

Luana Ribeiro Ricardi



**INTERAÇÃO CÉLULA-CRISOTILA
EM DUAS DIFERENTES LINHAGENS
CELULARES: UMA ABORDAGEM
MORFOLÓGICA E MOLECULAR**

**Dissertação apresentada ao
programa de Pós Graduação
em Biologia Celular e Tecidual
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de
Mestre em Ciências**

São Paulo | 2013



LUANA RIBEIRO RICARDI

**INTERAÇÃO CÉLULA-CRISOTILA EM DUAS DIFERENTES LINHAGENS
CELULARES: UMA ABORDAGEM MORFOLÓGICA E MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Tecidual da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2013

LUANA RIBEIRO RICARDI

**INTERAÇÃO CÉLULA-CRISOTILA EM DUAS DIFERENTES LINHAGENS
CELULARES: UMA ABORDAGEM MORFOLÓGICA E MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dr. Gláucia Maria Machado-Santelli

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ricardi, Luana Ribeiro.

Interação célula-crisotila em duas diferentes linhagens celulares: uma abordagem morfológica e molecular / Luana Ribeiro Ricardi. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia da célula tumoral.

Versão do título para o inglês: Cell-Chrysotile interaction in two different cell lines: a morphological and molecular approach.

1. Asbestos 2. Estrutura Celular 3. Microscopia confocal
4. Microscopia eletrônica 5. Endocitose 6. Receptores Celulares
I. Santelli, Profa. Dra. Gláucia Maria Machado II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0135/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luana Ribeiro Ricardi.

Título da Dissertação: Interação célula-crisotila em duas diferentes linhagens celulares: uma abordagem morfológica e molecular.

Orientador(a): Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 470/11 referente ao projeto intitulado: “*Estudo in vitro da interação célula-crisotila*” sob a responsabilidade de **Luana Ribeiro Ricardi**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 17 de agosto de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Ao meu amado André, com todo o meu amor, carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais amados, meus heróis, exemplos e modelos de vida. Agradeço o apoio, as palavras de incentivo, a força e o carinho dedicado a mim. Agradeço por tantas vezes me ajudarem, não me permitirem desanimar e sempre ajudarem a “levantar a peteca” e a ter “força na peruca”!

Ao meu irmão querido, por sempre me ajudar, me incentivar e tornar a minha vida mais alegre e feliz, mesmo nos momentos difíceis sempre conseguia arrancar um sorriso dos meus lábios!

A todos os familiares que sempre me incentivaram.

Ao André, meu amado marido, agradeço pelas noites sem dormir, pelas palavras de incentivo, pelos jantares, pelos cafunés, por acreditar em mim, por ter sempre à mão um chocolate e por tornar possível a realização deste trabalho. Sem você seria muito difícil, pode ter certeza disso!

À nossa “chefa”, a profa. Gláucia, pela oportunidade de trabalharmos juntas, por ter me acolhido em seu laboratório, pela amizade, por ter me ajudado e principalmente por ter confiado em mim durante esses anos.

À Paula e a Bia pela ajuda nos experimentos, pelas discussões, pelas broncas e pelos elogios nas horas certas, pelas risadas, pelo ombro amigo e principalmente pela amizade! Sem vocês acho que não conseguiria.

À Camis, minha metadinha, pela ajuda não só na parte laboratorial, mas também na pessoal! Você é e sempre será alguém muito especial na minha vida!

Ao Roberto Cabado, pelas imagens incríveis, pelo auxílio, pelas risadas e pelas tantas conversas *geeks* e divertidas.

Ao prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara por ceder o anticorpo necessário para citometria de fluxo.

À Vivian Bradaschia e ao prof. Victor Arana Chaves pela imensa ajuda na microscopia eletrônica, minhas imagens ficaram lindas com o auxílio de vocês!

Ao Gaspar e ao Edson, por sempre me auxiliar nos momentos da eletrônica, pelos cafés e pelas conversas que jogamos fora.

À Marlene, por ser minha segunda mãe, por estar sempre presente, ajudar no que for preciso e por cuidar de cada um de nós no lab.

À Celiana e a Regina, por serem tão prestativas, competentes e pelas inúmeras conversas que tivemos.

À Vivian, por ser sempre tão amável, disposta a ajudar e ter sempre uma palavra de ânimo.

Ao Evs e ao Adam pelas conversas, pelos *insights* e pelas sugestões durante conversas na famosa mesa e por tantos outros momentos descontraídos que só a pós-graduação proporciona!

Ao Jonatão pelo legado da eletrônica, pela inspiração, pela ajuda virtual e pessoal e pela amizade!

Ao Fábio por me auxiliar na parte técnica e intelectual, sem o sonicador eu não seria nada!

A Bianca e ao Jorge por serem dois fofos e acharem tudo tão lindo e envolvente.

À Marisa Ionta pelas conversas, pela amizade e pelo auxílio de mãe em um momento de pânico.

À todos os amigos do BioCeM que contribuíram para tornar a vida mais alegre e feliz: Amadinha, Humberto, Marcel, Mich, Marina, Mingau, Marcelo, Nati e Renan.

A todos os amigos que fiz no ICB: Jú, Lú, Helô, Ana, Dani, Tati, Elo e Vivian.

As meninas da “insitas” pelo incentivo e força para fazer mestrado. Adoro vocês demais!

A Elisa e a Milene que iniciaram a minha paixão pela Ciência ao mesmo tempo em que nascia uma amizade tão linda!

Aos amigos que ajudaram demais nos momentos de descontração e inovação.

Aos amigos de infância, aos amigos dos laboratórios e aos amigos da graduação que sempre estiveram presentes de uma forma ou de outra, perto ou longe.

Aos funcionários da biblioteca.

À FAPESP, a CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

“Ainda quando eu falasse todas as línguas dos homens e a língua dos próprios anjos, se eu não tiver caridade, serei como bronze que soa e um címbalo que retine, ainda quando tivesse o dom de profecia, que penetrasse todos os mistérios, e tivesse ciência de todas as coisas; ainda que tivesse toda a fé possível até o ponto de transportar montanhas, se não tiver caridade, nada sou...” (S. Paulo,1; Epistola aos coríntios)

RESUMO

RICARDI, L. R. **Interação célula-crisotila em duas diferentes linhagens celulares: uma abordagem morfológica e molecular**. 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Asbestos é um termo geral usado comercialmente para descrever minerais fibrosos de silicato que ocorrem na superfície terrestre. A fibra mais abundante e mais utilizada até hoje é denominada crisotila. Em maior ou menor grau, todas as formas de asbestos são potencialmente carcinogênicas, mas o uso da crisotila no mercado mundial é considerado seguro. Embora, fragmentos menores podem permanecer por mais tempo em tecidos pulmonares. As fibras de crisotila, assim como as demais fibras de asbestos, possuem sílica na sua composição e, por isso, podem ser fagocitadas com a participação de receptores *scavenger*, já que estes possuem uma interação com partículas contendo sílica. Este trabalho teve como objetivo o estudo de mecanismos de interação e de internalização das pequenas fibras de crisotila com uma linhagem celular monocítica e outra derivada de células de carcinoma de pulmão. Uma análise por microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de transmissão foi realizada e observou-se que ambas as linhagens são capazes de internalizar fibras de crisotila em um período que varia de 1 a 36 horas. A presença de elementos do citoesqueleto próximos às fibras de crisotila foi verificada. Observamos também alterações no nível de expressão de alguns elementos do citoesqueleto em células expostas a fibras de crisotila. Em ambas as linhagens celulares haviam fibras envoltas ou não pela membrana plasmática e frequentemente estavam associadas a elementos do citoesqueleto, sugerindo que a internalização das fibras pode ocorrer por meio da endocitose e/ou da perfuração física da membrana plasmática. Dentro deste contexto, a participação de receptores no processo de internalização de fibras de crisotila também foi estudada e verificamos que a exposição à crisotila gerou efeitos sobre os níveis de expressão do mRNA e de proteínas de alguns dos receptores *scavenger* estudados, sugerindo que esses receptores podem estar envolvidos de alguma forma com o processo de internalização de fibras de crisotila

Palavras-chave: Crisotila. Internalização. Membrana plasmática. Elementos do citoesqueleto. Receptores *scavenger*.

ABSTRACT

RICARDI, L. R. **Cell-Chrysotile interaction in two different cell lines: a morphological and molecular approach.** 2013. 92 p. Dissertation (Master thesis Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Asbestos is a general term used commercially to describe silicate minerals occurring in the Earth's surface. Chrysotile is the most used fiber until today and it is considered safe. In lesser or greater levels, all asbestos fibers are potentially carcinogenic, but chrysotile used in world market is considered. However, smaller fragments can be found in lung tissues for a long period of time. Chrysotile fibers, as other asbestos fibers, are composed by silica and may be phagocytosed with the participation of *scavenger* receptors, since these present a silica particle interaction. This study's goal was to study the interaction and internalization mechanisms of small chrysotile fibers in a monocytic cell lineage and in a carcinoma derived cell lineage. Confocal laser scan microscopy analysis and electronic microscopy transmission analysis were conducted in both lineages, that showed capable of internalize chrysotile fiber in a period of time that ranges from 1 to 36 hours. Cytoeskeleton elements presence near the fibers was verified on both microscopy analyses. We also found changes in expression levels of some of cytoskeleton elements in cells exposed by chrysotile fibers. In both cell lineages there were fibers involved or not by cell membrane and frequently associated to cytoskeleton elements. These facts suggest that the internalization of fibers may occur through endocytosis and/or by physical perforation of the plasma membrane. In this context, the participation of *scavenger* receptors in the internalization process of chrysotile fibers was also studied, and we verified that exposure to chrysotile affected the expression levels of mRNA and proteins of some *scavenger* receptors, suggesting that these receptors may be associated to the internalization process of chrysotile fibers.

Keywords: Chrysotile. Internalization. Plasma membrane. Cytoeskeleton elements. *Scavenger* receptor.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Produção mundial de asbestos.....	20
Figura 2- Consumo mundial de asbestos.....	21
Figura 3- Estrutura e desintegração das fibras de crisotila.....	25
Figura 4- Estrutura dos receptores <i>scavenger</i> pertencentes à classe A.....	29
Figura 5- Estrutura do receptor <i>scavenger</i> CD36, pertencente à classe B.....	30
Figura 6- Curva de crescimento celular da linhagem HK2 e THP-1.....	42
Figura 7- Aspectos morfológicos das linhagens HK2 e THP-1 ao microscópio de luz.....	44
Figura 8- Imunofluorescência de células HK2 na situação controle e exposta à crisotila por 8, 12 e 24 horas, observadas ao microscópio confocal de varredura a laser.....	48
Figura 9- Projeção ortogonal de células HK2 expostas à crisotila por 36 horas, observadas ao microscópio confocal de varredura a laser.....	49
Figura 10- Imunofluorescência de células THP-1 diferenciadas e não diferenciadas observadas ao microscópio confocal de varredura a laser.....	51
Figura 11- Projeção ortogonal de células THP-1 expostas à crisotila por 2 e 4 horas observadas ao microscópio confocal de varredura a laser.....	53
Figura 12- Projeção ortogonal de células THP-1 expostas à crisotila por 8 e 12 horas observadas ao microscópio confocal de varredura a laser.....	54
Figura 13- Ultraestrutura de células HK2 controle e expostas à crisotila por 4 e 12 horas.....	57
Figura14- Ultraestrutura de células HK2 expostas à crisotila por 36 horas.....	58
Figura 15- Ultraestrutura de células THP-1 não diferenciadas, diferenciadas e expostas à crisotila por 4 horas.....	60
Figura16- Ultraestrutura de Células THP-1 expostas à crisotila por 12 e 36 horas.....	62
Figura 17- Maior presença de Complexo de Golgi em células THP-1 expostas à crisotila em comparação com o controle, observadas na micrografia.....	63

Figura 18- Detalhe dos filamentos intermediários observados na micrografia de células HK2 expostas à crisotila por 12 horas.....	65
Figura 19- Imunofluorescência de células HK2 observadas ao microscópio confocal de varredura a laser para visualização da citoqueratina e vimentina.....	67
Figura 20- Perfil de colocação na célula HK2 entre citoqueratina, vimentina e fibras de crisotila.....	68
Figura 21- Expressão dos elementos do citoesqueleto controle e exposto à crisotila em HK2 e THP-1.....	70
Figura 22- Localização celular dos receptores <i>scavenger</i> SR-A e SCARA5 em imunofluorescência de células HK2 observadas ao microscópio confocal de varredura a laser.....	72
Figura 23- Localização celular dos receptores <i>scavenger</i> SR-A e SCARA5 em imunofluorescência de células THP-1 observadas ao microscópio confocal de varredura a laser.....	73
Figura 24- Presença dos receptores <i>scavenger</i> em gel de agarose a partir da amplificação do cDNA das células HK2 e THP-1.....	74
Figura 25- Expressão relativa de mRNA dos receptores <i>scavenger</i> SR-A e SCARA5 na situação controle e exposta à crisotila e o nível de expressão proteica desses receptores.....	76

LISTAS DE ABREVIATURAS

ATRA – All Trans Retinoic Acid

CD36 – receptor *scavenger*

cDNA – DNA complementar

DMEM/F-12 – Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F12 Ham

EPA – Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos da América

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

FITC – isotocianato de fluoresceína

FWD - forward

IARC – Agência Internacional de pesquisa em câncer

MARCO – receptor *scavenger* com estrutura de colágeno

mRNA – RNA mensageiro

min – minutos

pb – pares de base

PBS – solução de tampão fosfato de sódio

PBSA – solução de tampão fosfato de sódio sem cálcio e magnésio

PCR – reação em cadeia da polimerase

PVDF – fluoreto de polivinilideno

REV – reverse

RNase – ribonuclease

RT – transcrição reversa

SCARA5– receptor *scavenger* tipo A-5

SDS – dodecil sulfato de sódio

s – segundos

SR– receptor *scavenger*

SR-A– receptor *scavenger* A

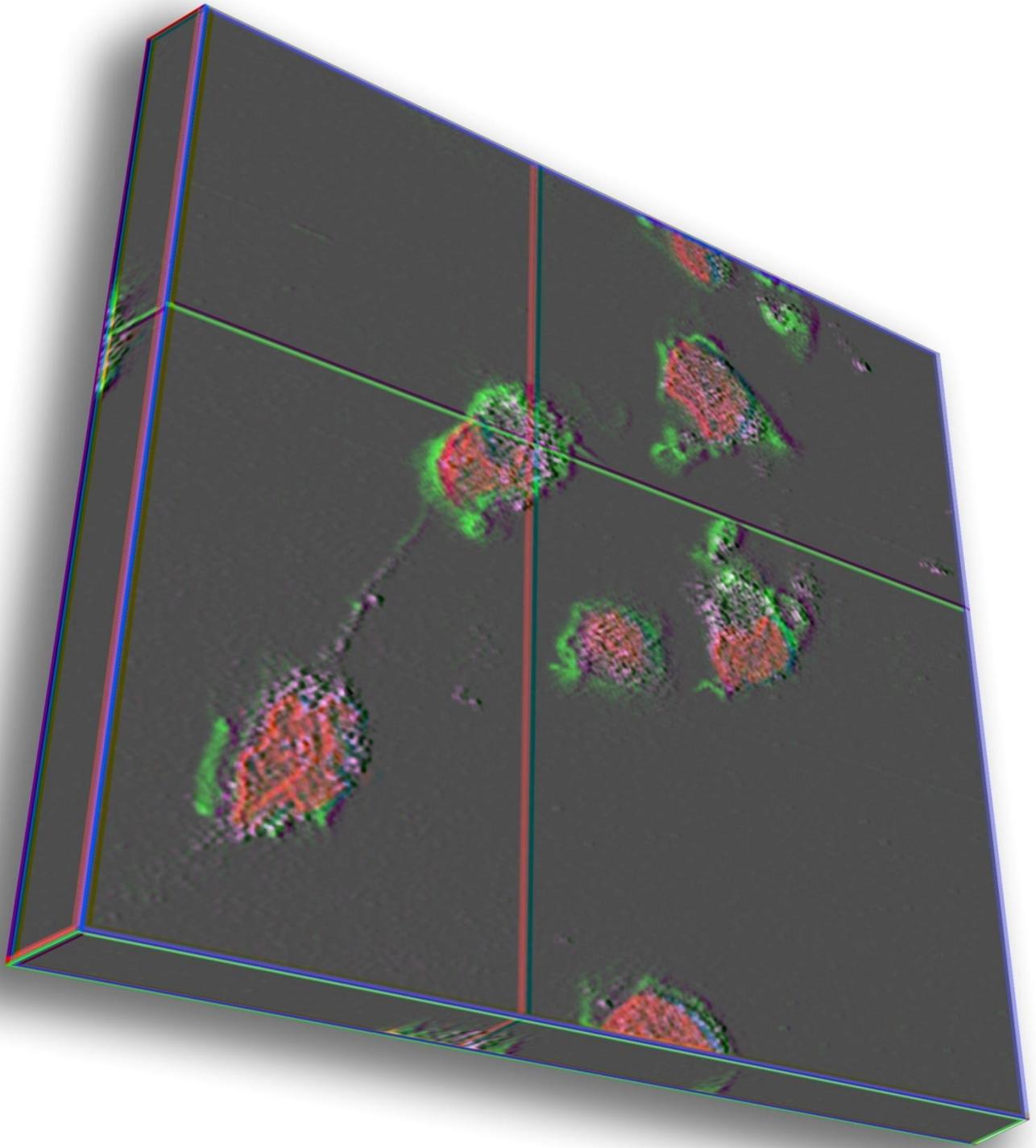
TEMED – Tetramethylethylenediamine

TM – temperatura de *melting* dos *primers*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Histórico do uso dos asbestos	18
1.2 Produção e consumo dos asbestos	19
1.3 Riscos a saúde pelo uso de asbestos	22
1.4 O uso da crisotila	24
1.5 Receptores <i>scavenger</i>	27
2 OBJETIVO	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Cultura de células	35
3.2 Diferenciação das células THP-1	35
3.3 Citometria de fluxo	35
3.4 Tratamento com crisotila	36
3.5 Imunofluorescência	36
3.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	37
3.7 Tamanho das fibras de crisotila	37
3.8 <i>Primers</i> utilizados	38
3.9 Extração de RNA, síntese do cDNA e qPCR	39
3.10 Análise da expressão de proteínas	39
3.11 Análise estatística	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Curva de crescimento das células HK2 e THP-1	42
4.2 Morfologia das células em cultura e diferenciação celular	42
4.3 Marcadores específicos de macrófagos	45
4.4 Interação célula-crisotila visualizada em microscopia confocal de varredura a laser	45
4.5 Microscopia eletrônica de transmissão: interação e internalização das fibras com células em cultura	55
4.6 Interação entre as fibras e elementos do citoesqueleto	64
4.6.1 <i>Morfologia celular utilizando microscopia</i>	64
4.6.2 <i>Expressão dos elementos do citoesqueleto</i>	69
4.7 Receptores <i>scavenger</i>	71
4.7.1 <i>Morfologia Celular e localização dos receptores</i>	71

4.7.2 Expressão relativa de mRNA e expressão proteica.....	74
5 Discussão.....	77
6 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	86



1_INTRODUÇÃO

Asbestos é um termo geral usado comercialmente para descrever minerais de silicato que ocorrem na superfície terrestre. A estrutura desses minerais pode ser encontrada tanto na forma fibrosa como não fibrosa. O nome usado comumente como asbestos é utilizado para descrever minerais de silicato fibrosos que são encontrados na forma de feixes filamentosos, compostos por fibras flexíveis, normalmente de pequeno diâmetro e comprimento longo. Já as formas não fibrosas, são encontradas na natureza como cristais (HSE, 2005; USGS, 2001¹ apud INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012).

Asbestos são encontrados na crosta terrestre, normalmente em lugares onde a rocha original sofreu metamorfismo ou em terrenos com uma composição ultrabásica, porém é comum a contaminação com outros minerais ou outros tipos de fibras também (IARC, 2012). As fibras de asbestos podem ser reunidas em dois grupos, os anfibólios e as serpentinas. O primeiro grupo inclui cinco tipos: antofilita, tremolita, actinolita, amosita (asbesto marrom) e crocidolita (asbesto azul). O segundo grupo inclui a fibra mais abundante e mais utilizada até hoje, denominada crisotila ou asbesto branco (GIANTOMASSI et al., 2010; VIRTA, 2005).

Dentre os tipos de asbestos citados, somente três tiveram relevância comercial na maioria dos países industrializados até a década de 80, são eles: amosita, crocidolita e crisotila. Durante o período de 1925 a 1975 cerca de 90% a 95% da produção industrial de asbestos era de crisotila, de 2 a 3% de amosita e 3% crocidolita (CRAIGHEAD; GIBBS, 2008). O que deixa evidente a preponderância do uso da crisotila frente aos outros asbestos.

1.1 Histórico do uso dos asbestos

Os asbestos têm sido utilizados desde a antiguidade por possuírem características físicas e químicas atraentes, tais como: resistência à tração, a ácidos e a altas temperaturas (MURRAY, 1990). Estudos arqueológicos indicam que os habitantes do oeste da Finlândia utilizavam potes de barro e utensílios de cozinha reforçados com um mineral, identificado posteriormente como antofilita, há pelo

¹ USGS. Some Facts about Asbestos. **USGS Fact Sheet FS-012-01**, 2001. HEALTH AND SAFETY EXECUTIVE. **HSG 248 'Asbestos: The analysts' guide for sampling, analysis and clearance procedures'**. London: HSE Books, 2005.

menos 4500 anos, sugerindo que o uso dos asbestos na civilização humana é bastante antigo (EUROPAEUS-ÄYRÄPÄÄ, 1930² apud ROSS; NOLAN, 2003).

Também há descrições do uso dos asbestos na Grécia e na Roma antiga, há mais de 2000 anos, em candeeiros, toalhas de mesa, mortalhas e até nas construções de casas (ROSS; NOLAN, 2003). Em meados do século XIII, Marco Polo em uma de suas viagens pela Ásia descreveu que os habitantes utilizavam roupas indestrutíveis, resistentes ao fogo (MURRAY, 1990).

A indústria moderna de asbestos começou em 1800 com o aparecimento da indústria têxtil italiana (ALLEMAN; MOSSMAN, 1997; BOWLES, 1946; SINCLAIR, 1959³ apud VIRTÁ, 2005;). Entre 1860 e 1870, a exploração dos asbestos ganhou força, possivelmente devido a necessidade de novas tecnologias aliada ao estabelecimento de um consórcio entre empresários italianos e ingleses e a exploração de depósitos de asbestos (hoje descritos como crisotila) no norte da Itália, Rússia e Quebec (ROSS; NOLAN, 2003).

Nesta época, o aumento do consumo de produtos contendo asbestos impulsionava a diversificação da produção e o surgimento de novas empresas. Em 1878, em uma exposição realizada em Paris, alguns desses novos produtos foram apresentados ao público com o intuito de obter maior atenção internacional para estes (ROSS; NOLAN, 2003). O aumento da industrialização e as vantagens que os asbestos apresentavam, tais como: flexibilidade, resistência ao calor e à tração, trouxeram novas aplicações que podem ser sumarizadas em um artigo intitulado "Asbestos and its applications", publicado em 1883 (MURRAY, 1990).

1.2 Produção e consumo dos asbestos

O advento de novas tecnologias resultou em um aumento significativo no uso de produtos associados aos asbestos, como é o caso da máquina Hatschek que une a fabricação de cimento aos asbestos e possibilitou a produção de materiais de construção mais baratos e resistentes ao fogo, desempenhando um papel

² EUROPAEUS-ÄYRÄPÄÄ, A. **Die relative chronologie der steinzeitlichen Kermik**, Finland: Acta Archaeologie, v. 1, p. 169–190, 1930.

³ ALLEMAN, J. E., MOSSMAN, B.T., 1997, **Asbestos revisited: Scientific American**, v. 277, n. 1, p. 70-75, 1997.

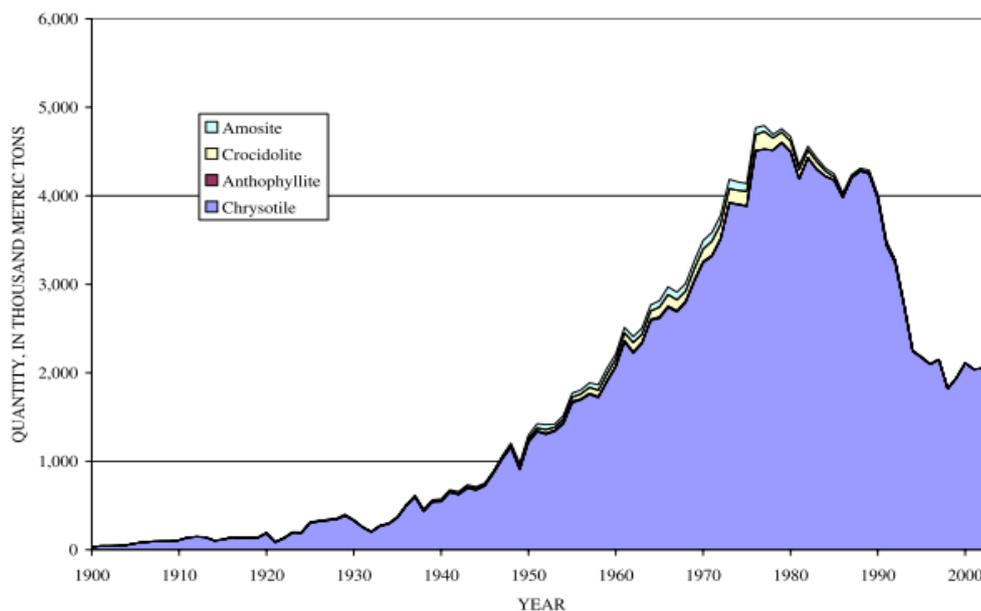
BOWLES, O. **Asbestos—The silk of the mineral kingdom**. New York: Ruberoid Co., 1946.

