (1996). 154(4 Pt 1): 1076-1081.
- Kajekar R, Udem BJ and Myers AC. Role of cyclooxygenase activation and prostaglandins in antigen-induced excitability changes of bronchial parasympathetic ganglia neurons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2003). 284(4): L581-587.
- Kamal AM, Flower RJ and Perretti M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2005). 100 Suppl 1: 39-47.
- Levitzky MG. *Fisiologia Pulmonar.* Barueri (SP), Manole.(2004).

- Lido AV, Kitamura S, Oliveira JI, Lucca SR, Azevedo VA and Bagatin E. [Occupational exposure and occurrence of pneumoconioses in Campinas, Brazil, 1978-2003]. *J Bras Pneumol.* (2008). 34(6): 367-372.
- Lim LH and Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J.* (2007). 21(4): 968-975.
- Lim LH, Solito E, Russo-Marie F, Flower RJ and Perretti M. Promoting detachment of neutrophils adherent to murine postcapillary venules to control inflammation: effect of lipocortin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1998). 95(24): 14535-14539.
- Mariani TJ, Roby JD, Mecham RP, Parks WC, Crouch E and Pierce RA. Localization of type I procollagen gene expression in silica-induced granulomatous lung disease and implication of transforming growth factor-beta as a mediator of fibrosis. *Am J Pathol.* (1996). 148(1): 151-164.
- Mendes R. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE A SILICOSE PULMONAR NA REGIÃO SUDESTE DO BRASIL, ATRAVÉS DE INQUÉRITO EM PACIENTES INTERNADOS EM HOSPITAIS DE TISIOLOGIA. *Revista de Saúde Pública de São Paulo.* (1979). 13: 7-19.
- Montes, II, Rego G, Cambor C, Quero A, Gonzalez A and Rodriguez C. Respiratory disease in aggregate quarry workers related to risk factors and Pi phenotype. *J Occup Environ Med.* (2004). 46(11): 1150-1157.
- Mossman BT and Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* (1998). 157(5 Pt 1): 1666-1680.
- Myers AC and Udem BJ. Analysis of preganglionic nerve evoked cholinergic contractions of the guinea pig bronchus. *J Auton Nerv Syst.* (1991). 35(3): 175-184.
- Parente L and Perretti M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem Pharmacol.* (2003). 65(2): 153-159.

- Perez-Ramos J, de Lourdes Segura-Valdez M, Vanda B, Selman M and Pardo A. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* (1999). 160(4): 1274-1282.
- Perretti M. Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation. *Gen Pharmacol.* (1998). 31(4): 545-552.
- Perretti M, Chiang N, La M, Fierro IM, Marullo S, Getting SJ, Solito E and Serhan CN. Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. *Nat Med.* (2002). 8(11): 1296-1302.
- Perretti M and D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* (2009). 9(1): 62-70.
- Perretti M and Dalli J. Exploiting the Annexin A1 pathway for the development of novel anti-inflammatory therapeutics. *Br J Pharmacol.* (2009). 158(4): 936-946.
- Perretti M and Gavins FN. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News Physiol Sci.* (2003). 18: 60-64.
- Perretti M, Getting SJ, Solito E, Murphy PM and Gao JL. Involvement of the receptor for formylated peptides in the in vivo anti-migratory actions of annexin 1 and its mimetics. *Am J Pathol.* (2001). 158(6): 1969-1973.
- Petrilli V, Dostert C, Muruve DA and Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol.* (2007). 19(6): 615-622.
- Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Sappino AP and Vassalli P. Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature.* (1990). 344(6263): 245-247.

- Rees D and Murray J. Silica, silicosis and tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* (2007). 11(5): 474-484.
- Reinheimer T, Mohlig T, Zimmermann S, Hohle KD and Wessler I. Muscarinic control of histamine release from airways. Inhibitory M1-receptors in human bronchi but absence in rat trachea. *Am J Respir Crit Care Med.* (2000). 162(2 Pt 1): 534-538.
- Ribeiro FSN. Exposição ocupacional à sílica no Brasil no ano de 2001. *Rev Bras Epidemiol.* (2008). 11(1): 89-96.
- Rimal B, Greenberg AK and Rom WN. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Curr Opin Pulm Med.* (2005). 11(2): 169-173.
- Robbins S. *Patologia Estrutural e Funcional.* Rio de Janeiro (RJ), Elsevier Editora (2005).
- Sakae RS, Leme AS, Dolhnikoff M, Pereira PM, do Patrocínio M, Warth TN, Zin WA, Saldiva PH and Martins MA. Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacholine. *Am J Physiol.* (1994). 266(1 Pt 1): L23-29.
- Sawmynaden P and Perretti M. Glucocorticoid upregulation of the annexin-A1 receptor in leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* (2006). 349(4): 1351-1355.
- Scannell M, Flanagan MB, deStefani A, Wynne KJ, Cagney G, Godson C and Maderna P. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol.* (2007). 178(7): 4595-4605.
- Solito E, Kamal A, Russo-Marie F, Buckingham JC, Marullo S and Perretti M. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *FASEB J.* (2003). 17(11): 1544-1546.
- Terra Filho M and Santos Ude P. [Silicosis]. *J Bras Pneumol.* (2006). 32 Suppl 2: S41-47.

- Walther A, Riehemann K and Gerke V. A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. *Mol Cell.* (2000). 5(5): 831-840.
- Weigand LA, Myers AC, Meeker S and Udem BJ. Mast cell-cholinergic nerve interaction in mouse airways. *J Physiol.* (2009). 587(Pt 13): 3355-3362.
- West J. *Fisiologia respiratória.* Barueri/SP, Manole.(2002).
- Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, Serhan CN and Murphy PM. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev.* (2009). 61(2): 119-161.
- Yona S, Heinsbroek SE, Peiser L, Gordon S, Perretti M and Flower RJ. Impaired phagocytic mechanism in annexin 1 null macrophages. *Br J Pharmacol.* (2006). 148(4): 469-477.

