



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

AUTOIMUNIDADE EM TRABALHADORES EXPOSTOS À
SÍLICA

MICHELLE CORRÊA DA ROCHA

Campinas, 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

AUTOIMUNIDADE EM TRABALHADORES EXPOSTOS À
SÍLICA

MICHELLE CORRÊA DA ROCHA

Tese de Doutorado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade de
Campinas - UNICAMP para obtenção
de título de Doutor em Farmacologia.
Sob orientação da Profa. Dra. Mary
Luci de Souza Queiroz.

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

R582a Rocha, Michelle Corrêa da, 1980 -
Autoimunidade em trabalhadores expostos à sílica /
Michelle Corrêa da Rocha. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Mary Luci de Souza Queiroz.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sílica. 2. Linfócitos. 3. Auto-imunidade. 4.
Citocinas. I. Queiroz, Mary Luci de Souza. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Autoimmunity in silica-exposed workers.

Palavras-chave em inglês:

Silica

Lymphocytes

Autoimmunity

Cytokines

Área de concentração: Imunotoxicologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Edson Antunes

Eduardo Mello de Capitani

Sara Teresinha Olalla Saad

Iracilda Zeppone Carlos

Cláudia Bincoletto Trindade

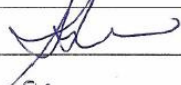
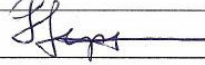
Data da defesa: 26-01-2012

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

MICHELLE CORRÊA DA ROCHA

Orientadora: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Membros:	
Prof. Dr. Edson Antunes	
Prof. Dr. Eduardo Mello de Capitani	
Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad	
Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos	
Profa. Dra. Cláudia Bincoletto Trindade	

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/01/2012

Dedico este trabalho...

*Ao meu marido, **DANIEL**, por todo amor,
compreensão, carinho e apoio incondicionais que sempre recebi
para ir à busca de meus sonhos como foi a realização deste
trabalho. Tenho certeza de que outros tantos sonhos nós
conquistaremos juntos. Agradeço sempre a Deus por ter colocado
você em minha vida.*

*Aos meus queridos pais, **JULIO e LENI**
Pela vida e amor incondicional.*

*À minha querida irmã **DANIELLE** e
sobrinho **JULIO HENRIQUE**
Por todo companheirismo e apoio.*

*Aos meus queridos tios, **GERMANO e MARIA HELENA**
(Por que pais são também aqueles que participam de nossa criação)
Pelo incentivo em todos meus projetos e por estarem presentes em
todos os momentos da minha vida.*

*Obrigada por tudo!
Saibam que cada conquista minha é um triunfo de vocês!*

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente à **Deus**,
por ter guiado meus caminhos,
por ter me dado fé e força pra seguir em frente,
pela serenidade que tive para aceitar as coisas e entender que tudo tem uma razão de ser.*

*Aos indivíduos da pesquisa,
Doutores na arte da vida,
que incansáveis, tornam o desejo de luta maior que o próprio medo
que sedentos de vida, assumem por ela todos os riscos,
o risco mesmo de perdê-la.
Com vocês, estamos sempre aprendendo
que a luta, nem sempre seguida de vitória,
é o que importa e torna preciosa nossa efêmera existência.
Aos que vitoriosos alcançaram o objetivo de viver,
Aos que persistentes continuam lutando,
Aos que perderam a batalha, mas engrandeceram seu espírito
e deixaram em nossa memória a lembrança de sua coragem.
(Autor desconhecido)*

*À querida Professora Mary,
orientadora deste trabalho,
pela oportunidade de trabalhar em sua linha de pesquisa,
orientação, confiança e apoio. Mas, principalmente,
agradeço pelo carinho e pelos ensinamentos valiosos
durante esta jornada científica.*

*À minha querida avó Glorinha,
Por todo amor dedicado a mim.*

*À toda minha família, primos, tios, etc.,
especialmente à minha sogra **Sônia** e aos meus cunhados **João Paulo e Fábio**,
por todo apoio e torcida.*