Sinclair, W. E. **Asbestos—its origin, production, and utilization**. London: Mining Publications, 1959.

importante na construção civil (ROSATO, 1959; SINCLAIR, 1959⁴, apud VIRTA, 2005). Os novos usos dos asbestos em diferentes indústrias, como automobilística (pastilhas, lonas de freio e embreagens), construção civil e no abastecimento de água, aumentaram a produção mundial em 1910 para 80.000 toneladas de amianto, um aumento de 300 a 400% do que era encontrado em 1900 (VIRTA, 2005).

Apesar da diminuição tanto da produção como do consumo de asbestos durante períodos de guerras e de crises econômicas, após a passagem destes eventos ocorria novamente um aumento da demanda do uso dos asbestos, impulsionados pelos novos mercados em expansão, como a indústria têxtil, construção civil, asfalto, reforço em vigas de aço, etc (figuras 1 e 2) (VIRTA, 2005).

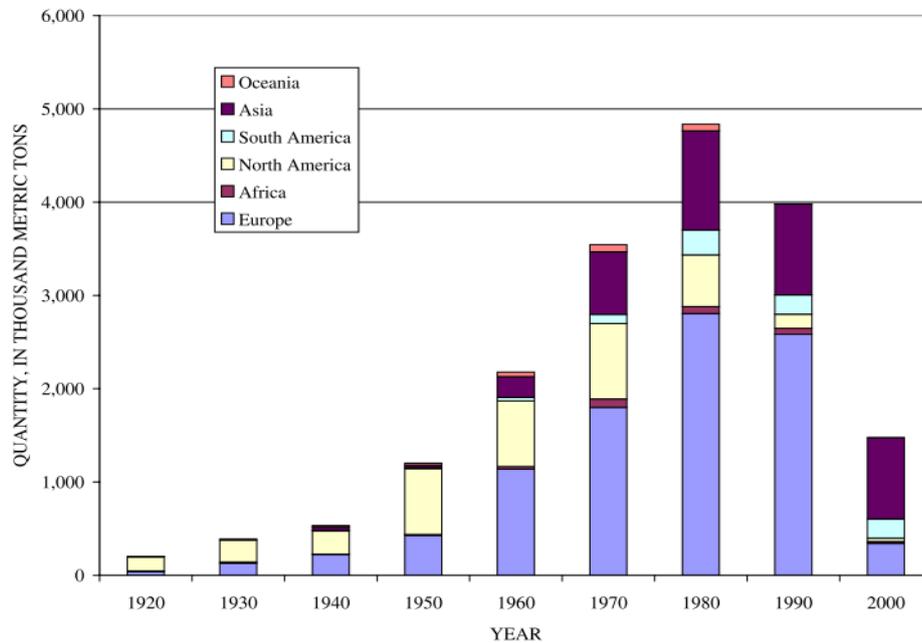
Figura 1- Produção mundial de asbestos, dos diferentes tipos, no período que compreende 1900 a 2003.



Fonte: Virta, 2005

⁴ ROSATO, D. V. **Asbestos-Its industrial applications**. New York: Reinhold Publishing Corp., 1959. SINCLAIR, W. E. **Asbestos—Its origin, production, and utilization**. London: Mining Publications, 1959.

Figura 2- Consumo mundial de asbestos de acordo com no período que compreende 1920 a 2000.



Fonte: Virta, 2005

Ao longo dos anos, mais de 3000 produtos industrializados continham asbestos (CRAIGHEAD; GIBBS, 2008) e o pico do uso destas fibras minerais foi em meados de 1970, com produção de cerca de 5.000.000 toneladas de asbestos por 25 países (PARK et al., 2012; VIRTA, 2005). A partir desta época, houve um declínio do uso e da produção destas fibras devido a preocupações relacionadas à saúde humana e muitos países impuseram medidas rigorosas ou até o banimento total dos asbestos (NISHIKAWA et al., 2008).

A crisotila é o tipo predominante produzido e consumido no mundo e, embora o consumo de asbestos tenha diminuído na América do Norte e na Europa ocidental, a venda em países do Sudeste da Ásia, América do Sul e leste da Europa aumentaram até meados da década de 90 (STAYNER et al., 1996). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de crisotila e, embora grande parte da sua produção seja destinada a exportação, o uso no país é justificado por ser controlado e seguro, porém para trabalhadores brasileiros o limite aceito é de 2,0 fibras/cm³ (Norma Regulamentadora NR-15, anexo 12), sendo que o aceito mundialmente é de 0,4 fibras/cm³ (LADOU, 2004).

1.3 Riscos a saúde pelo uso de asbestos

Os efeitos adversos oriundos dos asbestos começaram a aparecer na forma de relatos de trabalhadores para inspetores de fábricas na França e no Reino Unido. No ano de 1906, em Londres, um médico relatou a observação de uma fibrose incomum nos pulmões de um trabalhador de uma fábrica de asbestos para um comitê responsável por doenças oriundas do trabalho, mas não obteve nenhuma resposta deste comitê (AURIBAUT, 1906⁵ apud MURRAY, 1990). O interessante é que este trabalhador foi o único de dez companheiros da mesma fábrica a viver mais de trinta anos de idade, já que seus companheiros morreram por volta desta idade, provavelmente de doenças decorrentes da exposição aos asbestos (MURRAY, 1990).

Em 1927, o termo asbestose foi usado pela primeira vez ao associar doenças a “curiosos corpos” que apareciam nos pulmões de trabalhadores expostos aos asbestos. Casos similares continuaram a ser descritos e, durante a década de 1930, alguns trabalhos descreveram doenças decorrentes ao uso dos asbestos (MURRAY, 1990). Estas doenças compreendem as asbestoses (fibrose nos pulmões), câncer de pulmão, mesoteliomas e placas pleurais (PARK et al., 2012).

A exposição das pessoas que trabalhavam diretamente com os asbestos e a presença de asbestos no ar (formação de poeira) devido a manipulação das fibras, começaram a ser motivo de preocupação. Em uma tentativa de minimizar os riscos, em 1938 foram estabelecidos limites de concentração de poeira no ar, principalmente em indústrias têxteis, nas quais durante o processo de fabricação uma grande quantidade de poeira era formada (CRAIGHEAD; GIBBS, 2008).

A contaminação com os asbestos pode ocorrer por meio da inalação das fibras, a principal forma de exposição para a população, e em menor grau por meio de água ou solo contaminado. As famílias das pessoas que trabalham diretamente com os asbestos também podem estar expostas às fibras indiretamente, através da inalação de fibras impregnadas em roupas e cabelos (IARC, 2012).

Em 1992, os asbestos foram classificados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) como importantes substâncias a serem estudadas e pesquisadas em relação aos efeitos que causam sobre a saúde humana.

⁵ AURIBAUT, M. *Bulletin d'Inspection du Travail*, v. 14, p. 120-132, 1906

De acordo com a classificação da Agencia Internacional para Pesquisa com Câncer (IARC) asbestos são considerados carcinogênicos para humanos (BERNSTEIN, et al., 2005).

A inalação de fibras de asbestos e a sua deposição nos alvéolos é um aspecto importante para patogenicidade e está associada com o desenvolvimento de doenças malignas e não malignas (BERNSTEIN et al., 2005; IARC, 2012). Esta patogenicidade é complexa e depende de outros fatores, como: a aerodinâmica, geometria, diâmetro, interação entre as cargas elétricas, solubilidade e o tamanho das fibras quando inaladas (BERNSTEIN et al., 2005).

O tamanho das fibras parece estar relacionado com a facilidade de limpeza e de fagocitose pelos macrófagos, uma vez que as fibras longas podem penetrar profundamente no tecido, dificultar a remoção pelos macrófagos, interagir localmente ou sofrer translocação para outras regiões. As fibras menores tendem a ser mais facilmente fagocitadas pelos macrófagos durante o processo de limpeza (BERNSTEIN et al., 2005). A tentativa frustrada de digestão de fibras de asbestos pelos macrófagos pode ocasionar a morte destas células, a liberação de citocinas e de fatores pró-inflamatórios que juntos podem vir a promover a secreção de colágenos e conseqüentemente a fibrose (STROHMEIER, et al., 2010).

O potencial patogênico dos asbestos depende não só da variedade química entre os diferentes tipos, mas também da organização do mineral (hábito mineral) e do tamanho das fibras (IARC, 2012). A associação entre a exposição aos asbestos e o aparecimento de doenças desencadeou uma série de pesquisas relacionadas aos tipos de fibra, tamanho, composição, durabilidade e biopersistência nos tecidos pulmonares (BECKLAKE; BAGATIN; NEDER, 2007).

Em maior ou menor grau, todas as formas de asbestos são potencialmente carcinogênicas e estudos epidemiológicos, ensaios clínicos e laboratoriais foram capazes de induzir câncer de pulmão, mesoteliomas e uma grande variedade de doenças decorrentes da exposição aos asbestos (LANDRIGAN, 1998). Porém, os mecanismos pelos quais essas fibras produzem malignidade e toxicidade não estão completamente elucidados e não são completamente independentes, podendo estar relacionados uns com os outros. Há evidências de que os eventos incluem: stress oxidativo, alterações genéticas e epigenéticas e inflamações (HUANG et al., 2011).

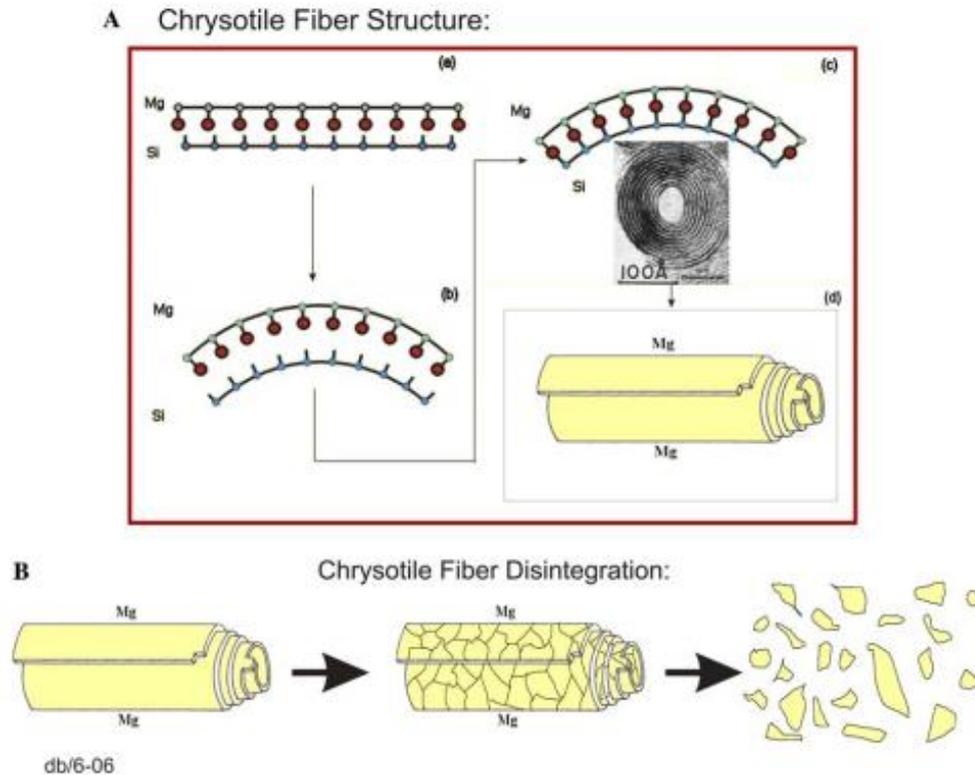
1.4 O uso da crisotila

Os minerais do tipo anfibólitos são fibras finas e pontiagudas, muito mais resistentes a ataques químicos (de ácidos e bases fortes) e físicos (alta durabilidade), conseqüentemente possuem uma biopersistência maior nos pulmões (ADDISON; MCCONNELL, 2008). As fibras do tipo anfibólito foram substituídas gradualmente pelas serpentinas, principalmente pela crisotila, por serem mais maleáveis, solúveis e apresentarem uma menor biopersistência nos pulmões (BECKLAKE et al., 2007; BERNSTEIN et al., 2005). A crisotila é o tipo predominante de asbesto produzido e consumido hoje em dia e representava 98,5% do consumo dos Estados Unidos na década de 1990, sendo que o principal uso é na indústria de fibrocimento (STAYNER et al., 1996).

As fibras do tipo anfibólito são muito diferentes da crisotila, já que possuem uma estrutura muito mais complexa; essa diferença reflete na fórmula química e conseqüentemente na acomodação e organização dos átomos. A fórmula química da crisotila é $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$ e, apesar de todos os asbestos conterem sílica, as fibras de crisotila formam folhas de silicato tubulares ao invés de hastes, devido ao alinhamento dos íons de magnésio e sílica (BERNSTEIN; HOSKINS, 2006). Com o auxílio da microscopia eletrônica de transmissão é possível visualizar a ultraestrutura das fibras de crisotila com aspecto cristal tubular e uma estrutura composta por cilindros concêntricos (FALINI et al., 2006)

O magnésio tem uma grande importância na estrutura química da crisotila, corresponde cerca de 30% da molécula e está localizado na parte externa da molécula (na região exposta). A exposição do átomo de magnésio é interessante na medida em que é solúvel no líquido pulmonar, podendo facilmente reagir com os ácidos na superfície, diminuindo a estabilidade da molécula e promovendo a quebra da fibra (BERNSTEIN; HOSKINS, 2006). Dessa forma, a estrutura química da crisotila facilita o processo de quebra e desagregação das fibras quando misturadas a soluções aquosas ou ácidas (Figura 3).

Figura 3 – Estrutura e desintegração das fibras de crisotila.



(A) Estrutura da fibra de crisotila. (a,b,c) Esquema representativo da formação das folhas tubulares e (d) folha tubular formada. (B) Representação esquemática da desintegração das fibras de crisotila.

Fonte: Bernstein e Hoskins 2006

Esse é um fator considerado importante para a menor biopersistência das fibras de crisotila em relação às fibras do tipo anfibólios (BERNSTEIN; HOSKINS 2006). Embora as fibras de crisotila não se acumulem nos tecidos pulmonares de camundongos como as fibras do tipo anfibólio, devido a maior fragmentação, foram encontradas fibras de crisotila de até $5\mu\text{m}$ nos tecidos pulmonares de camundongos após 400 dias de exposição à crisotila, sugerindo que os fragmentos menores podem permanecer nos tecidos por um longo período de tempo (BERNSTEIN et al., 2005).

Apesar das evidências encontradas em diferentes estudos, o uso da crisotila ainda é discutido, uma vez que ainda há controvérsias de interpretação e heterogeneidade dos dados de razões ainda desconhecidas, como por exemplo: a influência dos tipos, tamanhos e níveis de exposição às fibras diferem de indústria para indústria; o período de latência das doenças, a contaminação das minas de crisotila com outros minerais ou com outras fibras de asbestos; a comparação entre

os diferentes ensaios com animais e humanos, entre outros (IARC, 2012; YARBOROUGH, 2007).

Uma questão particularmente discutida é a menor potência da crisotila frente à indução de câncer de pulmão e outras doenças em relação aos asbestos do tipo anfibólios, isso é denominado de “hipótese anfibólio”. Este argumento é principalmente baseado na baixa biopersistência observada após exposição às fibras de crisotila; porém, nem sempre esta menor biopersistência está relacionada com a menor toxicidade e potência na indução de doenças (IARC, 2012).

O uso da crisotila no mercado mundial é considerado seguro devido à fragmentação das fibras em pedaços pequenos, como discutido anteriormente, o que contribui para uma menor biopersistência nos pulmões. Porém, fragmentos menores que 5µm são capazes de atravessar o pulmão e alcançar a pleura, podendo acumular-se neste tecido ou serem translocadas para outras regiões do corpo, como nódulos linfáticos e tecidos mesoteliais. O acúmulo dessas fibras de crisotila na região pleural é frequentemente observado em mesoteliomas e placas pleurais, sugerindo que as fibras de crisotila são capazes de induzir mesoteliomas malignos (KANAREK, 2011; SUZUKI; YUEN, 2001).

Estudos indicam que células humanas em cultura tratadas com crisotila tem um aumento da formação dos micronúcleos (DOPP et al., 1997; POSER et al., 2004) e aberrações cromossômicas ocasionadas por quebras duplas no DNA (OKAYUSU et al., 1999). Também foi observada em culturas de células humanas expostas à crisotila a presença de mitoses aberrantes e fusos multipolares que podem originar células aneuplóides (CORTEZ et al., 2011).

Um estudo epidemiológico realizado com trabalhadores de fábricas têxteis avaliou o tamanho das fibras de crisotila e a prevalência de certas doenças. Embora o tamanho das fibras avaliadas tenha sido estimado em relação aos locais onde os trabalhadores se encontravam, neste estudo foi verificado que fibras curtas (< 5µm) estão mais relacionadas às asbestoses e fibras longas (> 5µm) com câncer de pulmão (LOOMIS et al., 2012; STAYNER et al., 2008).

As fibras de crisotila também possuem efeitos sobre a morte e a proliferação celular. Células epiteliais de pulmão expostas a crisotila (A549) apresentam uma diminuição de proteínas relacionadas a proliferação celular e a observação da ultraestrutura dessas células indica um aumento da apoptose celular quando em

contato com as fibras, sugerindo uma possível relação entre citotoxicidade das fibras e a diminuição da proliferação (GIANTOMASSI et al., 2010).

Através da microscopia eletrônica de transmissão, é possível observar a morfologia das fibras no interior das células que se apresentam envoltas pela membrana plasmática ou livres no citosol, indicando que podem haver diferentes repostas celulares relacionadas à internalização dessas fibras e sugerindo também que as fibras pequenas podem ser capazes de interagir com proteínas no citosol (MACCORKLE et al., 2006)

1.5 Receptores *scavenger*

A inalação de partículas contendo sílica desencadeia um processo de reconhecimento e ligação entre as células e as partículas, de acordo com as características físicas da superfície do material e da ligação com os receptores específicos. Esse reconhecimento inicial desencadeia o processo de fagocitose mediado inicialmente pelos macrófagos alveolares (HAMILTON; THAKUR; HOLIAN, 2007).

As fibras de crisotila, assim como as demais fibras de asbestos, possuem sílica na sua composição e, por isso, podem apresentar uma superfície com carga negativa ou positiva, dependendo da sua composição e de sua integridade estrutural (VIRTA, 2005). Estudos indicam que partículas contendo sílica podem ser fagocitadas com a participação de receptores *scavenger*, já que estes possuem uma região positiva (DOI et al., 1993). Essa ligação foi observada entre crocidolita e receptores *scavenger*, sugerindo a participação destes receptores na internalização de fibras de asbestos (ANDERSSON; FREEMAN, 1998).

Os receptores *scavenger* são um grupo diverso de proteínas de superfície celular, sendo alguns com domínios múltiplos, envolvidas na adesão celular e agrupadas em uma única família por possuírem ligantes comuns que incluem: lipoproteínas modificadas de baixa densidade, polinucleotídeos e poliânions compostos, partículas fagocitáveis, bactérias, polissacarídeos e células apoptóticas (MARTÍNEZ et al., 2011; SANTIAGO-GARCIA et al., 2003).

A ampla capacidade de reconhecimento de ligantes sugere que estes receptores têm propriedades que podem ser importantes para a ativação de

mecanismos de imunidade celular inata, já que agem como receptores de reconhecimento de padrão (PRR), ou seja, capazes de reconhecer diferentes estruturas de patógenos (CHAO et al., 2001; PEARSON, 1996).

Inicialmente os receptores *scavenger* foram funcionalmente classificados como receptores capazes de ligar-se em lipoproteínas de baixa densidade acetiladas e oxidadas, tendo uma importante participação na formação de aterosclerose (ARESCOUD; GORDON, 2009). Sabe-se que hoje esta família de proteínas é ampla e compreende 8 classes de proteínas de membrana e também solúveis, agrupados de A a H de acordo com os domínios estruturais comuns (STEPHEN et al., 2010). Os receptores são encontrados em diversos grupos de animais vertebrados e invertebrados e em muitos tipos celulares diferentes, como: monócitos, células B, células endoteliais e em macrófagos (BOWDISH; GORDON, 2009).

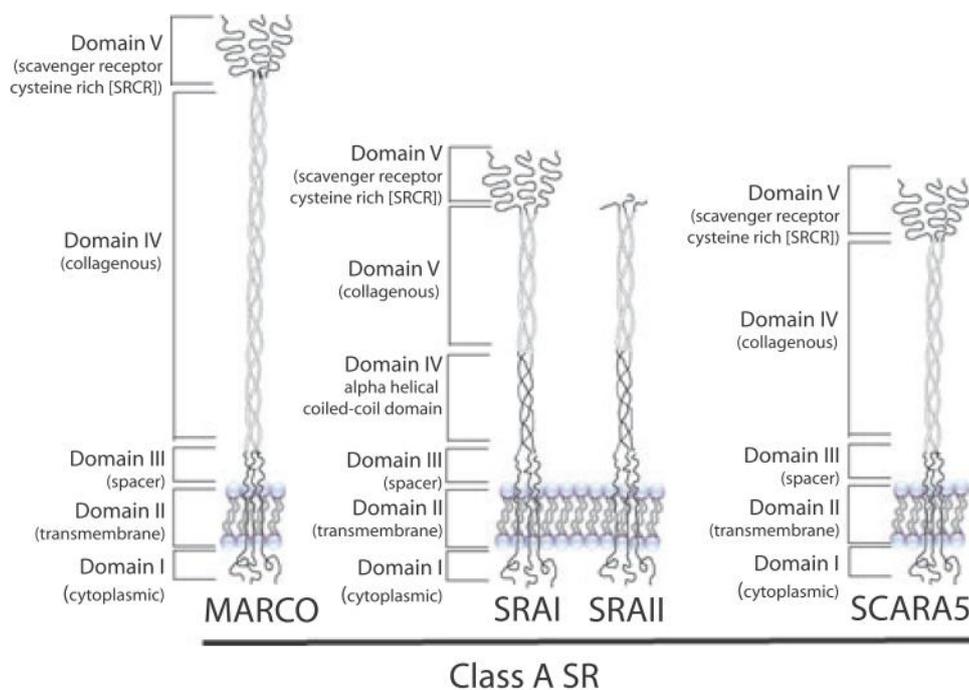
Alguns desses receptores *scavenger* estão associados com a internalização de ligantes contendo sílica e pertencem à classe A e B, sendo expressos em diferentes tipos celulares (HAMILTON; THAKUR; HOLIAN, 2007). Os receptores pertencentes à classe A que estão associados a ligantes com sílica são: o receptor *scavenger* A (SR-A) e o receptor *scavenger* de macrófago com estrutura de colágeno (MARCO), ambos expressos em macrófagos e o receptor *scavenger* tipo A-5 (SCARA5) expresso principalmente em células epiteliais especializadas. Na classe B há o receptor CD36, expresso em macrófagos, mas também em células endoteliais, epiteliais, adipócitos e leucócitos (STEPHEN et al., 2010).

O receptor *scavenger* A (SR-A) foi o primeiro a ter a sua estrutura predita por Kodama e colaboradores em 1998 a partir de células de fígado e pulmão bovino. O SR-A é uma proteína transmembrana que consiste em seis domínios, incluindo o domínio de colágeno e o domínio rico em cisteína (Figura 4) (GREAVES; GORDON, 2009). Este receptor apresenta três isoformas (SR-AI, SR-AII e SR-AIII) e é expresso em macrófagos, células endoteliais e de músculo liso (STEPHEN et al., 2010).

O receptor *scavenger* com estrutura de colágeno (MARCO) é bastante semelhante ao SR-A, diferindo principalmente no tamanho do domínio de colágeno, como pode ser observado na figura 4. É expresso constitutivamente em macrófagos e células dendríticas (BOWDISH; GORDON, 2009). Assim como o SR-A, o receptor MARCO é uma glicoproteína transmembrana trimérica, com cinco domínios.

O receptor *scavenger* tipo A-5 (SCARA5) foi caracterizado como pertencente à família dos receptores *scavenger* recentemente por Jiang e colaboradores em 2006. Este receptor também é caracterizado por ser uma proteína trimérica com cinco domínios (Figura 4) e foi encontrada com expressão restrita a: testículo, traqueia, pulmão, bexiga e intestino. Embora não tenha nenhum trabalho que relacione este receptor com a internalização de compostos contendo sílica, este foi estudado no presente trabalho, visto que é um receptor *scavenger* expresso em células epiteliais especializadas.

Figura 4 – Estrutura dos receptores *scavenger* pertencentes à classe A.



Fonte: Modificado de Bowdish e Gordon, 2009

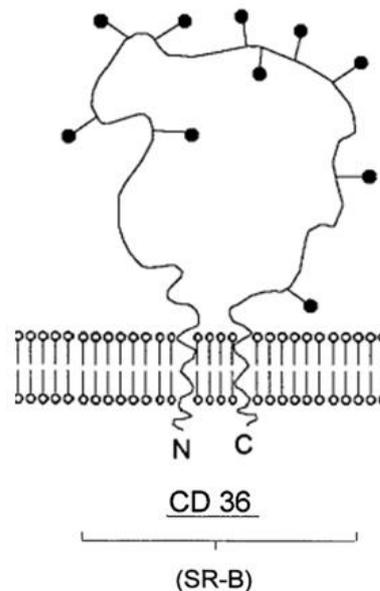
O único representante da família da classe B dos receptores *scavenger* que até o momento parece estar relacionado com a internalização de compostos contendo sílica é o receptor CD36. Da mesma forma que os outros *scavenger*, este receptor também é uma glicoproteína de membrana, porém estruturalmente é diferente dos anteriores descritos, já que possui uma grande alça extracelular (figura 5) (PEISER; GORDON, 2001). Além de ser expresso em diferentes tipos celulares, o CD36 possui múltiplas funções, estando também associado a diferentes ligantes,

entre eles a trombospondina que tem um importante papel na resposta inflamatória (SILVERSTEIN; FEBBRAIO, 2009).