Table 1: Effect of stimulation with IL-13 or TGF β on mRNA expression of FPR1 and FPR2 receptors in pulmonary fibroblasts from C57BL6 mice.

	$\Delta\Delta\text{Ct}$ (real time – PCR)	
	Fpr1	Fpr2
Control	25,789 \pm 0,042	28,531 \pm 0,235
IL-13 [40 ng/mL]	27,754 \pm 0,100*	30,982 \pm 0,338*
TGF β [10 ng/mL]	25,982 \pm 0,040	29,144 \pm 0,250

Values are represented as mean \pm SEM of triplicates. n = 4. The symbol * denotes p<0.05 compared to non-stimulated group.

Figure Legends

Figure 1: Analysis of lung function and airway hyperreactivity of mice instilled with saline and silica (10 mg). The parameters of resistance (A) and elastance (B) were evaluated in lung after aerosolization with PBS and methacholine (3 - 27 mg/mL), 7 days after challenge with silica. The animals were treated for 7 consecutive days with dexamethasone (Dexa, 25 μ g) and Ac2-26 peptide (50 - 200 μ g). The columns represent the mean \pm SEM of at least five animals per group. The symbols * and + indicate $p < 0.05$ compared to saline group and silica, respectively.

Figure 2: Morphological analysis of lungs of mice instilled with saline and silica (10 mg), treated with dexamethasone (Dexa, 25 μ g) and Ac2-26 peptide (50 - 200 μ g). The groups included saline (A), silica (B), dexamethasone (C), and Ac2-26 peptide 50 mg (D) 100 mg (E) and 200 mg (F). The panel G represents the morphometric analysis of percentage of parenchyma occupied by granuloma. The columns represent the mean \pm SEM and the symbol * indicates $p < 0.05$ compared to silica group. The sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and images were captured and analyzed under light microscope at magnification of 200x. We used at least six animals per group.

Figure 3: labeling of collagen fibers in lungs of mice instilled with saline and silica (10 mg), treated with dexamethasone (Dexa, 25 μ g) and Ac2-26 peptide (50 - 200 μ g). The groups included saline (A), silica (B), dexamethasone (C), and Ac2-26 peptide 50 mg (D) 100 mg (E) and 200 mg (F). The panel G represents the collagen quantification in pulmonary tissue. The columns represent the mean \pm SEM and the symbols * and + indicate $p < 0.05$ compared to saline and silica group, respectively. The sections were stained with picrus sirius and images were captured and analyzed under light microscope at magnification of 200x. We used at least six animals per group.

Figure 4: Cytokines and chemokines quantification in lungs of mice instilled with saline and silica (10 mg). The animals were treated with dexamethasone (Dexa, 25 μ g) and Ac2-26 peptide (200 μ g). It was assessed KC (A), MCP-1 (B), TNF α (C), TGF β (F) and INF γ (D). Values represent the mean \pm SEM of 6 animals per group.

The symbols * and + denote $p < 0.05$ compared with saline groups and silica, respectively.

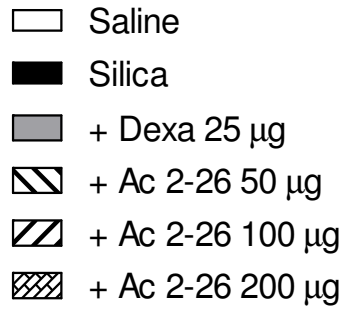
Figure 5: Analysis of the presence of macrophages (F4/80) and myofibroblasts (α -SMA) in the pulmonary parenchyma of mice instilled with saline and silica (10 mg), treated with dexamethasone (25 μ g) and Ac2-26 peptide (200 μ g). The groups included saline (A, E), silica (B, F), dexamethasone (C, G) and Ac2-26 peptide 200 μ g (D, H). It was used the immunohistochemical technique with the negative control omitting the primary antibody (figure inserted - CT). We used six animals per group. The images were captured and analyzed under light microscope at magnification of 200x.

Figure 6: Effect of Ac2-26 peptide on proliferation of fibroblasts from lungs of Swiss-Webster mice. The cells were incubated with Ac2-26 peptide (7.5 to 60 μ M) 1 h before stimulation with IL-13 (40 η g/mL) (A) and TGF β (10 η g/mL) (B). The symbol * denotes $p < 0.05$ when compared to non-stimulated group. Values represent the mean \pm SEM of triplicates. $n = 3$.

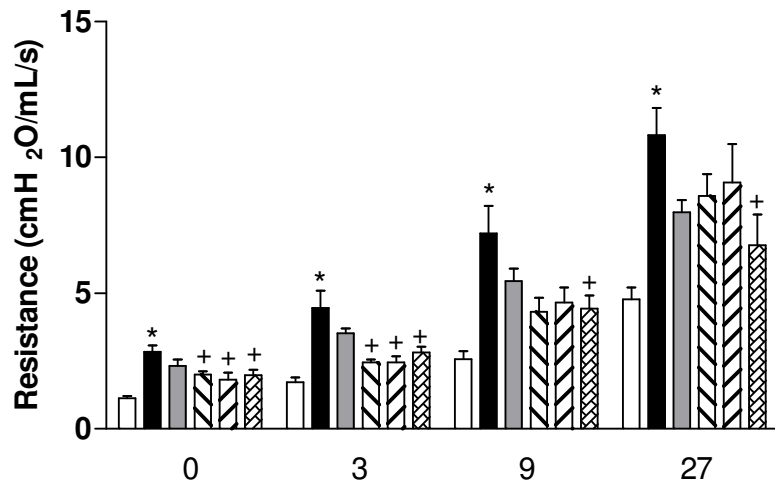
Figure 7: Effect of Ac2-26 peptide on production of collagen (A, C) and MCP-1 (B, D) by fibroblasts from lungs of Swiss-Webster mice. The cells were incubated with Ac2-26 peptide (10 - 30 μ M) 1 h before stimulation with IL-13 (40 η g/mL) (A and B) or TGF β (10 η g/mL) (C and D). Values represent the mean \pm SEM of triplicates. $n = 3$. The symbols * and + denote $p < 0.05$ when compared to non-stimulated and stimulated untreated with Ac2-26 peptide, respectively.

