Milena Marques Pagliarelli Acencio

**Resposta comparativa pleural “in vivo”
e do mesotélio “in vitro” à exposição por
diferentes fibras de asbesto**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Pneumologia
Orientador: Prof. Dr. Evaldo Marchi

**São Paulo
2006**

Dedico esta dissertação à minha família.

*Aos meus avós, **Cida e Osmar**, pelo incentivo constante, esforço, carinho e dedicação que permitem a realização dos meus sonhos;*

*À minha mãe, **Mara**, pelo carinho imensurável e incentivo em todas as decisões de minha vida;*

*Ao meu marido, **Fábio**, pelo carinho, apoio, compreensão e, acima de tudo, pelo grande amor dedicado, que sempre me alentaram durante todos esses anos que compartilhamos juntos;*

*Aos meus irmãos, **Vanessa e Dennis**, por me acompanharem mostrando que sozinha nada conseguirei.*

- Ao meu orientador, **Prof. Dr. Evaldo Marchi**, exemplo de pesquisador, pela amizade, incentivo e incansável dedicação em todas as etapas, não somente deste trabalho, mas em minha carreira científica;
 - Ao **Prof. Dr. Francisco Vargas Suso**, pelo incentivo constante, sempre me conduzindo e participando de meu crescimento científico;
 - À **Profa. Dra. Leila Antonangelo** e **Profa. Dra. Lisete Ribeiro Teixeira**, exemplos de dedicação acadêmica, pela amizade e incentivo. Agradeço pelos ensinamentos primordiais que me conduzem sempre a crescer profissionalmente;
 - Aos colegas, **Carlos Sérgio Rocha Silva**, **Gabriela Gaspar Carnevale** e **Luciana Previato de Almeida**, pela amizade e auxílio capital para a realização deste estudo;
 - À **Dra. Olga Ibanez** e **Dr. Orlando Ribeiro**, pela colaboração científica e apoio no fornecimento dos animais utilizados neste estudo;
 - Ao **Luiz César Moreira**, **Tânia Cabral**, **Antonieta Lamana** e **Geni Pedroso**, por me acolher em seu meio e terem sido fundamentais na realização deste estudo;
-

- À **Dra. Márcia Seiscento, Dr. Eduardo Henrique Genofre, Dra. Roberta Karla Barbosa Sales, Dr. Roberto Onishi e Dr. Carlos Verrastro**, pelo incentivo, apoio e amizade;
 - À **Olga, Solange, Priscila, Marina e Vera**, pelo constante auxílio e colaboração;
 - Ao **Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular**, pelo acolhimento e cordialidade que permitiram a realização deste trabalho;
 - À **Divisão de Experimentação**, pelo auxílio e disponibilidade de sua estrutura nas etapas experimentais desenvolvidas neste estudo;
 - À **Comissão de Pós-graduação**, pela serenidade e apoio em transmitir ensinamentos essenciais durante este período da pós-graduação;
 - À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho;
 - A todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, compartilharam para que esta tese se tornasse realidade, o meu profundo agradecimento.
-

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

INTRODUÇÃO	01
1 – Epidemiologia	02
2 – Características do asbesto	04
3 – Fisiopatologia da agressão mesotelial pelo asbesto	07
3.1 – Mediadores inflamatórios envolvidos na agressão pelo asbesto: Citocinas	09
3.1.1 – Interleucina-1 (IL-1)	10
3.1.2 – Interleucina-6 (IL-6)	11
3.1.3 – Proteína inflamatória macrofágica-2 (MIP-2)	12
3.1.4 – Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)... ..	12
3.2 – Alterações celulares secundárias à agressão pelo asbesto: Apoptose	14
4 – Camundongos selecionados geneticamente	16
OBJETIVOS	19
MATERIAL E MÉTODOS	21
1 – Experimento <i>in vivo</i>	22
1.1 – Animais	22
1.2 – Grupos	22
1.3 – Preparação do asbesto	23
1.4 – Injeção intrapleural	24
1.5 – Eutanásia e retirada de líquido pleural e tórax dos animais	24
2 – Experimento <i>in vitro</i>	25
2.1 – Cultura de células mesoteliais de camundongo	25
2.2 – Grupos	26
3 – Análises laboratoriais	27

3.1 – Análise citológica	27
3.2 – Imunofluorescência (anexina V e iodeto de propídio)	27
3.3 – Imunohistoquímica (TdT FragEL™)	28
3.4 – Dosagem de citocinas	28
3.5 – Imunohistoquímica da pleura	29
3.5.1 – Apoptose	29
3.5.2 – Ra PDGF	30
4 – Análises estatísticas	31
 RESULTADOS	 32
1 – Experimento <i>in vivo</i>	33
1.1 – Análise citológica do líquido pleural	33
1.1.1 – Total de leucócitos	33
1.1.2 – Neutrófilos	34
1.1.3 – Macrófagos	37
1.2 – Análise dos mediadores inflamatórios no líquido pleural	39
1.2.1 – Interleucina-1b (IL-1b)	39
1.2.2 – Interleucina-6 (IL-6)	41
1.2.3 – Proteína inflamatória macrofágica-2 (MIP-2)	41
1.3 – Correlações no modelo <i>in vivo</i>	44
1.3.1 – Leucócitos totais e neutrófilos	44
1.3.2 – Macrófagos, MIP-2 e IL-6	45
2 – Experimento <i>in vitro</i>	46
2.1 – Análise das citocinas no sobrenadante da cultura	46
2.1.1 – Interleucina-1b (IL-1b)	46
2.1.2 – Interleucina-6 (IL-6)	47
2.1.3 – Proteína inflamatória macrofágica-2 (MIP-2)	49
2.2 – Alterações celulares após exposição às fibras	50
2.2.1 – Apoptose	50
2.2.2 – Necrose	51
2.3 – Correlações das alterações celulares e mediadores inflamatórios do modelo <i>in vitro</i>	53
3 – Correlações entre os modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	53

4 – Análise da expressão do Ra PDGF	54
5 – Demonstração da expressão do Ra PDGF	56
6 – Demonstração de apoptose no fragmento de cultura	57
7 – Demonstração de apoptose na cultura de células mesoteliais	57
 DISCUSSÃO	 58
 CONCLUSÕES	 69
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 71

ANEXOS

Anexo A

Anexo B

Anexo C

Anexo D

Anexo E

Anexo F

Anexo G

LISTA DE ABREVIATURAS

AIR max	Camundongos selecionados geneticamente para alta resposta inflamatória
AIR min	Camundongos selecionados geneticamente para baixa resposta inflamatória
FITC	Fluorocéina
IARC	Agência internacional de pesquisa em câncer
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacáride de parede bacteriana
MIP-2	Proteína Inflamatória macrofágica-2
PBS	<i>Phosphate Buffer saline</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
R_α	Receptor alfa
SFB	Soro fetal bovino
TBS	<i>Tris Buffer Saline</i>
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TGF-β	Fator de crescimento transformador-beta
TNF	Fator de necrose tumoral
VCAM	Molécula de adesão celular vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Valores de leucócitos (mm ³) no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados e C57/Bl6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.	35
Figura 2: Valores de neutrófilos (mm ³) no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados e C57/Bl6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.	36
Figura 3: Valores de macrófagos (mm ³) no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados e C57/Bl6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.	38
Figura 4: Níveis de IL-1 β (pg/mL) no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados e C57/Bl6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.	40
Figura 5: Níveis de IL-6 (pg/mL) no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados e C57/Bl6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.	42
Figura 6: Níveis de MIP-2 (pg/mL) no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados e C57/Bl6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.	43
Figura 7: Correlação entre os valores de leucócitos e neutrófilos no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados e C57/Bl6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita ou crisotila.	44
Figura 8: Níveis de IL-1 β (pg/mL) no sobrenadante da cultura de células mesoteliais após exposição aos controles, RPMI ou wolastonita e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.	47

Figura 9: Níveis de IL-6 (pg/mL) no sobrenadante da cultura de células mesoteliais após exposição aos controles, RPMI ou wolastonita e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.	48
Figura 10: Níveis de MIP-2 (pg/mL) no sobrenadante da cultura de células mesoteliais após exposição aos controles, RPMI ou wolastonita e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.	49
Figura 11: Porcentagem de células mesoteliais em apoptose após exposição aos controles, RPMI ou wolastonita e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.	51
Figura 12: Porcentagem de células mesoteliais em necrose após exposição aos controles (RPMI ou wolastonita) e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.	52
Figura 13: Expressão do R α PDGF (/1000 μ m de pleura) em fragmentos de pleura visceral de camundongos geneticamente selecionados e C57/Bl6 após injeção intrapleural de asbesto crocidolita ou crisotila ou PBS.	55

RESUMO

Acencio MMP. Resposta comparativa pleural *in vivo* e do mesotélio *in vitro* à exposição por diferentes fibras de asbesto [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 82p.

Os produtos derivados de asbesto são amplamente utilizados pelo setor industrial, sendo descritas diversas doenças relacionadas à sua exposição, entre elas, o tumor primário da pleura, ou mesotelioma. O mecanismo fisiopatológico da lesão pelas fibras de asbesto no espaço pleural ainda não está totalmente estabelecido. Entre os fatores possivelmente implicados estão os efeitos provocados por uma resposta inflamatória com migração celular e liberação de mediadores moleculares levando à necrose, apoptose e alterações na proliferação e fibrogênese. No entanto, existem dificuldades no estudo da resposta *in vivo* ao asbesto, principalmente em virtude da população multicelular da cavidade pleural. Neste sentido, tem sido preconizado na literatura o estudo envolvendo animais geneticamente modificados ou selecionados, a fim de melhor compreender o papel das diversas populações envolvidas neste processo. Neste trabalho, tivemos como objetivo estudar comparativamente a resposta inflamatória aguda no líquido pleural e em células mesoteliais em cultura expostas a diferentes fibras de asbesto. Para tanto, animais controle e geneticamente selecionados para alta (AIR max) e baixa (AIR min) resposta inflamatória, e células mesoteliais em cultura foram expostas às fibras de asbesto crocidolita ou crisotila. Após 4, 24 ou 48 horas foram avaliadas a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e MIP-2. Adicionalmente, no modelo *in vivo* foi avaliado o perfil celular do líquido pleural e a expressão do R α PDGF em

fragmentos de pleura, e no modelo *in vitro* a resposta celular de apoptose e necrose. Como resultados, as fibras de asbesto crocidolita e crisotila produziram, em animais AIR max, uma elevação significativa no líquido pleural de leucócitos, neutrófilos e da IL-1 β em comparação aos controles e aos animais AIR min. Entretanto, não houve diferença no número de macrófagos, IL-6 e MIP-2. As células mesoteliais em cultura expostas tanto às fibras crocidolita quanto crisotila apresentaram elevados índices de apoptose e necrose e da produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e MIP-2 quando comparadas aos controles. Houve forte correlação das citocinas MIP-2 e IL-1 β em cultura com os níveis no líquido pleural para ambas as fibras estudadas. Foi demonstrado, para ambas as fibras, uma forte expressão do R α PDGF na superfície pleural tanto nos animais com alta quanto com baixa resposta inflamatória quando comparado aos controles. Como conclusão, caracterizamos o perfil da resposta inflamatória aguda a diferentes fibras de asbesto em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, contribuindo para a melhor compreensão do mecanismo de agressão celular secundário a este material de uso comercial tão freqüente.

Descritores: 1. Amiantos serpentininas, 2. Amianto crocidolita, 3. Inflamação, 4. Apoptose, 5. Mesotelioma, 6. Modelos animais

SUMMARY

Acencio MMP. Comparison of in vivo pleural response and in vitro mesothelial response to different asbestos fibers [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2006. 82p.

Asbestos-derived products are used thoroughly by industry. Several diseases related to asbestos exposition have been described, among them the primary tumor of the pleura mesothelioma. The mechanisms by which asbestos fibers produce injury to the pleural space are not clear. Among the factors possibly implicated are the effects secondary to an inflammatory response characterized by cellular migration and the release of molecular mediators leading to necrosis, apoptosis, cellular proliferation and fibrogenesis. However, it is difficult to characterize the cellular response in vivo, mainly by virtue of the multi-cellular population present into the pleural cavity. Therefore, studies involving animals genetically modified or genetically selected have been proposed in the literature, in order to better understand the role of the several cellular populations involved in this complex process. In this study, our objective was to determine the inflammatory response of the pleural fluid and compare to the response of cultured mesothelial cells exposed to different asbestos fibers. Controls and mice genetically selected for high (AIR max) or low (AIR min) inflammatory response as well as mice cultured mesothelial cells were treated to crocidolite or chrysotile asbestos fibers. After 4, 24 or 48 hours the production of the cytokines IL-1 β , IL-6 and MIP-2 were analyzed. In addition, the in vivo cellular profile of the pleural fluid and the α PDGF expression in the pleura fragments was documented. In parallel, the in vitro mesothelial cellular response of apoptosis and necrosis

was quantified. Both asbestos fibers produced in AIR max mice a significant elevation in the pleural fluid total leukocytes, neutrophils and IL-1 β levels in comparison to the controls and AIR min animals. However, no difference was found in the macrophage number, IL-6 and MIP-2 levels. Cultured mesothelial cells had a high apoptosis, necrosis, IL-1 β , IL-6 and MIP-2 levels in comparison to the controls when exposed to either crocidolite or chrysotile. MIP-2 and IL-1 β levels in cultured mesothelial cells strongly correlated with the levels of the pleural fluid for both fibers. In addition, a pronounced expression of R α PDGF in the pleural surface was demonstrated in both high and low inflammatory selected mice when compared to the controls. In conclusion, we characterized the acute inflammatory response to the asbestos fibers crocidolite and chrysotile in an in vivo and in vitro experimental model, aiming to contribute to better understand the mechanism of cellular aggression secondary to this particulate material of such frequent commercial use.

Descriptors: 1. Serpentine asbestos, 2. Crocidolite asbestos, 3. Inflammation, 4. Apoptosis, 5. Mesothelioma, 6. Animal models

INTRODUÇÃO

Amianto (latim) ou asbesto (grego) são denominações dadas a um minério, derivado da sílica, muito utilizado pelo setor industrial. Um expressivo número de doenças do aparelho respiratório tem sido atribuído à exposição ao asbesto, razão pela qual esse minério tem sido intensivamente estudado devido, principalmente, ao seu efeito citotóxico e genotóxico¹.

Como uma das principais conseqüências da inalação e deposição das fibras de asbesto na via respiratória encontra-se o mesotelioma, um tumor primário da pleura de elevados índices de morbi-mortalidade e que tem sido descrito de forma cada vez mais freqüente.

1 – Epidemiologia

Mais de 30 milhões de toneladas de amianto, em suas várias formas, foram minados no último século. O amianto é considerado um dos perigos ambientais mais prevalentes no mundo, estando presente em mais de 3.000 produtos fabricados².