Estudos relacionando o receptor CD36 com a internalização de compostos contendo sílica ainda são controversos, uma vez que é possível encontrar na literatura tanto informações sobre a participação deste receptor em processos inflamatórios decorrentes do uso da sílica (WANG et al., 2010) como o não envolvimento deste receptor com a toxicidade mediada pela sílica (HAMILTON; THAKUR; HOLIAN, 2007).

Figura 5 – Estrutura do receptor *scavenger* CD36, pertencente à classe B.

● — potenciais sítios de glicosilação



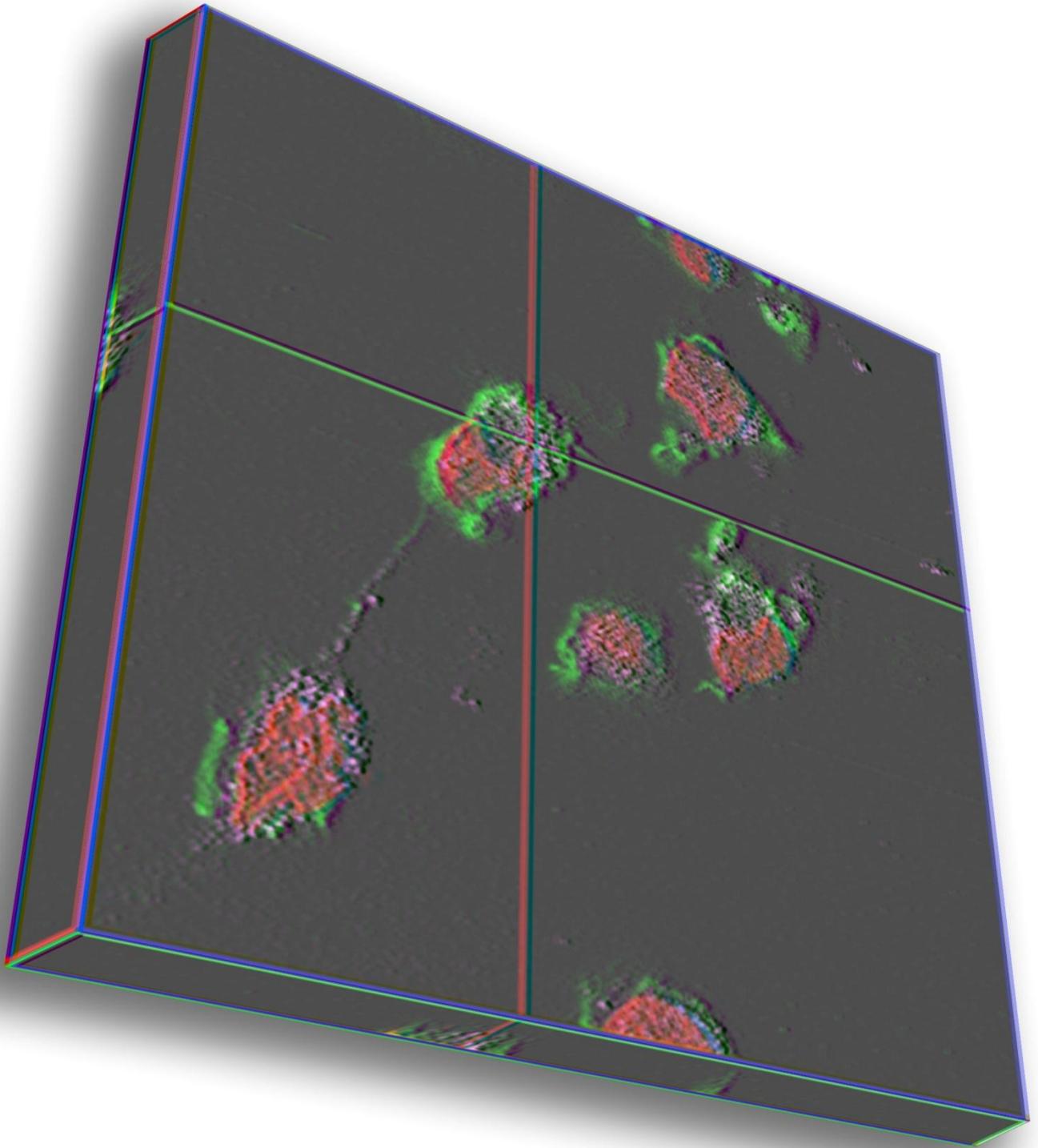
Fonte: Modificado de Peiser e Gordon, 2001

Alguns trabalhos demonstram que há uma estreita relação entre toxicidade induzida por sílica e receptores *scavenger*, pois quando células são pré-tratadas com inibidores para receptores *scavenger* ou quando macrófagos alveolares de uma linhagem de camundongo knockout para receptores *scavenger* são expostos a partículas contendo sílica na sua composição, a toxicidade é bastante reduzida, apesar de não ser completamente eliminada (BEAMER; HOLIAN, 2005; IYER et al., 1996). Também foi verificado que macrófagos alveolares de camundongo em cultura podem sofrer apoptose e ativação das caspases, quando em contato com

sílica, mediadas por receptores *scavenger* e que esses efeitos eram minimizados na presença de inibidores de SR-A. (CHAO et al., 2001).

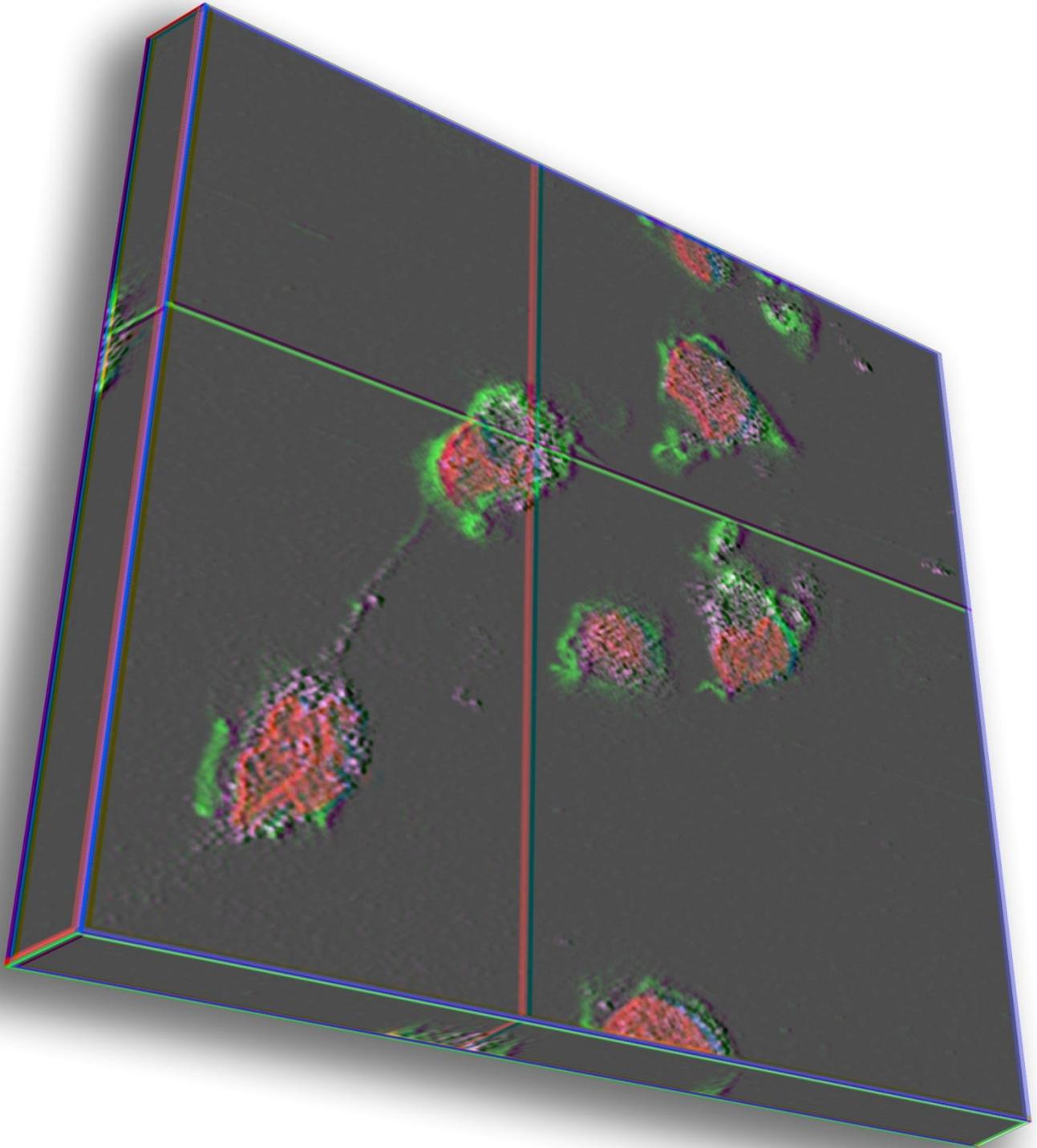
É possível perceber que há uma grande quantidade de receptores *scavenger* para funções e ligantes muito semelhantes, resultando em um fenômeno denominado de redundância funcional. Essa multiplicidade de receptores *scavenger* sugere que há funções importantes que não são somente limitadas a endocitose, mas também a adesão celular, cascata de sinalização intracelular e o transporte de partículas com diferentes cargas (GREAVES; GORDON, 2009; HAMILTON et al., 2006)

Os conjuntos dos dados descritos acima sugerem que os receptores *scavenger* tem um papel importante na indução de citotoxicidade por sílica. Entender como ocorre à interação de fibras de crisotila com as células é o primeiro passo para compreender o processo de indução da toxicidade gerada por danos ao material genético da célula. O processo de toxicidade induzida pelas fibras de asbestos ainda não está completamente elucidado, há várias hipóteses e ainda há muito a explorar.



2_OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar o mecanismo de interação de fibras pequenas de crisotila com células em cultura, comparando uma linhagem celular monocítica e outra derivada de carcinoma de células não pequenas de pulmão. Desta forma, o ponto principal foi investigar o processo de internalização de fibras pequenas de crisotila por microscopia eletrônica de transmissão e por microscopia confocal de varredura a laser. Neste contexto, o envolvimento dos receptores *scavenger* no processo de interação e internalização das fibras pode ter um papel fundamental, por isso a expressão destes receptores foi analisada nas duas linhagens.



3_MATERIAIS e MÉTODOS

3.1 Cultura de células

Foram utilizadas a linhagem de células tumorais HK2, proveniente de carcinoma de células não pequenas epiteliais de pulmão (BONALDO et al., 1991) e a linhagem de células monocíticas THP-1, proveniente de leucemia monocítica, que exibem morfologia de macrófagos quando estimuladas com ácido retinóico (CHEN; ROSS, 2004). As células foram cultivadas em meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium –DMEM) com meio Ham F12, 1:1 (DMEM/F-12 – Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife Campinas, SP, Brasil) e mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂. O meio de cultura era trocado por meio fresco a cada dois dias e as células eram subcultivadas regularmente. Para o subcultivo as células eram submetidas à dissociação enzimática com uma solução de tripsina a 0,2% acrescida de EDTA a 0,02%.

3.2 Diferenciação das células THP-1

As células da linhagem THP-1 foram semeadas em placa de Petri de 35 mm de diâmetro com meio de cultura contendo 1 µM de ácido retinóico (All Trans Retinoic Acid – Merck, Darmstadt, Germany). Após um período de 48 horas ocorre a diferenciação celular de monócitos para macrófagos e as células diferenciadas mostram-se aderidas e com morfologia característica de macrófagos.

3.3 Citometria de fluxo

A expressão do receptor de superfície CD11b foi analisada por citometria de fluxo para checar a diferenciação celular das células THP-1 antes e após o estímulo com ácido retinóico. As células THP-1 diferenciadas e não diferenciadas (controle) foram lavadas com solução de tampão fosfato de sódio (PBS) e submetidas à imunoreação com o anticorpo monoclonal anti-CD11b FITC (1:100, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), diluído em PBS contendo 2% de soro fetal bovino. A proporção da expressão do marcador de superfície foi medida pelo citômetro de

fluxo Guava (GE). Foram realizadas três repetições dos grupos experimentais e contadas 5000 células em cada experimento.

3.4 Tratamento com crisotila

As fibras de crisotila 5R (Quebec Standard) obtidas da SAMA Mineração de Amianto Ltda (Minaçu, GO, Brasil) foram gentilmente cedidas pela Dra. Flavia M. Cassiola. Para obter fibras de tamanhos menores elas eram sonicadas durante 1,5 minutos com 80% de amplitude e ressuspendidas em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células eram subcultivadas em placas de Petri 35 mm e após 24 horas o meio de cultura era trocado por uma mistura de meio com fibras de crisotila na concentração de 80 µg/mL. A exposição era realizada por diferentes períodos de tempos, variando de 1 a 36 horas.

3.5 Imunofluorescência

As células eram fixadas em formaldeído 3,7% por 30 minutos e lavadas com PBSA por 3 vezes, para então serem permeabilizadas com Triton X-100 0,5% durante 10 minutos. As células eram tratadas com RNAase (10 mg/ml) por 30 minutos e incubadas com anticorpos primário contra β-tubulina (Sigma, 1:200), vimentina (Sigma, 1:200), pan-citoqueratina (Sigma, 1:100), SR-A (Abcam, 1:100) e SCARA5 (Abcam, 1:20) *overnight* em câmara úmida. Após esse período, as células eram lavadas novamente por 3 vezes com PBSA e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse FITC ou Cy5 (Sigma, 1:200). Os núcleos eram corados com iodeto de propídeo (Sigma, 10 µg/ml) e os filamentos de actina com faloidina conjugada a FITC (Sigma). As lamínulas eram montadas em lâminas histológicas com 10 µl de *anti-fading*-Vectashield (Burlingame, CA, EUA).

A captura das imagens de crisotila era feita em uma configuração que permitia a detecção da autofluorescência da crisotila (excitação com laser Argônio em 488 nm, filtro HFT 488). As preparações celulares eram observadas no microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510). Para a construção do gráfico de colocação foi utilizado a ferramenta Profile Display Mode do software LSM 510 versão 3,2 ao longo de um traçado sobre a imagem com os diferentes

canais do laser. Esse traçado, representado por uma seta, pode ser visualizado sobre o conjunto de imagens e esquematizado no gráfico da intensidade do laser pela distância.

3.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As células eram fixadas por 2 horas em uma solução de glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2%, após isso eram lavadas com uma solução de tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 e pós-fixadas em uma solução de tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão. As células eram desidratadas em lavagens de 15 minutos em uma série gradual de desidratação etílica, iniciando com o etanol 50%, 70%, 80%, 90% e 2 lavagens de etanol 100%. Após essas lavagens, o material permanecia imerso em óxido de propileno durante 10 minutos. A infiltração da resina era realizada com uma mistura de resina Epon® (Electron Microscopy Science, PA, USA) e óxido de propileno (1:1) durante 5 horas. A mistura era então substituída por resina Epon® pura, permanecendo as células nesta solução por mais 5 horas. A inclusão das células era feita em formas de silicone preenchidas com a mesma resina, sendo esta polimerizada após 48 horas em estufa a 65°C. Após o desbaste dos blocos de resina, eram feitos cortes em ultramicrótomo, sendo estes montados em lâmina de vidro, corados com azul de toluidina e visualizados ao microscópio de luz. A região de interesse no bloco era escolhida e cortes feitos na espessura de 70 a 90nm, sendo posteriormente colocados em telas de cobre (200 *mesh*). O material era contrastado em uma solução de acetato de uranila a 4% por 30 minutos, posteriormente lavados em água e colocados em uma solução de citrato de chumbo a 10%. O material foi analisado ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol® 100 CX II (100 KV) e Jeol® 1010 (80 kV), ambos da Queensland, Brisbane, Austrália.

3.7 Tamanho das fibras de crisotila

Foram realizadas medidas do comprimento de 200 fibras de crisotila a partir das imagens obtidas de microscopia eletrônica de transmissão com o auxílio do programa Axionvision Imaging System Rel 40 V 4.6.3.0. (Carl Zeiss, Alemanha).

3.8 Primers utilizados

Os *primers* foram desenhados com base nas sequências de referência depositadas no *GeneBank* utilizando o programa *Primer 3* disponibilizado online e estão descritos na tabela 1.

Tabela 1- Lista de *primers* utilizados neste trabalho

Gene	Sequencia do <i>primers</i>	GeneBank
SRA	FWD: ATT GCC CTT TAC CTC CTC GT REV: CCA TGT TGC TCA TGT GTT CC	CCDS 5997.1 (AC023396, D90188, DA995755)
MARCO	FWD: TCT GGG GAG CAA GGA GTA AA REV: GCC CTT CCT TTG GAG TAA CC	CCDS 2124.1 (AF035819, BC016004, CB529479)
SCARA5	FWD: GAT GGT CCA TGT CAC AAA CG REV: AAG TCC CGG AAG CTC TCA TT	CCDS 6064.1 (AA934589, AC104997, AK172746, BQ944057, DA991818, DA993754)
CD36	FWD: ACA GAT GCA GCC TCA TTT CC REV: TGG GTT TTC AAC TGG AGA GG	CCDS 34673.1 (AC124834, DA857400, DC338512, L06850, M98398)
Vimentina	FWD: GAG AAC TTT GCC GTT GAA GC REV: TCC AGC AGC TTC CTG TAG GT	CCDS 7120.1 (BC000163, BQ050765)
Actina	FWD: CAT GAG GTA GTC AGT CAG GT REV: ATG ACC CAG ATC ATG TTT GAG	CCDS5341.1 (AK130157, BC009636)
β -tubulina	FWD: CTC TGA AGC TGA CCA CAC CA REV: GCC AGG CAT AAA GAA ATG GA	CCDS 13475.1 (AJ292757, AL109840)

3.9 Extração de RNA, síntese do cDNA e qPCR

Para extração de RNA total das células foi utilizado o Charge Switch® Total RNA Cell Kit (Invitrogen) e a quantificação era feita utilizando o aparelho NanoDrop ND1000 Spectrophotometer. Para a síntese do cDNA a partir do RNA total, foram realizadas reações de RT-PCR com o Kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), sob as seguintes condições: 70 °C por 5 minutos, 25 °C por 5 minutos e 42 °C por 60 minutos. A amplificação do cDNA seguiu com os *primers* desenhados e, posteriormente, era confirmada em gel de agarose, tendo como base o marcador de peso molecular *1 kb plus ladder* (Invitrogen).

Para a análise do perfil de expressão eram realizadas reações de RT-PCR em tempo real com o kit AgPath-ID One-Step RT-PCR (Ambion) e Sybr-Green (Invitrogen) em um aparelho da Corbett Research modelo Rotor Gene 6000 Real-Time Cycler. As condições dos qRT-PCR foram 45 °C por 10 min; 95°C por 15 min, 40 ciclos [95 °C por 15 s; T_m °C por 20 s; 72 °C por 30 s], seguindo então o *melting*. Os pares de *primers* utilizados estão descritos na tabela 1 e as temperaturas de *melting* (T_m) foram de 55 °C para os receptores *scavenger* e de 52 °C para os elementos do citoesqueleto. Os produtos amplificados possuíam no máximo 250 pares de bases, como sugerido por Bustin (2002). A normalização foi feita por massa de RNA total (BUSTIN, 2000, 2002).

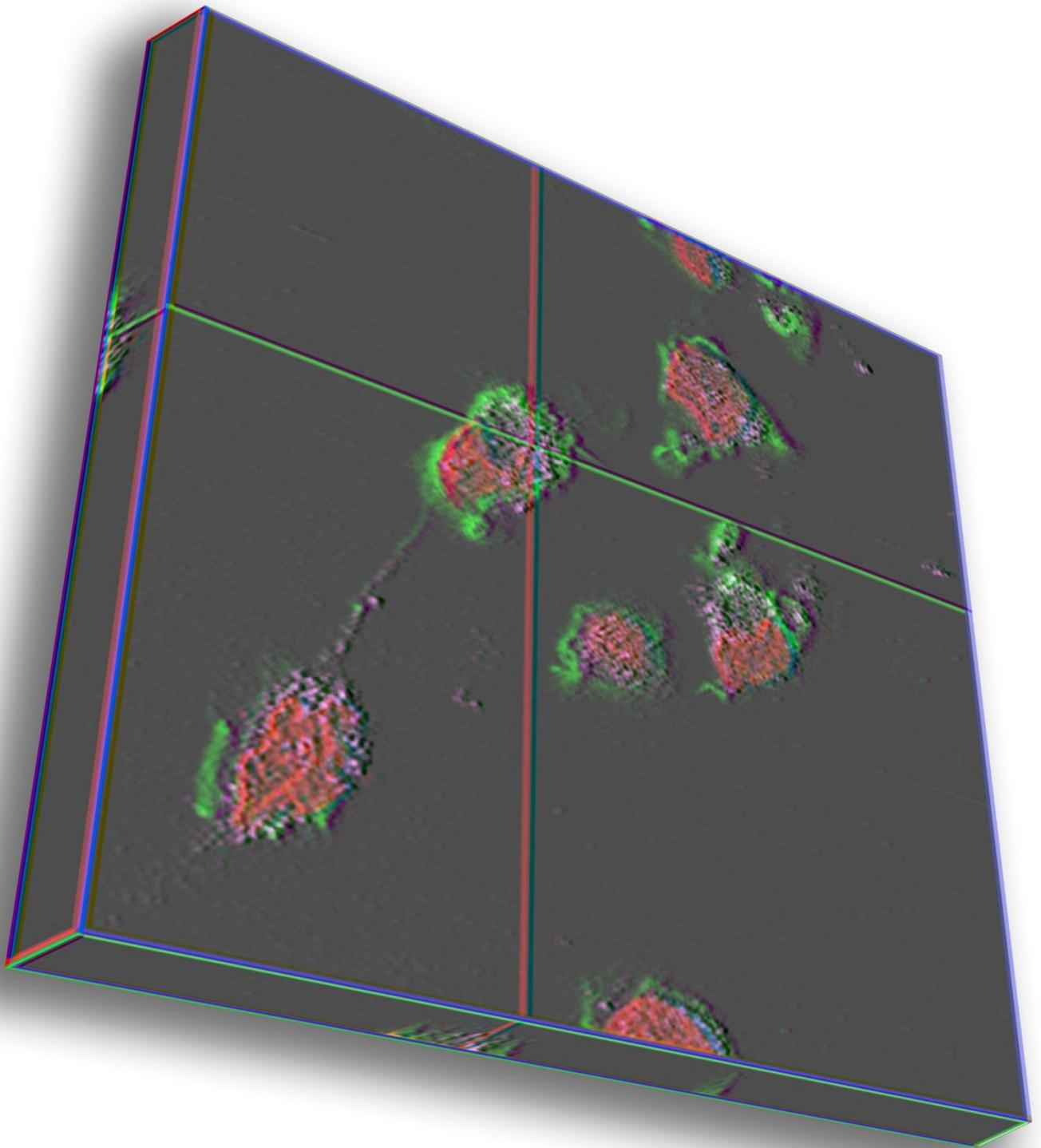
3.10 Análise da expressão de proteínas

As células eram lisadas em tampão RIPA (NaCl 150mM, Nonidet P40 1%, ácido deoxicolato de sódio 0,5% em Tris 50 mM-HCl em pH 7,5) contendo inibidores de proteases (1 mg/ml pepstatina A, 100mM PMSF e 1 mg/ml E-64) e retiradas das placas de petri com auxílio de um *scraper* para serem transferidas para tubos de 1,5 mL. Os lisados celulares eram sonicados e, em seguida, centrifugados a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C. As proteínas eram quantificadas através do método de BCA (Pierce Inc Rockford, 23225) e ressuspendidas em tampão de amostra contendo 3% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 150 mM Tris pH 6.8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol. Eram aplicados 30µg de proteína por poço em gel de SDS-PAGE 10% (preparado com 1,5 M Tris-HCl, 10% SDS, 30%

bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas eram transferidas para membranas de PVDF (Amersham,GE) e, em seguida, os sítios de ligações específicas eram bloqueados com 5% de leite desnatado em solução salina Tris Buffer acrescido de Tween20 0,1% (TTBS). Após o bloqueio, as membranas eram incubadas com anticorpos primários contra SR-A e SCARA5 (Abcam, EUA) por 12 horas a 4 °C e eram detectados por anticorpos secundários conjugados com peroxidase. O resultado foi registrado em filmes radiográficos após a revelação utilizando o protocolo de quimioluminescência (ECL kit, Amersham, GE). Foram utilizados os anticorpos contra β -actina para controle da concentração de proteínas carregadas no gel de poliacrilamida.

3.11 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram realizados em triplicatas de três experimentos independentes e expressos em níveis de significância. Para verificar se os grupos experimentais eram significativamente diferentes um do outro, foi usado o teste t-de Student e os valores de p considerados para corroborar as hipóteses de diferença significativa foram os menores ou iguais a 0,05.