Figure 8: Effect of Ac2-26 peptide on production of collagen and MCP-1 by pulmonary fibroblasts from FPR1^{+/+} (A, C) and FPR1^{-/-} (B, D) mice stimulated with IL-13 (40 η g/mL) and TGF β (10 η g/mL). Values represent the mean \pm SEM of triplicates. $n = 4$. The symbol * denotes $p < 0.05$ compared to non-stimulated group (dotted line), while + represents $p < 0.05$ compared to stimulated group untreated with Ac2-26 peptide.

Figure 9: Effect of Ac2-26 peptide on production of collagen and MCP-1 by pulmonary fibroblasts from FPR2^{+/+} (A, C) and FPR2^{-/-} (B, D) mice stimulated with IL-13 (40 ng/mL) and TGFβ (10 ng/mL). Values represent the mean ± SEM of triplicates. n = 4. The symbol * denotes p<0.05 compared to non-stimulated group (dotted line), + represents p<0.05 compared to group stimulated untreated with Ac2-26 peptide.



A



B

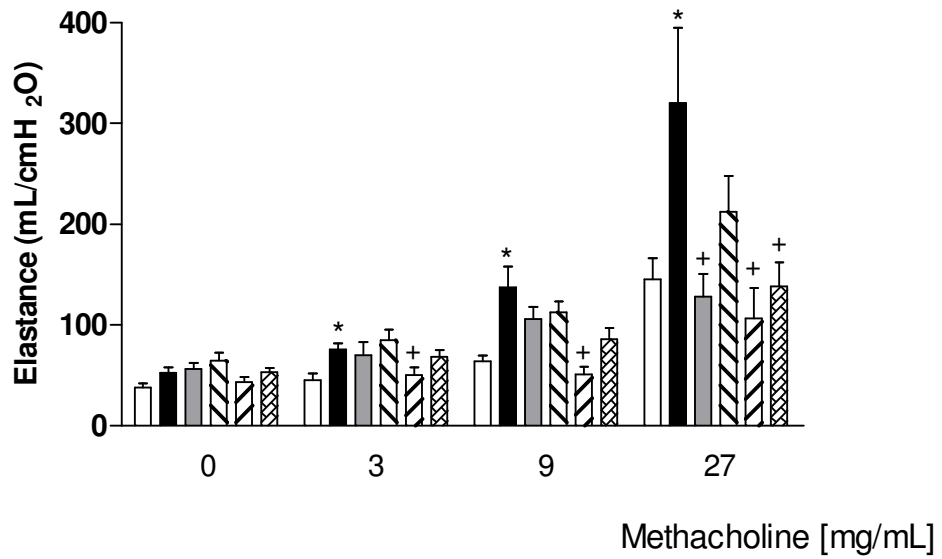


Figure 1

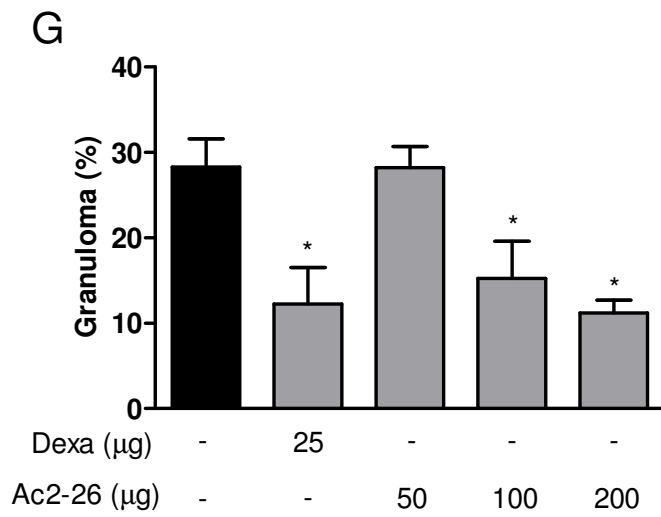
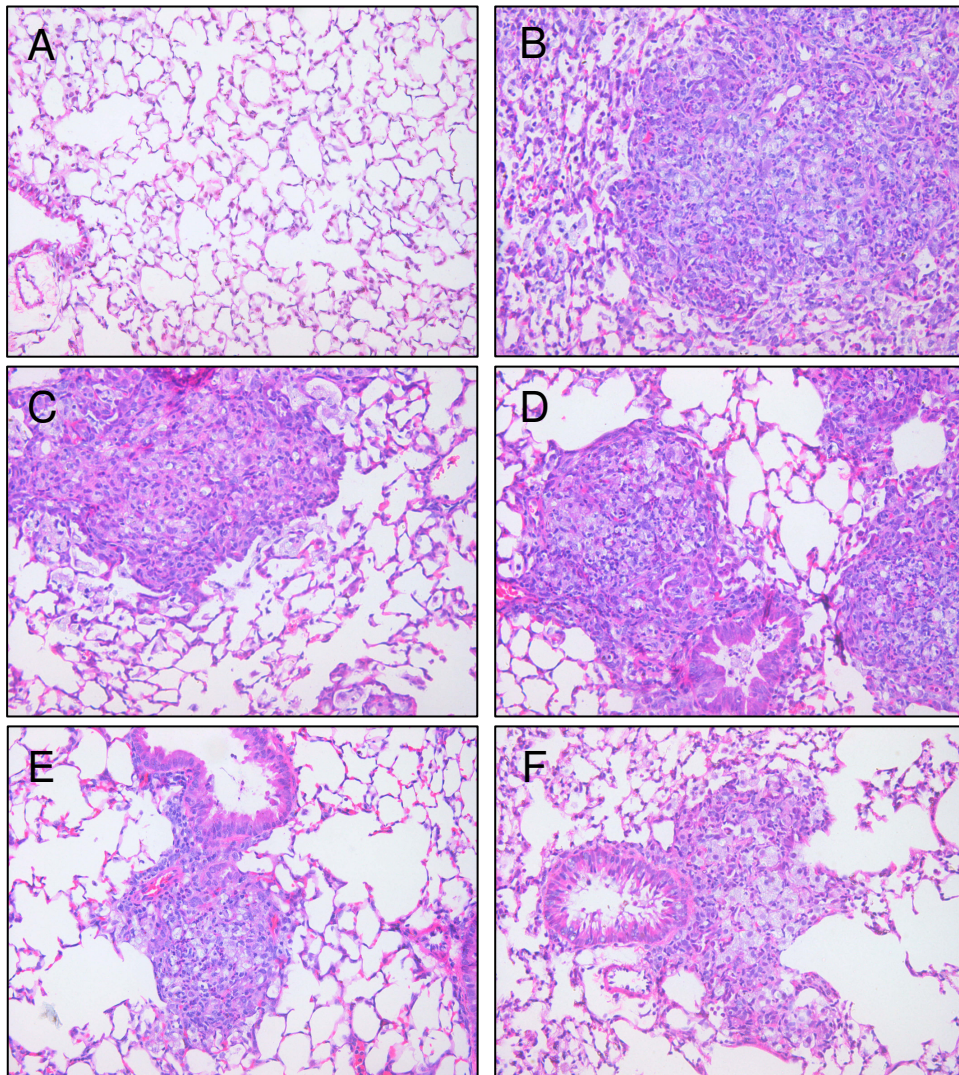