As formas de asbesto amosita e crocidolita, por serem consideradas as mais prejudiciais à saúde, vêm sendo proibidas em vários países como França, Itália e Alemanha. A partir desta proibição, o asbesto crisotila tornou-se o mais importante comercialmente, respondendo por mais de 90% da produção mundial atual³. No Brasil, cerca de 25.000 trabalhadores são expostos ao asbesto nos vários segmentos da indústria e na mineração.

Os efeitos da exposição ao asbesto são a asbestose, as placas pleurais, o câncer de pulmão e o mesotelioma de pleura e peritônio⁴. O risco

dos efeitos tóxicos do asbesto aumenta linearmente com a exposição cumulativa e com o tempo desde a primeira exposição⁵.

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC)⁶, da Organização Mundial da Saúde, classifica o amianto como definitivamente carcinogênico para os humanos, com base na consistência de resultados gerados por pesquisas epidemiológicas. Estudos que relacionam a ocorrência de mesotelioma pleural em mineiros, trabalhadores na indústria de processamento de asbesto e em modelos animais mostraram, de forma inequívoca, a carcinogenicidade dos diferentes tipos de fibra de amianto⁷. Apesar destas evidências, mantém-se no Brasil um vivo debate sobre as constatações dos efeitos do amianto sobre a saúde.

A argumentação dos defensores brasileiros do uso do amianto fixa-se nos riscos distintos atribuídos aos vários tipos de fibras, sugerindo a liberação somente da crisotila devido ao seu suposto baixo potencial carcinogênico^{8,9}. Estes grupos pretendem demonstrar a relativa inocuidade da crisotila, em particular no que se refere ao potencial carcinogênico.

No entanto, vários estudos demonstram que esta fibra pode ser muito prejudicial à saúde humana. Pesquisadores canadenses e britânicos defendem a tese de que a carcinogenicidade atribuída ao asbesto crisotila ocorre devido à "contaminação" por fibras anfibólicas^{10,11}. Esta "hipótese dos anfibólitos" teria nascido da observação de que, em pulmões necropsiados, predominaria a retenção tecidual deste tipo de fibra em detrimento da retenção de crisotila. A partir desta constatação, os autores argumentam que a nocividade e carcinogenicidade das fibras de asbesto pode ser proporcional ao grau de retenção deste material no tecido pulmonar^{12,13}. No

caso do Canadá, acredita-se que a contaminação por tremolita seria provavelmente a responsável pela maioria dos casos de mesotelioma na região mineira de Quebec¹⁴. Alguns trabalhos, no entanto, têm a argumentação contrária à suposta inocuidade da crisotila, confirmando a carcinogenicidade por efeito direto destas fibras, mesmo na sua forma pura^{15,16}.

Muitos estudos foram realizados e trouxeram progressos na compreensão do mecanismo de toxicidade pelas fibras de asbesto. Entretanto, ainda há a necessidade de novas pesquisas, em especial para a compreensão da gênese do mesotelioma, um tumor extremamente agressivo e de prognóstico reservado.

2 – Características do asbesto

As fibras de asbesto são divididas em dois grupos, as serpentinas e os anfibólios, de acordo com sua forma e característica bioquímica da superfície.

Os anfibólios se agrupam em cinco variedades principais: amosita $[(\text{Fe},\text{Mg})_7\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$, crocidolita $[\text{Na}_2(\text{Fe}^{3+})_2(\text{Fe}^{2+})_3\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$, antofilita $[(\text{Mg},\text{Fe})_7\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$, tremolita $[\text{Ca}_2\text{Mg}_5\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$ e actinolita $[\text{Ca}_2(\text{Mg},\text{Fe})^{5-}\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$. As fibras serpentinas têm como principal variedade a crisotila $[\text{Mg}_6\text{SiO}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8]$ ¹⁷.

Acredita-se que, dentre os fatores de toxicidade celular pelo asbesto, estão a morfologia, a composição química e o potencial elétrico da superfície das fibras.

A morfologia da fibra serpentina é ondulada e flexível, e as fibras anfíbolos são mais compactas, retas e pontiagudas, com cerca de 1/3 do comprimento das fibras serpentinas¹⁸.

Um dos aspectos provavelmente implicados na grande propensão das fibras de asbesto em induzirem o tumor primário da pleura, ou mesotelioma, diz respeito às suas propriedades geométricas (fibras longas e finas). Esta característica das fibras favorece sua penetração profunda e resistência à degradação, o que, em termos gerais, promove sua persistência nos tecidos. Em experimento utilizando diferentes tipos de fibras (amiantos, vidro, fibras naturais não-asbesto) na cavidade pleural, as fibras longas e finas foram mais tumorigênicas¹⁹. Entretanto, Suzuki et al.²⁰, estudando as fibras de asbesto encontradas em fragmentos de mesotelioma pleural através de microscopia eletrônica, constataram que 89,4% destas eram fibras curtas (0,25 μm) e finas, concluindo que este tipo de fibra também parece contribuir para a gênese do mesotelioma maligno.

Outra característica importante associada à toxicidade celular pelo asbesto é a composição química das fibras. Neste sentido, as fibras serpentinas têm como importante componente químico o magnésio, e as fibras anfíbolos o ferro. Esses elementos químicos podem interferir na absorção, oxidação e redução das reações bioquímicas, com implicações na resposta celular e patogenicidade das fibras de asbesto²¹.

Em virtude desta composição química variável, acredita-se que o potencial elétrico gerado na superfície das fibras de asbesto seja um dos responsáveis pela elevada reatividade biológica deste material. Neste sentido, os asbesto crocidolita e amosito, considerados como os mais tóxicos, apresentam fibras com carga elétrica negativa na superfície, enquanto o asbesto crisotila, comumente encontrado nas minas brasileiras, tem carga positiva.

A carga elétrica também influencia na adsorção de diferentes proteínas presentes no meio de interação das fibras de asbesto. Jaurand et al.²² e Boylan et al.²³ descreveram que as fibras de amianto podem ser adsorvidas em proteínas e fosfolípidos, o que contribui para a internalização do asbesto nas células e a ocorrência de seus efeitos tóxicos.

A superfície das fibras de asbesto é dinâmica e complexa e pode ser modificada após a adsorção de proteínas e outras macromoléculas. Elementos como o magnésio da fibra de asbesto crisotila ou o ferro da fibra crocidolita ou amosita, podem ser mobilizados intra ou extracelularmente, mediando a toxicidade destas fibras por mudança de carga da superfície ou reações de redox^{21,24}. Como exemplo, o magnésio das fibras crisotila pode mudar sua carga de superfície de positiva para negativa, alterando seu potencial tóxico²⁵. O ferro dos anfibólios, ao entrar em contato com as proteínas, macromoléculas ou com as células mesoteliais, pode produzir reações de oxidação, aumentando seu potencial tóxico.

3 – Fisiopatologia da agressão mesotelial pelo asbesto

Após a inalação, as fibras de asbesto podem migrar e produzir, além de lesões ao epitélio brônquico e ao alvéolo, alterações nas células mesoteliais. Sabe-se que a citotoxicidade na célula mesotelial pode ser de 10 a 100 vezes maior que a das células epiteliais ou de fibroblastos²⁶. Porém o mecanismo exato de agressão das células mesoteliais pelo asbesto ainda não está bem estabelecido.

Estudos têm demonstrado que as fibras de asbesto parecem interagir com as células mesoteliais por mecanismos diretos ou indiretos. No entanto, ainda não está claro se as fibras que iniciam o mesotelioma necessitam de translocação para o espaço pleural ou podem agir a partir do parênquima pulmonar subpleural, seja por contato direto com as células mesoteliais ou por via de mediadores inflamatórios produzidos como resposta à presença deste material.

Estudos experimentais demonstraram a translocação de fibras do pulmão, após inalação, para a cavidade pleural. Em humanos, foram identificadas fibras de amianto em áreas de antracose da pleura parietal²⁷. Numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* também demonstraram que fibras de asbesto podem atingir a pleura e serem internalizadas pelas células mesoteliais, levando o mesotélio exposto a um microambiente reativo caracterizado por fenômenos de inflamação e proliferação mesotelial²⁸.

Os efeitos indiretos provocados pelas fibras de asbesto podem ser constatados pela observação da liberação de diversos mediadores inflamatórios relacionados à atividade do infiltrado leucocitário local. Esta

resposta inflamatória intensa e persistente, caracterizada por migração leucocitária e liberação de mediadores moleculares ocasionando dano celular, proliferação, apoptose e fibrinogênese, foi demonstrada em estudos experimentais em modelo animal²⁹.

Finalmente, o papel da célula mesotelial na orquestração da resposta inflamatória pelo asbesto parece ser fundamental. As células mesoteliais são metabolicamente ativas e estão diretamente envolvidas nos processos de organização e recrutamento dos leucócitos na inflamação pleural que ocorre na fase inicial da resposta celular à agressão pelas fibras de asbesto. Para que os leucócitos sejam atraídos para o local de inflamação, quatro eventos básicos parecem ser necessários³⁰:

(I) o sítio precisa ser um local de ativação;

(II) células residentes precisam ser ativadas e sinais gerarem o início da resposta;

(III) deve haver um gradiente quimiotático para dirigir os leucócitos para o local de inflamação;

(IV) a expressão de moléculas de adesão deve ser regulada para permitir migração de leucócitos e transmigração para o espaço seroso.

As fibras de asbesto, presentes na cavidade pleural, promovem uma resposta inflamatória caracterizada pela liberação de citocinas e quimiocinas pelas células mesoteliais³¹. Como característica, a secreção de quimiocinas pelas células mesoteliais parece ser polarizada, promovendo uma migração transmesotelial dirigida de neutrófilos e monócitos³². Este fenômeno produz uma afluência volumosa de leucócitos do compartimento vascular para o espaço pleural, iniciando a cascata de eventos inflamatórios³³.

O movimento de leucócitos da circulação para o local de inflamação é facilitado pela expressão de integrinas e moléculas de adesão. As células mesoteliais expressam várias moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular (VCAM), que atuam na organização e na promoção do movimento de leucócitos nas células endoteliais dos capilares e na migração para o sítio da inflamação³⁴. Produzem também fator de crescimento e transformação beta (TGF- β), que atua na função de estímulo e proliferação celular para a própria célula mesotelial (efeito autócrino), além de promover o estímulo para a produção de diferentes componentes de matriz extracelular³⁵.

Além das quimiocinas e citocinas, as células mesoteliais metabolicamente ativas também participam da inflamação em resposta ao asbesto liberando outros mediadores pró e anti-imunomoduladores, como o óxido nítrico, as espécies reativas de nitrogênio e oxigênio e as moléculas da matriz extracelular³¹.

3.1 – Mediadores inflamatórios envolvidos na agressão pelo asbesto:

Citocinas

As citocinas são proteínas reguladoras das respostas inflamatórias e imunes, e geralmente agem de maneira autócrina ou parácrina³⁶. Atuam, principalmente, no controle da intensidade da resposta imune por ação na ativação, proliferação e diferenciação de outras células para a produção de anticorpos ou secreção de outras citocinas. Com papel central no processo

inflamatório, situam-se o fator de necrose tumoral (TNF) e as interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8.

3.1.1 – Interleucina-1 (IL-1)

A IL-1 foi inicialmente definida como um polipeptídeo derivado de fagócitos mononucleares. A produção da IL-1 pode ser desencadeada por produtos bacterianos como lipopolissacárides de parede bacteriana (LPS), por citocinas derivadas de macrófagos, ou pelo contato com as células T CD4+. Sua principal função é mediar a resposta inflamatória aguda.

Existem duas formas principais de IL-1, designadas por IL-1 α e IL-1 β , produtos de dois diferentes genes. A maioria da atividade de IL-1 encontrada na circulação é devido à IL-1 β ³⁶.

Os efeitos biológicos desta citocina dependem da quantidade de IL-1 liberada. Em baixas concentrações, sua principal função é mediar a resposta inflamatória local. Como exemplo, a IL-1 age sobre as células endoteliais para promover a coagulação e aumentar a expressão das moléculas de superfície que agem como mediadoras da adesão leucocitária. Neste sentido, a IL-1 não ativa diretamente os leucócitos envolvidos na inflamação, tal como neutrófilos, porém faz com que os fagócitos mononucleares e outras células (células endoteliais e mesoteliais) sintetizem quimiocinas que ativam indiretamente os leucócitos³⁶.

A investigação da expressão de TNF e IL-1 em modelos animais de exposição ao asbesto demonstra aumento precoce destes mediadores inflamatórios precedendo a inflamação e fibrose³⁷.

3.1.2 – Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é produzida por diferentes tipos celulares. A principal fonte *in vivo* são monócitos estimulados, fibroblastos e células endoteliais. A IL-6 é produzida freqüentemente em paralelo com as citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α , tendo um papel importante na indução de reações de fase aguda^{38,39}.

Mossman e Churg⁴⁰ descreveram que as células mesoteliais expostas ao asbesto produzem uma persistente resposta inflamatória pela geração de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-6 e IL-8.

Como fator relevante foi constatado que a IL-6, IL-1 e TNF são produzidas durante o curso do mesotelioma maligno, através da produção diretamente por células mesoteliais malignas, ou indiretamente em resposta ao crescimento tumoral. Esses fatores podem contribuir para as manifestações clínicas e patológicas desta doença⁴¹.

Adicionalmente, um grupo de citocinas pró-inflamatórias conhecidas como quimiocinas, que incluem a IL-8 e a proteína inflamatória macrofágica-2 (MIP-2), foi implicado como contribuinte fundamental à resposta inflamatória ao asbesto.

3.1.3 – Proteína inflamatória macrofágica-2 (MIP-2)

A MIP-2 é uma quimiocina produzida por uma variedade de tipos celulares, incluindo células imunes e não-imunes. A MIP-2 tem atividade quimiotática para células como neutrófilos, monócitos e linfócitos. Já foi demonstrado que anticorpos anti-MIP-2 atenuam a infiltração de neutrófilos normalmente presentes na inflamação³⁷.

Em estudo *in vitro*, foi demonstrada a expressão de MIP-2 como resultado direto da exposição por partículas do asbesto crocidolita. Neste mesmo estudo foi demonstrado que o gene promotor de MIP-2 em ratos contém um sítio para o fator de transcrição NFκB, crítico para conferir responsividade de células epiteliais pulmonares a partículas de crocidolita, regulando vários genes que codificam para proteínas envolvidas em respostas inflamatórias e imunes⁴².

3.1.4 – Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

Diversos estudos sugerem um papel relevante do PDGF como fator carcinogênico no mesotelioma^{43,44}. O mecanismo pelo qual o PDGF facilita a gênese tumoral ainda é desconhecido. Estudos demonstram uma ação controversa deste marcador *in vivo* e *in vitro*: o PDGF tem efeito antiproliferativo *in vitro* e de estímulo do tumor *in vivo*, sugerindo uma regulação parácrina envolvendo possivelmente outras células do sistema imune⁴⁵.