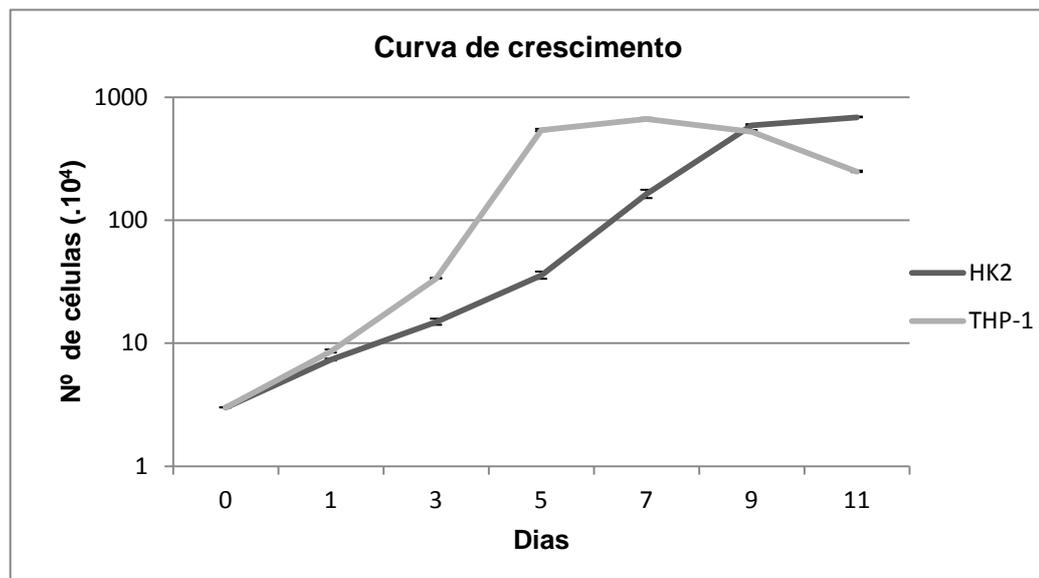


4_RESULTADOS

4.1 Curva de crescimento das células HK2 e THP-1

Inicialmente, as linhagens celulares HK2 e THP-1 foram caracterizadas por meio da construção da curva de crescimento celular, a fim de determinar a fase de crescimento exponencial, padronizar o início da diferenciação celular e da exposição à crisotila. As células de ambas as linhagens foram mantidas em cultura por um período de 11 dias e contadas de dois em dois dias, a partir do inóculo inicial de $3 \cdot 10^4$ células no dia zero. Foram realizadas triplicatas em cada um dos pontos (dias) coletados e foi calculado a média e desvio padrão para cada uma das linhagens. Com base nesses dados, foi possível construir as curvas de crescimento celular da linhagem HK2 e THP-1 (Figura 6). As curvas indicam que no terceiro dia ocorre a fase exponencial, período ideal para o tratamento.

Figura 6 – Curva de crescimento celular da linhagem HK2 e THP-1.

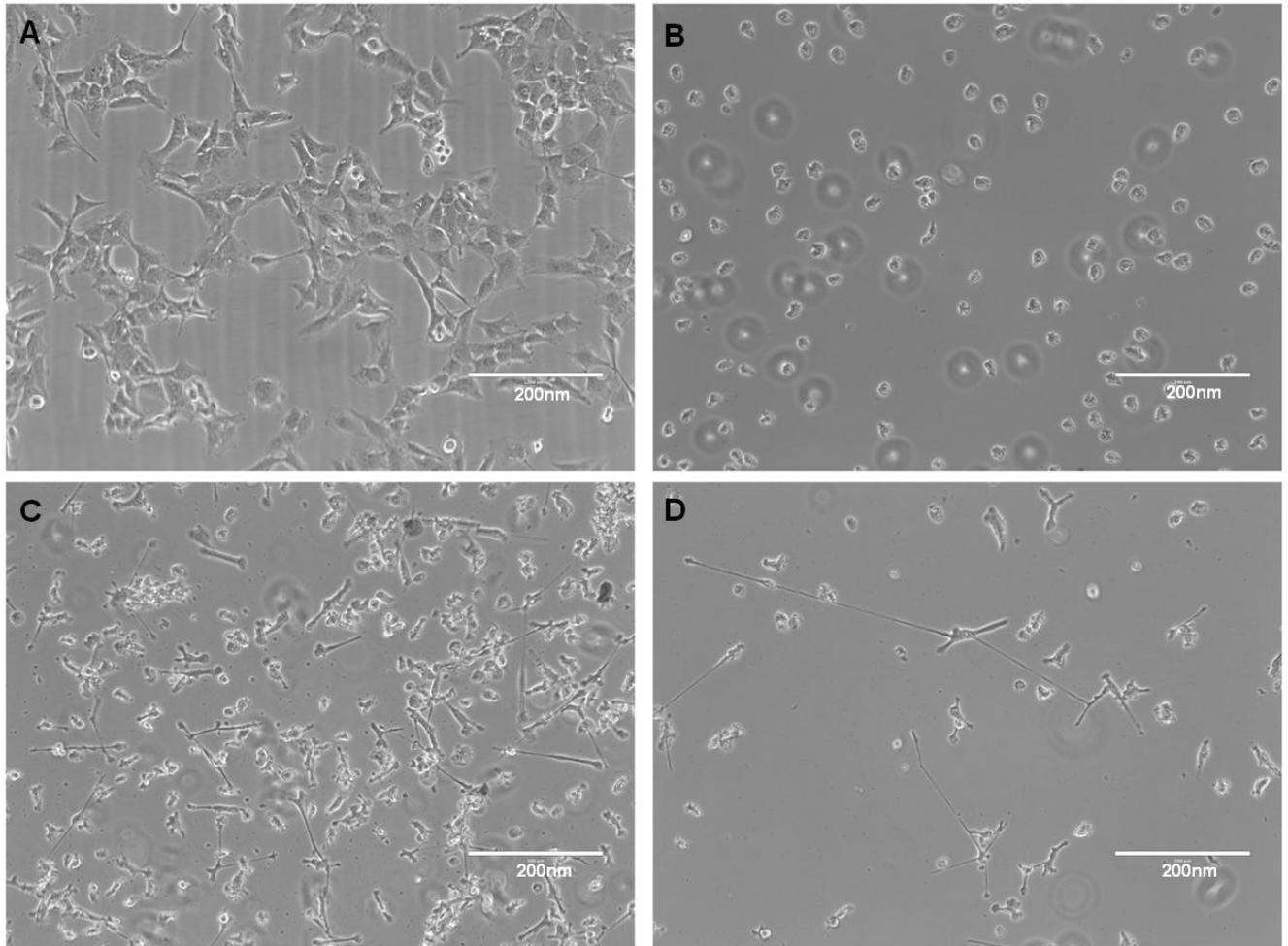


4.2 Morfologia das células em cultura e diferenciação celular

Analisando a morfologia das células ao microscópio de luz com contraste de fase foi observado que as células da linhagem HK2 crescem aderidas formando monocamada típica (Figura 7A). Já as células da linhagem THP-1 são arredondadas e crescem em suspensão. No momento em que essas células são induzidas à diferenciação em macrófagos elas aderem ao substrato e modificam a sua

morfologia de células arredondadas para células com prolongamentos citoplasmáticos (Figura 7, B a D).

Figura 7 – Aspectos morfológicos das linhagens HK2 e THP-1 ao microscópio de luz com contraste de fase



(A) Células HK2. (B) Células THP-1 com morfologia de monócitos (em suspensão, não diferenciadas). (C) Células THP-1 com morfologia de macrófagos (diferenciadas e aderidas). (D) Detalhe dos prolongamentos citoplasmáticos das células THP-1 diferenciadas.

4.3 Marcadores específicos de macrófagos

A expressão do receptor CD11b é aumentada durante a diferenciação celular de monócitos em macrófagos. O receptor CD11b forma um heterodímero com o receptor CD18 na superfície de granulócitos, monócitos e macrófagos e está relacionado com a adesão e fagocitose de partículas (CHEN e ROSS, 2004, CABEC et al., 2002). Para avaliar a diferenciação das células THP-1 após o tratamento com 1 μ M de ácido retinóico (All Trans Retinoic Acid - ATRA) por 48 horas a porcentagem de células positivas para CD11b foi determinada por citometria de fluxo, sendo as células não diferenciadas consideradas controle. O tratamento com ácido retinóico aumentou significativamente a expressão dos receptores, a porcentagem de células positivas para CD11b aumentou de 45% em células controle para 90% em células após o tratamento, indicando que a diferenciação dessas células ocorreu eficientemente.

4.4 Interação célula-crisotila visualizada em microscopia confocal de varredura a laser

As células das duas linhagens estudadas foram submetidas à imunofluorescência para a visualização da morfologia celular, cromatina, microtúbulos e microfilamentos em presença ou ausência de fibras. As fibras de crisotila também puderam ser observadas ao microscópio confocal de varredura a laser por apresentarem autofluorescência. Foram feitos grupos de células controle e expostas a 80 μ g/mL de fibras de crisotila sonicadas por diferentes períodos de tempo (1, 2, 4, 8, 12 e 36 horas).

A partir da análise das imagens foi possível visualizar que a cultura de células HK2 controle é formada por células grandes, espaiadas e mononucleadas (Figura 8, A e B). A exposição das células a crisotila levou ao aumento da frequência de células binucleadas, como é possível verificar no detalhe das setas nas imagens da figura 8 C e D.

Pode-se observar a presença de fibras de crisotila no interior das células nos diferentes tempos de tratamento. Por esse método não foi possível determinar que a internalização das fibras ocorre em intervalos de tempo menores como 8, 12 e 24

horas, uma vez que os cortes ortogonais desses tempos não permitiram a visualização das fibras no interior dessas células (Figura 8, C a H). Isto não significa necessariamente que as fibras não foram internalizadas, mas que as observações ao microscópio confocal de varredura a laser, nos tempos estudados, não permitiram a visualização de fibras internalizadas.

Quando observamos a internalização das fibras após tempos maiores de exposição, como 36 horas (Figura 9), foi possível visualizar pequenos fragmentos de fibras de crisotila no interior das células, evidenciado pelas projeções ortogonais (Figura 9, A' e B'). Dessa forma, com as imagens analisadas e as projeções ortogonais, é possível afirmar que há um indício de internalização das fibras de crisotila nas células HK2 pelo menos após 24 horas de exposição.

(A e B) Cultura controle, formada por células grandes e mononucleadas. (C e D) Células expostas à crisotila por: 8 horas. (E e F) 12 horas e (G e H) por 24 horas. (C, D e F) Células binucleadas nas setas completas e (F) célula apoptótica na ponta de seta.

Figura 8 – Células HK2 controle e expostas à crisotila. Imunofluorescência de células HK2 observadas ao microscópio confocal de varredura a laser para visualização da actina (verde), cromatina (vermelho) e da crisotila (rosa).

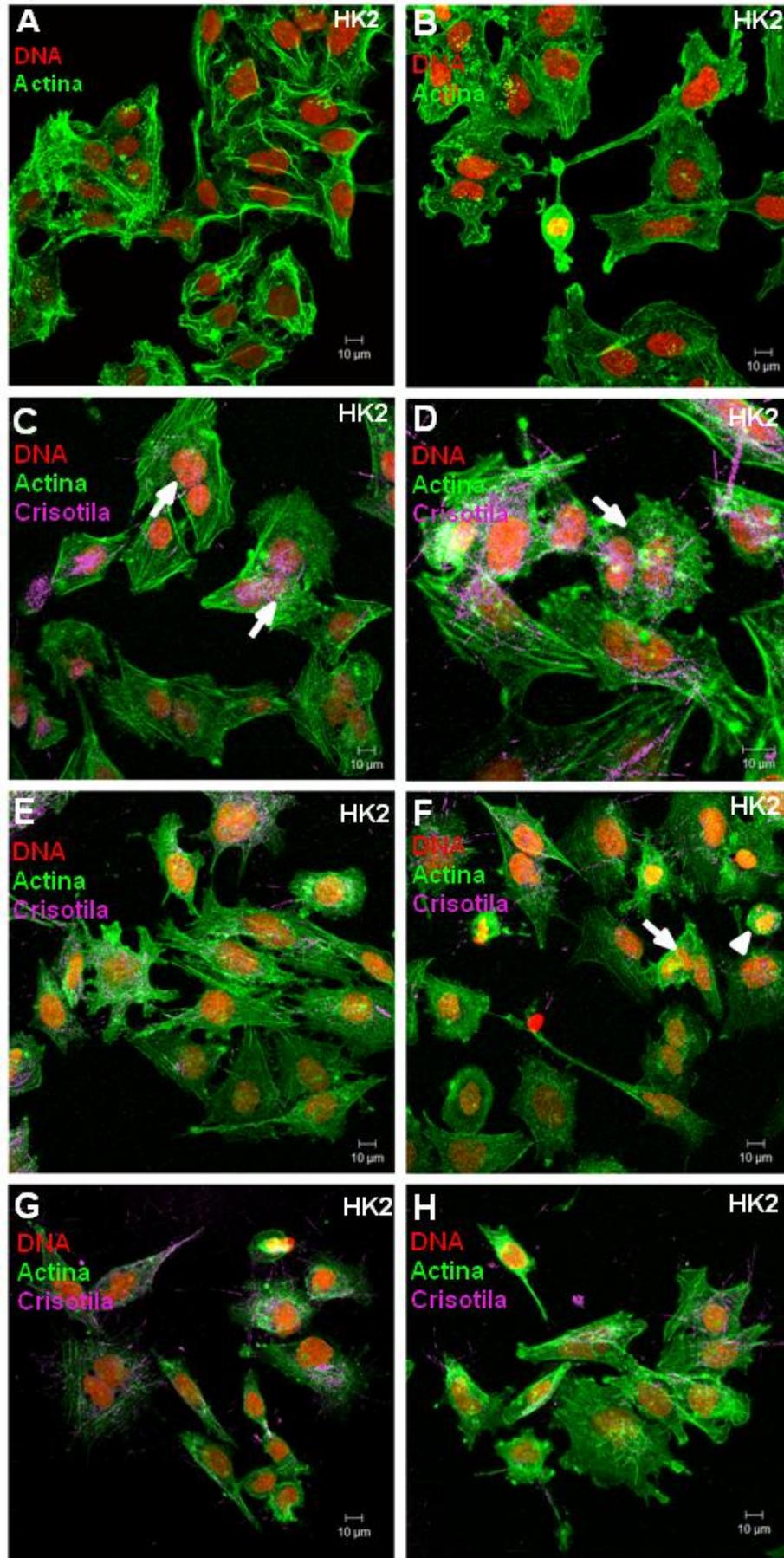
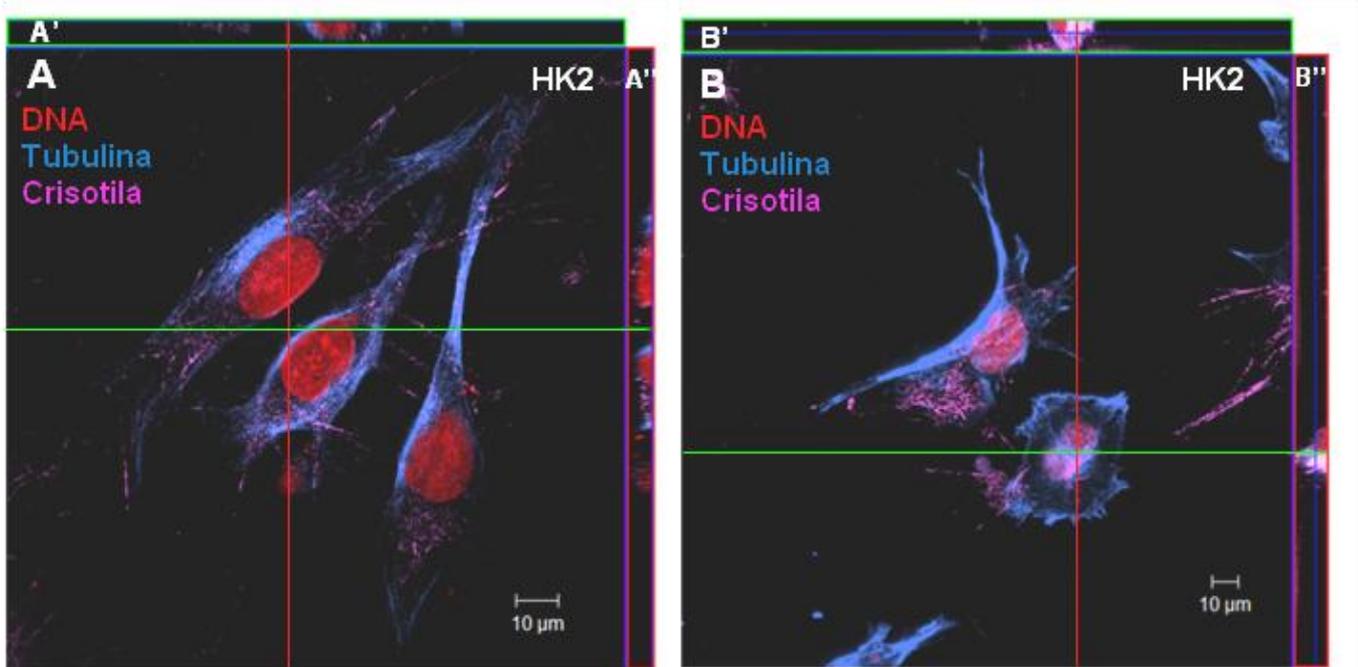


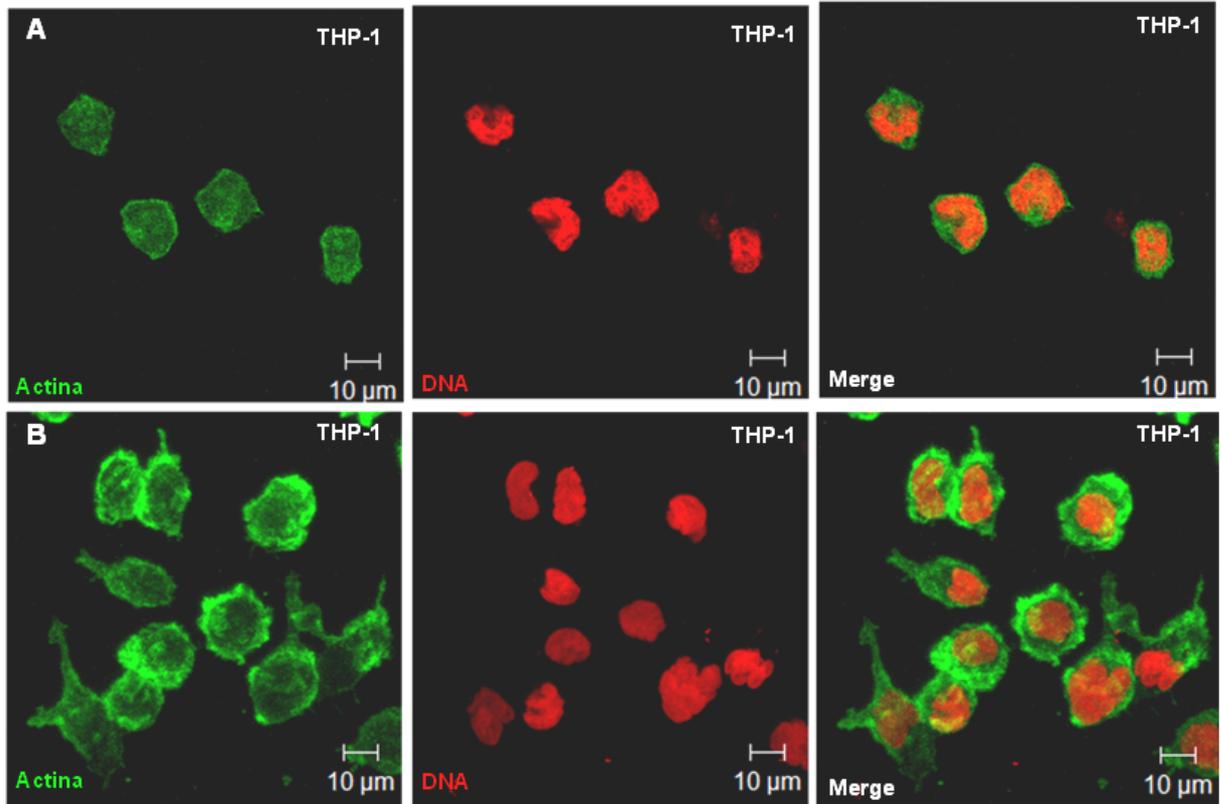
Figura 9 – Células HK2 expostas à crisotila por 36 horas. Imunofluorescência de células HK2 observadas ao microscópio confocal de varredura a laser para visualização da tubulina (azul), cromatina (vermelho) e da crisotila (rosa).



(A e B) Projeção ortogonal, evidenciando crisotila no interior das células.

A análise das células THP-1 ao microscópio confocal de varredura a laser confirmou as características observadas em microscopia de luz, na qual as células não diferenciadas (monócitos) apresentam-se arredondadas com um núcleo indentado (Figura 10A). Já as células diferenciadas (macrófagos), possuem um contorno irregular, com protrusões e reentrâncias, típicas de células fagocíticas (Figura 10B). Também é possível observar que a exposição das células THP-1 a crisotila não alterou a morfologia das mesmas (Figura 11 e 12).

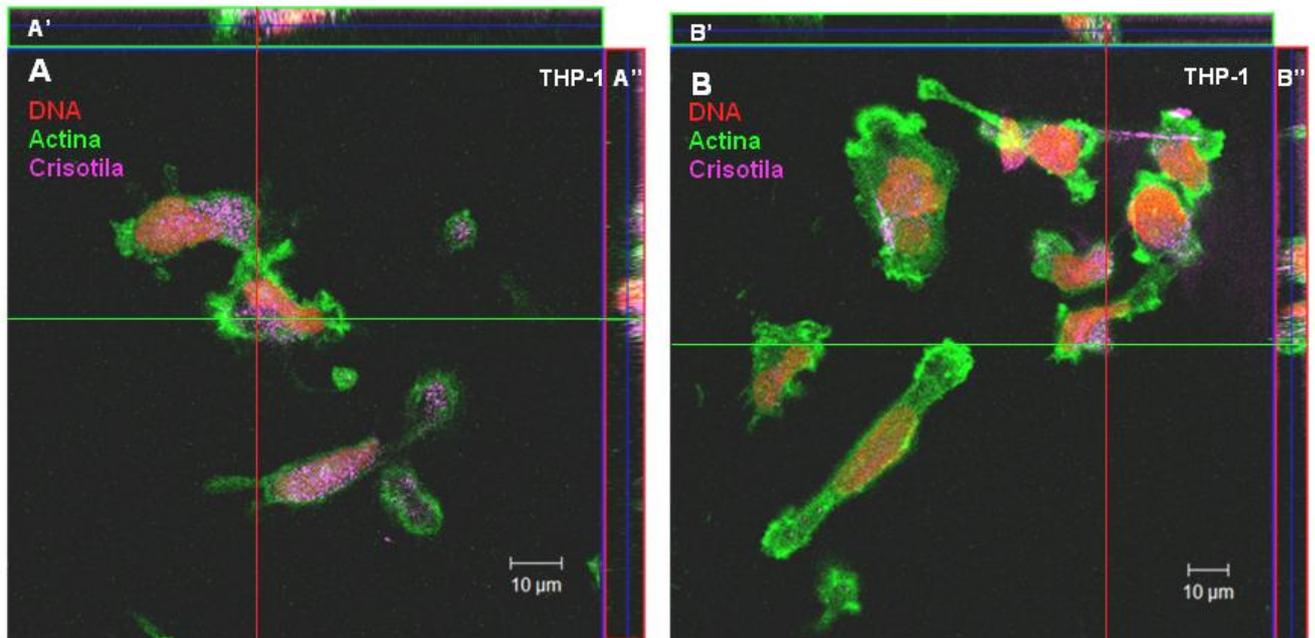
Figura 10 – Células THP-1 não diferenciadas e diferenciadas (controle). Imunofluorescência de células THP-1 observadas ao microscópio confocal de varredura a laser para visualização da actina (verde) e da cromatina (vermelho).



(A) Células THP-1 não diferenciadas e (B) células diferenciadas, formada por células irregulares, com protusões e núcleos na forma de rim.

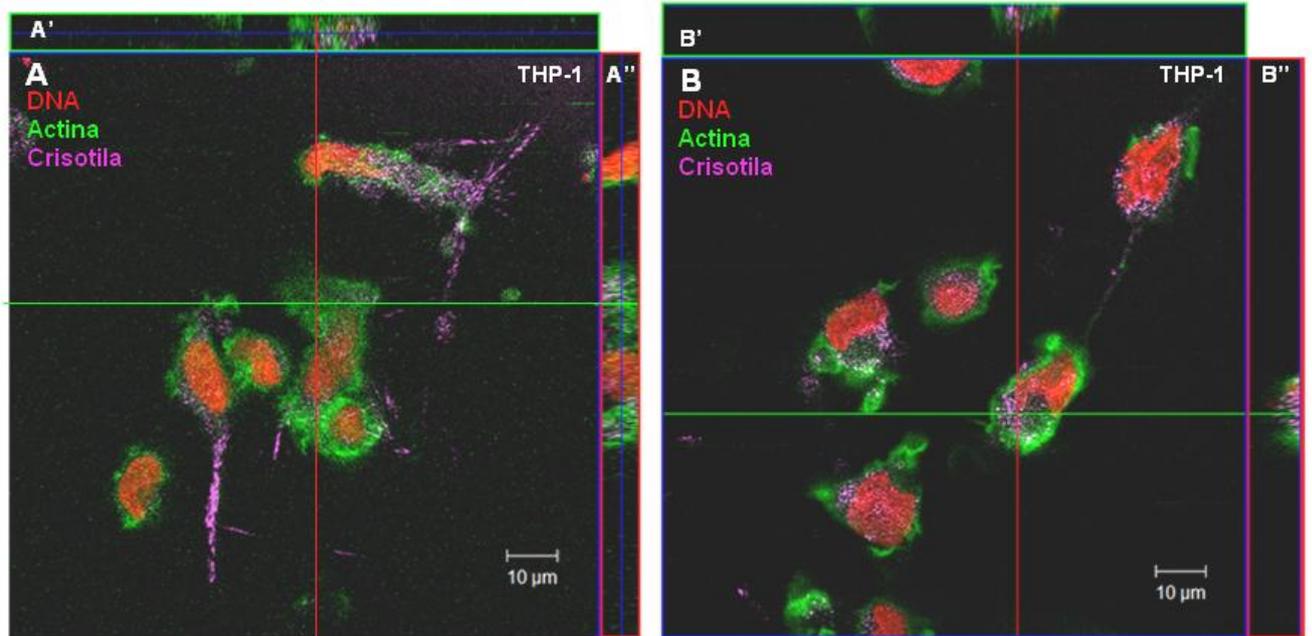
As células THP-1, quando expostas às fibras de crisotila, mostraram-se eficientes no processo de internalização nos diferentes períodos de tempo analisados. É relevante perceber que tanto em intervalos de tempo menores de exposição, 2 horas e 4 horas (Figura 11) como em intervalos maiores, 8 e 12 horas (Figura 12), há pequenos fragmentos de fibras de crisotila no interior das células, evidenciados pelas projeções ortogonais (Figura 11 A' e B'; Figura 12 A' e B'). As imagens analisadas e as projeções ortogonais demonstram um indício de que a internalização das fibras de crisotila por essas células ocorre em menos de 24 horas de exposição.