Figure 2

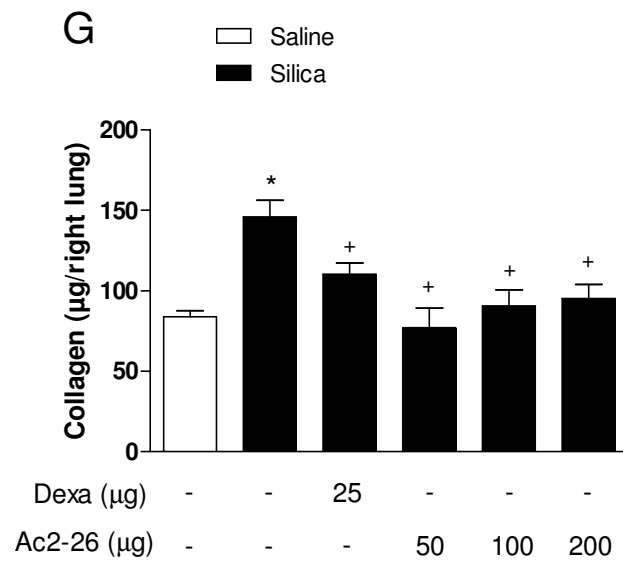
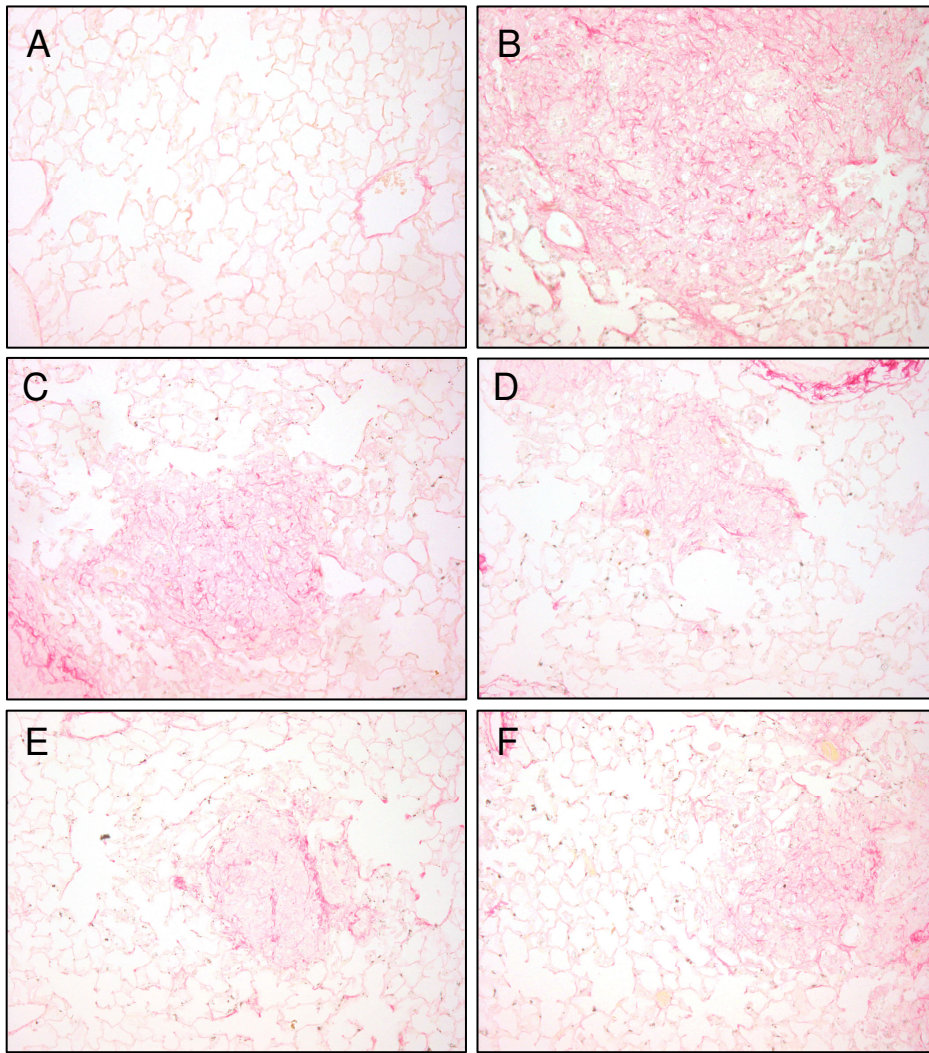