O PDGF é uma proteína heterodimérica constituída das cadeias distintas -A e -B, que formam os dímeros AA, BB ou AB. Estas unidades exercem seu efeito mitogênico quando se ligam aos receptores de membrana PDGF- α (AA, BB ou AB) ou PDGF- β (BB). O PDGF-AA em níveis elevados induz potente efeito mitogênico em células mesoteliais humanas⁴⁵. Estudos demonstram que a expressão aumentada do PDGF-AA é acompanhada da elevação da expressão de seu respectivo receptor PDGF- α ⁴⁶.

Além do recrutamento de outras células e liberação de mediadores inflamatórios, as células mesoteliais sofrem várias alterações importantes como consequência da exposição às fibras de asbesto.

Em estudos *in vitro* com células mesoteliais foi demonstrado que o asbesto provoca a inibição do crescimento celular, produzindo um ciclo celular arrastado²², rompimento de mitose⁴⁷, indução de dano ao DNA e cromossômico⁴⁸, rompimento da membrana celular consistente com morte necrótica⁴⁹, e morte celular por apoptose⁵⁰.

A apoptose induzida pelo asbesto tem sido extensivamente estudada, uma vez que a falha deste mecanismo de resposta celular pode estar implicado na gênese do mesotelioma.

3.2 – Alterações celulares secundárias à agressão pelo asbesto:

Apoptose

Apoptose, ou morte celular programada, é um fenômeno biológico complexo regulado por diversas vias bioquímicas que convergem para a ativação de proteases denominadas caspases⁵¹. A apoptose é um processo fisiológico universal responsável pela manutenção da homeostase dos tecidos através de um balanço entre a proliferação e a morte celular^{52,53}.

A célula, ao sofrer apoptose, perde sua propriedade de adesão e destaca-se das células vizinhas, desintegrando-se de maneira ordenada. Por ser um mecanismo geneticamente orientado, a seqüência de eventos na apoptose se inicia com a fragmentação do DNA e a condensação do núcleo em “micronúcleos”, nos quais os cromossomos se encontram fragmentados. A seguir, a célula em apoptose se fragmenta em vários corpos apoptóticos. Durante a apoptose a membrana celular permanece mecanicamente íntegra, porém funcionalmente alterada, expondo em sua superfície a fosfatidilserina, o que torna as células reconhecíveis para a fagocitose⁵². É importante ressaltar que uma célula apoptótica nunca libera o seu conteúdo citosólico, porque sua membrana não se rompe.

Por outro lado, a necrose é um processo no qual as células submetidas à exposição por um agente tóxico perdem a continência da membrana celular, permitindo a liberação do conteúdo citosólico para o meio extracelular. Posteriormente, substâncias solúveis são secretadas pelas células adjacentes ou pelas próprias células que sofrem a necrose⁵², provocando a atração de células do sistema imune à área afetada,

resultando na produção de uma resposta inflamatória característica deste tipo de morte celular.

Embora a apoptose das células mesoteliais possa ser detectada facilmente *in vitro*, em virtude da facilidade de isolamento e crescimento do mesotélio em cultura, em modelos experimentais *in vivo* a identificação e quantificação deste fenômeno pode se tornar difícil. Diversas razões contribuem para este fato, sendo a mais importante a dificuldade de isolamento do pequeno número de células mesoteliais da população multicelular inflamatória do líquido pleural. Além disso, a quantificação pode ser subestimada, pois *in vivo* as células em apoptose são rapidamente ingeridas por fagócitos.

Muitos estudos identificaram a apoptose de células mesoteliais *in vitro*, em particular depois da exposição às fibras de asbesto⁵⁴. Após fagocitose das fibras, através do efeito mecânico direto, ou indiretamente através da liberação de radicais oxidantes, a célula mesotelial sofre um dano cromossômico irreparável que culmina em morte celular.

O maior interesse no estudo da apoptose da célula mesotelial está na compreensão dos mecanismos de gênese do mesotelioma. Acredita-se que o efeito das fibras de asbesto na célula mesotelial se faça em longo prazo (em geral, maior que 20 anos), período em que a inflamação se perpetua, levando ao acúmulo de mutações que podem permitir a inibição do mecanismo de apoptose. Neste sentido, a principal hipótese para a gênese do mesotelioma é a da falha no mecanismo de apoptose da célula mesotelial, com produção de células com anormalidades genéticas capazes de resistir à morte celular e, portanto, capazes de gerar a neoplasia.

A deleção e remoção de DNA celular danificado através de apoptose reduzem a probabilidade de uma evolução para malignidade. Assim, a inibição da apoptose induzida pelo amianto pode ser crucial para a gênese do tumor.

O papel da apoptose protegendo contra o câncer foi demonstrado em estudos do oncogene c-myc. Quando o c-myc é ativado, células morrem por apoptose e tumores não se formam. Em situações em que ocorre a inibição do c-myc, como por exemplo, na super expressão da proteína BCL-xL, pode ocorrer proliferação celular anômala e o desenvolvimento de tumores⁵⁵.

A importância da inibição de apoptose no desenvolvimento do mesotelioma também foi demonstrada por Vaslet et al.⁵⁶ em modelo de camundongos com perda da função de p53 e, presumivelmente, defeito no processo de apoptose. Esses animais desenvolveram tumor significativamente mais rápido do que o tipo selvagem de camundongo.

4 – Camundongos selecionados geneticamente

Vários trabalhos têm utilizado animais geneticamente modificados ou selecionados para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos de diversas doenças.

Na década de 70, estudos com animais selecionados geneticamente para uma determinada resposta imunológica foram iniciados por Biozzi et al.⁵⁷, com o propósito de caracterizar os parâmetros genéticos da fase quantitativa da resposta imune, assim como as modificações

imunocompetentes induzidas pelo processo de seleção gênica. Estas linhagens são constituídas por camundongos selecionados para diferentes respostas na produção de anticorpos contra imunógenos naturais, sendo obtidas através de cruzamentos seletivos bidirecionais.

O processo de seleção bidirecional foi iniciado a partir de uma população geneticamente heterogênea (F_0), composta de camundongos *outbred* albinos e desenvolvidos pelo acasalamento de animais com fenótipos extremos, em gerações sucessivas, até a obtenção de duas linhagens com fenótipos opostos de alta e baixa produção de anticorpos. A resposta progressiva à seleção demonstra o acúmulo, em cada linhagem, de múltiplos genes dotados de efeitos aditivos sobre a produção de anticorpos. No limite de seleção (divergência máxima interlinhagens) admite-se que as linhagens sejam homozigotas para todos os alelos relacionados à definição do caráter selecionador.

Stiffel et al.⁵⁸ selecionaram geneticamente duas linhagens de camundongos que produzem alta resposta inflamatória aguda (AIR max) ou baixa resposta inflamatória (AIR min). Essa seleção foi baseada no influxo de leucócitos e concentração plasmática em exsudatos produzidos pela injeção de géis de poliacrilamida por via subcutânea.

Em virtude da necessidade de uma compreensão mais adequada da resposta celular à exposição ao amianto, questionamos se a intensidade da resposta inflamatória pode contribuir para as alterações observadas na fase aguda da exposição a este agente. Para tanto, nos propomos a estudar a resposta a diferentes fibras do asbesto em animais selecionados

geneticamente para alta e baixa resposta inflamatória, bem como determinar as alterações do mesotélio *in vitro* exposto a estes agentes.

OBJETIVOS

1. Comparar e correlacionar o perfil celular e os níveis de citocinas inflamatórias no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados após exposição aguda pelas fibras de asbesto crocidolita e crisotila;
2. Determinar e correlacionar os índices de apoptose e necrose em células mesoteliais em cultura após exposição às fibras de asbesto crocidolita e crisotila;
3. Quantificar os níveis de citocinas inflamatórias produzidas pelas células mesoteliais em cultura após exposição às fibras de asbesto crocidolita e crisotila;
4. Correlacionar os valores dos mediadores inflamatórios e das alterações celulares do líquido pleural no modelo *in vivo* com as variáveis do modelo *in vitro*;
5. Comparar a expressão do R α PDGF em fragmentos de pleura de animais geneticamente selecionados após exposição aguda pelas fibras de asbesto crocidolita e crisotila.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pleura do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP, conforme parecer nº 506/03 de 31 de julho de 2003 (Anexo A).

1 – Experimento *in vivo*

1.1 – Animais

Camundongos adultos, selecionados para alta resposta inflamatória (AIR max) e baixa resposta inflamatória (AIR min) (geração 24-26 da seleção bidirecional) (Biozzi, 1979) obtidos do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil) e camundongos C57/Bl6 (Controle) foram divididos em grupos que receberam injeções intrapleurais de fibras de asbesto crocidolita ou crisotila ou o controle de material particulado wolastonita. Como controle de injeção foi utilizado o PBS (*Phosphate Buffer Saline*), agente diluente do material particulado.

1.2 – Grupos

Foram constituídos 4 grupos de 15 animais de cada linhagem que receberam por via intrapleural as diferentes fibras de asbesto e controles conforme indicado:

- a. Asbesto Crocidolita, obtido do *National Institute of Environmental Health and Safety* (Research Triangle Park, NC, USA), que apresenta comprimento médio da fibra de 19 μm (1 a 560 μm). Foi adicionado 3,0 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$;
- b. Abestos Crisotila, obtido da mina brasileira Minaçu – GO, com comprimento médio de 27 μm (1 a 470 μm). Foi adicionado 3,0 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$;
- c. Wolastonita (NYCO Minerals, Willsboro, NY, USA), uma fibra de cálcio e silicato não patogênica, tanto *in vivo*⁵⁹ quanto *in vitro*⁶⁰ de tamanho semelhante ao crocidolita (média de 12 μm). Como a wolastonita apresenta cerca de metade do número de fibras do crocidolita por grama (120×10^6 fibras/grama), este agente foi utilizado com o dobro da dose da fibra crocidolita por cm^2 da cavidade pleural (6,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$);
- d. PBS (Controle), tampão utilizado como diluente das fibras.

O volume final da solução instilada na cavidade pleural de cada camundongo foi de 0,5 mL, e o tempo de exposição dos agentes foi de 4, 24 ou 48 horas.

1.3 – Preparação do asbesto

As fibras crocidolita, crisotila e wolastonita foram diluídas em PBS e submetidas ao processo de sonicação (450 sonifier; Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA) com força de 60 W por 5 segundos para adequada separação das fibras. Após homogenização da amostra por 10 minutos, a solução final foi utilizada na concentração desejada.

1.4 – Injeção intrapleural

Para a injeção intrapleural das diferentes fibras de asbesto ou controles, os camundongos foram anestesiados com uma breve inalação de éter etílico (Merck; Darmstadt, Alemanha).

Posteriormente, o tórax do animal foi preparado para cirurgia asséptica com solução de álcool a 70° (Merck; Darmstadt, Alemanha).

A solução foi injetada no espaço pleural direito, em um ponto lateral do esterno, utilizando-se uma agulha de calibre 23G (Becton-Dickson; Paraná, Brasil), introduzida através da pele até o espaço pleural. Esta agulha encontrava-se conectada a uma seringa de 3 mL sem êmbolo, que continha a solução. Ao penetrar no espaço pleural, a pressão negativa intrapleural permitia que todo o volume da solução fosse aspirado para a cavidade. Terminada a instilação, todo o sistema foi imediatamente retirado para prevenir a entrada de ar inadvertidamente na cavidade pleural.

1.5 – Eutanásia e retirada de líquido pleural e tórax dos animais

Após a exposição das fibras nos tempos determinados, os animais foram eutanasiados através da inalação letal de éter etílico (Merck; Darmstadt, Alemanha).

Em seguida, foi realizada uma laparotomia e através do diafragma foi injetado 1mL de PBS para “lavagem” da cavidade pleural (líquido pleural), e o material subdividido em tubos contendo EDTA para realização da citologia global e diferencial, e em tubos secos para dosagem de citocinas.

O tórax foi removido em bloco. Em seguida, os pulmões foram insuflados com formol, através de colocação de um cateter plástico na traquéia, e submergidos em 10% de formalina durante um período mínimo de 48 horas. Após esse período foi realizada a abertura da cavidade pleural e retirados fragmentos de pleura visceral e pulmão do hemitórax direito. Os fragmentos foram colocados em tampão de formol a 10% e processados para realização de blocos para posterior avaliação microscópica.

2 – Experimento *in vitro*

2.1 – Cultura de células mesoteliais de camundongo

Para extração de células mesoteliais de camundongo, foi introduzido tripsina/ EDTA 0,25%/0,5 mM na cavidade pleural dos animais. Após a ação da tripsina por 5 minutos, a suspensão de células mesoteliais que se destacaram da pleura e a tripsina foram colocadas em meio de cultura RPMI 1640 acrescido com 10% de soro fetal bovino (SFB) para neutralização da ação da tripsina sobre as células mesoteliais.

Esse material foi centrifugado, e as células do depósito ressuspensas e colocadas em placas de cultura de 25 cm² contendo meio de RPMI 1640/DMEM 1:1 acrescido de soro fetal bovino (SFB) a 10%, 100 U/mL de penicilina e 100 µg de estreptomicina.

Os experimentos foram iniciados entre a terceira e quarta passagem quando apresentavam crescimento das células e confluência acima de 70% da placa.

2.2 – Grupos

As células em cultura foram expostas às diferentes fibras de asbesto e respectivos controles conforme indicado:

- a. Asbesto Crocidolita → 3,0 µg / cm²;
- b. Asbesto Crisotila → 3,0 µg / cm²;
- c. Wolastonita → 6,0 µg/cm²;
- d. RPMI 1640 (controle negativo);
- e. H₂O₂ 50 µM (controle de apoptose);
- f. H₂O₂ 200 µM (controle de necrose).

As células mesoteliais foram expostas às fibras e controles por 4, 24 ou 48 horas. Após o período de exposição, as células mesoteliais foram processadas para análise da resposta celular através da quantificação da viabilidade, necrose e apoptose, com marcação por imunofluorescência e leitura por citometria de fluxo e imunohistoquímica. O sobrenadante das culturas foi separado para posterior análise de citocinas.

3 – Análises laboratoriais

3.1 – Análise citológica

A citologia do líquido pleural foi realizada através da coloração pelo líquido de Turk para determinação do total de células em câmara de Neubauer, e coradas por Leishman para a determinação do diferencial celular.

As amostras de líquido pleural separadas para a dosagem de citocinas foram centrifugadas a 1.500 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado e armazenado a -80° C para posterior dosagem das citocinas.