Figura 11 – Células THP-1 expostas à crisotila. Imunofluorescência de células THP-1 observadas ao microscópio confocal de varredura a laser para visualização da actina (verde), da cromatina (vermelho) e da crisotila (rosa).



(A e B) Projeção ortogonal, evidenciando crisotila no interior das células tratadas expostas à crisotila por (A) 2 horas e (B) e 4 horas.

Figura 12 – Células THP-1 expostas à crisotila. Imunofluorescência de células THP-1 observadas ao microscópio confocal de varredura a laser para visualização da actina (verde), da cromatina (vermelho) e da crisotila (rosa).



(A e B) Projeção ortogonal, evidenciando crisotila no interior das células expostas à crisotila por (A) 8 horas e (B) 12 horas.

4.5 Microscopia eletrônica de transmissão: interação e internalização das fibras com células em cultura

A análise ao microscópio confocal de varredura a laser da presença de pequenas fibras de crisotila no interior das células da HK2 e THP-1 demonstrou que ambas as linhagens são capazes de internalizar as fibras durante o tempo observado, de 1 a 36 horas. Os processos de internalização dessas fibras de crisotila seriam melhores observados utilizando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Com base nos dados obtidos pela microscopia confocal a laser, foram definidos três períodos de tempo de exposição às fibras para serem utilizados na microscopia eletrônica de transmissão: 4 horas, 12 horas e 36 horas.

As fibras de crisotila são facilmente visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão por apresentarem-se alongadas, na forma de cilindros de tamanhos diferentes e possuem eletron densidade. O comprimento médio das fibras de crisotila observadas nas imagens analisadas é de 77,47nm devido principalmente ao processo de sonicação. Em pouco tempo de exposição já foi possível visualizar fibras de crisotila no interior das células de ambas as linhagens, demonstrando que o processo de internalização das fibras é relativamente rápido e possivelmente ocorre antes de 4 horas.

Nas células da linhagem HK2, na situação controle, foi possível observar núcleo e nucléolo evidentes, retículo endoplasmático rugoso e muitas mitocôndrias (Figura 13, A e B). A exposição das células à crisotila possibilitou a observação de fibras dentro da célula, fora dela e bem próximas à membrana plasmática (Figura 14).

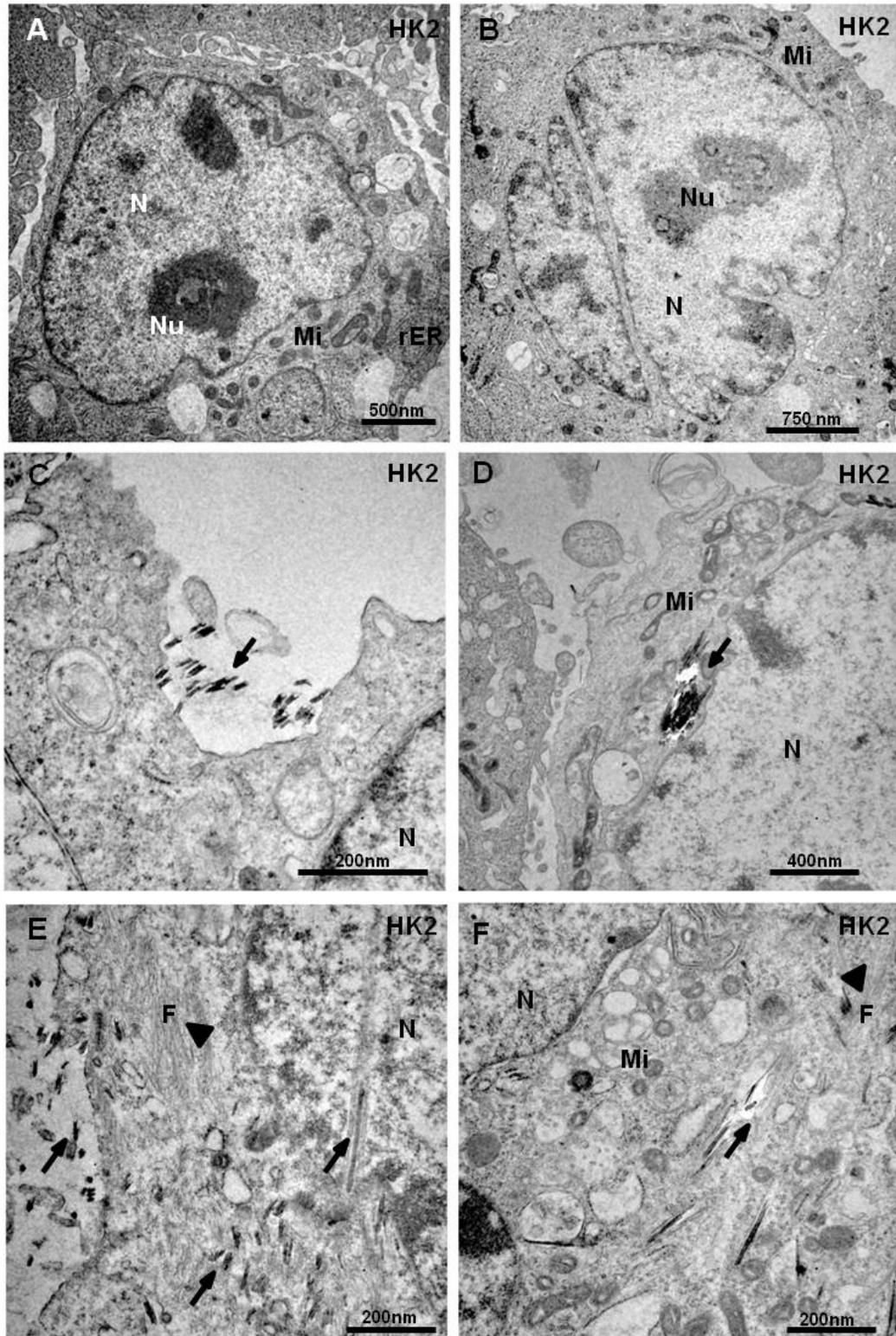
Algumas fibras estavam presentes tanto no citoplasma como no núcleo, sugerindo uma possível interação entre as fibras de crisotila e a cromatina (Figura 13, E). É possível constatar também diferentes tamanhos de fibras de crisotila, devido ao processo de sonicação que as fragmenta em tamanhos diversos (Figuras 13 e 14).

Em todos os períodos de tempo estudados foi possível observar fibras de crisotila envoltas por membrana plasmática, provavelmente decorrente de fagocitose, e fibras livres no citoplasma (Figura 13, E e F; Figura 14, A e B). Isso sugere que a entrada das fibras nas células possa ter ocorrido de diferentes formas,

não apenas por meio da endocitose, resultando em fibras não envoltas por membranas no citoplasma.

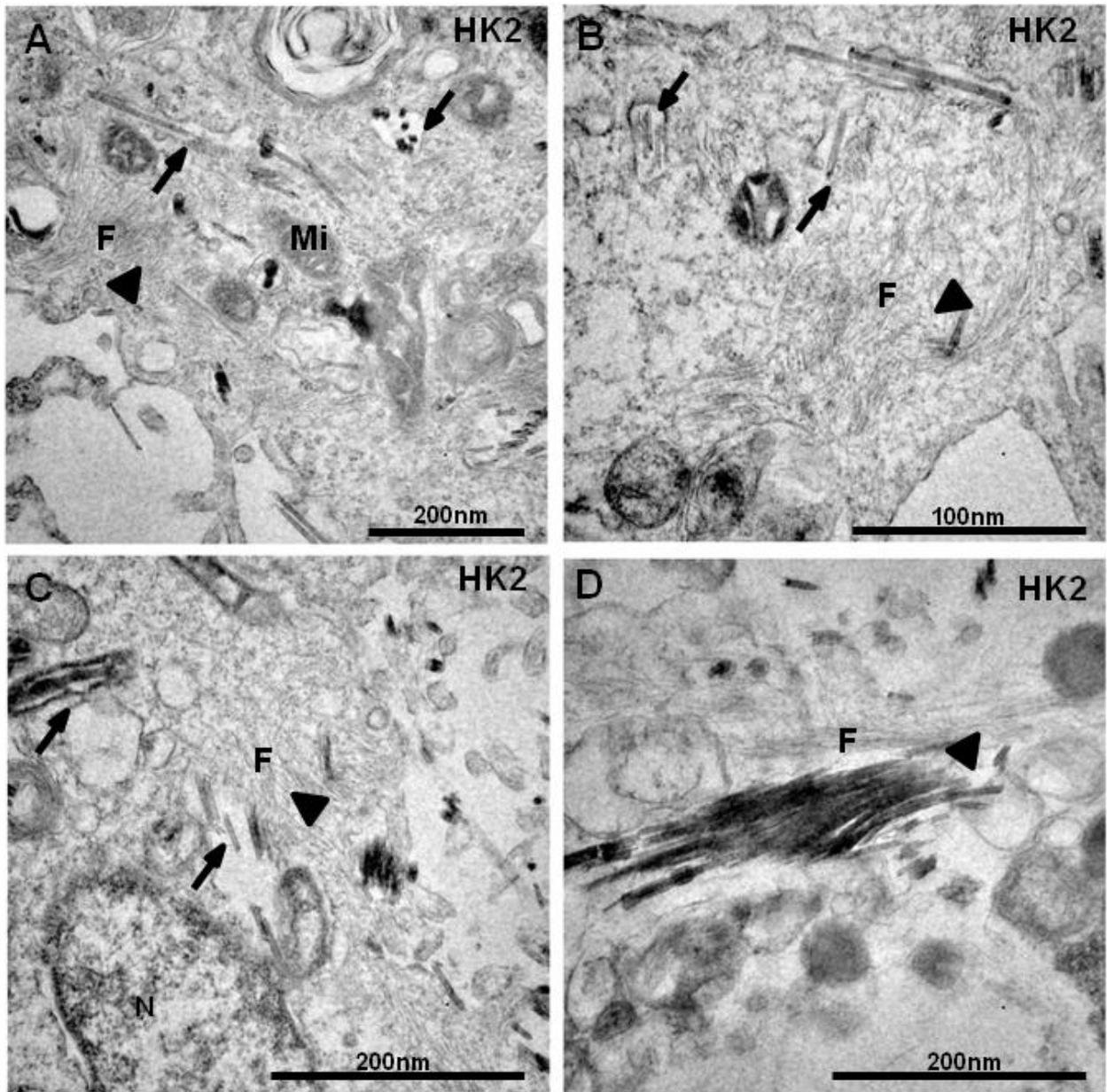
É interessante observar a presença de elementos do citoesqueleto próximos à região onde as fibras de crisotila estavam localizadas, independentemente do tempo de exposição à crisotila (Figura 13 e 14, C e D – pontas de seta), o que sugere uma possível interação entre essas fibras de crisotila e os elementos do citoesqueleto.

Figura 13 – Ultraestrutura de células HK2 controle e expostas à crisotila.



(A e B) Células HK2 controle, (C e D) Células expostas à crisotila por 4 horas, fibras de crisotila evidenciadas pelas setas finas, (E e F) Células expostas à crisotila por 12 horas, fibra de crisotila no núcleo (seta) e filamentos intermediários (ponta de seta). N, núcleo; Nu, nucléolo; Mi, mitocôndria, F, filamentos intermediários, rER, retículo endoplasmático rugoso.

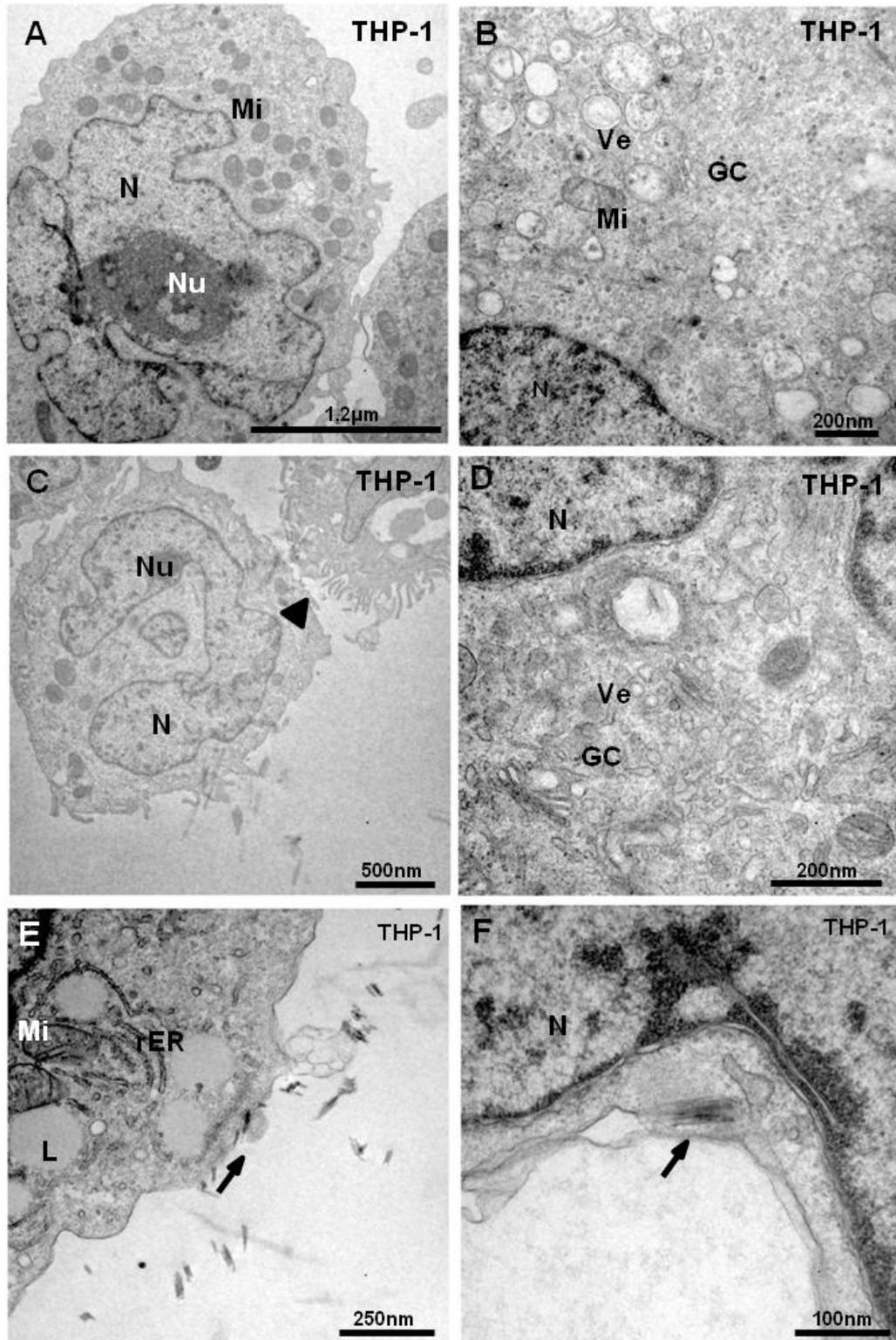
Figura 14 – Ultraestrutura de células HK2 expostas à crisotila por 36 horas.



(A e B) Fibras de crisotila evidenciadas pelas setas e filamentos intermediários pelas pontas de setas. (C e D) Detalhe dos filamentos intermediários próximos às fibras de crisotila (C e D). Mi, mitocôndria; F, filamentos intermediários; N, núcleo.

As células da linhagem THP-1 não diferenciadas (monócitos), mostraram núcleos indentados com aparelho de Golgi bem desenvolvido, assim como retículo endoplasmático liso, rugoso e lisossomos no citoplasma (Figura 15 A e B). O contorno das células diferenciadas (macrófagos) há inúmeros processos em forma de dedos (*Fingerlike*) que participam da fagocitose e movimentação celular (Figura 15C). Tanto nos monócitos como nas células diferenciadas, é possível observar a presença de aparelho de Golgi, retículo endoplasmático liso e rugoso bem desenvolvidos (Figura 15, C e D).

Figura 15 – Ultraestrutura de células THP-1.



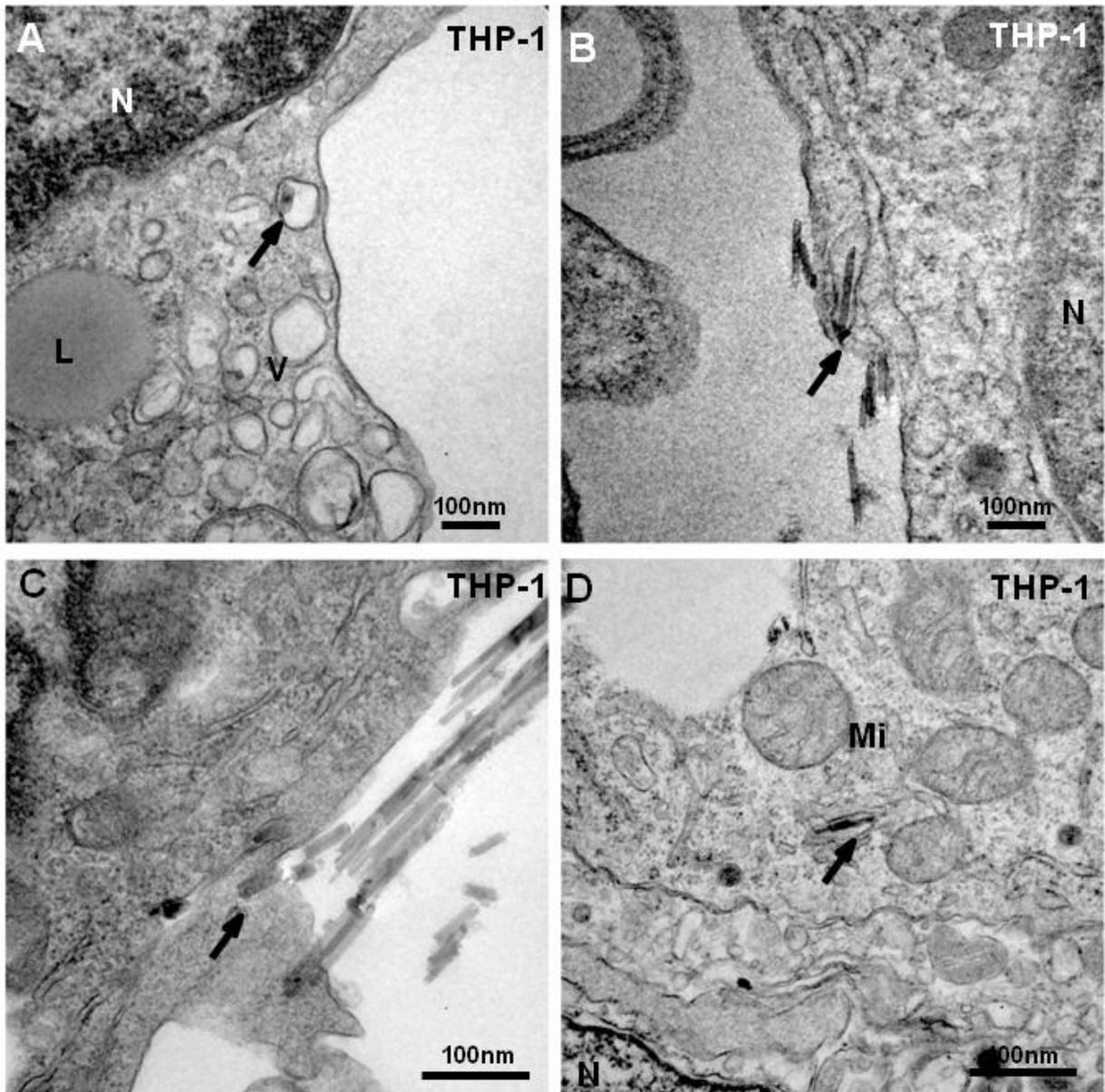
(A e B) Células não diferenciadas. (C e D) Células diferenciadas, detalhe das projeções citoplasmáticas na ponta da seta (*Fingerlike*). (E e F) Células expostas à crisotila por 4 horas, detalhe das fibras de crisotila nas setas finas. N, núcleo; Nu, nucléolo; Mi, mitocôndria, L, lipídeos; rER, retículo endoplasmático rugoso; Ve vesículas; GC, complexo de Golgi.

Nas células THP-1 expostas à crisotila também foram observadas fibras que não estavam envoltas pela membrana plasmática e fibras que estavam envoltas por essa membrana (Figura 15, E e F; Figura 16, A e D). Em algumas células é possível visualizar imagens compatíveis com fases iniciais do processo de englobamento ou da interação inicial de fibras que estavam sendo internalizadas (Figuras 15 E e 16, B e C).

Analisando as preparações de células THP-1 antes e depois da exposição às fibras de crisotila, é possível perceber uma maior presença de Complexo de Golgi (Figura 17). Essas vesículas possivelmente devem conter enzimas hidrolíticas que tem como função degradar os materiais estranhos advindos do meio exterior.

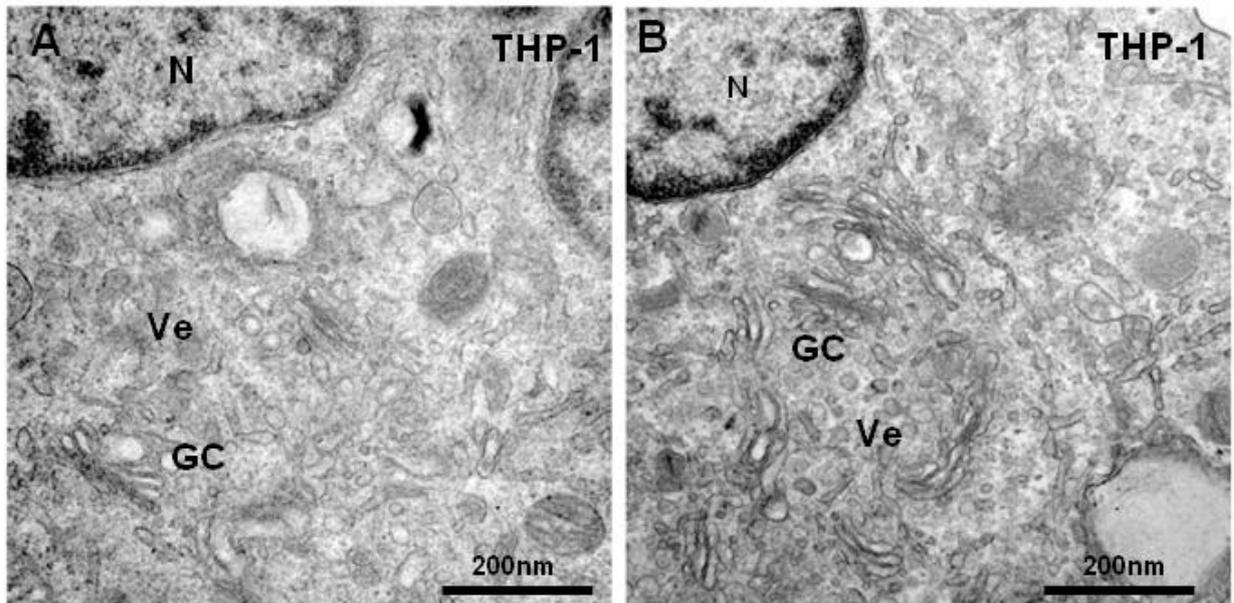
Analisando as preparações obtidas de células THP-1 expostas a crisotila, é interessante perceber que diferentemente da linhagem de células HK2, a linhagem THP-1 não apresentou os filamentos intermediários próximos a regiões que continham fibras de crisotila, indicando que talvez esse processo não seja comum a todas as células.

Figura 16 – Ultraestrutura de Células THP-1 expostas à crisotila.



(A e B) Células expostas à crisotila por 12 horas. (C e D) Células expostas à crisotila por 36 horas. Fibras de crisotila evidenciadas pelas setas. N, núcleo; Mi, mitocôndria, L, lipídeo; V, vacúolo.

Figura 17 – Ultraestrutura de Células THP-1 controle e expostas à crisotila.