Figure 3

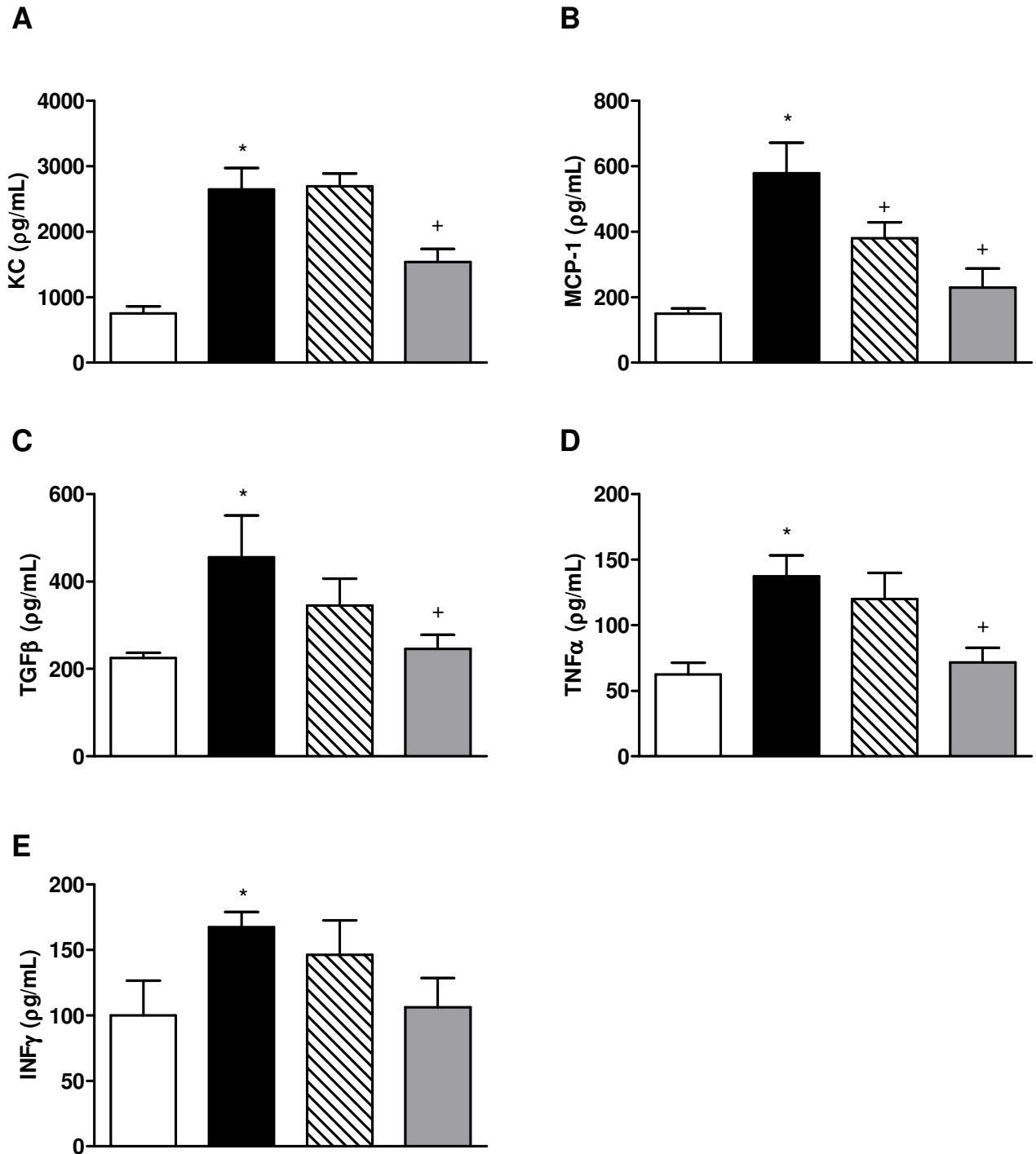
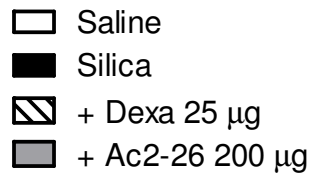