3.2 – Imunofluorescência (anexina V e iodeto de propídio)

Após o período de exposição das células mesoteliais em cultura às diferentes fibras e controles, as células que permaneceram aderidas às placas foram destacadas com tripsina/ EDTA a 0,25%/0,5 mM e adicionadas às células contidas no sobrenadante da cultura.

Para quantificação da viabilidade, necrose e apoptose celular foram utilizadas marcações por imunofluorescência direta com annexin V-FITC e iodeto de propídio (Apoptosis detection kit, BD PharMingen, Califórnia, USA), de acordo com o protocolo sugerido no manual do fabricante (Anexo B).

Após a realização da imunofluorescência as células foram analisadas em citômetro de fluxo utilizando o programa CellQuest em até 1 hora após o

preparo. A aquisição da amostra e a leitura foi realizada no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, USA).

3.3 – Imunohistoquímica (TdT FragEL™)

Para efeito de confirmação da ocorrência de apoptose celular das células mesoteliais expostas às fibras de asbesto foi utilizada a técnica de imunohistoquímica.

Após a exposição, foram preparadas lâminas das células mesoteliais, fixadas com solução de formaldeído 4% por 10 minutos e etanol a 80% por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram armazenadas a -20° C para posterior análise.

As lâminas foram expostas ao kit FragEL™ (Oncogene, Massachusetts, USA) para identificação e quantificação comparativa de apoptose. Os detalhes da metodologia de imunohistoquímica das células mesoteliais utilizando-se o TdT FragEL™ podem ser encontrados no Anexo C.

3.4 – Dosagem de citocinas

Foram realizadas as dosagens das citocinas IL-1 β , IL-6 e MIP-2 (R&D Systems; Minneapolis, MN, USA) do sobrenadante das culturas de células mesoteliais e do líquido pleural dos camundongos expostos às fibras e controles.

As citocinas foram medidas pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de acordo com o protocolo sugerido nos manuais dos fabricantes, adaptado para a utilização neste estudo (Anexo D).

A quantificação das citocinas foi realizada por leitura de densidade óptica, utilizando-se um leitor de ELISA (Power Wave; Bio-Tek; Winooski, VT, USA) com filtro de 450 nm. Foi utilizado, uma curva padrão de 7 pontos, um branco e um controle de concentração determinada.

A faixa de detecção para as citocinas estudadas foi de 15,6 a 2000 pg/mL. Quando os valores foram maiores que a faixa de detecção, diluíram-se as amostras e estas foram dosadas novamente para a obtenção dos valores exatos.

3.5 – Imunohistoquímica da pleura

Fragmentos de pulmão direito, incluindo a pleura visceral dos camundongos foram colhidos e submetidos à imunohistoquímica TdT FraGEL™ para demonstração de apoptose e do receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (R α PDGF).

3.5.1 – Apoptose

Fragmentos de parênquima pulmonar, incluindo a pleura visceral, com 3 a 4 μ m de espessura foram desparafinizados e em seguida utilizou-se a mesma metodologia descrita para a quantificação de apoptose por

imunohistoquímica em cultura de células mesoteliais, utilizando-se o kit TdT FragEL™.

3.5.2 – Rα PDGF

Fragmentos de parênquima pulmonar, incluindo a pleura visceral, com 3 a 4 µm de espessura foram desparafinizados e fixados em lâminas para determinação do Rα PDGF por imunohistoquímica utilizando anticorpos monoclonais (R&D Systems; Minneapolis, MN, USA). O título do anticorpo monoclonal foi estabelecido a partir de ajustes com lâminas controles (fornecidas pelo fabricante).

Para marcação e identificação do Rα PDGF utilizou-se a metodologia de imunohistoquímica sugerida pelo fabricante (Anexo E).

A quantificação do Rα PDGF foi realizado através da análise de cinco diferentes campos aleatoriamente selecionados em aumento de 400X. Para a quantificação, foi utilizado o sistema analisador de imagens modelo Leica Q500IW (Leica Imaging Systems Ltda., Heerbrugg, Switzerland), que permite medidas quantitativas geométricas e densitométricas.

A quantidade de Rα PDGF dentro de uma área conhecida de pleura foi expressa em µm², após correção para 1000 µm² de pleura analisada.

4 – Análises estatísticas

Todos os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Para comparação entre as fibras (crisotila e crocidolita) foi utilizado o teste-t de Student quando apresentavam distribuição normal e o teste Mann-Whitney quando apresentavam distribuição não normal.

Na análise comparativa entre as três linhagens de camundongos estudadas foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA). Quando foram detectadas diferenças significativas, os testes foram complementados pelos testes de comparações múltiplas de Tukey ou Dunn.

Na avaliação da correlação entre os achados citológicos, inflamatórios e resposta celular *in vivo*, assim como para a correlação entre os resultados apresentados *in vivo* e *in vitro* em todos os grupos, foi utilizada a correlação de Pearson (dados com distribuição normal) ou a correlação de Spearman (dados com distribuição não normal).

Para todos os testes foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa de computador SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

RESULTADOS

1 – Experimento *in vivo*

Para os experimentos *in vivo* todas as variáveis (citologia e citocinas) apresentaram níveis significativamente menores ($p < 0,001$) nos grupos controles, PBS e material fibrogênico – wolastonita, em comparação com os grupos experimentais crocidolita e crisotila. Os resultados do controle PBS são apresentados na primeira coluna das figuras e, de forma detalhada, no Anexo F.

Os resultados que se seguem serão apresentados, para efeitos práticos, obedecendo a seguinte ordem:

- a) análise comparativa entre as fibras crocidolita x crisotila;
- b) análise comparativa entre as linhagens controle – C57/Bl6, AIR min e AIR max.

1.1 – Análise citológica do líquido pleural

1.1.1 – Total de leucócitos

Na análise comparativa entre as fibras, o líquido pleural mostrou níveis significativamente mais elevados do número total de leucócitos no grupo crocidolita quando comparado com o grupo crisotila somente após 48 horas de exposição em todas as linhagens ($p < 0,05$).

Na comparação das diferentes linhagens, os camundongos AIR max apresentaram número total de leucócitos significativamente mais elevados

do que AIR min e C57/Bl6, após 24 e 48 horas ($p<0,05$) da injeção de fibras crocidolita. Nos animais que receberam a fibra crisotila somente foi observada diferença significativa entre AIR max comparado com AIR min e C57/Bl6 no tempo de 24 horas ($p<0,05$) (Figura 1).

1.1.2 – Neutrófilos

Os neutrófilos foram as células de maior expressão em relação ao total de leucócitos nos animais estudados.

O comportamento dos níveis de neutrófilos no líquido pleural foi semelhante aos níveis de leucócitos, tanto na comparação entre as fibras quanto na comparação entre as linhagens (Figura 2).

Figura 1: Valores de leucócitos (mm^3) no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados e C57/BL6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.

Comparação entre fibras: # $p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita > Crisotila (AIR max, AIR min e C57/BL6 $\rightarrow$ 48 h)

Comparação entre linhagens: * $p < 0,05 \rightarrow$ AIR max > AIR min e C57BL6 (Crocidolita – 24h e 48h)

** $p < 0,05 \rightarrow$ AIR max > AIR min e C57BL6 (Crisotila – 24h)

Figura 2: Valores de neutrófilos (mm^3) no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados e C57/BL6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.

Comparação entre fibras: $\# p < 0,05 \rightarrow \text{Crocidolita} > \text{Crisotila}$ (AIR max, AIR min e C57/BL6 $\rightarrow$ 48 h)

Comparação entre linhagens: $* p < 0,05 \rightarrow \text{AIR max} > \text{AIR min}$ e C57BL6 (Crocidolita – 24h e 48h)

$** p < 0,05 \rightarrow \text{AIR max} > \text{AIR min}$ e C57BL6 (Crisotila – 24h)

1.1.3 – Macrófagos

Quando analisamos os valores de macrófagos no líquido pleural, observamos uma tendência de aumento temporal destas células para ambas as fibras de asbesto em todas as linhagens estudadas.

Na análise comparativa entre as fibras, o número de macrófagos foi significativamente mais elevado no grupo crocidolita quando comparado com o grupo crisotila nas primeiras 4 horas ($p < 0,05$) de exposição em todas as linhagens. Com 24 horas, observamos aumento significativo da fibra crocidolita comparado com a crisotila somente no controle C57/Bl6 ($p < 0,05$).

Na comparação entre as linhagens, não observamos diferenças significativas nos valores de macrófagos para ambas as fibras nos tempos estudados (Figura 3).

Figura 3: Valores de macrófagos (mm^3) no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados e C57/BL6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.

Comparação entre fibras: # $p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita $>$ Crisotila (AIR max, AIR min e C57/BL6 $\rightarrow$ 4h)
$p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita $>$ Crisotila (C57/BL6 $\rightarrow$ 24h)

Comparação entre linhagens: Não apresentaram diferenças significativas

1.2 – Análise dos mediadores inflamatórios no líquido pleural

1.2.1 – Interleucina-1b (IL-1b)

Na análise da IL-1 β no líquido pleural, observamos uma tendência de elevação dos níveis desta citocina até 24 horas no grupo crocidolita, com decréscimo até níveis indetectáveis após 48 horas. Para a fibra crisotila, a IL-1 β elevou-se com 24 horas somente no grupo no AIR max.

Quando comparamos os níveis de IL-1 β entre as fibras, observamos aumento significativo no grupo crocidolita quando comparado com o grupo crisotila no tempo de 24 horas nas linhagens AIR min e C57/Bl6 ($p<0,05$).

Na análise comparativa entre as linhagens, o grupo AIR max apresentou níveis mais elevados de IL-1 β quando comparado com os grupos AIR min e C57/Bl6, somente no tempo de 24 horas para ambas as fibras ($p<0,05$) (Figura 4).

Figura 4: Níveis de IL-1 β (pg/mL) no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados e C57/BL6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.

Comparação entre fibras: # $p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita > Crisotila (AIR min e C57/BL6 $\rightarrow$ 24h)

Comparação entre linhagens: * $p < 0,001 \rightarrow$ AIR max > AIR min e C57BL6 (Crocidolita e Crisotila – 24h)

1.2.2 – Interleucina-6 (IL-6)

Quando analisamos os níveis de IL-6 no líquido pleural, observamos um aumento significativo nas primeiras 4 horas, com decréscimo temporal para ambas as fibras de asbesto em todas as linhagens estudadas quando comparado com 24 e 48 horas.

Na análise dos níveis de IL-6 entre as fibras, observamos aumento significativo no grupo crocidolita quando comparado com o grupo crisotila no tempo de 48 horas para todas as linhagens estudadas ($p < 0,05$).

Na comparação entre as linhagens, não observamos diferenças significativas dos níveis de IL-6 no líquido pleural em todos os tempos do estudo (Figura 5).

1.2.3 – Proteína inflamatória macrofágica-2 (MIP-2)

Na análise dos níveis de MIP-2, observamos uma tendência de elevação quando comparamos 4 horas com os demais tempos estudados para ambas as fibras estudadas.

Quando comparamos os níveis de MIP-2 entre as fibras de asbesto e entre as linhagens, não observamos diferenças significativas dos índices desta citocina no líquido pleural em todos os tempos de estudo (Figura 6).

Figura 5: Níveis de IL-6 (pg/mL) no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados e C57/BL6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.

Comparação entre fibras: # $p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita > Crisotila (AIR max, AIR min e C57/BL6 $\rightarrow$ 48h)

Comparação entre linhagens: Não apresentaram diferenças significativas

Figura 6: Níveis de MIP-2 (pg/mL) no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados e C57/Bl6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.

Comparação entre fibras e entre linhagens: sem diferenças significativas

1.3 – Correlações no modelo *in vivo*

1.3.1 – Leucócitos totais e neutrófilos

Quando correlacionamos os valores de leucócitos totais e neutrófilos no líquido pleural, observamos uma forte correlação tanto para as fibras de asbesto crocidolita ($R = 0,956$; $p < 0,001$) quanto para as de crisotila ($R = 0,924$; $p < 0,001$) (Figura 7).

Figura 7: Correlação entre os valores de leucócitos e neutrófilos no líquido pleural de camundongos geneticamente selecionados e C57/Bl6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita ou crisotila.

1.3.2 – Macrófagos, MIP-2 e IL-6

Observamos ainda correlações significativas, porém fracas, entre os níveis de MIP-2 e o número total de macrófagos para as fibras crocidolita ($R = 0,493$; $p < 0,05$) e crisotila ($R = 0,363$; $p < 0,05$).

Foram também observadas correlações significativas e negativas entre os níveis de MIP-2 e IL-6, com $R = -0,695$ para a fibra crocidolita e $R = -0,359$ para a fibra crisotila ($p < 0,05$).

A IL-6 também apresentou correlação significativa com o total de macrófagos observados no líquido pleural, para ambas as fibras crocidolita e crisotila. Essa correlação foi negativa com $R = -0,784$ para a fibra crocidolita e $R = -0,626$ para a fibra crisotila ($p < 0,05$).

2 – Experimento *in vitro*

2.1 – Análise das citocinas no sobrenadante da cultura

2.1.1 – Interleucina-1b (IL-1b)

Na análise dos níveis de IL-1 β no sobrenadante da cultura de células mesoteliais expostas às fibras de asbesto, observamos um perfil semelhante desta citocina ao do líquido pleural, com um pico após 24 horas e decréscimo posterior.

Quando comparamos os níveis de IL-1 β no sobrenadante da cultura, observamos aumento significativo somente no tempo de 24 horas para a fibra crocidolita em relação à crisotila.

Em todos os tempos estudados, as fibras crocidolita e crisotila produziram níveis de IL-1 β significativamente mais elevados do que os controles, RPMI e wolastonita ($p < 0,05$), com exceção do tempo de 48 horas para a fibra crisotila (Figura 8).

Figura 8: Níveis de IL-1 β (pg/mL) no sobrenadante da cultura de células mesoteliais após exposição aos controles, RPMI ou wolastonita e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.

Comparação entre fibras: * $p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita > Crisotila $\rightarrow$ 24h

2.1.2 – Interleucina-6 (IL-6)

Quando analisamos os níveis de IL-6 no sobrenadante da cultura de células mesoteliais expostas aos diferentes tipos de asbesto, observamos um aumento temporal significativo ($p < 0,05$) para ambas as fibras.

Na análise comparativa dos níveis de IL-6 entre as fibras, observamos níveis mais elevados no sobrenadante de cultura exposto à fibra crocidolita comparado com a fibra crisotila em todos os tempos estudados (Figura 9).

Quando comparamos os controles, RPMI e wolastonita, ambos apresentaram níveis significativamente menores de IL-6 do que os grupos experimentais crocidolita e crisotila ($p < 0,001$). O controle wolastonita apresentou níveis significativamente mais elevados de IL-6 do que o controle RPMI ($p < 0,05$) em todos os tempos estudados.