*À todos meus amigos,
especialmente **Fabiana (cabeção), Sandra (co), Dani (ser)**
Mônica, Juliana, Camila e Milene,
aos amigos de Maastricht **Anna, Lenka, Gönci, Francesca, Lilla, Guido e Ricardo**
pela amizade e incentivo mesmo que à distância.*

Aos amigos do laboratório de CFU e Imunotoxicologia,

À Andrana,

*uma amiga muito “querida” e especial,
por me escutar tantas vezes, por compartilhar sonhos e esperanças,
pela amizade sincera, apoio e carinho nesses quatro anos de convivência diária.*

À Sueli,

*Uma grande amiga,
pelas “injeções de ânimo” durante todo o período do doutorado,
pelos conselhos e por sempre me ajudar com muita atenção e eficiência.*

À Mariana,

*Minha “roommate”,
pela amizade sincera e especial,
pela força, conselhos e apoio nos momentos em que precisei.*

À Cris,

*pelo apoio nas horas difíceis,
pela sua solicitude,
companhia agradável nas nossa viagens para “Pira”
e amizade.*

À Aline (Fia),

*por me acolher em sua casa logo que cheguei em Campinas,
pela ajuda e apoio incondicional.*

À Juliana (Jubinha),

*Pelos bons momentos, risadas, amizade
e ajuda, principalmente com minhas amostras
para a realização de testes na Holanda*

À Miriam,

*Uma pessoa muito meiga,
Pela amizade, força e ajuda nos experimentos.*

*À todos que já passaram ou acabaram de ingressar,
até mesmo aos que já passaram e regressaram ao laboratório
(Simone, Raphael, Marcos, Samara, Julia, Victor, Laís, Sabrina, Patrícia e Roberta),
pelo companheirismo e alegria que tornavam o ambiente de trabalho muito mais
agradável. Enfim, agradeço a todos vocês pela amizade.*

*À querida Professora Leo,
pelos ensinamentos,
pela ajuda na realização
dos experimentos e na
discussão dos resultados.*

*Ao Prof. Dr. Ericson Bagatin,
pela colaboração nesse projeto para a seleção da população
de indivíduos expostos à sílica, imprescindível
para a realização deste estudo.*

*Ao Dr. Alessandro Vito Lido,
pela convocação dos indivíduos do estudo para a coleta.
Muito obrigada pela atenção,
presteza no acompanhamento dos pacientes
e no fornecimento dos dados clínicos.*

*À equipe médica da Divisão de Medicina do Trabalho do HC-UNICAMP,
em especial à Dra. Juliana pelo apoio nos dias de coleta.*

*Ao Prof. Dr. Jan Willem Cohen Tervaert,
do Laboratório de Imunologia da Universidade de Maastricht, Holanda,
pela oportunidade dada para poder desenvolver parte de meu trabalho de doutorado em
um grupo de excelência em pesquisa Imunológica na Holanda. Agradeço também ao Dr.
Jan Damoiseaux e a todos os outros companheiros do laboratório (especialmente Marc,
Ruud, Steven, Daniela, Benjamin, Santosh, Lucienne e Maria) que me receberam com
carinho, e de alguma forma contribuíram para realização do meu trabalho.*

*À FAPESP e ao CNPq,
pelo apoio financeiro,
imprescindível para a realização deste trabalho.*

*Ao Departamento de Farmacologia e ao Hemocentro,
pela infra-estrutura e
por todo aprendizado teórico e prático.*

*À Dona Elza e Toyoko,
do setor de coleta do HC
pela atenção, dedicação, paciência
e presteza na coleta das amostras dos pacientes.*

*Aos estatísticos da FCM,
pelo auxílio na análise estatística.*

***À Prof. Dra. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand-Metze
e Fernanda Gonçalves Pereira Cunha,***

do laboratório de marcadores celulares e citologia do hemocentro, pela oportunidade de uso do FacsAria e pela ajuda na leitura da centena de tubos no citômetro.