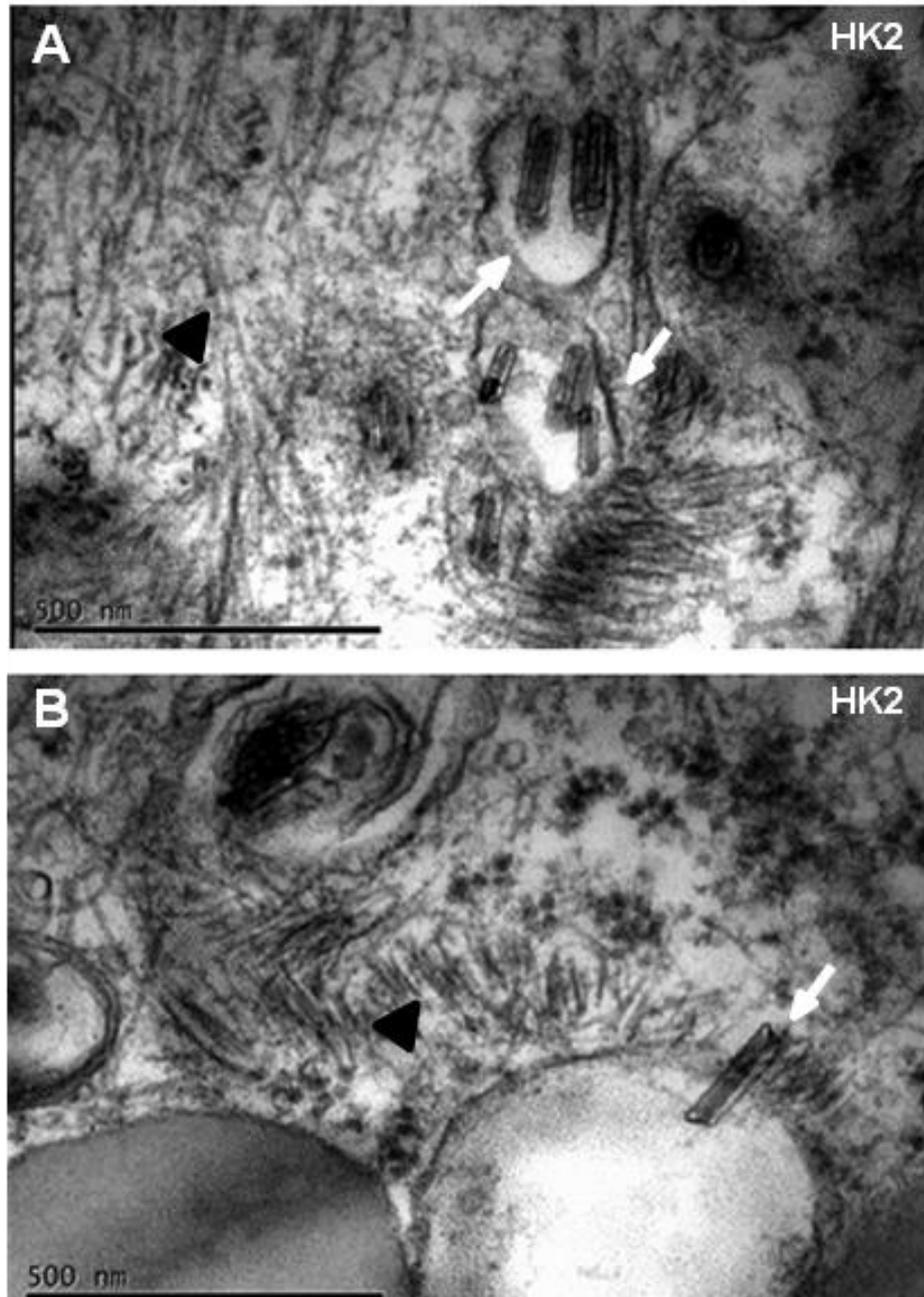
(A) Complexo de Golgi e vesículas presentes nas células THP-1 controle. (B) Presença maior de Complexo de Golgi e de vesículas em células THP-1 expostas à crisotila por 4 horas. N, núcleo; GC, complexo de Golgi; Ve, vesícula.

4.6 Interação entre as fibras e elementos do citoesqueleto

4.6.1 Morfologia celular utilizando microscopia

Para confirmar os possíveis filamentos intermediários nas imagens de microscopia eletrônica, utilizamos imagens com maior aumento e com mais destaque para esses elementos, que podem ser observados na figura 18. Nessas imagens, é possível visualizar fibras de crisotila envoltas pela membrana plasmática (Figura 18A) e inclusive uma fibra que parece perfurar a vesícula (Figura 18B). Também foi possível medir esses elementos do citoesqueleto e constatar que de fato são os filamentos intermediários que parecem estar próximos das fibras de crisotila internalizadas na linhagem HK2, já que possuem um diâmetro médio de 11,5nm, diâmetro este que é encontrado em média nos filamentos intermediários.

Figura 18 – Ultraestrutura de células HK2 expostas à crisotila por 12 horas, detalhe para os filamentos intermediários.



(A e B) Filamentos intermediários (ponta de seta) próximos às fibras de crisotila (setas) dentro de vesículas.

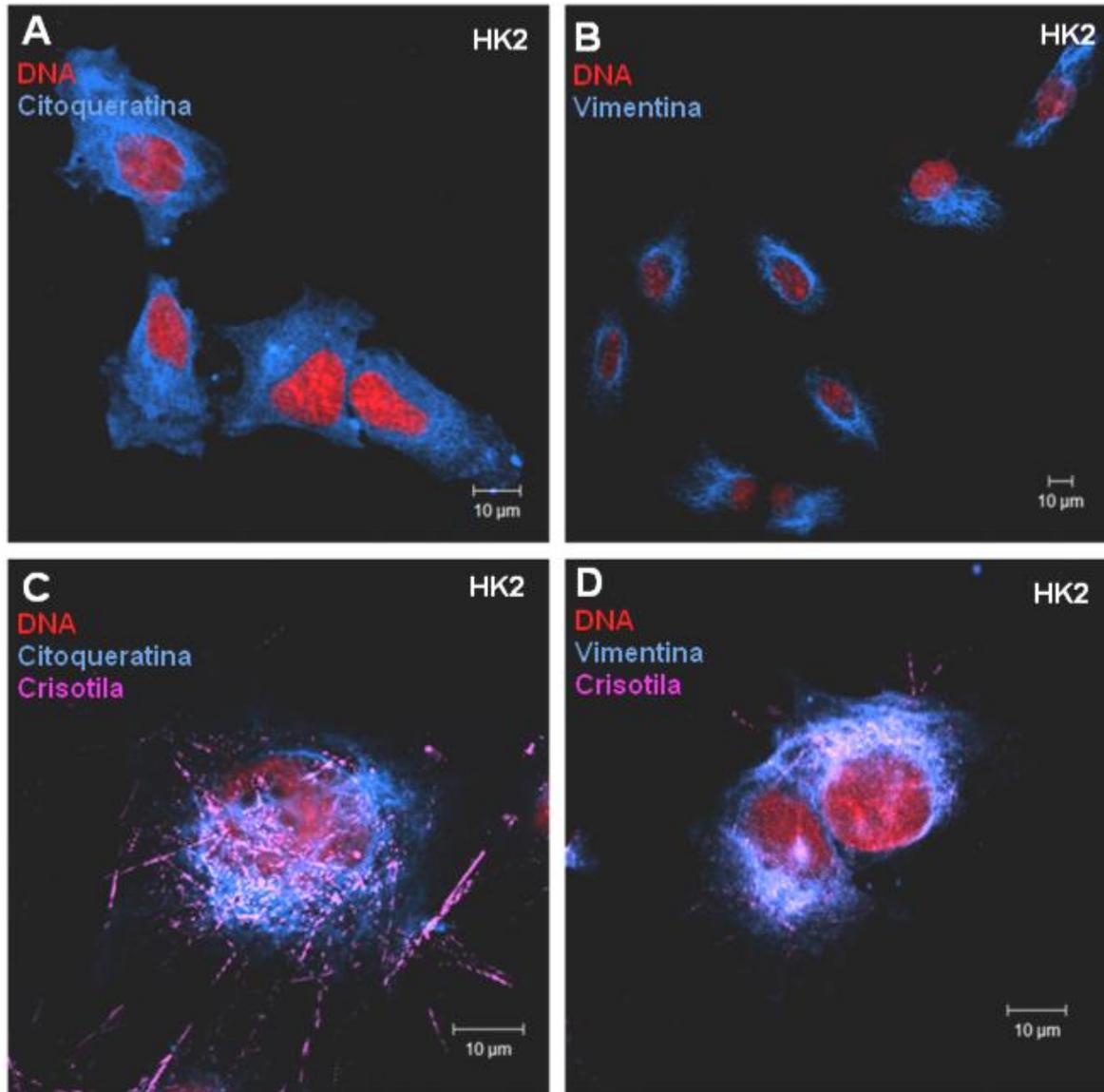
Para complementar as observações obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, também foi estudada por microscopia confocal de varredura a laser a associação entre as fibras de crisotila e os elementos do citoesqueleto, como os filamentos intermediários citoqueratina e vimentina. As células HK2 foram expostas à crisotila por um período de 12 horas e submetidas à imunofluorescência para visualização da crisotila e dos filamentos intermediários.

A análise das imagens confirmou as observações da microscopia eletrônica de transmissão, nas quais os elementos do citoesqueleto que pareciam associados às fibras são os filamentos intermediários pesquisados, neste caso tanto a citoqueratina como a vimentina (Figura 19). As imagens mostram as fibras de crisotila e os filamentos intermediários muito próximos uns dos outros, sendo às vezes aparecem colocalizados (Figura 19, C e D).

Essa interação entre as fibras de crisotila e os filamentos intermediários foi investigada por meio da construção de perfis que evidenciam a fluorescência dos elementos estudados. Foram analisadas 20 imagens no total, sendo 10 imagens de citoqueratina e 10 de vimentina. O perfil é ilustrado pela figura 20 A e B, na qual a seta traçada sobre a imagem com a marcação para citoqueratina, vimentina e crisotila, indica os possíveis locais de colocalização analisados nos respectivos gráficos ao lado.

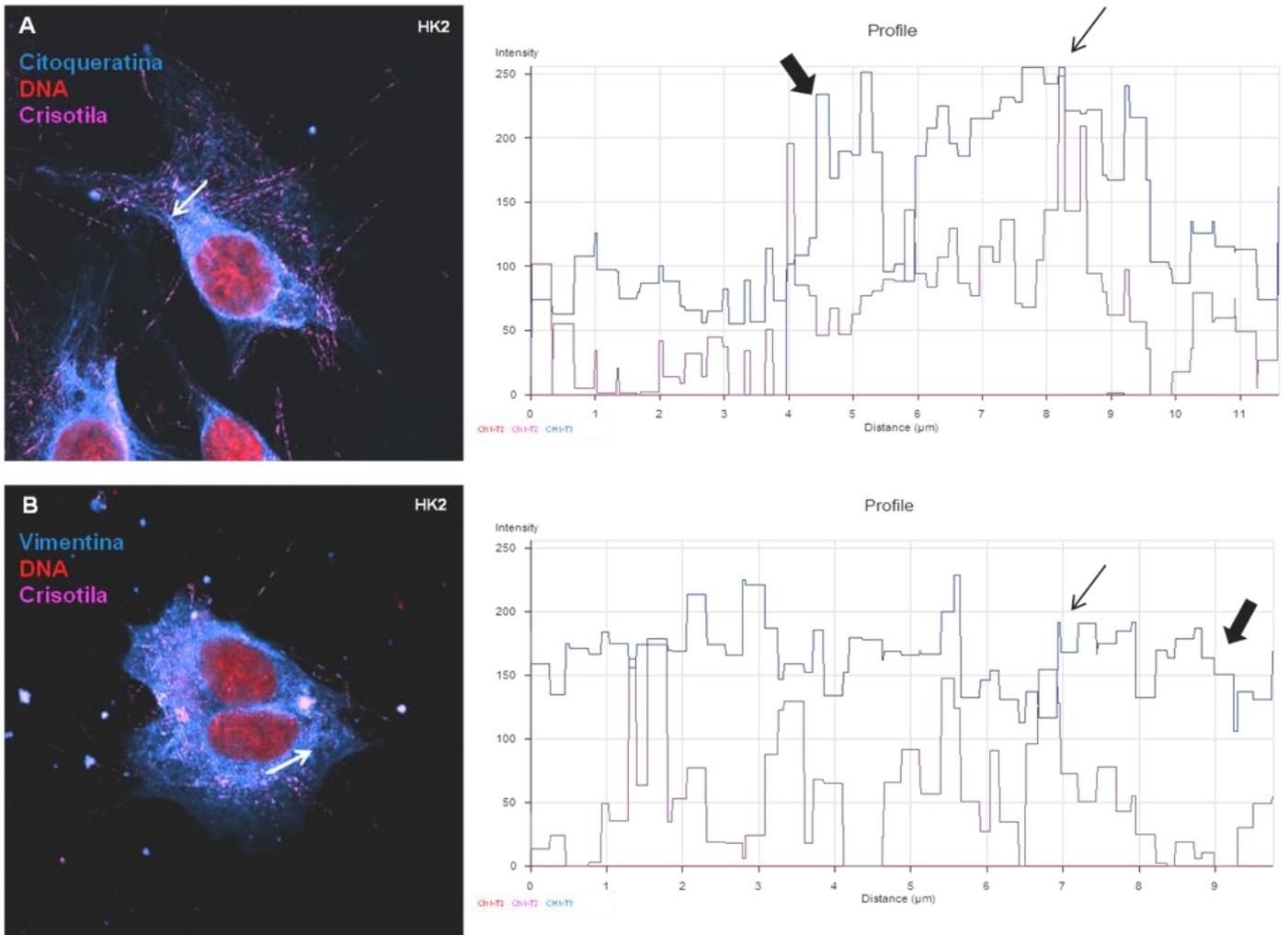
O gráfico indica que há uma relação entre as fibras de crisotila e os filamentos intermediários, sendo que em alguns pontos é possível observar a colocalização dos elementos e das fibras de crisotila (setas finas), porém nem todas as fibras estão colocalizadas com os filamentos intermediários ao longo do traçado desenhado (setas grossas). Isso sugere uma interação entre as fibras de crisotila e elementos do citoesqueleto dentro da célula, mas não uma interação constante, pois há momentos em que as fibras e os elementos não estão colocalizados.

Figura 19 – Células HK2 controle e expostas à crisotila. Imunofluorescência de células HK2 observadas ao microscópio confocal de varredura a laser para visualização da citoqueratina e vimentina controle, ambos em azul, cromatina (vermelho) e crisotila (rosa).



(A) células citoqueratina controle, (B) células vimentina controle, (C) citoqueratina exposta à crisotila por 12 horas e (D) vimentina expostas à crisotila por 12h.

Figura 20 – Perfis de fluorescência de crisotila e filamentos intermediários na célula HK2.

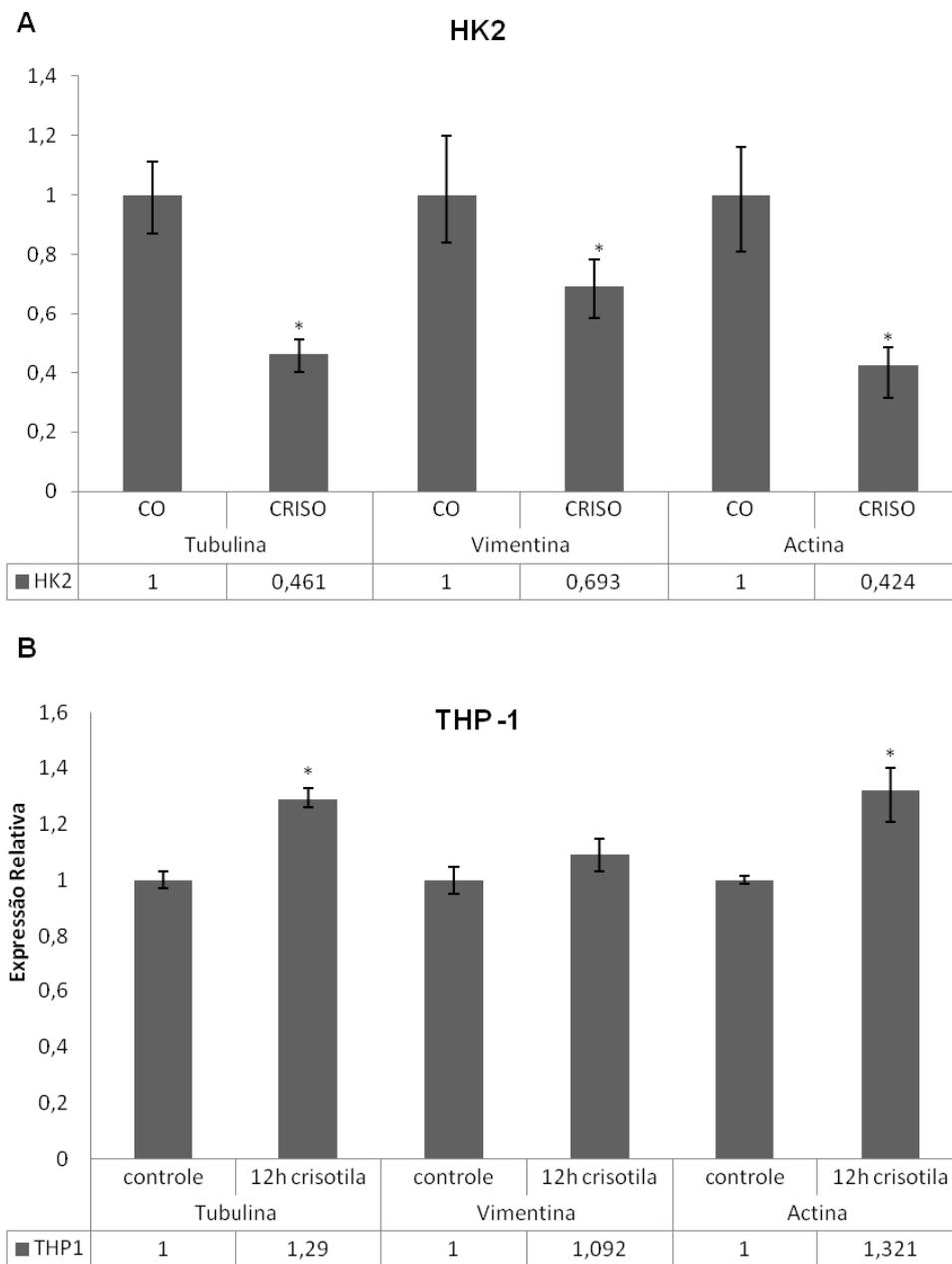


(A e B) Perfil de colocalização entre (A) citoqueratina e (B) vimentina em azul e crisotila (rosa) observadas ao microscópio confocal de varredura a laser. À direita os gráficos de colocalização dos respectivos filamentos e das fibras de crisotila. Nas setas finas exemplos de colocalização e nas setas grossas exemplos de fibras não colocalizadas com os elementos do citoesqueleto.

4.6.2 Expressão dos elementos do citoesqueleto

Os níveis de expressão relativa do mRNA de alguns elementos do citoesqueleto (tubulina, vimentina e actina) foram analisados por PCR quantitativo em ambas as linhagens, tanto na situação controle como exposta à crisotila por um período de 12 horas, como mostrado na figura 21 A e B. Não foi analisado o nível de expressão da citoqueratina, uma vez que essa célula, por ter sido estabelecida no laboratório, não foi caracterizada anteriormente para essa proteína, portanto não sabemos quais das citoqueratinas essa célula expressa. Por isso, nas imunofluorescências utilizamos pan-citoqueratina, já que esse anticorpo é capaz de corar uma variedade de citoqueratinas, tais como: 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 e 19. Na figura 21, após a exposição à crisotila por 12 horas, houve diferenças significativas nos perfis de expressão dos elementos do citoesqueleto estudados em ambas as linhagens. É interessante notar que a diferença no nível de expressão é mais acentuada na linhagem HK2 do que na THP-1, evidenciando algumas das diferenças anteriormente observadas na microscopia eletrônica.

Figura 21 – Expressão dos elementos do citoesqueleto na situação controle e exposta à crisotila por 12 horas.



(A) HK2 e (B) THP-1.

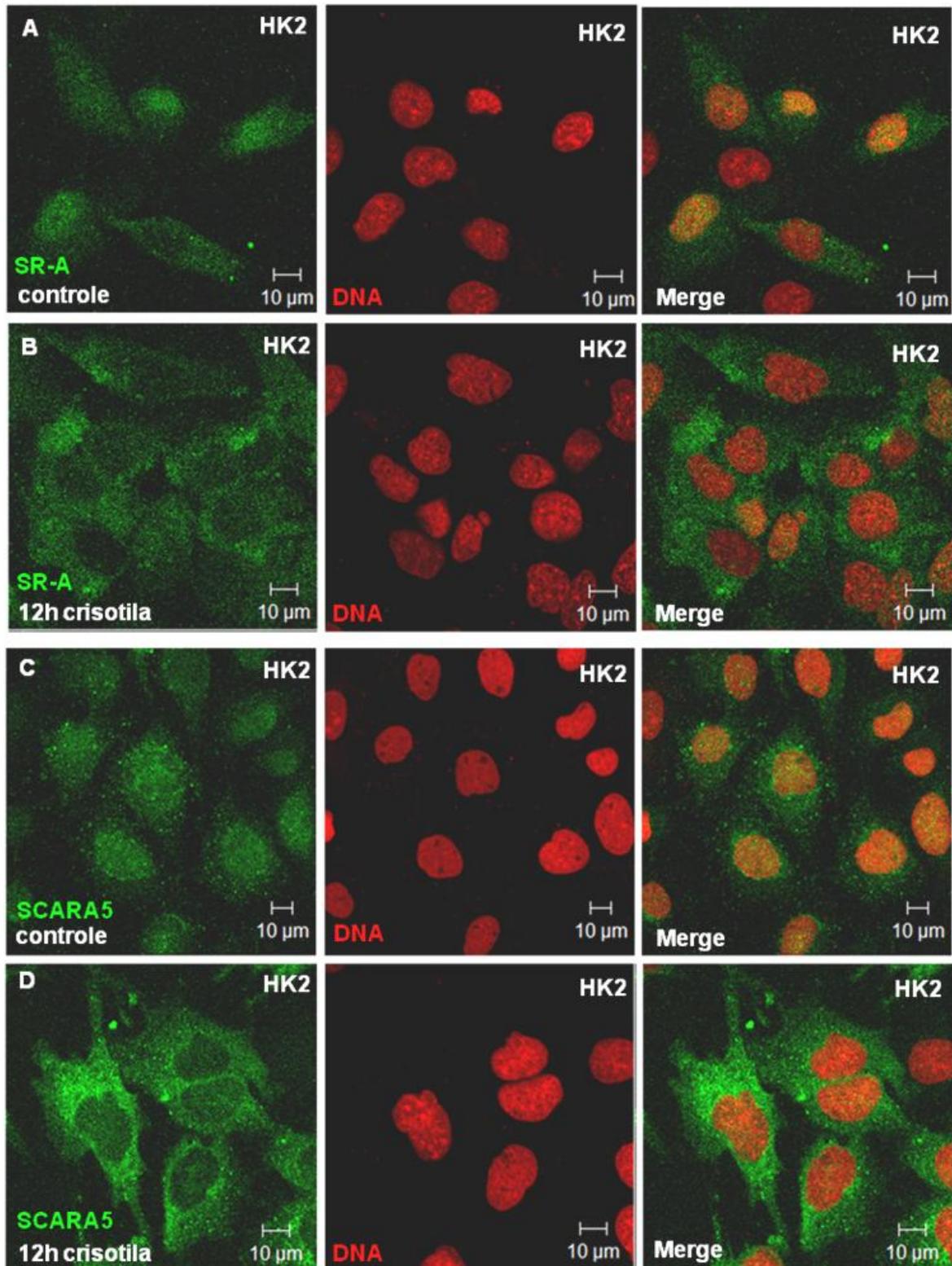
4.7 Receptores *scavenger*

4.7.1 Morfologia celular e localização dos receptores

As células da linhagem HK2 e THP1 foram submetidas à imunofluorescência para a visualização da localização dos receptores *scavenger* escolhidos, SR-A e SCARA5 (Figuras 22 e 23). As células foram observadas ao microscópio confocal de varredura a laser na situação controle e exposta às fibras de crisotila por um período de 12 horas.