Figura 9: Níveis de IL-6 (pg/mL) no sobrenadante da cultura de células mesoteliais após exposição aos controles, RPMI ou wolastonita e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.

Comparação entre fibras: * $p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita > Crisotila $\rightarrow$ 4h, 24h e 48h

2.1.3 – Proteína inflamatória macrofágica-2 (MIP-2)

O comportamento temporal dos níveis de MIP-2 foi semelhante ao observado com a IL-6 no sobrenadante da cultura de células mesoteliais expostas às fibras de asbesto.

Quando comparamos as fibras crocidolita e crisotila, observamos um aumento significativo dos níveis MIP-2 para a fibra crocidolita em todos os tempos de estudo ($p < 0,05$) (Figura 10).

Na análise comparativa dos níveis de MIP-2 entre os controles e as fibras de asbesto estudadas, observamos níveis significativamente mais elevados no sobrenadante das culturas expostas ao asbesto crocidolita e crisotila quando comparados com os controles, RPMI e wolastonita ($p < 0,001$). Não observamos diferenças significativas entre os controles.

Figura 10: Níveis de MIP-2 (pg/mL) no sobrenadante da cultura de células mesoteliais após exposição aos controles, RPMI ou wolastonita e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.

Comparação entre fibras: * $p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita $>$ Crisotila $\rightarrow$ 4h, 24h e 48 h

2.2 – Alterações celulares após exposição às fibras

2.2.1 – Apoptose

Na análise dos índices de apoptose na cultura de células mesoteliais, observamos um aumento temporal significativo para ambas as fibras de asbesto ($p < 0,05$).

Quando analisamos comparativamente os índices de apoptose entre as fibras, observamos valores mais elevados de apoptose nas células expostas a fibra crocidolita comparado com a fibra crisotila nos tempos de 24 e 48 horas ($p < 0,05$) (Figura 11).

Na análise comparativa dos índices de apoptose entre os controles e as fibras de asbesto crocidolita e crisotila, observamos índices significativamente mais elevados nos grupos expostos aos diferentes tipos de asbesto quando comparados com os controles, RPMI e wolastonita ($p < 0,05$). Não observamos diferenças significativas entre os controles.

Figura 11: Porcentagem de células mesoteliais em apoptose após exposição aos controles, RPMI ou wolastonita e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.

Comparação entre fibras: * $p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita > Crisotila $\rightarrow$ 24h e 48h

2.2.2 – Necrose

Quando analisamos os índices de necrose, observamos um aumento significativo dos índices no tempo de 24 horas quando comparado a 4 horas para ambas as fibras ($p < 0,05$), com estabilização no tempo de 48 horas.

Na análise comparativa dos índices de necrose entre as diferentes fibras de asbesto, não observamos diferenças significativas em todos os tempos de estudo (Figura 12).

Os índices de necrose das fibras de asbesto crocidolita e crisotila foram significativamente mais elevados quando comparados com os controles, RPMI e wolastonita ($p < 0,05$). Não observamos diferenças significativas entre os controles.

Figura 12: Porcentagem de células mesoteliais em necrose após exposição aos controles (RPMI ou wolastonita) e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.

2.3 – Correlações das alterações celulares e mediadores inflamatórios do modelo *in vitro*

Quando correlacionamos os valores de necrose e apoptose das células mesoteliais com os mediadores inflamatórios das culturas expostas às diferentes fibras de asbesto, observamos fortes correlações entre os índices de apoptose e MIP-2 ($R = 0,926$; $p < 0,05$), apoptose e IL-6 ($R = 0,983$; $p < 0,05$), necrose e MIP-2 ($R = 0,799$; $p < 0,05$) e necrose e IL-6 ($R = 0,894$; $p < 0,05$). Entretanto, os níveis de IL-1 β não se correlacionaram com as alterações celulares.

3 – Correlações entre os modelos *in vivo* e *in vitro*

Quando correlacionamos os mediadores inflamatórios do modelo *in vivo* e *in vitro*, observamos correlações significativas dos níveis de MIP-2 ($R = 0,708$; $p < 0,05$) e dos níveis de IL-1 β ($R = 0,742$; $p < 0,05$). Entretanto não observamos correlação significativa entre os níveis de IL-6 do modelo *in vivo* e *in vitro*.

4 – Análise da expressão do R α PDGF

Na análise da expressão do R α PDGF em fragmentos de pleura visceral de camundongos expostos às fibras de asbesto, observamos uma expressão significativamente menor com 4 horas quando comparado com 24 e 48 horas ($p < 0,001$). Quando comparamos os tempos de 24 e 48 horas, observamos somente uma tendência de aumento para ambas as fibras de asbesto.

Na análise comparativa dos valores de R α PDGF entre as fibras, observamos uma tendência de índices mais elevados no grupo crocidolita comparado com a fibra crisotila, porém sem diferença estatística (Figura 13).

Na análise comparativa entre as linhagens, não observamos diferenças significativas entre os índices do R α PDGF para ambas as fibras estudadas.

Figura 13: Expressão do $R\alpha$ PDGF (/1000 μ m de pleura) em fragmentos de pleura visceral de camundongos geneticamente selecionados e C57/Bl6 após injeção intrapleural de asbesto crocidolita ou crisotila ou PBS.

Comparação entre fibras e entre linhagens: sem diferenças significativas

5 – Demonstração da expressão do R α PDGF

Figura 14: Expressão do R α PDGF em fragmentos de pleura visceral de camundongos após a injeção intrapleural de asbesto crocidolita ou crisotila ou PBS. Aumento 200x.

6 – Demonstração de apoptose no fragmento de pleura

Figura 15: Marcação de apoptose por imunohistoquímica em fragmentos de pleura visceral de camundongos após a injeção intrapleural de asbesto crocidolita ou crisotila.

7 – Demonstração de apoptose na cultura de células mesoteliais

Figura 16: Marcação de apoptose por imunohistoquímica TdT FragEL em cultura de células mesoteliais de camundongos após exposição de asbesto, crocidolita ou crisotila ou controles.

DISCUSSÃO

A exposição ao asbesto tem sido associada a várias doenças pulmonares e pleurais. Como uma das principais consequências da inalação e deposição das fibras de asbesto na via respiratória encontra-se o tumor primário da pleura, ou mesotelioma. Embora numerosos estudos tenham sido realizados no sentido de esclarecer o mecanismo de toxicidade pelas fibras de asbesto, ainda há a necessidade de novas pesquisas, em especial para compreensão da gênese do mesotelioma, um tumor considerado extremamente agressivo e de prognóstico limitado.

Em nosso estudo desenvolvemos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* na tentativa de compreender o processo fisiopatológico que ocorre na fase aguda após a exposição ao asbesto.

No modelo *in vivo* nos propusemos identificar a resposta celular e dos mediadores inflamatórios da fase inicial do processo que ocorre após a instilação das fibras de asbesto no espaço pleural. Para isso, utilizamos animais selecionados geneticamente para alta e baixa resposta inflamatória no intuito de caracterizar o perfil da resposta de fase aguda.

Além disso, utilizamos um modelo *in vitro* de cultura de células mesoteliais de camundongo com o intuito de estudar especificamente a resposta da célula mesotelial, uma vez que é o mesotélio o principal envolvido na coordenação da resposta inflamatória pleural e, em última análise, aquele que sofre as alterações que resultarão no mesotelioma.

Numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que fibras de asbesto podem atingir a pleura e serem internalizadas pelas células mesoteliais, levando o mesotélio exposto a um microambiente reativo caracterizado por fenômenos de inflamação e proliferação mesotelial²⁸. Além

da ação celular direta, os efeitos provocados pelas fibras de asbesto podem ser constatados pela observação da liberação de mediadores inflamatórios relacionados à atividade celular local³⁰. Visser et al.³³ descreveram que as fibras de asbesto na cavidade pleural promovem uma resposta inflamatória caracterizada pela liberação de citocinas e quimiocinas pelas células mesoteliais. Como característica, a secreção de quimiocinas parece ser polarizada, promovendo uma migração transmesotelial dirigida de neutrófilos e monócitos. Este fenômeno produz uma afluência volumosa de leucócitos do compartimento vascular para o espaço pleural, iniciando a cascata de eventos inflamatórios.

Em nosso estudo, observamos uma importante afluência de leucócitos para a cavidade pleural, maior no grupo crocidolita quando comparado com a crisotila após 48 horas de exposição em todas as linhagens estudadas. Dentre os leucócitos, a célula de maior expressão foi o neutrófilo.

Outra célula descrita como fundamental no processo fisiopatológico de agressão pelo asbesto é o macrófago, principalmente por sua propriedade de fagocitose. Em nosso estudo os índices de macrófagos apresentaram um aumento temporal em todas as linhagens estudadas. Observamos que, na fase inicial, a fibra crocidolita recruta um número maior de macrófagos que a fibra crisotila, igualando-se ao longo das 48 horas.

Além da migração celular, Mutsaers et al.³¹ descreveram que as fibras de asbesto podem provocar uma resposta inflamatória intensa e persistente, amplificada pela liberação de mediadores moleculares que podem levar ao dano celular, proliferação, apoptose e fibrinogênese. Corroborando estes

achados, Mossman e Churg⁴⁰ descreveram que as células mesoteliais expostas ao asbesto produzem uma persistente resposta inflamatória pela geração de mediadores pró-inflamatórios, principalmente a IL-1 β , IL-6 e IL-8.

A IL-6 e IL-1 β são produzidas durante o curso do mesotelioma maligno, através da produção diretamente por células mesoteliais malignas, ou indiretamente em resposta ao crescimento tumoral. Esses fatores podem contribuir para as manifestações clínicas e patológicas desta doença⁴¹. Em um estudo avaliando mediadores produzidos por trabalhadores expostos às fibras de asbestos foi observado um aumento significativo dos níveis de IL-6 e IL-8 comparando com os controles estudados⁶¹.

Em nosso estudo, demonstramos que as citocinas IL-6, IL-1 β e MIP-2 estão elevadas nas primeiras 48 horas no líquido pleural dos animais que foram expostos tanto às fibras crocidolita como crisotila. A produção de IL-6 foi mais elevada nas primeiras 4 horas, com decréscimo posterior para ambas as fibras de asbesto em todas as linhagens estudadas. No tempo de 24 horas a citocina que está mais elevada no líquido pleural é a IL-1 β , principalmente no grupo crocidolita, com decréscimo até níveis indetectáveis após 48 horas. O grupo de animais geneticamente selecionados para alta resposta inflamatória apresentou níveis mais elevados dessa citocina do que as demais linhagens estudadas, com níveis mais elevados também no grupo crocidolita.

Um novo grupo de citocinas pró-inflamatórias conhecidas como quimiocinas, que inclui a proteína inflamatória macrofágica-2 (MIP-2), também foi implicado como contribuintes fundamentais à resposta inflamatória ao asbesto.

Em estudo *in vitro*, foi demonstrada a expressão de MIP-2 como resultado direto da exposição por partículas do asbesto crocidolita. Neste mesmo estudo foi demonstrado que o gene promotor de MIP-2 em ratos contém um sítio para o fator de transcrição NFκB, crítico para conferir responsividade de células epiteliais pulmonares a partículas de crocidolita, regulando vários genes que codificam para proteínas envolvidas em respostas inflamatórias e imunes⁴².

Em nosso estudo demonstramos que a MIP-2 no líquido pleural está elevada já nas primeiras 4 horas quando comparada aos controles, com subsequentemente aumento temporal ao longo das 48 horas.

Quando correlacionamos os mediadores inflamatórios com o perfil celular observado no líquido pleural após a exposição às fibras crocidolita e crisotila, observamos correlações significativas, porém baixas, entre os níveis de MIP-2 e o número de macrófagos ($R = 0,493$ para crocidolita e $R = 0,363$ para crisotila). Também observamos correlações significativas entre a IL-6 e MIP-2 ($R = -0,695$ para a crocidolita e $R = -0,359$ para a crisotila) e IL-6 e macrófagos ($R = -0,784$ para a crocidolita e $R = -0,626$ para a crisotila), porém negativas, indicando que a IL-6 é produzida como uma das primeiras respostas à exposição às fibras de asbestos, com queda ao longo do tempo. No entanto, subsequente à sua produção, começa a ocorrer a liberação da MIP-2, com o aumento em paralelo do número de macrófagos. O aumento nesta fase de macrófagos provavelmente deve estar relacionado à tentativa de “limpeza” da cavidade pleural, através da fagocitose das fibras de asbesto por estas células.

Paralelamente, quando analisamos a produção dessas citocinas pelas células mesoteliais em cultura expostas às fibras crocidolita e crisotila, observamos elevação de IL-1 β com 24 horas e MIP-2 nos tempos subseqüentes, semelhante ao perfil de produção no modelo *in vivo* com correlação superior a 70%, indicando a importante participação na liberação dessas citocinas pelas células mesoteliais. Entretanto não observamos correlações entre os níveis de IL-6 nos modelos *in vivo* e *in vitro*.

Quanto às alterações celulares, acredita-se que a inflamação crônica provocada pelas fibras de asbesto leva a célula mesotelial a sofrer diversas alterações, como dano ao DNA e cromossomo, apoptose e necrose.

Estudos experimentais em animais e cultura de células revelam que as fibras de asbestos podem transformar células mesoteliais de roedores e hamster *in vitro* e causar mesotelioma maligno nestas espécies⁶².

A principal hipótese para a gênese do mesotelioma é a da falha no mecanismo de apoptose da célula mesotelial, com produção de células com anormalidades genéticas capazes de resistir à morte celular e, portanto, capazes de gerar a neoplasia.

Ao contrário da necrose, a apoptose é um processo ativo de controle genético, identificado como um fator importante para a eliminação de células danificadas por vírus, irradiação, ou radicais de oxigênio⁶³. Devido a importância da apoptose na regulação de populações celulares e na deleção de células danificadas, existe o interesse em se estudar a indução de apoptose das células mesoteliais pleurais pelas fibras de asbesto.

Outra interação importante que leva a alterações celulares, como a falha da apoptose, foi descrita por Liu et al.⁵⁴ em 2000 relacionando a

fagocitose pelas células mesoteliais às fibras de asbesto. A fagocitose das fibras de asbesto pode provocar a geração de espécies reativas de oxigênio intracelular, que interagem com os cromossomos e causam dano no aparato mitótico.

Em nosso estudo, observamos que, após a exposição às fibras de asbesto crocidolita e crisotila, as células mesoteliais apresentaram índices elevados de apoptose quando comparado com os controles (RPMI e wolastonita). Observamos também que esse aumento foi temporal para ambas as fibras de asbesto, porém com índices de apoptose mais elevados nas células expostas à fibra crocidolita comparado com a fibra crisotila (24 e 48 horas).

Paralelamente analisamos os níveis de necrose e observamos também índices mais elevados quando comparados com os controles, porém sem diferença entre as fibras estudadas.