***À Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes e
Profa. Dra. Elaine Conceição de Oliveira***
*do Instituto de Biociências-IB,
pela ajuda com a determinação das citocinas no Luminex.*

À Rose
*e a todos os outros alunos da Profa. Léo,
pelo auxílio nos ensaios de linfoproliferação.*

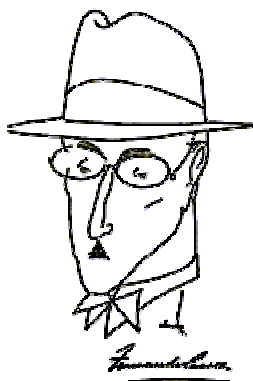
Aos funcionários do SAME,
pela ajuda com os prontuários dos indivíduos da pesquisa.

*Enfim,
a todos que contribuíram de diferentes formas para o desenvolvimento deste trabalho.
Muito obrigada!*

***Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e
nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não
nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais
bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."***

(Charles Chaplin)

"Tudo o que chega, chega sempre por alguma razão."
(Fernando Pessoa)



SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxv
LISTA DE FIGURAS.....	xxix
LISTA DE TABELAS.....	xxxiii
RESUMO.....	xxxv
ABSTRACT.....	xxxix
1. INTRODUÇÃO.....	43
1.1. Aspectos Gerais.....	45
1.2. Sílica e autoimunidade.....	47
2. OBJETIVOS	55
2.1. Objetivo Geral.....	57
2.2. Objetivos Específicos.....	57
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.1. População.....	61
3.2. Avaliação da presença de alterações autoimunes.....	62
3.3. Avaliação da produção de autoanticorpos.....	62
3.3.1. Obtenção do soro.....	62
3.3.2. Determinação dos níveis séricos de FAN e FR.....	63
3.3.3. Avaliação dos níveis séricos dos anticorpos anti-células endoteliais (“Anti- Endothelial Cell Antibodies”-AECAs).....	63
3.3.3.1. Isolamento e cultivo das células do endotélio vascular humano de cordão umbilical (Human Vascular Endothelial Cells-HUVECs).....	63
3.3.3.2. Ensaio de ELISA para quantificação dos AECAs.....	66

3.4. Determinação da Resposta Imune Celular.....	67
3.4.1. Obtenção das células mononucleares.....	67
3.4.2. Isolamento das células mononucleares do sangue total.....	67
3.4.3. Ensaio de proliferação celular.....	67
3.4.4. Quantificação do número absoluto de linfócitos.....	69
3.4.5. Quantificação das diferentes populações linfocitárias por citometria de fluxo.....	69
3.4.6. Quantificação dos níveis séricos da forma solúvel do ligante de Fas (sFasL).....	70
3.4.7. Quantificação das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL- 10.....	70
3.4.8. Quantificação da citocina TGF- β	71
3.5. Investigação de polimorfismos genéticos.....	72
3.5.1. Isolamento do DNA das células mononucleares do sangue periférico.....	72
3.5.2. Tipificação de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) pelo método de RFLP-PCR (Polimerase chain reaction-Restriction Fragments Length Polymorphism).....	73
3.5.2.1. PD1.3 G/A (+7146 G/A).....	73
3.5.2.2. PD1.5 C/T (+7785 C/T).....	74
3.5.2.3. CTLA-4+49 G/A.....	74
3.5.2.4. CTLA-4-318 C/T.....	75
3.6. Análise Estatística.....	76
4. RESULTADOS.....	77