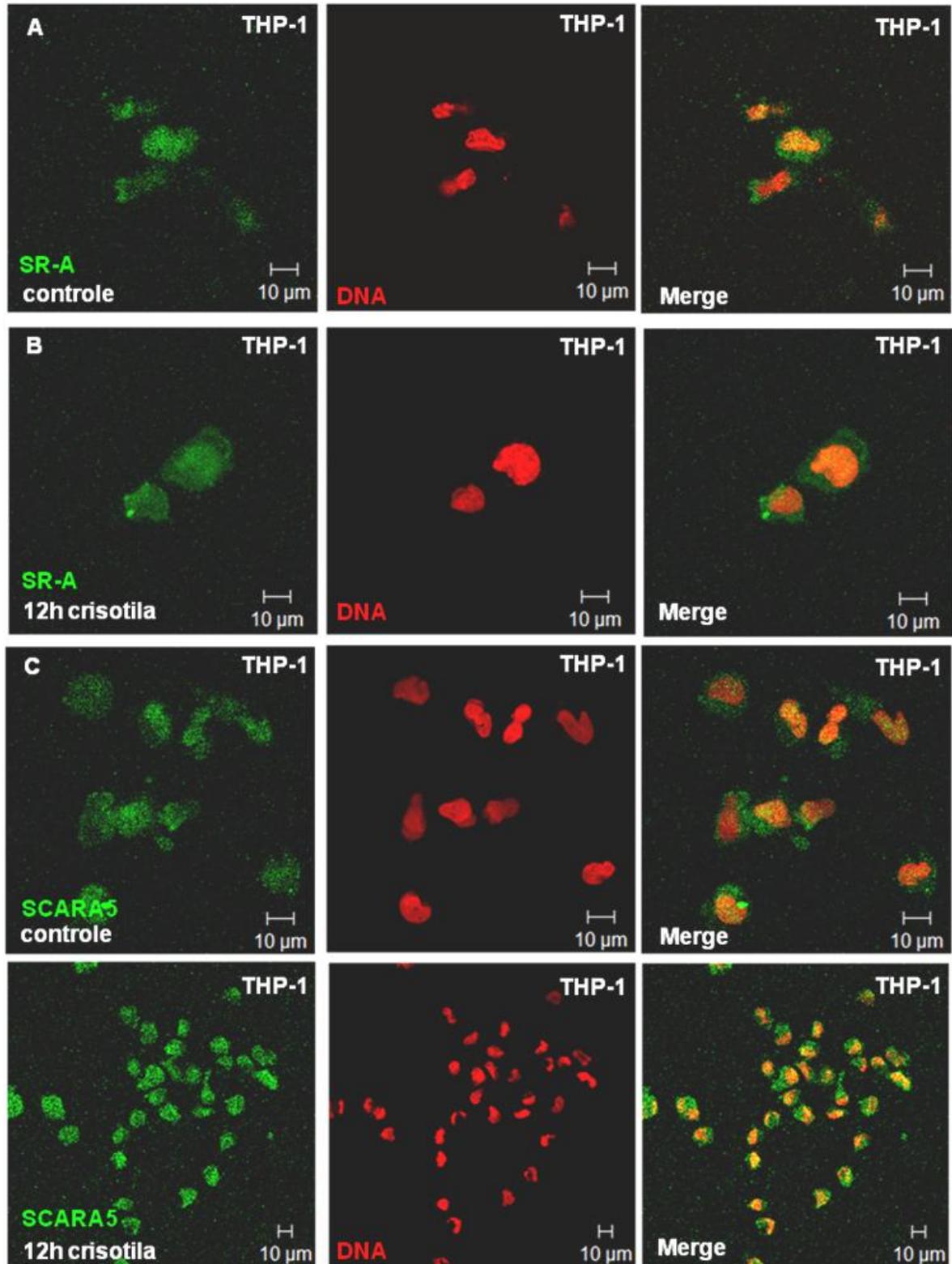
A partir da análise das imagens nas figuras 22 e 23, é possível observar que os receptores estudados estão localizados por toda a extensão celular, com um maior acúmulo na região nuclear e perinuclear na situação controle de ambas as linhagens (Figuras 22 e 23, A e C). Para as células da linhagem HK2 e THP-1 expostas à crisotila é possível observar uma mudança de padrão, em que há um menor acúmulo na região nuclear e perinuclear e maior distribuição no citosol (Figuras 22 e 23, B e D).

Figura 22 – Imunofluorescência de células HK2 observadas ao microscópio confocal de varredura a laser para visualização da localização celular dos receptores scavenger SR-A e SCARA5 (verde) e da cromatina (vermelho).



(A) receptor SR-A controle. (B) receptor SR-A exposto a crisotila por 12 horas. (C) receptor SCARA5 controle. (D) receptor SCARA5 exposto à crisotila por 12 horas.

Figura 23 – Imunofluorescência de células THP-1 observadas ao microscópio confocal de varredura a laser para visualização da localização celular dos receptores *scavenger* SR-A e SCARA5 (verde) e da cromatina (vermelho).



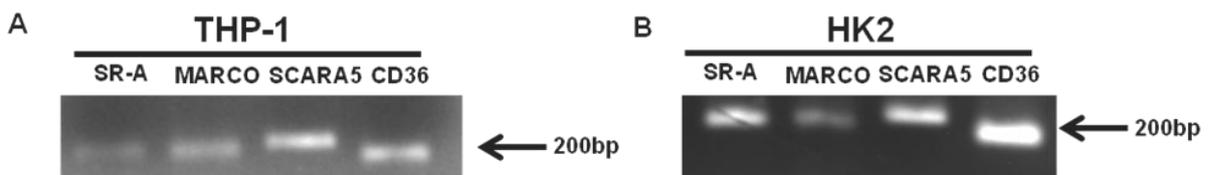
(A) receptor SR-A controle. (B) receptor SR-A exposto à crisotila por 12 horas. (C) receptor SCARA5 controle. (D) receptor SCARA5 exposto à crisotila por 12 horas.

4.7.2 Expressão relativa de mRNA e expressão proteica

O passo seguinte foi realizar experimentos para analisar a participação dos mesmos receptores *scavenger* utilizados anteriormente (SR-A e SCARA5) no processo de internalização das fibras pelas células. Os receptores *scavenger* escolhidos neste estudo foram baseados no tipo de tecido onde ocorre a sua expressão e na sua possível relação com a internalização de partículas contendo sílica.

Inicialmente, pela amplificação do cDNA, foram investigados quais receptores eram expressos em ambas as linhagens. Como indica a figura 24, A e B a presença dos receptores *scavenger* foi detectada em ambas as linhagens. O interessante é que mesmo receptores que não são descritos como expressos comumente em certas linhagens celulares tiveram sua expressão detectada, como é o caso do receptor SR-A, descrito como receptor expresso em macrófagos e detectado em células HK2 que são células epiteliais. Isso pode ter ocorrido porque ambas as linhagens não são de células normais e sim de células de origem tumoral, o que pode ter ocasionado a alteração da expressão gênica dessas células.

Figura 24 – Eletroforese em gel de agarose 3% indicando a presença dos receptores *scavenger* a partir da amplificação do cDNA.



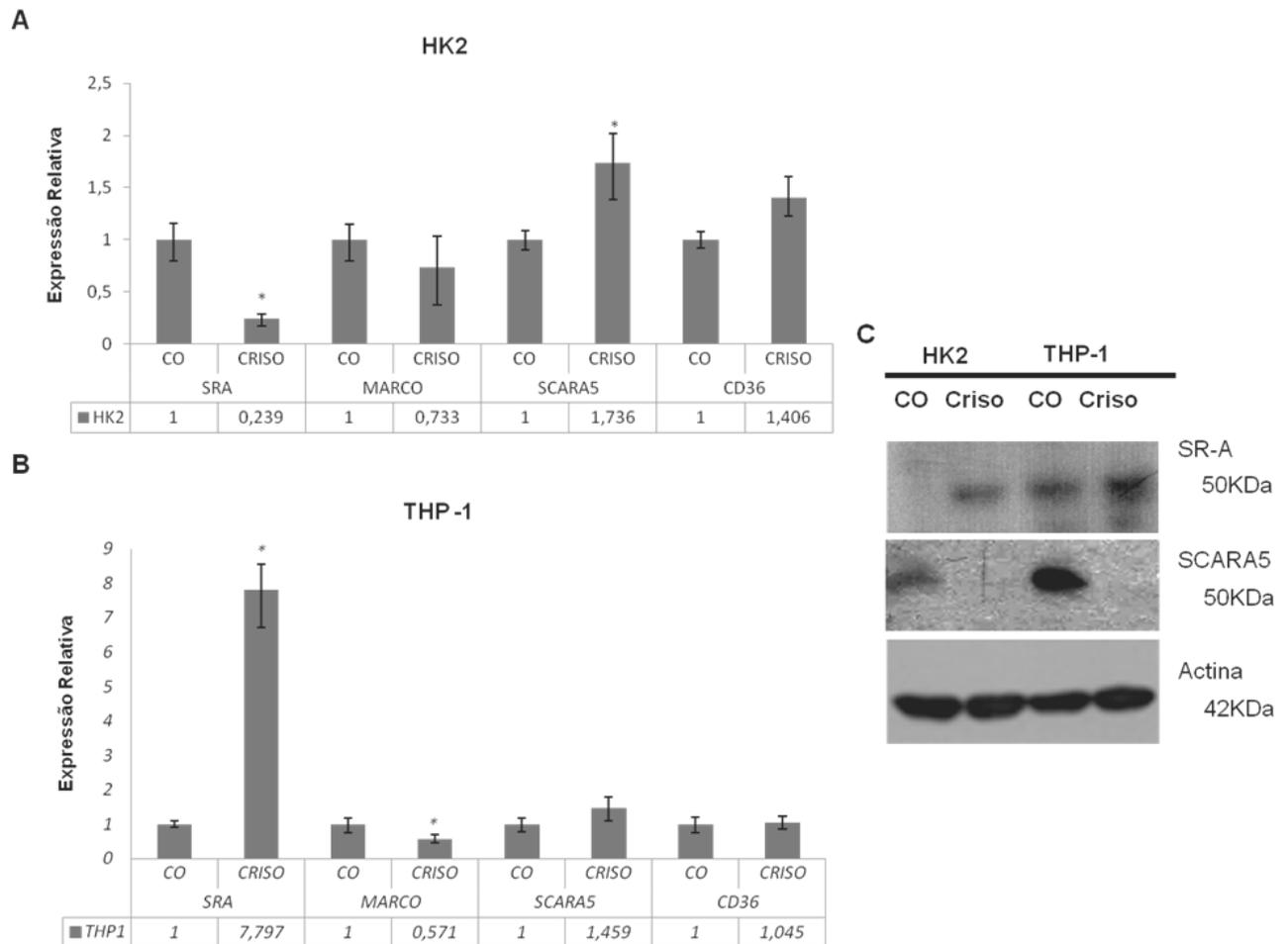
(A) HK2 (B) THP-1.

A partir dos dados descritos acima, foram investigados por PCR quantitativo para ambas as linhagens os níveis de expressão relativa do mRNA e os níveis de expressão proteica dos receptores *scavenger*, tanto na situação controle como exposta à crisotila por 12 horas. Na figura 25 A e B, é possível observar que a exposição à crisotila por 12 horas, alterou a expressão relativa de mRNA de alguns dos receptores *scavenger*, sendo significativa para o receptor SR-A e SCARA5 na linhagem HK2 e para o receptor SR-A e MARCO na linhagem THP-1.

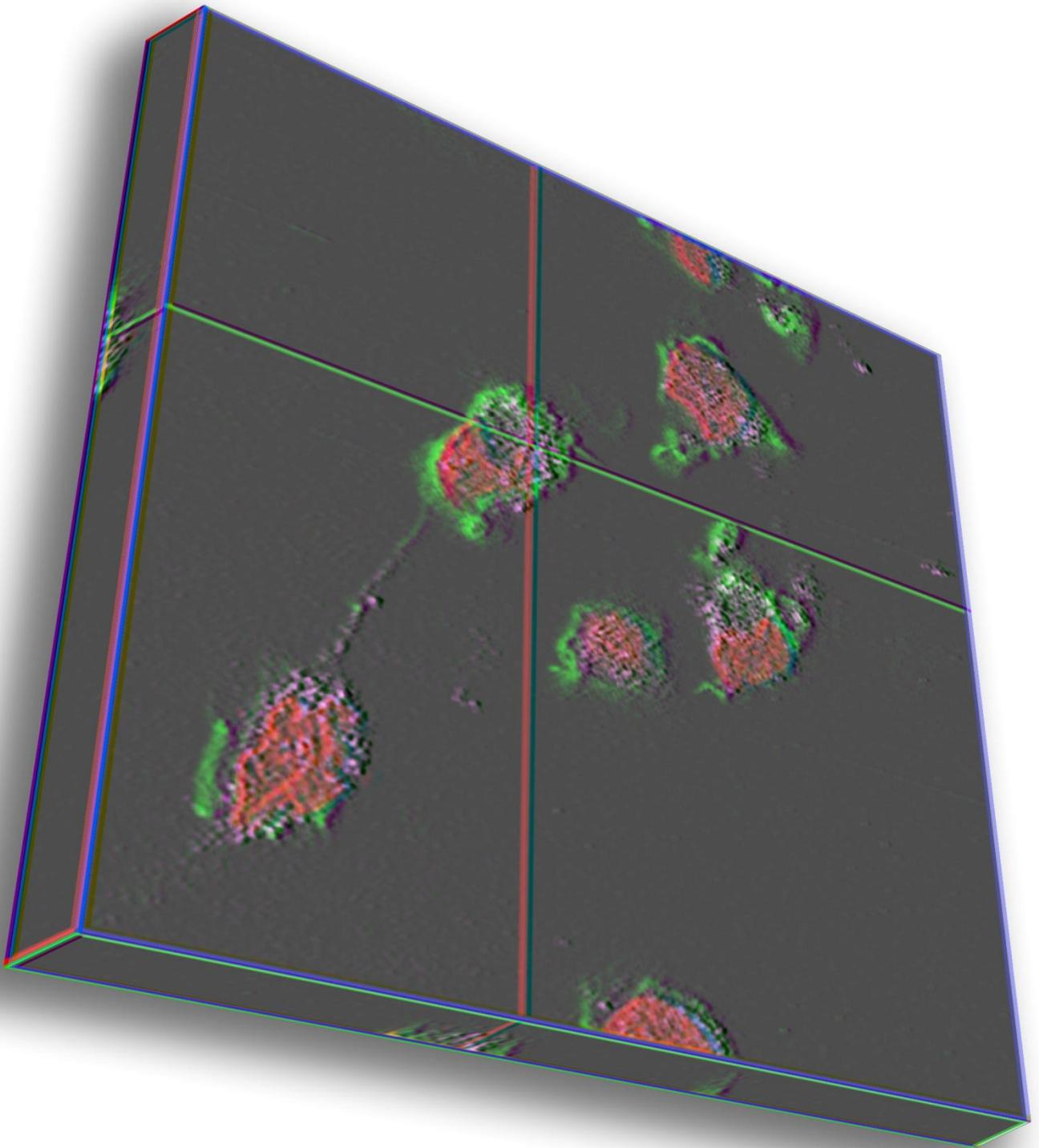
Em relação ao nível de expressão proteica, é possível observar na figura 25 C que na linhagem HK2 o receptor SR-A não apresentou expressão detectável desta proteína no grupo controle, sendo detectado somente no grupo exposto a crisotila. Já para o receptor SCARA5 a situação foi oposta, é possível observar que houve expressão proteica detectável somente no grupo controle.

Para a linhagem THP-1 é possível observar que o receptor SR-A apresentou expressão proteica detectável tanto para o grupo controle como para o exposto à crisotila. Assim como foi observado em HK2, o receptor SCARA5 somente foi expresso na situação controle, porém na linhagem THP-1 a expressão do receptor é maior em relação a HK2.

Figura 25 – Expressão relativa de mRNA dos receptores *scavenger* SR-A e SCARA5 e o nível de expressão proteica dos mesmos receptores *scavenger* na situação controle e exposta à crisotila por 12 horas para a linhagem.



(A) HK2 e (B) THP-1 e nível de expressão proteica (C) dos receptores *scavenger* SR-A e SCARA5.



5_DISCUSSÃO

No presente trabalho analisamos o processo de interação de pequenas fibras de crisotila em duas linhagens celulares de origens diferentes, uma derivada de carcinoma de células não pequenas de pulmão (HK2) e outra de leucemia monocítica (THP-1). Ambas demonstraram ser eficientes no processo de internalização das fibras, visto que mesmo as células não fagocíticas profissionais (HK2) foram capazes de internalizar as fibras de crisotila no mesmo tempo das células fagocíticas profissionais (THP-1), ocorrendo em pelo menos 4 horas de exposição. Liu e colaboradores (2000), estudando a internalização de asbestos por células mesoteliais de pulmão não especializadas em fagocitose, verificaram que a citotoxicidade resultante da exposição às fibras de asbestos também foi observada após exposição por 4 horas.

Comparando os processos de internalização de fibras de crisotila de ambas as linhagens, pode-se dizer que uma das formas de entrada de crisotila na célula ocorre por meio da endocitose, resultando em fibras envoltas pela membrana plasmática. A outra forma de entrada das fibras na célula poderia ser por meio da perfuração física da membrana celular, resultando em fibras livres no citosol. Porém, é necessário destacar que essas fibras livres no citosol podem ser originadas também de uma tentativa frustrada do compartimento lisossomal em digerir as fibras, com posterior perda de integridade de sua membrana e liberação das fibras no citosol (HAMILTON; THAKUR; HOLIAN, 2007). Com os dados obtidos no nosso trabalho, não é possível definir se há uma via predominante, logo é possível que ambas estejam ocorrendo nas duas linhagens.

MacCorkle e colaboradores (2006) verificaram a presença de fibras de asbestos livres no citosol e envoltas pela membrana plasmática em cultura de fibroblastos de pulmão humano. A fim de estudar a possível interação dessas fibras livres no citosol com elementos celulares, os autores realizaram um ensaio *in vitro* para identificar as proteínas celulares associadas aos asbestos crisotila e crocidolita. Verificaram que há associação entre esses asbestos e algumas proteínas celulares, entre elas: vimentina, lamina, tubulina, proteína ribossomal, proteína centromérica, entre outras.

A interação das fibras de crisotila com os elementos do citoesqueleto também foi observada no nosso trabalho, visto que há uma maior densidade dos elementos do citoesqueleto próximos as fibras de crisotila. É importante destacar que no nosso

trabalho esta associação foi observada utilizando células em cultura, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia confocal, diferentemente do trabalho anteriormente citado que utiliza ensaio *in vitro*. Também verificamos uma diminuição da expressão relativa de RNA que codifica tubulina, vimentina e actina quando expostos às fibras, diferença que é significativamente maior nas células HK2 para todos os elementos estudados.

A diminuição da expressão dos elementos do citoesqueleto pode estar relacionada com o *stress* celular devido à internalização de fibras de crisotila ou com o rearranjo intracelular decorrente dessa internalização, como proposto por Malorni e colaboradores (1990). Estes autores verificaram mudanças morfológicas e estruturais nos elementos do citoesqueleto, actina, citoqueratina e tubulina de células tumorais de mama devido à internalização de fibras de crisotila e sugeriram que essas alterações celulares poderiam interferir no processo de sinalização intracelular, levando a diversos mecanismos citotóxicos decorrentes da exposição dos asbestos.

Malorni e colaboradores (1990) verificaram por microscopia eletrônica de transmissão que células de mama expostas à crisotila sofriam degradação dos elementos do citoesqueleto citados acima na presença de fibras de crisotila em 3 horas de exposição, porém esses elementos eram recuperados após 6 horas. Isso não foi observado no nosso trabalho, pois em 12 horas de exposição às fibras há uma diminuição na expressão relativa de RNA dos elementos estudados. Essa diferença encontrada entre o nosso trabalho e o de Malorni e colaboradores (1990) pode ser decorrente da concentração de fibras utilizadas, já que os autores utilizaram 8 vezes menos crisotila do que o apresentado neste trabalho e sonicaram as fibras de crisotila 13 vezes mais do que o apresentado neste trabalho. É interessante observar também que os autores propuseram que os elementos do citoesqueleto poderiam estar relacionados ao transporte intracelular das fibras de crisotila.

Nagai e colaboradores (2011) utilizando ensaios *in vitro* também propõe que as fibras de crisotila livres no citosol podem interagir não somente com as proteínas celulares, mas também com o DNA, RNA, ribossomos e proteínas associadas, principalmente devido a interação por carga (NAGAI et al., 2011), sugerindo que as fibras de crisotila também podem interferir nos processos de replicação, transcrição

e tradução. A afinidade de crisotila pelo DNA é maior do que a dos outros tipos de asbestos, isso pode ser explicado pelo fato da superfície da crisotila na sua condição íntegra apresentar-se com carga positiva, devido à presença de cátions. Porém, após a desagregação das fibras, a camada rica em sílica é exposta e a superfície dos fragmentos apresenta carga negativa (NAGAI et al., 2011; VIRTÁ, 2005). Neste trabalho, as fibras de crisotila utilizadas foram sonicadas para a obtenção de fragmentos menores, como nesse processo as fibras foram desagregadas, há uma maior probabilidade dos fragmentos de crisotila produzidos terem carga negativa, o que pode ter favorecido uma maior presença de fibras no citosol em detrimento do núcleo.

No presente trabalho foi verificada a presença de fibras no núcleo de células da linhagem HK2, fato que pode ter levado a formação de células multinucleadas e apoptóticas como observadas na microscopia confocal. Cortez e Machado-Santelli (2008) observaram multinucleação celular e apoptose em células epiteliais em cultura após a exposição à crisotila. A interação célula-crisotila também pode levar a formação de fusos multipolares durante a mitose e gerar células aneuplóides (CORTEZ; MACHADO-SANTELLI, 2008). Essas falhas na citocinese e formação de fusos multipolares poderiam estar relacionadas com a interação entre as fibras de crisotila e os elementos do citoesqueleto, actina tubulina e vimentina, observados neste trabalho.

As fibras de crisotila também podem interagir com as células através de receptores celulares, já que a internalização de moléculas da superfície celular e de partículas pode ocorrer por meio da endocitose mediada por receptores. Entre os receptores que podem participar desse processo estão os receptores *scavenger* que podem interagir com ligantes contendo sílica devido a interações conformacionais dependentes de carga no domínio de colágeno (ANDERSSON; FREEMAN, 1998; HAMILTON; THAKUR; HOLIAN, 2007).

É possível que no nosso trabalho, além do processo de fagocitose das fibras de crisotila pelas células, também ocorra endocitose mediada por receptores celulares, pois nossos resultados sugerem uma possível interação de alguns receptores *scavenger* com as fibras de crisotila, visto que houve alterações na expressão relativa de mRNA e na expressão proteica dos mesmos após a exposição às fibras de crisotila. Além disso, verificamos a expressão de receptores *scavenger*

não comumente expressos em certos tipos celulares, como é o caso de SR-A em HK2 e SCARA5 em THP-1, provavelmente devido ao fato das linhagens utilizadas terem uma origem tumoral e, por isso, diferente do padrão esperado para linhagens não tumorais.

Neste trabalho observamos alterações na localização dos receptores SR-A e SCARA5 na situação exposta à crisotila em relação à situação controle, tanto na linhagem HK2 como na THP-1. Podemos observar que tanto o receptor SR-A como o SCARA5 estão mais presentes na região nuclear e citoplasmática perinuclear na situação controle e após a exposição às fibras são encontrados principalmente no citoplasma. Isso pode significar que nos controles há uma maior predominância dessa proteína no retículo endoplasmático, local onde ela está sendo produzida, típica da rede trans-Golgi (HUANG et al., 2010). Já na situação exposta às fibras de crisotila, essas proteínas não apresentam esse padrão, o que pode significar que há um deslocamento para membrana e reciclagem de alguns dos receptores que foram internalizados em vesículas, possivelmente algumas delas contendo fibras.

Em relação à expressão dos receptores *scavenger* é possível perceber que há uma diminuição na expressão de RNA do receptor SR-A na linhagem HK2 que não é acompanhada da diminuição da expressão proteica, visto que essa não foi detectada no controle. Isso pode ter ocorrido porque na situação controle a expressão desta proteína era baixa ou indetectável e em contato com as fibras de crisotila, na situação tratada, a expressão proteica de SR-A é ativada, o que permitiu a detecção desta proteína pela técnica de *Western blot*.

A expressão deste receptor não é comum em células epiteliais, como é o caso da HK2, possivelmente por isso a redução da expressão de RNA pode ser explicada pela diminuição da necessidade da produção deste receptor após certa quantidade ser produzida. Além disso, é possível também que a transcrição e a tradução não estejam diretamente relacionadas neste caso, já esse o mecanismo pode depender de sinais intracelulares para ocorrer. Isto foi encontrado por Zhao e colaboradores (2009) para o receptor *scavenger* MARCO em monócitos de pacientes com prótese de quadril, no qual a expressão de RNA e a expressão proteica desse receptor também não estavam relacionadas.

Já o receptor SCARA5 é comumente expresso em células epiteliais especializadas, o que foi confirmado nas células HK2 controles. O nível de

expressão do RNA aumentou na situação tratada e a proteína não foi detectada por *Western blot*. Isso pode ter ocorrido em consequência de sua possível internalização em vesículas e posteriormente, a sua degradação e a não reciclagem desse receptor para a membrana plasmática, o que explica não detecção proteica. Dessa forma, o aumento da expressão do RNA pode estar relacionado à reposição deste receptor.

Para a linhagem THP-1, há um grande aumento da expressão do RNA de SR-A acompanhado da detecção da proteína em maior concentração na situação tratada. A expressão deste receptor é comumente encontrada em macrófagos, o que pode explicar esse grande aumento. Para o receptor SCARA5, o mesmo padrão da linhagem HK2 foi observado, apesar do aumento da expressão de RNA não ser significativo para THP-1. O receptor SCARA5 pode estar sendo degradado e repostado em ambas as linhagens de maneira similar após o processo de internalização das fibras, fato comumente observado com alguns receptores e seus respectivos ligantes (SORKIN; ZASTROW, 2002).

Com base no que foi descrito acima, é possível inferir que a presença do receptor SR-A é favorecida pela exposição à crisotila, o que pode significar uma relação entre esse receptor e a endocitose das fibras. Esses dados foram consistentes com as observações de Iyer e colaboradores (1996) e de Orr e colaboradores (2011) que demonstraram em seus trabalhos que o receptor SR-A tem uma importante função na internalização de sílica e na subsequente inflamação e apoptose celular decorrente dessa internalização, visto que na presença de inibidores para esse receptor a apoptose celular diminui bastante.