Figure 4

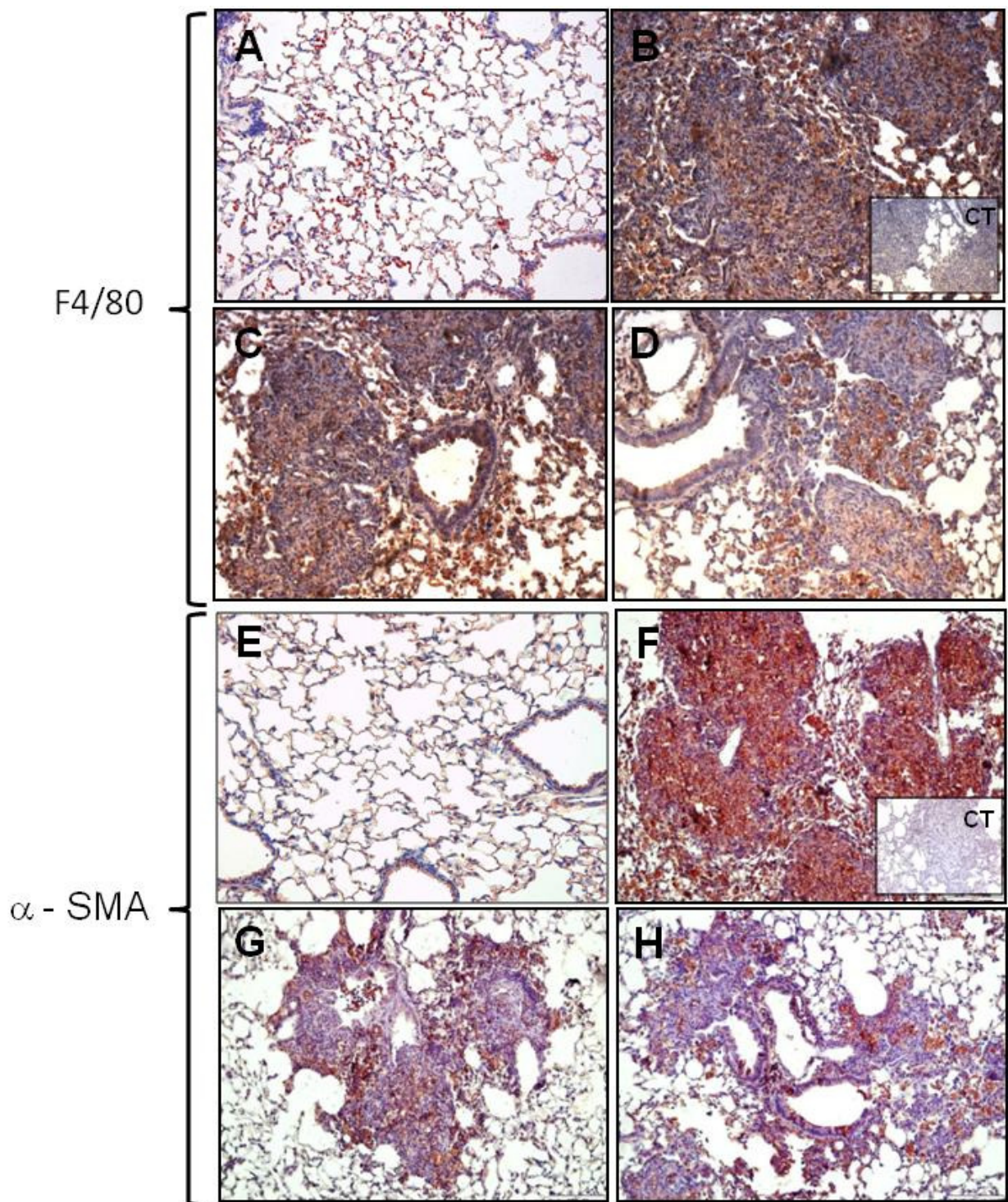


Figure 5

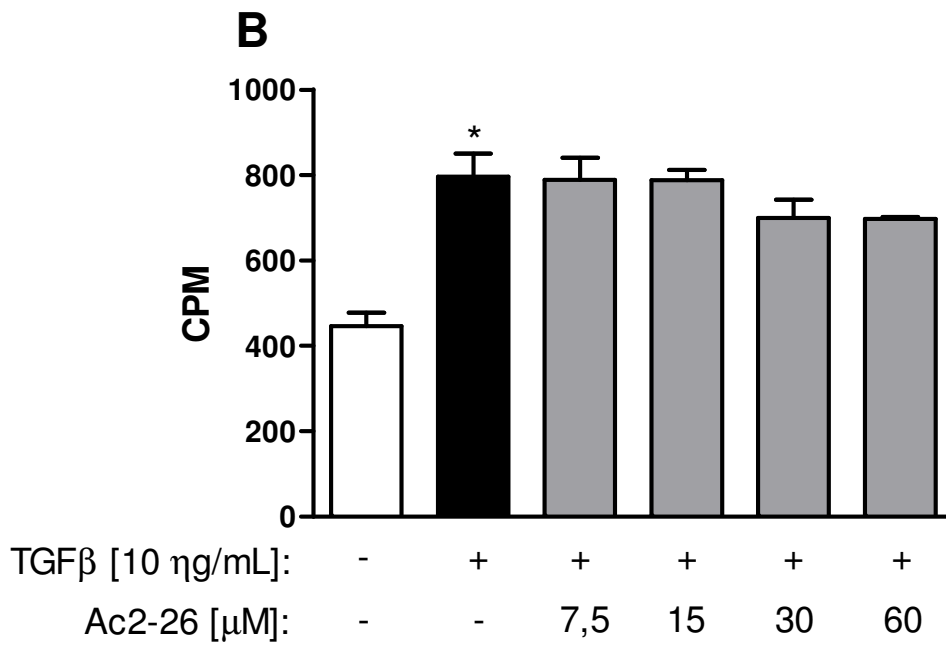
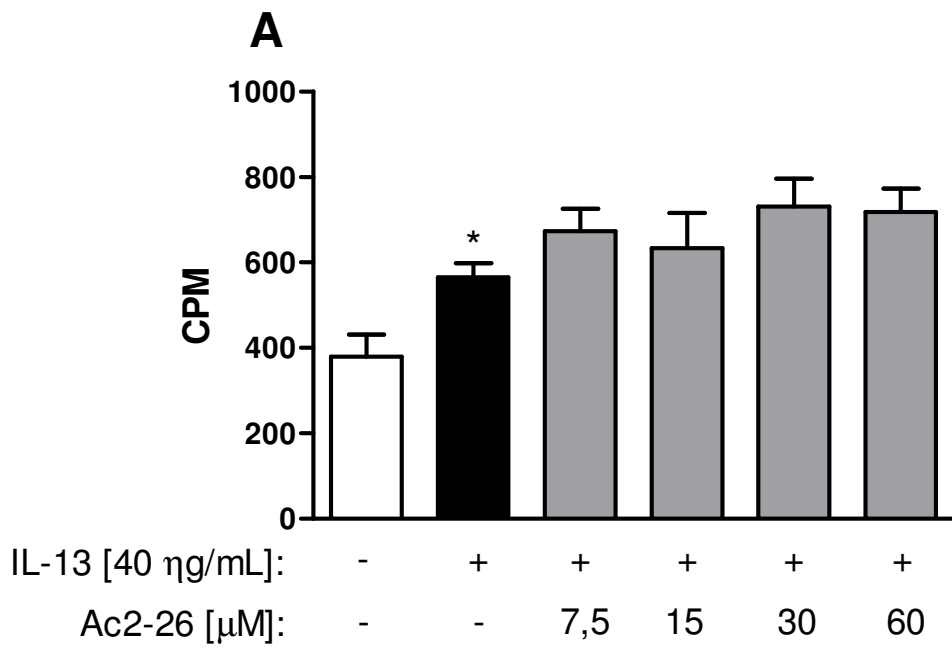