Existem algumas especulações na literatura sobre esse potencial mais tóxico das fibras crocidolita comparado com a crisotila. Porém, em nosso estudo demonstramos que, na fase aguda, ambas causam reações inflamatórias e celulares importantes.

Outro marcador importante que tem sido descrito como carcinogênico no mesotelioma é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). O mecanismo pelo qual o PDGF facilita a gênese tumoral ainda é desconhecido.

Lasky et al.⁶⁴ estudando modelo de lesão pulmonar pelas fibras de asbesto demonstraram que o aumento do $R\alpha$ PDGF precede o desenvolvimento de lesões fibroproliferativas. Essa ativação da expressão

do PDGF após exposição às fibras de asbesto também foi demonstrada por Lui et al.⁶⁵, porém após 24 horas de exposição. Os autores sugerem que o PDGF pode iniciar e amplificar outros eventos precoces associados com o dano provocado pelas fibras de asbesto. A rápida ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B observado em células expostas a fibras de asbesto em cultura pode promover a produção do PDGF. Além disso, o PDGF pode estimular a atividade do NF- κ B em um mecanismo de retroalimentação⁶⁶.

Lasky et al.⁶⁴ ainda discutem o efeito do PDGF-AA e seu potente efeito mitogênico, pois a elevação da expressão do PDGF-AA é acompanhada da elevação da expressão de seu respectivo receptor (R α PDGF).

Porém o mecanismo de expressão do R α PDGF na agressão celular pelo asbesto é desconhecido. Algumas citocinas foram descritas como reguladoras da expressão do R α PDGF como, por exemplo, a IL-1 β . Essa citocina é relacionada à fase aguda na inflamação, e foi descrita como capaz de regular a expressão e subsequente ação do R α PDGF⁶⁷.

Em nosso estudo observamos índices elevados da expressão do R α PDGF em fragmentos de pleura visceral de camundongos expostos às fibras de asbesto crocidolita e crisotila após 24 e 48 horas de exposição. No entanto, não observamos correlações significativas entre os níveis de IL-1 β no líquido pleural e a expressão do R α PDGF. Os níveis mais elevados de IL-1 β apresentaram-se após 24 horas, tempo no qual também temos os níveis mais elevados do R α PDGF, porém subsequentemente os níveis de

IL-1 β decaíram e os do R α PDGF permaneceram elevados. Especulamos, neste sentido, que a IL-1 β pode ter sido somente o estimulador inicial de sua produção.

Em trabalho recente foram avaliados os níveis séricos de PDGF em 3 grupos de indivíduos: pacientes expostos as fibras de asbesto que desenvolveram mesotelioma, pacientes expostos as fibras de asbesto com alto risco da doença e indivíduos sadios. Foram observados altos níveis de PDGF no soro do grupo de pessoas com mesotelioma; níveis menos elevados nos indivíduos com alto risco e níveis baixos nos indivíduos sadios. Nesse trabalho também foi associado os altos níveis de PDGF com menor sobrevida no grupo de pessoas com mesotelioma. Como conclusão, os autores destacam que o PDGF pode ser um marcador útil bem como um fator prognóstico para avaliar o mesotelioma pleural⁶⁸.

Em virtude da necessidade de uma compreensão mais adequada da resposta celular à exposição ao asbesto, associada à produção de marcadores inflamatórios, questionamos a contribuição das alterações observadas na fase aguda da exposição a este agente em animais selecionados geneticamente para alta e baixa resposta inflamatória.

Utilizamos o modelo idealizado por Biozzi⁵⁷ e desenvolvido por Stiffel et al.⁵⁸ em 1987, que selecionou geneticamente duas linhagens de camundongos que produzem alta resposta inflamatória aguda (AIR max) ou baixa resposta inflamatória aguda (AIR min), baseada no influxo de leucócitos e na concentração plasmática em exsudatos produzidos pela injeção de géis de poliacrilamida por via subcutânea.

Em 1998, Biozzi et al.⁶⁹ demonstrou a importância dessa seleção no processo de tumorigênese. Nesse estudo, utilizando modelo de neoplasia de pele, foi demonstrado uma menor susceptibilidade no desenvolvimento do tumor em camundongos AIR max do que em AIR min, como uma taxa de 10^6 vezes maior de indução de tumor nos animais AIR min. A intensa resposta inflamatória aguda foi associada com a resistência, e a baixa resposta inflamatória aguda à susceptibilidade ao tumor.

O fenótipo/genótipo extremo das linhagens selecionadas e o conhecimento da constituição genética da população oferecem novas possibilidades para discriminar genes e mecanismos que controlam importantes características como a resposta inflamatória aguda para tumorigênese. A descrição de genes resistentes ao tumor em camundongos selecionados para alta resposta inflamatória pode ser útil para o estudo da epidemiologia e terapia do câncer.

Em nosso estudo, quando comparado as linhagens AIR max e AIR min, observamos um processo inflamatório celular e de produção de citocinas, de uma maneira geral, mais intenso no grupo AIR max. Entretanto, a menor susceptibilidade no desenvolvimento do tumor, como descrito por Biozzi et al.⁶⁹, não foi demonstrado através da marcação do R α PDGF, marcador que vem sendo associado ser importante na fase inicial da tumorigênese. Os animais AIR max e AIR min, em nosso estudo, apresentaram níveis de R α PDGF semelhantes nos fragmentos de pleura expostos às fibras de asbesto crocidolita ou crisotila, não diferenciando a intensidade inflamatória local produzida pelas diferentes linhagens e a expressão do R α PDGF.

Em resumo, neste estudo caracterizamos a resposta inflamatória aguda ao asbesto em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Procuramos, com isto, contribuir para a melhor compreensão à agressão por este material de uso comercial tão freqüente e relacionado a diversas doenças clínicas, em especial ao mesotelioma, um tumor primário da pleura considerado agressivo e de prognóstico extremamente limitado.

CONCLUSÕES

1. As fibras de asbesto crocidolita e crisotila produziram, em animais selecionados para alta resposta inflamatória, uma elevação significativa no líquido pleural de leucócitos, neutrófilos e da IL-1 β em comparação aos controles e aos animais de baixa resposta inflamatória. Entretanto, não houve diferença no número de macrófagos e das citocinas IL-6 e MIP-2;
2. As células mesoteliais em cultura expostas às fibras de asbesto crocidolita ou crisotila apresentaram elevados índices de apoptose e necrose quando comparadas aos controles;
3. As citocinas IL-1 β , IL-6 e MIP-2 apresentaram níveis elevados no líquido pleural e no sobrenadante das células mesoteliais em cultura para ambas as fibras estudadas quando comparadas aos controles;
4. Os níveis das citocinas MIP-2 e IL-1 β no sobrenadante das células mesoteliais em cultura demonstrou forte correlação com os níveis observados no líquido pleural após a exposição às fibras crocidolita e crisotila;
5. Foi demonstrada forte expressão do R α PDGF na superfície pleural tanto dos animais de alta quanto de baixa resposta inflamatória para ambas as fibra de asbesto em comparação aos animais controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Dusinska M, Collins A, Kazimirova A, Barancokova M, Harrington V, Volkovova K, Staruchova M, Horska A, Wsolova L, Kocan A, Petrik J, Machata M, Ratcliffe B, Kyrtopoulos S. Genotoxic effects of asbestos in humans. *Mutat Res.* 2004;553(1-2):91-102.
- 2) Algranti E. Epidemiologia das doenças ocupacionais respiratórias no Brasil. *Epidemiologia das Doenças Respiratórias.* 2001; 1(3):119-43.
- 3) Landrigan PJ. Asbestos - still a carcinogen. *N Engl J Med.* 1998; 338(22):1618-9.
- 4) Green FH, Harley R, Vallyathan V, Althouse R, Fick G, Dement J, Mitha R, Pooley F. Exposure and mineralogical correlates of pulmonary fibrosis in chrysolite asbestos workers. *Occup. Environ. Med.* 1997; 54:549-59.
- 5) Boffetta P. Health effects of asbestos exposure in humans: a quantitative assessment. *Med Lav.* 1998; 6:471-80.
- 6) IARC. International Agency for Research on Cancer. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Supplement 7. Lyon: IARC; 1987.
- 7) Doll R. Mortality from lung cancer in asbestos workers. *Br J Ind Med.* 1995; 12: 81-6.

- 8) Mendes R. Asbesto (amianto) e doença: revisão do conhecimento científico e fundamentação para a urgente mudança da atual política brasileira sobre a questão. *Cad Saúde Publica*. 2001; 17(1):7-29.
- 9) McDonald JC. Call for an International Ban on Asbestos: Why not ban asbestos? *Am J Ind Med*. 2000;37(2):235.
- 10) McDonald JC, Armstrong B, Case B, Doell D, McCaughey WT, McDonald AD, Sebastien P. Mesothelioma and asbestos fiber type. Evidence from lung tissue analyses. *Cancer*. 1989; 63(8):1544-7.
- 11) Case BW. On talc, tremolite, and tergiversation. Ter-gi-ver-sate: 2: to use subterfuges. *Br J Ind Med*. 1991;48(5): 357-9.
- 12) Mossman BT. In vitro studies on the biologic effects of fibers: correlation with in vivo bioassays. *Environ Health Perspect*. 1990; 88: 319-22.
- 13) Churg A. Analysis of lung asbestos content. *Br J Ind Med*. 1991; 48 (10): 649-52.
- 14) Liddell FD, McDonald AD, McDonald JC. The 1891-1920 birth cohort of Quebec chrysotile miners and millers: development from 1904 and mortality to 1992. *Ann Occup Hyg*. 1997;41(1):13-36.

- 15) Smith AH, Wright CC. Chrysotile asbestos is the main cause of pleural mesothelioma. *Am J Ind Med.* 1996; 30(3):252-66.
- 16) Frank AL, Dodson RF, Williams MG. Carcinogenic implications of the lack of tremolite in UICC reference chrysotile. *Am J Ind Med.* 1998; 34(4):314-7.
- 17) Veblen DR, Wylie AG. Mineralogy of amphiboles and 1:1 layer silicates. In: Guthrie Jr. GD & Mossman BT, editors. *Health Effects of Minerals dusts. Reviews in Mineralogy, Vol. 28.* Mineralogical Society of America. Washington, DC, 1993; 61-138.
- 18) Hochella MD. Surface chemistry, structure and reactivity of hazardous. In: Guthrie Jr. GD & Mossman BT, editors. *Health Effects of Minerals dusts. Reviews in Mineralogy, Vol. 28.* Mineralogical Society of America. Washington, DC, 1993; 275-308.
- 19) Merchant JA. Human epidemiology: a review of fiber type and characteristics in the development of malignant and nonmalignant disease. *Environ Health Perspect.* 1990; 88:287-93.
- 20) Suzuki Y, Yen SR, Ashley R. Short, thin asbestos fibers contribute to the development of human malignant mesothelial: pathological evidence. *Int J. Hyg Environ. Health.* 2005; 208(3): 201-10.

- 21) Hardy JA, Aust AE. Iron in asbestos chemistry and carcinogenicity. *Chem Rev.* 1995; 95:97-118.
- 22) Jaurand MC, Bastie-Sigeac I, Renie A, Bignon J. Comparative toxicity of different forms of asbestos on rat pleural mesothelial cells. *Environ Health Perspect.* 1983; 51:153-8.
- 23) Boylan AM, Sanan DA, Sheppard D, Broaddus VC. Vitronectin enhances internalization of crocidolite asbestos by rabbit pleural mesothelial cells via the integrin alpha v beta 5. *J. Clin Invest.* 1995; 96(4):1987-2001.
- 24) Hume LA, Rimstidt. The diiodurability of chrysotile asbestos. *Am Mineral.* 1992; 77:1125-8.
- 25) Churg A. Deposition and clearance of chrysotile asbestos. *Ann Occup Hyg.* 1994; 38:625-33.
- 26) Leard LE, Broaddus VC. Mesothelial cell proliferation and apoptosis. *Respirology.* 2004; 9:292-9.
- 27) Boutin C, Dumortier P, Rey F, Viallat JR, De Vuyst P. Black spots concentrate oncogenic asbestos fibers in the parietal pleura. Thoracoscopic and mineralogic study. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153(1):444-9.

- 28) Jaurand MC, Fleury-Feith J. Pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Respirology*. 2005; 10:2-8.
- 29) Li XY, Lamb D, Donaldson K. Mesothelial cell injury caused by pleural leukocytes from rats treated with intratracheal instillation of crocidolite asbestos or *Corynebacterium parvum*. *Environ Res*. 1994; 64(2): 181-91.
- 30) Mutsaers SE. Mesothelial cells: Their structure, function and role in serosal repair. *Respirology*. 2002; 7:171-91.
- 31) Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:9-16.
- 32) Nasreen N, Mohammed KA, Sanders K, Hardwick J, Van Horn RD, Sriram PS, Ramirez-Icaza C, Hage C, Antony VB. Pleural mesothelial cell (PMC) defense mechanisms against malignancy. *Oncol Res*. 2003; 14(3):155-61.
- 33) Visser CE, Tekstra J, Brouwer-Steenbergen JJ, Tuk CW, Boorsma DM, Sampat-Sardjoeopersad SC, Meijer S, Krediet RT, Beelen RH. Chemokines produced by mesothelial cells: huGRO-alpha, IP-19, MCP-1 and RANTES. *Clin. Exp. Immunol*. 1998; 112:270-5.
- 34) Liberek T, Topley N, Luttmann W, Williams JD. Adherence of neutrophils to human peritoneal mesothelial cells: Role of intercellular adhesion molecule-1. *J Am Soc Nephrol*. 1996; 7:208-17.