4.1. Avaliação da presença de alterações autoimunes pela análise do questionário “A Connective Tissue Disease Screening Questionnaire for Population Studies”	79
4.2. Determinação dos níveis séricos de Fator anti-núcleo (FAN) e Fator reumatóide (FR).....	79
4.3. Determinação dos níveis séricos dos anticorpos anti-células endoteliais (AECAS).....	81
4.4. Proliferação de linfócitos de indivíduos expostos à sílica cultivados em presença de soro com níveis elevados de sIL-2R α ou soro homólogo do tipo AB.....	82
4.5. Número absoluto de linfócitos.....	83
4.6. Determinação das populações de linfócitos T regulatórios CD4+CD25+ FoxP3+.....	84
4.7. Expressão do marcador CTLA-4 (CD152) em linfócitos CD4+.....	85
4.8. Expressão do marcador CTLA-4 (CD152) em linfócitos CD8+.....	86
4.9. Expressão do marcador PD-1 (CD279) em linfócitos CD4+.....	87
4.10. Expressão do marcador PD-1 (CD279) em linfócitos CD8+.....	88
4.11. Genotipagem e frequência alélica dos SNPs CTLA-4+49G/A e CTLA-4- 318C/T.....	89
4.12. Genotipagem e frequência alélica dos SNPs PD-1.3G/A (+7146G/A) e PD- 1.5C/T(+7785C/T).....	90
4.13. Comparação da expressão de PD-1 nos indivíduos com genótipo GG e GA.....	92
4.14. Determinação das populações de células “Natural Killer” CD3- CD16+CD56+.....	93
4.15. Determinação dos níveis séricos da forma solúvel do ligante de Fas (sFasL).....	94

4.16. Quantificação das citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares.....	95
5. DISCUSSÃO.....	105
6. CONCLUSÃO.....	123
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
ANEXOS.....	145
Anexo I.....	147
Anexo II.....	149
Anexo III.....	150
APÊNDICES.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS

ROS- Espécies reativas do oxigênio

IL- interleucina

TNF- α - do inglês “*tumor necrosis factor alpha*” ou fator de necrose tumoral alfa

DAIs - Doenças autoimunes

FAN- Fator anti-núcleo

FR- Fator reumatóide

LES- Lúpus eritematoso sistêmico

AR- Artrite reumatóide

AECAs- do inglês “*anti-endothelial cell antibodies*” ou anticorpos anti-células endoteliais

PHA- do inglês “*phytohemmagglutinin*” ou fitohemaglutinina

TREG - célula T reguladora

FoxP3- do inglês “*forkhead box protein*”

PD-1- do inglês “*programmed cell death*”

CTLA-4 - do inglês “*cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4*”, ou molécula 4 associada ao linfócito T citotóxico

PD-L- ligante de PD-1

sFasL- Fas ligante solúvel

NK- do inglês “*Natural killer*” ou células matadoras naturais

IFN- γ - do inglês “*gamma interferon*” ou interferon gama

TGF- β - do inglês “*tumor growth factor*” ou fator de crescimento tumoral”

sIL-2R- receptor α solúvel para IL-2

SNP- do inglês “*Single Nucleotide Polymorphism*” ou polimorfismo de único nucleotídeo

DNA - do inglês “*desoxyribonucleic acid*” ou ácido desoxirribonucleico

dNTP - desoxi-nucleotídeos trifosfato

PCR - do inglês “*polymerase chain reaction*” ou reação de polimerização em cadeia

RFLP *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RPMI - meio *Roswell Park Memorial Institute*

CD - do inglês “*cluster of differentiation*”, ou grupamento de diferenciação

Th - T “*helper*” - células T auxiliares

Células T CD4- Linfócitos T auxiliares

Células T CD8- Linfócitos T citotóxicos

FACS - do inglês "*Fluorescence-Activated Cell Sorter*"

FITC - do inglês "*fluorescein isothiocyanate*" ou isotiocianato de fluoresceína

PE - "*PhycoErythrin*" ou ficoeritrina

APC- "Allophycocyanin"

IFI-Imunofluorescência indireta

HUVECs- do inglês "Human vascular endothelial cells" ou células do endotélio vascular humano"

PBS - do inglês "*phosphate buffer saline*", ou solução salina tamponada de fosfatos