Figure 6

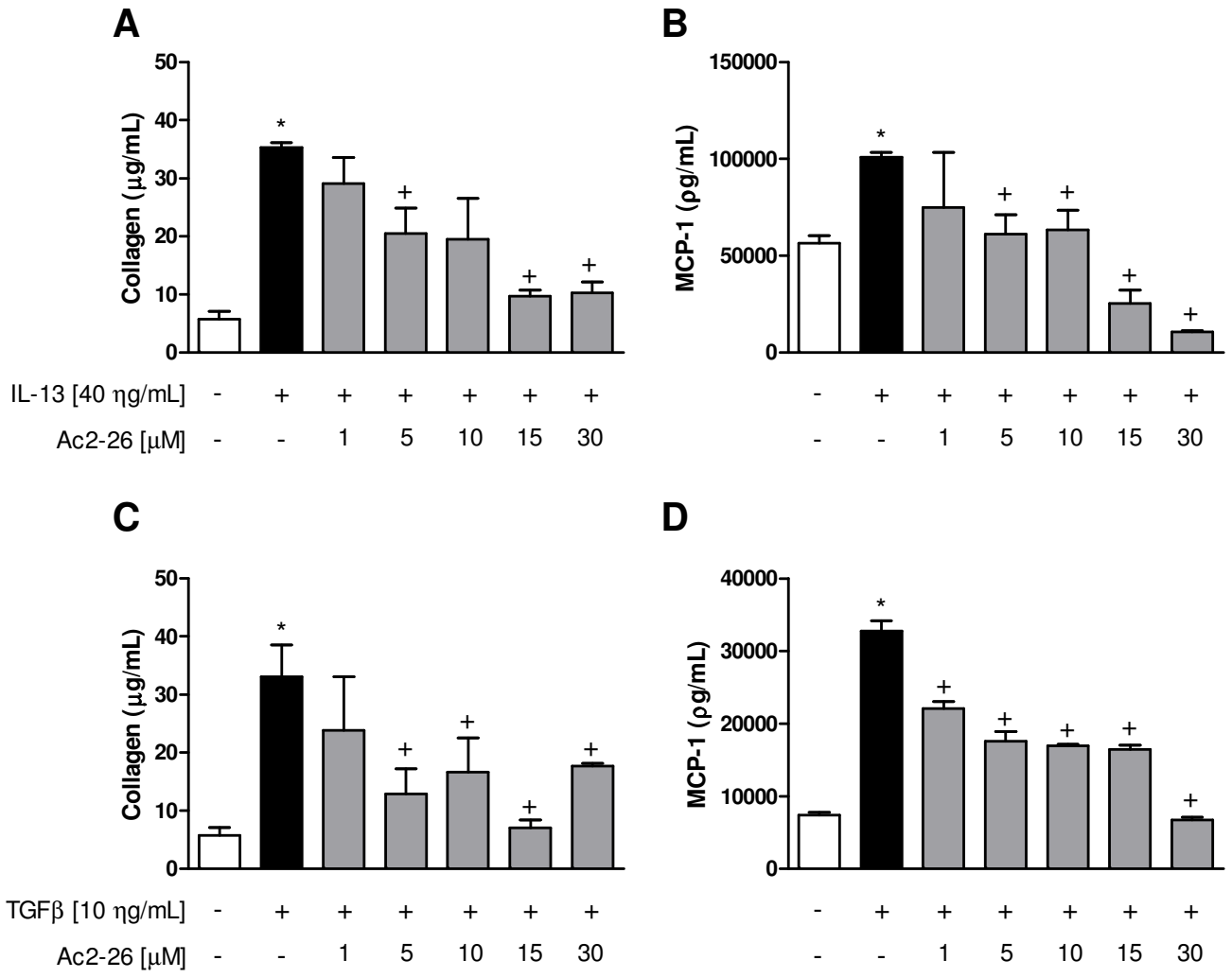


Figure 7

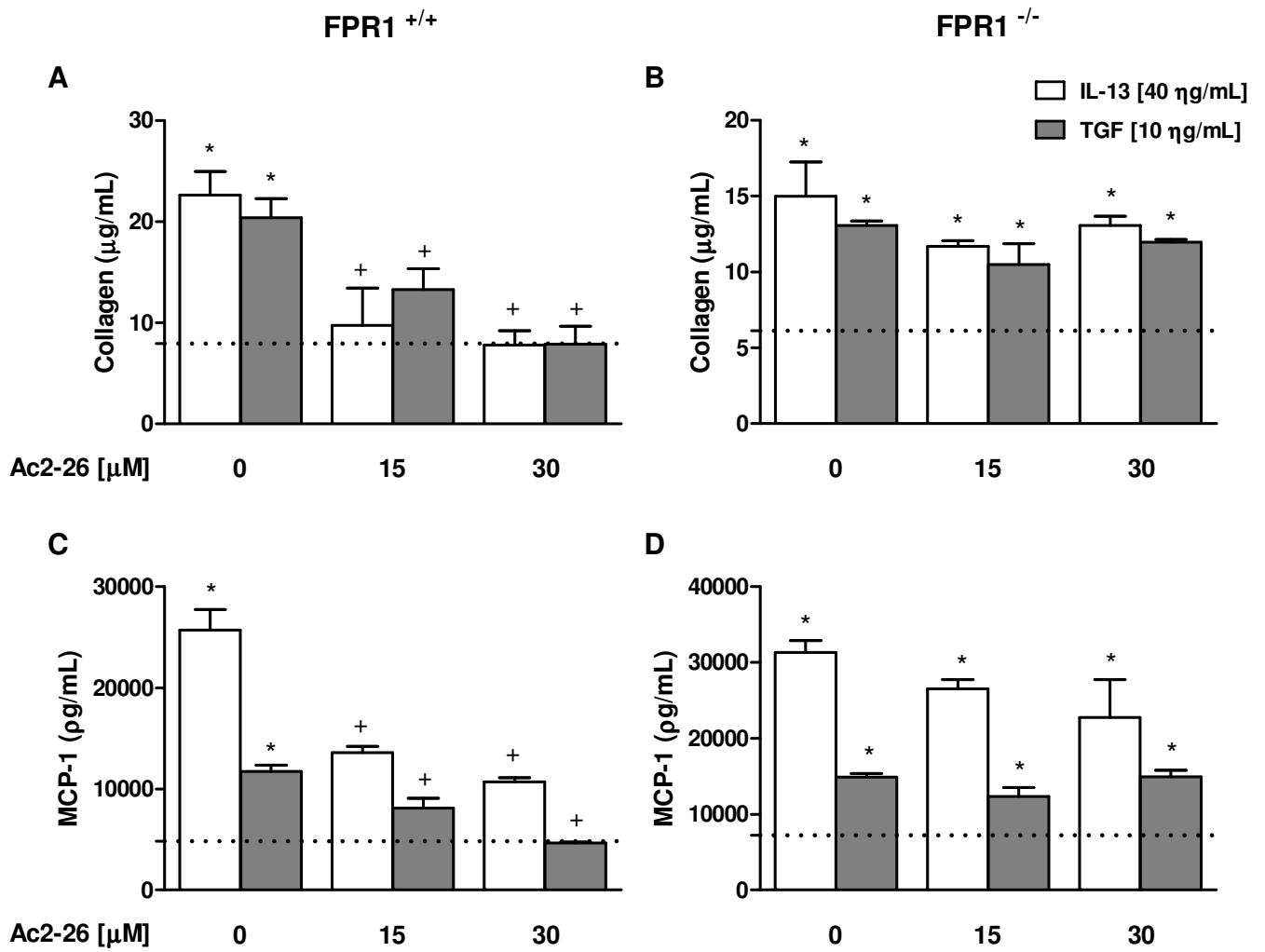