- 35) Robledo R, Mossman B. Cellular and molecular mechanisms of asbestos-induced fibrosis. *J Cel Physiol.* 1999; 180:158-66.
- 36) Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Mecanismos efetores das respostas imunes. In: *Imunologia celular e molecular*. 3ª edição. Editora Revinter. Rio de Janeiro, RJ, 2000; 255-85.
- 37) Driscoll KE, Maurer JK, Higgins J, Poynter J. Alveolar macrophage cytokine and growth factor production in a rat model of crocidolite-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *J Toxicol Environ Health.* 1995; 46(2):155-69.
- 38) Offner FA, Obrist P, Stadlmann S, Feichtinger H, Klingler P, Herold M, Zwierzina H, Hittmair A, Mikuz G, Abendstein. IL-6 secretion by human peritoneal mesothelial and ovarian cancer cells. *Cytokine.* 1995; 7:542-7.
- 39) Fujino S, Yokoyama A, Kohno N, Hiwada K. Interleukin 6 is an autocrine growth factor for normal human pleural mesothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1996; 14:508-15.
- 40) Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the Pathogenesis of Asbestosis and Silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 1666-80.
- 41) Bielefeldt-Ohmann H, Fitzpatrick DR, Marzo AL, Jarnicki AG, Himbeck RP, Davis MR, Manning LS, Robinson BW. Patho- and immunobiology of

- malignant mesothelioma: characterisation of tumour infiltrating leucocytes and cytokine production in a murine model. *Cancer Immunol Immunother.* 1994; 39(6):347-59.
- 42) Driscoll KE. TNF α and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicology Letters.* 2000; 112-113:177-98.
- 43) Gabrielson EW, Van der Meeren A, Reddel RR, Reddel H, Gerwin BI, Harris CC. Human mesothelioma cells and asbestos-exposed mesothelial cells are selectively resistant to amosite toxicity: a possible mechanism for tumor promotion by asbestos. *Carcinogenesis.* 1992; 13(8):1359-63.
- 44) Van der Meeren A, Seddon MB, Betsholtz CA, Lechner JF, Gerwin BI. Tumorigenic conversion of human mesothelial cells as a consequence of platelet-derived growth factor-A chain overexpression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993; 8(2):214-21.
- 45) Metheny-Barlow LJ, Flynn B, van Gijssel HE, Marrogi A, Gerwin BI. Paradoxical effects of platelet-derived growth factor-A overexpression in malignant mesothelioma. Antiproliferative effects in vitro and tumorigenic stimulation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 24(6):694-702.
- 46) Bonner JC, Goodell AL, Coin PG, Brody AR. Chrysotile asbestos upregulates gene expression and production of α -receptors for

- platelet-derived growth factor (PDGF-AA) on rat lung fibroblasts. *J Clin Invest.* 1993; 92(1):425-30.
- 47) Pelin K, Kivipensas P, Linnainmaa K. Effects of asbestos and man-made vitrofibers on cell division in culture human mesothelial cells in comparison to rodent cells. *Environ Mol Mutagen.* 1995; 25(2):118-25.
- 48) Nygren J, Suhonen S, Norppa H, Linnainmaa K. DNA damage in bronchial epithelial and mesothelial cells with and without associated crocidolite asbestos fibers. *Environ Mol Mutagen.* 2004; 44 (5):477-82.
- 49) Kuwahara M & Kagan E. The mesothelial cell and its role in asbestos-pleural injury. *Int J Pathol.* 1995; 76(3):163-70.
- 50) Broaddus VC, Yang L, Scavo LM, Ernst JD, Boylan AM. Asbestos induces apoptosis of human and rabbit pleural mesothelial cells via reactive oxygen species. *J Clin Invest.* 1996; 98(9):2050-9.
- 51) Amarante-Mendes GP. Controle molecular do processo de apoptose. In: Métodos avançado em genética e biologia celular. Módulo I. Instituto Butantan, São Paulo. 2000.
- 52) Roseto A, Brenner C. Apoptosis o la muerte celular programada. *Arch Argent Pediatr.* 1999; 97(4):253-75.

- 53) Engeland MV, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schtte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V – Affinity assay: a review on a apoptosis detection ystem based on phosphatidylserine exposure. Cytometry. 1998; 31:1-9.
- 54) Liu W, Ernst JD, Broaddus VC. Phagocytosis of crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in mesothelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2000; 23(3):371-8.
- 55) Pelengaris S, Khan M, Evan G. C-myc: more than just a matter of life and death. Nat Rev Cancer. 2002; 2(10):764-76.
- 56) Vaslet CA, Messier NJ, Kane AB. Accelerated progression of asbestos-induced mesotheliomas in heterozygous p53+/- mice. Toxicol Sci. 2002; 68(2):331-8.
- 57) Biozzi G, Mouton D, Sant`anna OA, Passos HC, Gennari M, Reis MH, Ferreira VC, Heumann AM, Boutillier Y, Ibanez OM, Stiffel C, Siqueira M. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. Curr Top Micro Biol Immunol. 1979; 85:31-98.
- 58) Stiffel C, Ibanez OM, Ribeiro OG, Decreusefond C, Mouton D, Siqueira M, Biozzi G. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. Exp Clin Immunogenet. 1990; 7(4):221-33.

- 59) Pailles WH, Judy DJ, Resnick H, Castranova V. Relative effects of asbestos and wollastonite on alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health*. 1984; 14(4):497-510.
- 60) Friedman J, Müller KM. Mesothelial proliferation due to asbestos and man-made fibers: experimental studies on rat omentum. *Pathol Res Pract*. 1990; 186:117-23.
- 61) Ilavska S, Jahnova E, Tulinska J, Horvathova M, Dusinska M, Wsolova L, Kyrtopoulos SA, Fuortes L. Immunological monitoring in workers occupationally exposed to asbestos. *Toxicology*. 2005; 206(2):299-308.
- 62) Ramos-Nino ME, Testa JR, Altomare DA, Pass HI, Carbone M, Bocchetta M, Mossman BT. Cellular and molecular parameters of mesothelioma. *J Cell Biochem*. 2006; 98 (4):723-34.
- 63) Broaddus VC. Asbestos, the mesothelial cell and malignancy: a matter of life or death. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997; 17(6):657-9.
- 64) Lasky JA, Tonthat B, Liu JY, Friedman M, Brody AR. Upregulation of the PDGF-alpha receptor precedes asbestos-induced lung fibrosis in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157:1652-7.

- 65) Liu JY, Morris G, Lei WH, Hart C, Lasky J, Brody AR. Rapid activation of PDGF-A and -B expression of sites of lung injury in asbestos-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997; 17:129-40.
- 66) Freter RR, Alberta JA, Hwang GY, Wrentmore AL, Stiles CD. Platelet-derived growth factor induction of the immediate-early gene MCP-1 is mediated by NF-kappaB and a 90-kDa phosphoprotein coactivator. *J Biol Chem*. 1996; 271(29):17417-24.
- 67) Raines EW, Dower SK, Ross R. Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science*. 1989; 243: 393-5.
- 68) Filiberti R, Marroni P, Neri M, Ardizzoni A, Betta PG, Cafferata MA, Canessa PA, Puntoni R, Ivaldi GP, Paganuzzi M. Serum PDGF-AB in pleural mesothelioma. *Tumour Biol*. 2005; 26(5):221-6.
- 69) Biozzi G, Ribeiro OG, Saran A, Araujo ML, Maria DA, De Franco M, Cabrera WK, Sant'anna OA, Massa S, Covelli V, Mouton D, Neveu T, Siqueira M, Ibanez OM. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis*. 1998; 19(2):337-46.

ANEXOS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 3471 – SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 31.07.03, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 506/03, intitulado: "Resposta do mesotélio "in vivo" e "in vitro" a diferentes fibras de asbesto utilizadas comercialmente" apresentado pelo Departamento de CÁRDIO-PNEUMOLOGIA.

Pesquisador(a) Responsável: DR. EVALDO MARCHI

Pesquisador(a) Executante: SRA. MILENA MARQUES PAGLIARELLI
ACENCIO

CAPPesq, 31 de Julho de 2003.

PROF. DR. CLAUDIO LEONE

Vice-Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

Imunofluorescência

Para realização da técnica de imunofluorescência direta foi ajustado a concentração de células a serem analisadas para 1×10^6 células/mm³ e, as mesmas, ressuspensas em tampão de cálcio.

Para cada tubo contendo 200 µL da solução de células foi adicionado 5µL de Anexina V-FITC (BD Pharmingen, Torreyan, San Diego, CA, USA) e 5µL de Iodeto de Propídio, em seguida, incubado por 15 minutos à temperatura ambiente no escuro.

Posteriormente, foi completado o volume para 500µL e homogeneizado em vórtex para efetuar a aquisição da amostra.

A aquisição e a leitura foram realizadas no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) utilizando o programa CellQuest em até 1 hora do preparo da amostra.

Neste estudo foi realizada a aquisição de 10.000 células marcadas por tubo analisado. Após a aquisição foram realizadas as leituras dos gráficos obtidos. De acordo com a disposição das células em cada quadrante, foi determinado a porcentagem de apoptose, necrose ou viabilidade celular.

Imunohistoquímica TdT FragEL™

As etapas da detecção de apoptose por imunohistoquímica, utilizando o kit TdT FragEL™ (Oncogene, Darmstadt, Germany), foram divididas em 6 etapas:

1 – Rehidratação

Para rehidratação das células, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente, submersas em tampão TBS (*Tris Buffer Saline*) por 15 minutos.

2 – Permeabilização

O princípio da técnica TdT FragEL™ é a marcação no DNA celular, portanto, é necessário realizar a permeabilização para ocorrer a marcação. A permeabilização foi realizada com 20ng/mL de proteinase K em tampão Tris incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, a solução foi retirada com lavagens em tampão TBS.

3 – Inativação da peroxidase endógena

É necessário realizar a inativação da peroxidase endógena para não ocorrer reação cruzada com a peroxidase utilizada na marcação da técnica. Para isto, foi utilizado H₂O₂ 3% em metanol. As lâminas foram incubadas

nesta solução em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida a solução foi retirada com lavagens em tampão TBS.

4 – Reação de equilíbrio e marcação

Para a etapa de reação de equilíbrio e marcação celular, foi acrescentado um tampão de equilíbrio (*TdT Equilibration Buffer*) e as lâminas foram incubado por 20 minutos à temperatura ambiente.

Durante o período de incubação, foi preparada a reação de marcação (*TdT Labeling Reaction Mixture*), misturando-se ligeiramente o conteúdo de *TdT Labeling Reaction Mix* e *TdT Enzyme*, soluções fornecidas pelo kit.

Imediatamente após o preparo foi aplicado o *TdT Labeling Reaction Mixture* e as lâminas foram cobertas com parafilme e incubadas em câmara úmida à 37°C por uma hora e meia.

Para finalizar a etapa de marcação, foi removido o parafilme e as lâminas foram enxaguadas em tampão TBS com adição de uma solução de parada (*Stop Solution*) e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos.

Ao final da incubação as lâminas foram imersas e retiradas rapidamente em tampão TBS.

5 – Detecção

Para a etapa de detecção da marcação, as lâminas foram incubadas em tampão de bloqueio (*Blocking Buffer*) por 10 minutos, um conjugado foi

adicionado posteriormente e, o conjunto foi incubado em câmara úmida à temperatura ambiente por trinta minutos.

Cinco minutos antes de concluir a incubação foi preparada a solução de DAB em H_2O_2 /Urea e, as lâminas imersas nesta solução por 10 minutos. Ao final as lâminas foram lavadas com água deionizada.

6 – Contracoloração

Para a contracoloração foi utilizado o corante *methyl green*, incubado por 3 minutos. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas de 2 a 4 vezes em 2 baterias de etanol 100% e posteriormente em 1 bateria de xilol.

Ao final as lâminas foram montadas em Permount.

Dosagem das Citocinas

Para dosagem de IL-1 β , IL-6 e MIP-2 foi utilizado o método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) de captura (R&D System, Inc., Minneapolis, USA).

Placas com 96 poços (Costar/Corning, Inc., Cambridge, USA) foram sensibilizadas com 100 μ L de anticorpo monoclonal e incubadas por 18 horas a 4°C.

Posteriormente, a placa foi bloqueada, para evitar ligações inespecíficas com 300 μ L de solução de bloqueio (BSA 2%) e incubada por 2 horas a 37°C.

Após o bloqueio, foi adicionado 100 μ L por poço das amostras e dos padrões diluídos previamente em PBS. Em dois poços foi colocado somente PBS para caracterização do branco.

A placa foi incubada por 18 horas a 4°C.

Após incubação, foram adicionados 100 μ L do anticorpo conjugado (biotinilado) na concentração estabelecida e as placas foram incubadas por 3 horas a 37°C. Posteriormente, foram adicionados 100 μ L de Streptavidina HRP (1:250) por poço e incubado por 30 minutos a 37°C.

A cada etapa a placa foi lavada com tampão de lavagem (PBS + Tween 20) por 6 vezes.

A revelação foi realizada através da adição de 100 μ L da Solução de Revelação (H₂O₂ + Tetrametilbenzidina) por poço e incubado de 5 a 60

minutos a 37°C de acordo com cada citocina. A reação foi parada com 50µL de H₂SO₄ 30% por poço e agitado lentamente.

A leitura foi feita em leitor de ELISA (Power Wave, Bio-tek, USA) utilizando filtro de 450nm.

Tabela A: Concentrações dos anticorpos utilizados no método ELISA.

Citocinas	Anticorpo de Captura (Sensibilização) (µg/mL)	Padrões (pg/mL)	Anticorpo de Detecção (ng/mL)
IL-1β	4	15,6 – 2000	100
IL-6	2	15.6 – 2000	200
MIP-2	2	15,6 – 2000	50

Imunohistoquímica do R α PDGF

Para realização da técnica de imunohistoquímica para determinação do receptor alfa do PDGF (R α PDGF) de fragmentos emblocados em parafina, utilizando peroxidase como revelação, é necessário realizar etapas de desparafinização, hidratação e bloqueio da amostra antes da marcação com o anticorpo específico.

1 – Desparafinização

Para desparafinização, as lâminas foram deixadas por 20 minutos em xilol quente e posteriormente foram imersas em três banhos de xilol frio.

2 – Hidratação

Após a desparafinização foi realizada a hidratação do fragmento em 2 banhos de álcool absoluto, 2 banhos de álcool 95º e 1 banho de álcool 70º. Em seguida, as lâminas foram imersas em água corrente e, posteriormente, em água deionizada.

3 – Bloqueio

Para realização do bloqueio da peroxidase endógena necessária para não ocorrer reação cruzada com a peroxidase utilizada na marcação da técnica, as lâminas foram imersas por 7 vezes em água oxigenada 10V. Em

seguida foram lavadas em água corrente e posteriormente em água deionizada.

Foram realizados também bloqueio de avidina com *Avidin Blocking Reagent* por 15 minutos e bloqueio de biotina com *Biotin Blocking Reagent* por 15 minutos.

A lavagem final de cada etapa de bloqueio foi realizada com tampão PBS.

4 – Marcação

As amostras foram incubadas com o anticorpo primário (anti-mouse PDGF R α) a 4°C por 24 horas. Posteriormente as lâminas foram lavadas por 3 vezes com tampão de lavagem e adicionado o anticorpo biotinilado por 60 minutos.

Após a incubação, foram realizadas 3 lavagens com tampão de lavagem retirando o excesso de tampão.

5 – Revelação

Iniciou-se então a etapa de revelação da marcação com adição de streptoavidina por 30 minutos e posterior adição do cromógeno DAB por 3 a 20 minutos. Esta última etapa foi monitorada através da intensidade da marcação em microscópio para assegurar uma intensidade adequada aos tecidos marcados.

Após obter a coloração desejada as lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos.

6 – Contracoloração

Para contracoloração foi utilizado o corante *methyl green* e, incubado por 3 minutos. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas de 2 a 4 vezes em 2 baterias de etanol 100% e posteriormente em 1 bateria de xilol. Ao final as lâminas foram montadas em Permount.