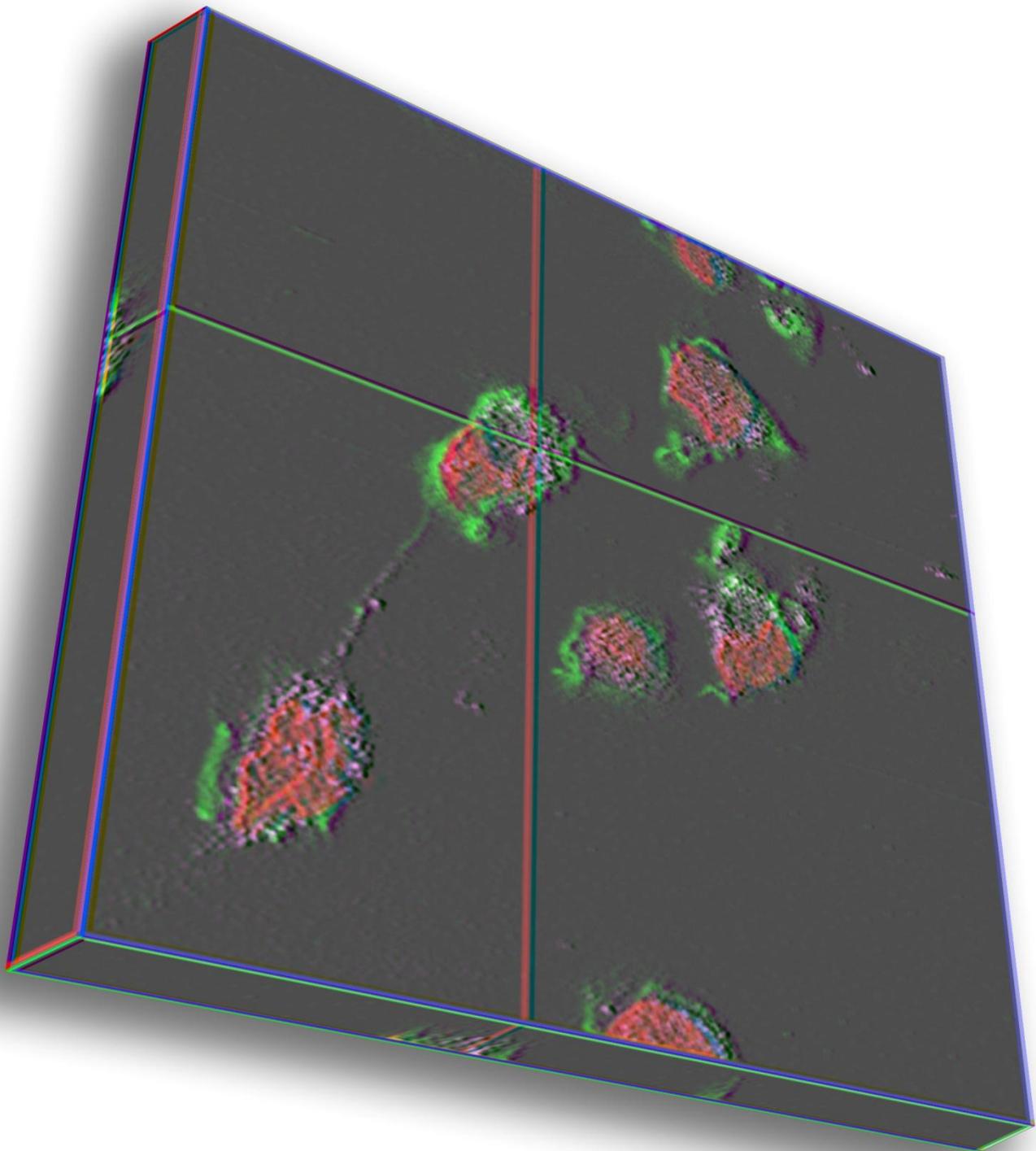
A endocitose mediada pelo receptor SR-A foi estudada por Zhu e colaboradores (2011) utilizando um ligante específico para SR-A em células de camundongo em cultura. Eles verificaram que a internalização do receptor SR-A pode ocorrer por rotas endocíticas distintas, tanto com a participação de clatrina como de cavéolas, isso pode possibilitar diferentes funções desse receptor no interior das células. O interessante é que essas rotas são independentes da concentração dos ligantes, diferentemente do observado em EGFR no qual a internalização ocorre por vias específicas dependendo da dose do ligante (SIGISMUND et al., 2005).

O mesmo pode acontecer para o receptor SCARA5, uma vez que a expressão de RNA é aumentada na presença de crisotila o que pode significar uma relação entre esse receptor e a endocitose das fibras. Entretanto, caso ambos os receptores participem da endocitose de fibras, somente o receptor SR-A é reciclado para a membrana plasmática, já que a detecção proteica de SCARA5 não foi observada em ambas as linhagens na situação tratada. Em um estudo realizado por Naito e colaboradores (1991) utilizando diversos tecidos bovinos para determinar a distribuição e localização intracelular do receptor SR-A, foi verificado que esse receptor em macrófagos alveolares é capaz de ligar-se aos respectivos ligantes, serem internalizados por vesículas revestidas, formarem endossomos e serem reciclados. Neste mesmo trabalho, não foram encontradas evidências de atividade lisossomal nestes endossomos, sugerindo a dissociação dos ligantes e a reciclagem do receptor para a membrana plasmática. Como THP-1 é uma linhagem celular relacionada com a fagocitose de partículas, é possível inferir que o receptor SR-A tenha um papel importante na entrada das fibras de crisotila nas células.

O presente trabalho foi o primeiro a relatar a relação da expressão do receptor SCARA5 com a exposição à crisotila. A identificação e a descrição do receptor SCARA5 é relativamente nova, (JIANG et al., 2006) provavelmente por isso ainda não exista relatos da relação deste receptor com o transporte de sílica.

Nossos dados não foram consistentes com Hamilton e colaboradores (2007) na análise de dois receptores diferentes. Os autores observaram uma relação positiva na expressão relativa de RNA entre a internalização de sílica e o receptor *scavenger* MARCO, relação esta não encontrada em nosso trabalho nas duas linhagens estudadas. Nenhuma relação foi encontrada pelos autores para o receptor *scavenger* CD36, porém no nosso trabalho este receptor apresentou um aumento, quase significativo, na expressão relativa de RNA somente na linhagem HK2.

É importante lembrar que há vários receptores na família de *scavenger* e que neste trabalho escolhemos apenas quatro deles para estudo. É possível que outros receptores estejam relacionados à interação de fibras de crisotila e compostos contendo sílica e também que haja sobreposição de funções, já que muitos são expressos nos mesmos tipos celulares e possuem ligantes similares entre si.

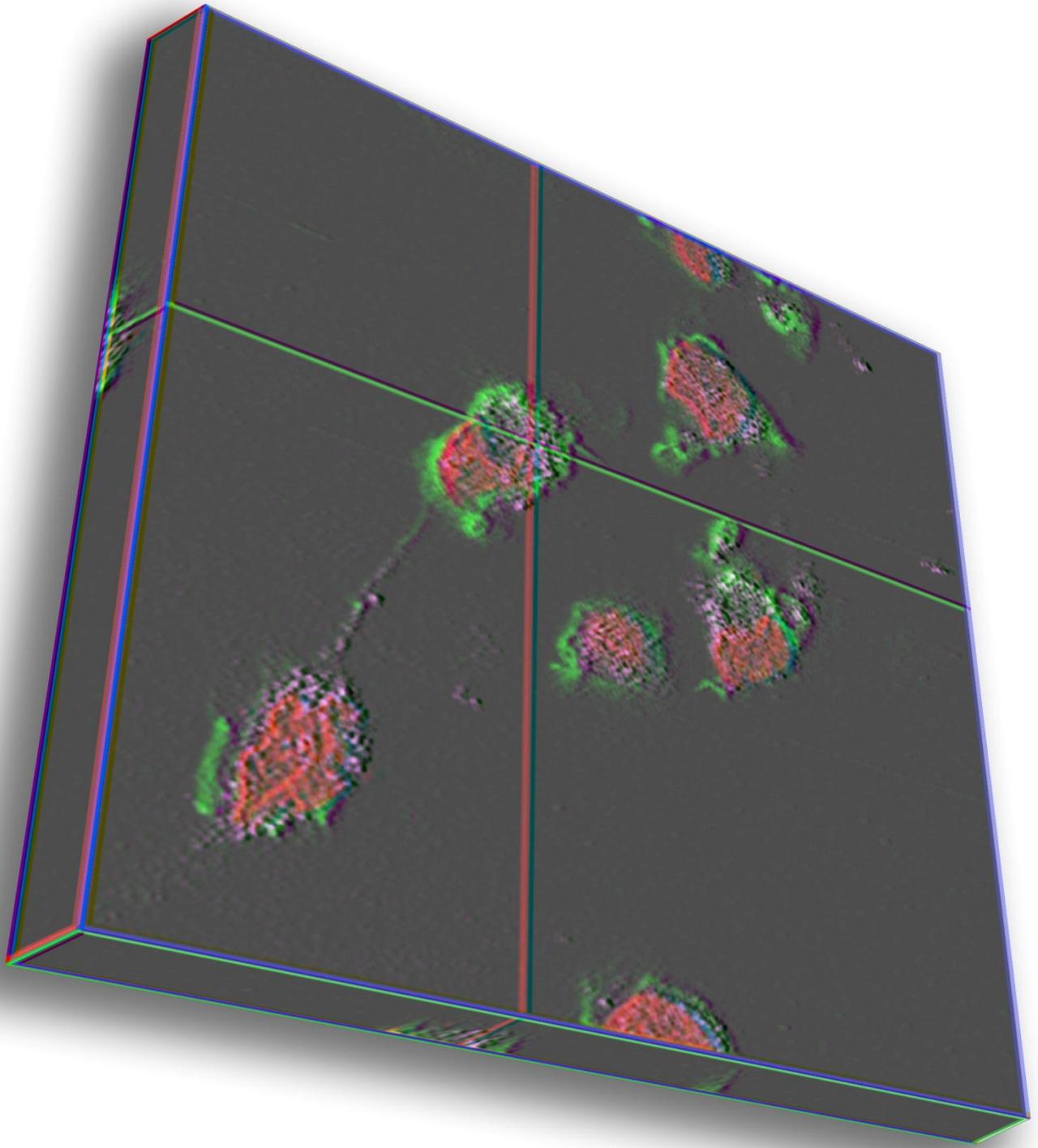


6_CONCLUSÕES

O presente trabalho mostra que a internalização de fibras de crisotila em ambas as linhagens celulares estudadas, possivelmente ocorre por duas vias diferentes: uma via endocítica, com fibras envoltas por membrana plasmática, e outra por interação física, perfuração da membrana resultando em fibras livres no citosol. Há também uma clara interação entre elementos do citoesqueleto e as fibras de crisotila, já que além da colocalização destes houve aumento da expressão relativa de RNA com diversos elementos do citoesqueleto. Essa interação pode ser responsável pela interferência em processos celulares que geram falhas na divisão celular, um dos fatores que pode ser determinante na citotoxicidade das fibras de crisotila.

Os receptores *scavenger* parecem interferir no processo de internalização das fibras de crisotila, sendo que alguns dos receptores estudados apresentaram modificação na sua expressão relativa de RNA e proteica após a exposição às fibras de crisotila, como o SR-A e SCARA5. Além disso, nosso trabalho foi o primeiro a encontrar relação entre o receptor SCARA5 e fibras de crisotila.

Para compreender melhor os processos de internalização de fibras de crisotila pelos receptores *scavenger*, mais estudos deverão ser realizados e alguns inibidores poderão ser utilizados.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS⁶

- ADDISON, J.; MCCONNELL, E. E. A review of carcinogenicity studies of asbestos and non-asbestos tremolite and other amphiboles. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 52, p. 187–199, 2008.
- ANDERSSON, L.; FREEMAN, M. W. Functional changes in *scavenger* receptor binding conformation are induced by charge mutants spanning the entire collagen domain. **J. Biol. Chem**, v. 273, p. 19592–19601, 1998.
- ARESCOUG, T.; GORDON, S. Microreview *Scavenger* receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 8, p. 1160–1169, 2009.
- BEAMER, C. A.; HOLIAN, A. *Scavenger* receptor class A type I/II (CD204) null mice fail to develop fibrosis following silica exposure. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 289, p. 186–195, 2005.
- BECKLAKE, M. R.; BAGATIN, E.; NEDER, J. A. Asbestos-related diseases of the lungs and pleura: uses, trends and management over the last century. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v.11, n.4, p.356–369, 2007.
- BERNSTEIN D.; CASTRANOVA, V.; DONALDSON, K.; FUBINI, B.; HADLEY, J.; HESTERBERG, T.; KANE, A.; LAI, D.; MCCONNELL, E. E.; MUHLE, H.; OBERDORTER, G.; OLIN, S.; WARHEIT, D. B. Testing of fibrous particles: short-term assays and strategies. **Inhal. Toxicol.**, v. 17, p. 497–537, 2005.
- BERNSTEIN, D. M.; CHEVALIER, J.; SMITH, P. Comparison of Calidria chrysotile asbestos to pure tremolite: final results of the inhalation biopersistence and histopathology examination following short-term exposure. **Inhal. Toxicol**, v. 17, p. 427-449, 2005.
- BERNSTEIN, D. M.; HOSKINS, J. A. The health effects of chrysotile: Current perspective based upon recent data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 45, p. 252–264, 2006.
- BONALDO, M. F.; PESTANA, C. B.; RIBEIRO, M. C.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; MORI, L.; OLIVEIRA, A. R. Comparative characterization of a human large cell lung carcinoma cell line and the xenograft derived cell line. **Cell. Biol. Int. Rep.**, v. 15, n. 3, p. 229-241, 1991.
- BOWDISH, D. M. E.; GORDON, S. Conserved domains of the class A *scavenger* receptors evolution and function. **Immunological Reviews**, v. 227, p. 19–31, 2009.

⁶ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 23–39, 2000.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169–193. 2002.

CABEC, V. LE.; CARRENO, S.; MOISAND, A.; BORDIER, C.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively. **J. Immunol.**, v. 169, p. 2003–2009, 2002.

CHAO, S. K.; HAMILTON, R. F.; PFAU, J. C.; HOLIAN, A. Cell surface regulation of silica-induced apoptosis by the SR-A scavenger receptor in a murine lung macrophage cell line (MH-S). **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 174, p. 10–16, 2001.

CHEN, Q.; ROSS, C. Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 297, n. 1, p. 68–81, 2004.

CORTEZ, B. de A.; QUASSOLLO, G.; CACERES, A.; MACHADO-SANTELLI, G. M. The fate of chrysotile-induced multipolar mitosis and aneuploid population in cultured lung cancer cells. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. 1–13, 2011.

CORTEZ, B. A.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Chrysotile effects on human lung cell carcinoma in culture: 3-D reconstruction and DNA quantification by image analysis. **BMC Cancer**, v. 8, n. 181, p. 1–10, 2008.

CRAIGHEAD, J. E.; GIBBS, A. R. **Asbestos and its diseases**. New York: Oxford University Press, 2008.

DOI, T.; HIGASHINO, K.; KURIHARA, Y.; WADA, Y.; MIYAZAKI, N.; NAKAMURA, H.; UESUGI, S.; IMANISHI, T.; KAWABE, Y.; ITAKURA, H.; YAZAKI, Y.; MATSUMOTO, A.; KODAMA, T. Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 2126–2133, 1993.

DOPP, E.; SCHULER, M.; SCHIFFMANN, D.; EASTMOND, D. A. Induction of micronuclei, hyperdiploidy and chromosomal breakage affecting the centric/pericentric regions of chromosomes 1 and 9 in human amniotic fluid cells after treatment with asbestos and ceramic fibers. **Mutat. Res.**, v. 377, p. 77–87, 1997.

FALINI, G.; FORESTI, E.; LESCI, I. G.; LUNELLI, B.; SABATINO, P.; ROVERI, N. Interaction of Bovine Serum Albumin with Chrysotile: Spectroscopic and Morphological Studies. **Chem. Eur. J.**, v. 12, p. 1968–1974, 2006.

GIANTOMASSI, F.; GUALTIERE, A. F.; SANTARELLI, L.; TOMASETTI, M.; LUSVARDI, G.; LUCARINI G.; GOVERNA, M.; PUGNALONI, A. Biological effects and comparative cytotoxicity of thermal transformed asbestos-containing materials in a human alveolar epithelial cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1521–1531, 2010.

GREAVES, D. R.; GORDON, S. The macrophage *scavenger* receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. **Journal of Lipid Research** April Supplement, 2009

HAMILTON J. R, Jr.; THAKUR, S. A.; MAYFAIR, J. K.; HOLIAN, A. MARCO Mediates Silica Uptake and Toxicity in Alveolar Macrophages from C57BL/6 Mice. **The journal of biological chemistry**, v. 281, n. 45, p. 34218–34226, 2006.

HAMILTON, R. F.; THAKUR, S. A.; HOLIAN, A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 44, p. 1246–1258, 2007.

HUANG, S. X. L.; JAURAND, M. C.; KAMP, D. W.; WHYSNER, J.; HEI, T. K. Role of mutagenicity in asbestos fiber-induced carcinogenicity and other disease. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 14, p. 179–245, 2011.

HUANG, J.; ZHENG, D. L.; QIN, F. S.; CHENG, N.; CHEN, H.; WAN, B. B.; WANG, Y. P.; XIAU, H. S.; HAN, Z. G.; Genetic and epigenetic silencing of SCARA5 may contribute to human hepatocellular carcinoma by activating FAK signaling. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 1, p. 223-241, 2010.

IARC. A Review of Human Carcinogens: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, 2012

IYER, R.; HAMILTON, R. F.; LI, L.; HOLIAN, A. Silica-induced apoptosis mediated via *scavenger* receptor in human alveolar macrophages. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 141, p. 84–92, 1996.

JIANG, Y.; OLIVER, P.; DAVIES, K. E.; PLATT, N. Identification and Characterization of Murine SCARA5 a Novel Class A *Scavenger* Receptor That Is Expressed by Populations of Epithelial Cells. **Journal. of Biol. Chem.**, v. 281, p. 11834–1184, 2006.

KANAREK, M. S. Mesothelioma from chrysotile asbestos: update. **Ann. Epidemiol.**, v. 21, n. 9 p. 688-697, 2011.

KODAMA, T.; FREEMAN, M.; ROHRER, L.; ZABRECKY, J.; MATSUDAIRA, P.; KRIEGER, M. Type I macrophage *scavenger* receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. **Nature**, v. 343, p. 531–535, 1990.

LADOU, J. The asbestos câncer epidemic. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 3, p. 285-290, 2004.

LANDRIGAN, P. J. Asbestos- Still a carcinogen. **N. Engl. J. Med**, v. 338, p. 1618-1619, 1998.

LIU, W.; ERNST, J. D.; BROADDUS, V. C. Phagocytosis of crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mesothelial cells. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 3, p. 371–378, 2000.

LOOMIS, D.; DEMENT, J. M.; ELLIOTT, L.; RICHARDSON, D.; KUEMPEL, E. D.; STAYNER, L. Increased lung cancer mortality among chrysotile asbestos textile workers is more strongly associated with exposure to long thin fibres. **Occup. Environ. Med.**, v. 69, p. 564-568, 2012.

MACCORKLE, R. A.; SLATTERY, S. D.; NASH, D. R.; BRINKLEY, B. R.; Intracellular protein binding to asbestos induces aneuploidy in human lung fibroblasts. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v.63, p.646–657, 2006.

MALORNI, W.; IOSI, F.; FALCHI, M. DONELLI, G. On the mechanism of cell internalization of chrysotile fibers: an immunocytochemical and ultrastructural study. **Environ. Res.**, v. 52, n. 2, p. 164-177, 1990.

MARTÍNEZ, V. G.; MOESTRUP, S. K.; HOLMSKOV, U.; MOLLENHAUER, J.; LOZANO, F. The Conserved *Scavenger* Receptor Cysteine-Rich Superfamily in Therapy and Diagnosis. **Pharmacol. Rev.**, v. 63, p. 967–1000, 2011.

MURRAY, R. Asbestos: a chronology of its origins and health effects. **Br. J. Ind. Med.**, v. 47, p. 361-365, 1990.

NAITO, M.; KODAMA, T.; MATSUMOTO, A.; DOI, T.; TAKAHASHI, K., Tissue Distribution, Intracellular Localization, and In Vitro Expression of Bovine Macrophage *Scavenger* Receptors. **American Journal of Pathology**, v. 139, n. 6, p. 1411-1423, 1991

NAGAI, H.; ISHIHARA, T.; LEE, W. H.; OHARA, H.; OKAZAKI, Y.; OKAWA, K.; TOYOKUNI, S. Asbestos surface provides a niche for oxidative modification. **Cancer Science**, v. 102, p. 2118–2125, 2011.

NISHIKAWA K.; TAKAHASHI K.; KARJALAINEN A.; WEN, C. P.; FURUYA, S.; HOSHUYAMA, T.; TODOROKI, M.; KIYOMOTO, Y.; WILSON, D.; HIGASHI, T.; OHTAKI, M.; PAN, G.; WAGNER, G. Recent mortality from pleural mesothelioma, historical patterns of asbestos use, and adoption of bans: a global assessment. **Environ. Health Perspect.**, v. 116, p. 1675–1680, 2008.

OKAYUSU R.; TAKAHASHI, S.; YAMADA, S.; HEI, T. K.; ULLRICH R. L. Asbestos and DNA double strand breaks. **Cancer Res.**, v. 59, p. 298–300, 1999.

ORR, G. A.; CHRISLER, W. B.; CASSENS, K. J.; TAN, R.; TARASEVICH, B. J.; MARKILLIE, L. M.; ZANGAR, R. C.; THRALL, B. D. Cellular recognition and trafficking of amorphous silica nanoparticles by macrophage *scavenger* receptor A. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 3, p. 296-311, 2011.

PARK, E. K.; TAKAHASHI, K.; JIANG, Y.; MOVAHED, M.; KAMEDA, T. Elimination of asbestos use and asbestos-related diseases: An unfinished story. **Cancer Sci.** 2012.

PEISER, L.; GORDON, S. The function of *scavenger* receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 149-159, 2001.

PEARSON, A. M. *Scavenger* receptors in innate immunity. **Curr. Opin. Immunol**, v. 8. p. 20–28, 1996.

POSER, I.; RAHMAN, Q.; LOHANI, M.; YADAV, S.; BECKER, H. H.; WEISS, D. G.; SCHIFFMANN, D.; DOPP, E. Modulation of genotoxic effects in asbestos-exposed primary human mesothelial cells by radical *scavenger*, metal chelators and a glutathione precursor. **Mutation Research**, v. 559, p. 19–27, 2004.

ROSS, M.; NOLAN, R. P. History of asbestos discovery and use and asbestos-related disease in context with the occurrence of asbestos within ophiolite complexes. **Geological Society of America**, v. 373 p. 447- 470, 2003.

SANTIAGO-GARCIA J.; KODAMA, T.; PITAS, R. E. The class A *scavenger* receptor binds to proteoglycans and mediates adhesion of macrophages to the extracellular matrix. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 6942–6946, 2003.

STAYNER, L.; DANKOVIC, D. A.; LEMEN, R. A.; Occupational exposure to chrysotile asbestos and Cancer Risk: A review of the amphibole hypothesis. **American Journal of Public Health**, v. 86, n. 2, p. 179-186, 1996.

STAYNER, L.; KUEMPEL, E.; GILBERT, S.; HEIN, M.; DEMENT, J. An epidemiological study of the role of chrysotile asbestos fibre dimensions in determining respiratory disease risk in exposed workers. **Occup. Environ. Med.** v. 65, p. 613–619, 2008

STEPHEN, S. L.; FREESTONE, K.; DUNN, S.; TWIGG, M. W.; HOMER-VANNIASINKAM, S.; WALKER, J. H.; WHEATCROFT, S. B.; PONAMBALAM, S. *Scavenger* Receptors and Their Potential as Therapeutic Targets in the Treatment of Cardiovascular. **Disease Int. J. Hypertens.**, Review Article p. 1-20, 2010

STROHMEIER, B. R.; HUNTINGTON, J. C.; BUNKER, K. L.; SANCHEZ, M. S.; ALLISON, K.; LEE, R. J. What is asbestos and why is it important? Challenges of defining and characterizing asbestos. **International Geology Review**, v.52, n.7–8, p. 801-872, 2010.

SILVERSTEIN, L. R.; FEBBRAIO, M. CD36, a *Scavenger* Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. **Sci. Signal**, v. 2, n. 72, 2009.

SIGISMUND, S., WOELK, T., PURI, C., MASPERO, E., TACCHETTI, C., TRANSIDICO, P., DI FIORE, P. P., AND POLO, S. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.102, n. 8, p.2760–2765, 2005.

SUZUKI Y.; YUEN S. R. Asbestos tissue burden study on human malignant mesothelioma. **Industrial Health**, v.39, p.150–160, 2001.

SORKIN A.; VON ZASTROW, M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 3, p. 600–614, 2002.

VIRTA, R. L. **Mineral commodity profiles—Asbestos.** U.S. Geological Survey Circular 1255–KK, 2005. 56 p.

WANG, X.; LV, L.; CHEN, Y.; CHEN, J. A CD36 synthetic peptide inhibits silica-induced lung fibrosis in the mouse, **Toxicol. Ind. Health**, v. 26, n. 47, 2010.

YARBOROUGH, C. M. The risk of mesothelioma from exposure to chrysotile asbestos. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**. v.13, p. 334–338, 2007.

ZHAO, D. S.; MA, G. F.; SELENIUS, M.; SALO, J.; PIKKARAINEN, T.; KONTTINEN Y. T. Ectopic expression of macrophage *scavenger* receptor MARCO in synovial membrane-like interface tissue in aseptic loosening of total hip replacement implants. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 92A, p. 641–649, 2009.

ZHU, X. D.; ZHUANG, Y.; BEN, J. J.; QIAN, L. L.; HUANG, H. P.; BAI, H.; SHA, J. H.; HE, Z. G.; CHEN, Q. Caveolae-dependent Endocytosis Is Required for Class A Macrophage *Scavenger* Receptor-mediated Apoptosis in Macrophages. **The Journal of biology chemistry**. v. 286, n. 10, p. 8231-8239, 2011.