Figure 8

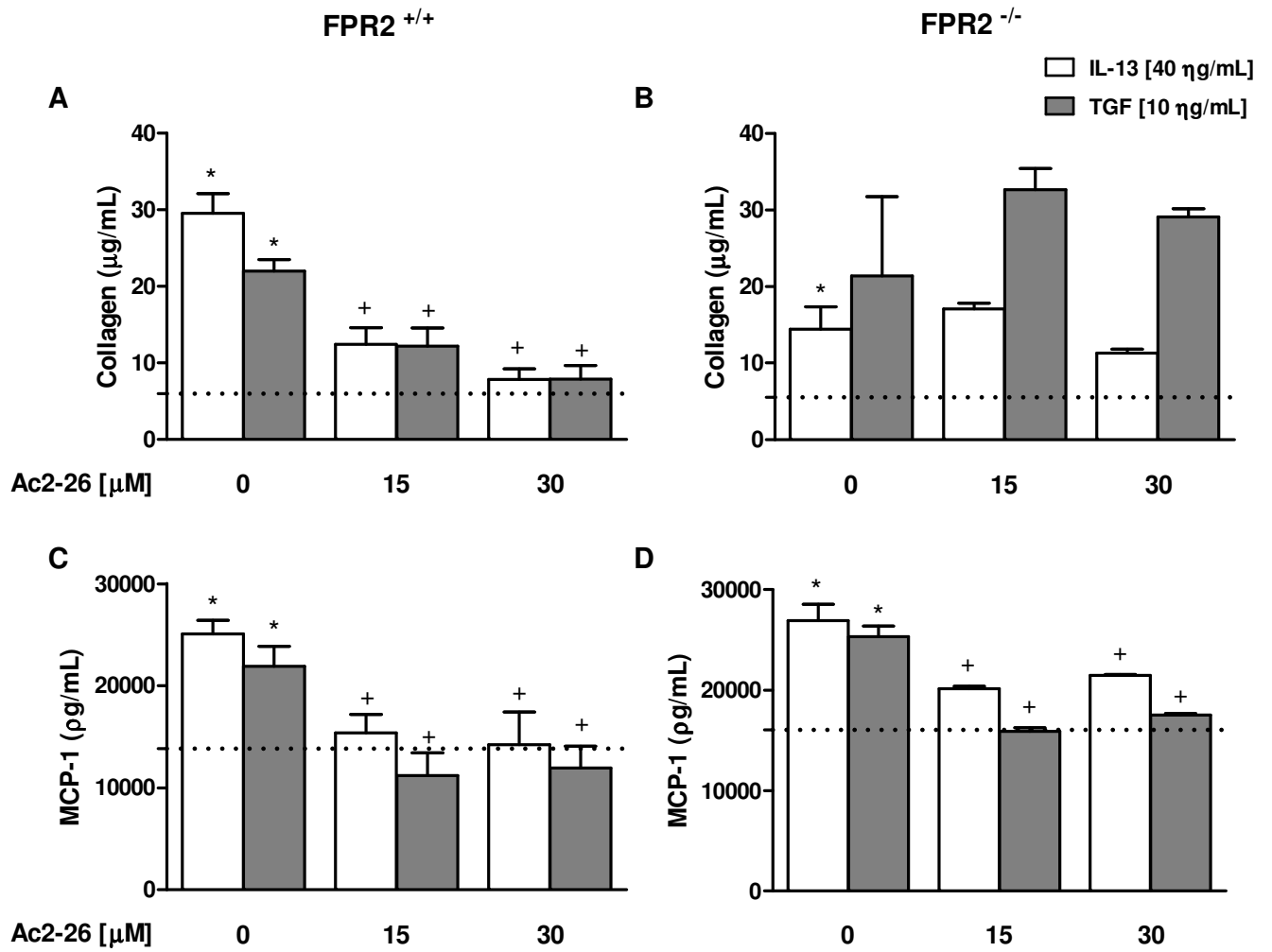


Figure 9