Controles (PBS e Wolastonita)

Para os experimentos *in vivo* todas as variáveis (citologia e citocinas) apresentaram níveis significativamente menores ($p < 0,001$) nos grupos controles, PBS e wolastonita, em comparação com os grupos experimentais crocidolita e crisotila. Os resultados dos controles estão expressos abaixo de forma detalhada:

Tabela B: Valores de leucócitos (mm^3) no líquido pleural de camundongos selecionados geneticamente e C57/Bl6 após injeção intrapleural dos controles PBS e wolastonita.

	PBS			Wolastonita		
	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
C57/Bl6	76,1 $\pm$ 30,5	69,4 $\pm$ 21,0	53,5 $\pm$ 1,5	510,5 $\pm$ 63,1	911,2 $\pm$ 315,3	817,2 $\pm$ 221,0
AIR min	99,7 $\pm$ 36,4	74,6 $\pm$ 40,8	70,8 $\pm$ 4,4	434,7 $\pm$ 51,9	618,9 $\pm$ 109,0	568,7 $\pm$ 182,1
AIR max	107,9 $\pm$ 69,6	105,4 $\pm$ 86,6	51,4 $\pm$ 10,3	565,3 $\pm$ 208,4	1596,0 $\pm$ 125,7	1177,6 $\pm$ 1364,4

Tabela C: Valores de neutrófilos (mm^3) no líquido pleural de camundongos selecionados geneticamente e C57/Bl6 após injeção intrapleural dos controles PBS e wolastonita.

	PBS			Wolastonita		
	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
C57/Bl6	3,8 $\pm$ 1,5	3,1 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,9	301,7 $\pm$ 28,2	654,7 $\pm$ 331,8	533,1 $\pm$ 99,6
AIR min	4,2 $\pm$ 3,2	6,0 $\pm$ 5,4	2,0 $\pm$ 0,3	260,3 $\pm$ 37,4	452,5 $\pm$ 157,3	317,1 $\pm$ 177,5
AIR max	7,4 $\pm$ 2,0	4,5 $\pm$ 4,4	3,9 $\pm$ 2,7	348,7 $\pm$ 106,5	1186,8 $\pm$ 102,8	845,4 $\pm$ 250,5

Tabela D: Valores de macrófagos (mm^3) no líquido pleural de camundongos selecionados geneticamente e C57/Bl6 após injeção intrapleural dos controles PBS e wolastonita.

	PBS			Wolastonita		
	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
C57/Bl6	18,5 ± 0,1	18,6 ± 0,1	16,4 ± 3,0	16,8 ± 3,7	640,8 ± 69,2	700,4 ± 110,8
AIR min	14,9 ± 17,8	17,7 ± 20,6	13,8 ± 16,3	19,8 ± 6,9	368,1 ± 192,2	543,3 ± 165,8
AIR max	15,8 ± 2,1	22,5 ± 26,9	24,1 ± 24,7	23,6 ± 27,7	738,4 ± 320,4	946,3 ± 459,8

Tabela E: Níveis de IL-1 β (pg/mL) no líquido pleural de camundongos selecionados geneticamente e C57/Bl6 após injeção intrapleural dos controles PBS e wolastonita.

	PBS			Wolastonita		
	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
C57/Bl6	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0
AIR min	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0
AIR max	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0

Tabela F: Níveis de IL-6 (pg/mL) no líquido pleural de camundongos selecionados geneticamente e C57/Bl6 após injeção intrapleural dos controles PBS e wolastonita.

	PBS			Wolastonita		
	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
C57/Bl6	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	137,3 ± 84,9	17,9 ± 3,4	15,6 ± 0,0
AIR min	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	98,1 ± 62,9	16,5 ± 1,6	15,6 ± 0,0
AIR max	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	179,3 ± 101,2	22,7 ± 10,2	15,6 ± 0,0

Tabela G: Níveis de MIP-2 (pg/mL) no líquido pleural de camundongos selecionados geneticamente e C57/Bl6 após injeção intrapleural dos controles PBS e wolastonita.

	PBS			Wolastonita		
	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
C57/Bl6	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	42,5 ± 7,3	16,6 ± 1,5	15,6 ± 0,0
AIR min	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	33,7 ± 13,4	16,0 ± 0,6	15,6 ± 0,0
AIR max	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	53,6 ± 50,5	19,1 ± 5,7	15,6 ± 0,0

Demonstração dos Resultados em Tabelas

Tabela H: Valores de leucócitos (mm^3) no líquido pleural de camundongos selecionados geneticamente e C57/Bl6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.

PBS		Crocidolita			Crisotila		
		4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
C57/Bl6	72 ± 22	4132 ± 1764	3272 ± 960	9501 ± 3232 [#]	4236 ± 1973	6408 ± 2184	3991 ± 1511
AIR min	82 ± 33	4349 ± 2070	4085 ± 1786	5207 ± 2247 [#]	2931 ± 736	3484 ± 893	1713 ± 392
AIR max	107 ± 64	5612 ± 1706	8022 ± 2447 *	14457 ± 6031* [#]	6432 ± 1703	11511 ± 4171 **	5210 ± 3315

Comparação entre fibras: # $p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita > Crisotila (AIR max, AIR min e C57/BL6 $\rightarrow$ 48 h)

Comparação entre linhagens: * $p < 0,05 \rightarrow$ AIR max > AIR min e C57BL6 (Crocidolita – 24h e 48h)

** $p < 0,05 \rightarrow$ AIR max > AIR min e C57BL6 (Crisotila – 24h)

Tabela I: Valores de neutrófilos (mm^3) no líquido pleural de camundongos selecionados geneticamente e C57/Bl6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.

PBS		Crocidolita			Crisotila		
		4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
C57/Bl6	4 ± 1	3490 ± 1469	2452 ± 729	5202 ± 2084 [#]	3340 ± 1047	2998 ± 279	3097 ± 1110
AIR min	5 ± 4	2989 ± 1623	2339 ± 682	3656 ± 1662 [#]	2045 ± 827	2462 ± 529	1641 ± 398
AIR max	5 ± 4	4237 ± 1433	5941 ± 1702 *	11603 ± 5247* [#]	3184 ± 1257	8367 ± 2987 **	3837 ± 2375

Comparação entre fibras: # $p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita > Crisotila (AIR max, AIR min e C57/BL6 $\rightarrow$ 48 h)

Comparação entre linhagens: * $p < 0,05 \rightarrow$ AIR max > AIR min e C57BL6 (Crocidolita – 24h e 48h)

** $p < 0,05 \rightarrow$ AIR max > AIR min e C57BL6 (Crisotila – 24h)

Tabela J: Valores de macrófagos (mm^3) no líquido pleural de camundongos selecionados geneticamente e C57/BL6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.

PBS		Crocidolita			Crisotila		
		4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
C57/BL6	17 ± 2	390 ± 57 [#]	3682 ± 658 ^{##}	5983 ± 3454	101 ± 76	1492 ± 1182	3120 ± 1675
AIR min	14 ± 18	198 ± 134 [#]	3216 ± 703	4841 ± 1621	74 ± 59	3285 ± 731	3022 ± 822
AIR max	18 ± 15	425 ± 186 [#]	5479 ± 1407	7781 ± 1994	65 ± 171	3549 ± 4351	4696 ± 2027

Comparação entre fibras: # $p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita > Crisotila (AIR max, AIR min e C57/BL6 $\rightarrow$ 4h)

$p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita > Crisotila (C57/BL6 $\rightarrow$ 24h)

Comparação entre linhagens: Não apresentaram diferenças significativas

Tabela K: Níveis de IL-1 β (pg/mL) no líquido pleural de camundongos selecionados geneticamente e C57/BL6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.

PBS		Crocidolita			Crisotila		
		4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
C57/BL6	15,6 ± 0	86,9 ± 41	148,3 ± 101 [#]	15,6 ± 0	39,6 ± 36	15,6 ± 0	15,6 ± 0
AIR min	15,6 ± 0	72,9 ± 43	124,1 ± 78 [#]	18,2 ± 4	29,1 ± 15	22,1 ± 14	15,6 ± 0
AIR max	15,6 ± 0	70,1 ± 24	413,5 ± 179 [*]	15,6 ± 0	74,3 ± 63	323,5 ± 97 [*]	15,6 ± 0

Comparação entre fibras: # $p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita > Crisotila (AIR min e C57/BL6 $\rightarrow$ 24h)

Comparação entre linhagens: * $p < 0,001 \rightarrow$ AIR max > AIR min e C57BL6 (Crocidolita e Crisotila – 24h)

Tabela L: Níveis de IL-6 (pg/mL) no líquido pleural de camundongos selecionados geneticamente e C57/BL6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.

PBS		Crocidolita			Crisotila		
		4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
C57/BL6	15,6 ± 0	3461,4 ± 136	344,2 ± 149	146,5 ± 32 [#]	2709,4 ± 989	286,7 ± 157	82,9 ± 92
AIR min	15,6 ± 0	3983,5 ± 351	454,5 ± 314	156,3 ± 94 [#]	2887,1 ± 125	228,5 ± 87	45,6 ± 18
AIR max	15,6 ± 0	3818,6 ± 414	589,9 ± 318	358,6 ± 221 [#]	3156,6 ± 431	631,2 ± 220	79,3 ± 29

Comparação entre fibras: # $p < 0,05 \rightarrow$ Crocidolita > Crisotila (AIR max, AIR min e C57/BL6 $\rightarrow$ 48h)

Comparação entre linhagens: Não apresentaram diferenças significativas

Tabela M: Níveis de MIP-2 (pg/mL) no líquido pleural de camundongos selecionados geneticamente e C57/Bl6 após injeção intrapleural do asbesto crocidolita, crisotila ou PBS.

PBS		Crocidolita			Crisotila		
		4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
C57/Bl6	15,6 ± 0	561,9 ± 186	1393,9 ± 255	1253,0 ± 348	518,5 ± 320	738,8 ± 319	966,4 ± 718
AIR min	15,6 ± 0	308,2 ± 186	1244,7 ± 388	959,6 ± 289	324,8 ± 149	919,8 ± 419	513,2 ± 251
AIR max	15,6 ± 0	754,4 ± 323	1708,0 ± 851	1265,7 ± 385	792,4 ± 330	957,1 ± 301	1102,9 ± 387

Comparação entre fibras: Não apresentaram diferenças significativas

Comparação entre linhagens: Não apresentaram diferenças significativas

Tabela N: Níveis de IL-1 β (pg/mL) no sobrenadante da cultura de células mesoteliais após exposição aos controles, RPMI ou wolastonita e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.

	4 h	24 h	48 h
RPMI	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0
Wolastonita	17,6 ± 2,3	15,6 ± 0,0	15,6 ± 0,0
Crocidolita	27,5 ± 11,3	56,9 ± 16,5 *	25,3 ± 6,9
Crisotila	29,3 ± 11,1	39,5 ± 13,9	21,6 ± 6,1

Comparação entre fibras: * p< 0,05 → Crocidolita > Crisotila → 24h

Tabela O: Níveis de IL-6 (pg/mL) no sobrenadante da cultura de células mesoteliais após exposição aos controles, RPMI ou wolastonita e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.

	4 h	24 h	48 h
RPMI	153,7 ± 95,2	77,4 ± 27,9	151,9 ± 90,3
Wolastonita	772,4 ± 132,5	749,6 ± 72,2	776,7 ± 180,9
Crocidolita	5.819,6 ± 76,9 *	12.598,1 ± 6.161,3*	22.027,2 ± 5.574,5*
Crisotila	1.327,2 ± 950,1	5.735,1 ± 198,4	13.247,9 ± 9.475,5

Comparação entre fibras: * p< 0,05 → Crocidolita > Crisotila → 4h, 24h e 48 h

Tabela P: Níveis de MIP-2 (pg/mL) no sobrenadante da cultura de células mesoteliais após exposição aos controles, RPMI ou wolastonita e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.

	4 h	24 h	48 h
RPMI	57,5 ± 21,1	88,9 ± 32,9	134,9 ± 72,3
Wolastonita	226,5 ± 125,0	275,2 ± 213,3	381,4 ± 122,1
Crocidolita	1.254,5 ± 670,7*	2.463,9 ± 1.187,5*	6.644,9 ± 3.684,7*
Crisotila	578,6 ± 139,1	1.298,1 ± 699,5	2.829,3 ± 1.658,6

Comparação entre fibras: * p< 0,05 → Crocidolita > Crisotila → 4h, 24h e 48 h

Tabela Q: Porcentagem de células mesoteliais em apoptose após exposição aos controles, RPMI ou wolastonita e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.

	4 h	24 h	48 h
RPMI	2,9 ± 1,0	3,1 ± 0,8	6,3 ± 2,1
Wolastonita	2,9 ± 0,6	5,9 ± 0,9	7,8 ± 1,5
Crocidolita	11,7 ± 2,0	21,6 ± 3,4 *	27,2 ± 1,2 *
Crisotila	8,6 ± 1,2	13,4 ± 1,9	20,2 ± 1,5

Comparação entre fibras: * p< 0,05 → Crocidolita > Crisotila → 24h e 48h

Tabela R: Porcentagem de células mesoteliais em necrose após exposição aos controles, RPMI ou wolastonita e as fibras de asbesto, crocidolita ou crisotila.

	4 h	24 h	48 h
RPMI	3,5 ± 0,5	5,7 ± 0,8	5,7 ± 1,0
Wolastonita	3,2 ± 0,8	5,3 ± 1,8	6,3 ± 2,0
Crocidolita	8,5 ± 2,4	18,0 ± 4,3	17,9 ± 2,4
Crisotila	7,3 ± 2,1	11,3 ± 1,7	14,3 ± 1,0

Comparação entre fibras: Não apresentaram diferenças significativas

Tabela S: Expressão do Rα PDGF (/1000 μm de pleura) em fragmentos de pleura visceral de camundongos selecionados geneticamente e C57/Bl6 após injeção intrapleural de asbesto crocidolita ou crisotila ou PBS.

PBS		Crocidolita			Crisotila		
		4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
C57/Bl6	0,0 ± 0,0	10,4 ± 9,5	199,2 ± 72,9	227,4 ± 86,3	8,9 ± 7,8	187,4 ± 102,6	201,1 ± 80,7
AIR min	0,0 ± 0,0	6,9 ± 8,3	189,2 ± 90,4	198,7 ± 79,3	6,3 ± 5,9	179,3 ± 80,2	191,3 ± 79,5
AIR max	0,0 ± 0,0	16,7 ± 12,3	232,9 ± 107,9	265,3 ± 101,2	13,9 ± 21,3	209,2 ± 103,6	242,2 ± 97,6

Comparação entre fibras: Não apresentaram diferenças significativas

Comparação entre linhagens: Não apresentaram diferenças significativas