EDTA - sal di-sódico do ácido etilenodiaminotetracético

³H timidina- Timidina tritiada

mg- Miligramas

cm³- Centímetros cúbicos

mL- Mililitros

ng-Nanogramas

pg-Picogramas

nm-nanômetros

AI-Amplitude interquartílica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Anticorpos anti-células endoteliais (AECAs) presentes no soro dos indivíduos expostos à sílica.....	81
Figura 2	Resposta proliferativa frente à PHA de linfócitos provenientes de indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33) incubados com soro com níveis elevados de sIL-2R α ou soro homólogo do tipo AB.....	83
Figura 3	Células CD4+CD25+FOXP3+ presentes no sangue periférico de indivíduos expostos à sílica.....	84
Figura 4	Células CD3+CD4+CD152+ presentes no sangue periférico de indivíduos expostos à sílica.....	85
Figura 5	Células CD3+CD8+CD152+ presentes no sangue periférico de indivíduos expostos à sílica.....	86
Figura 6	Células CD3+CD4+CD279+ presentes no sangue periférico de indivíduos expostos à sílica.....	87
Figura 7	Células CD3+CD8+CD279+ presentes no sangue periférico de indivíduos expostos à sílica.....	88
Figura 8	Mediana e valores individuais da porcentagem (%) de expressão de CD279 nas células T CD4 de trabalhadores expostos à sílica apresentando o genótipo GG (n=64) e GA (n=6) e dos controles apresentando o genótipo GA (n=6) na análise do polimorfismo PD1.3.....	92
Figura 9	Células NK (CD3-CD16+CD56+) presentes no sangue periférico de indivíduos expostos à sílica.....	93
Figura 10	Níveis de Fas ligante solúvel (sFasL) no soro de indivíduos expostos à sílica.....	94
Figura 11	Níveis de IFN- γ no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA).....	97

Figura 12	Níveis de TNF- α no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA).....	98
Figura 13	Níveis de IL1- β no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA).....	99
Figura 14	Níveis de IL-2 no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA).....	100
Figura 15	Níveis de IL-6 no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA).....	101
Figura 16	Níveis de IL-10 no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA).....	102
Figura 17	Níveis de TGF- β no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA).....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Porcentagem de indivíduos expostos à sílica positivos para FAN e FR nas duas primeiras avaliações do estudo temático e no presente estudo.....	80
Tabela 2	Genótipo e frequência alélica dos SNPs CTLA-4 +49G/A e CTLA-4 -318C/T em indivíduos expostos à sílica e controles.....	89
Tabela 3	Genótipo e frequência alélica dos SNPs PD-1.3 e PD-1.5 em indivíduos expostos à sílica e controles.....	91
Tabela 4	Produção das citocinas pró e anti-inflamatórias no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico.....	96

RESUMO

A sílica cristalina, ou quartzo, é um mineral abundante na areia, rochas e solo, cuja exposição crônica predispõe a lesões pulmonares, proliferação de fibroblastos e produção excessiva de colágeno no pulmão causando silicose, uma forma de fibrose pulmonar. A exposição ocupacional à sílica cristalina também tem sido considerada um fator predisponente a doenças autoimunes como artrite reumatóide, esclerodermia e lúpus eritematoso sistêmico. Neste sentido, a sílica tem mostrado agir como adjuvante, aumentando os níveis de imunocomplexos e imunoglobulinas de forma inespecífica, podendo estar relacionado ao desenvolvimento de doença autoimune. Porém, a relação entre exposição à sílica e o desenvolvimento de autoimunidade não está clara devido à falta de conhecimento dos mecanismos envolvidos. Não se sabe se a silicose constitui apenas um marcador de exposição a altos níveis de sílica em pó ou se é uma patologia que pode predispor à doença autoimune. Assim, uma investigação mais acurada de indicadores de autoimunidade em indivíduos com silicose é necessária. Nossos resultados apresentam evidências de alterações compatíveis com autoimunidade nos indivíduos expostos à sílica comparado com a população controle ao demonstrar ativação da resposta imune humoral e celular, além de alterações funcionais nos linfócitos T (LT). Isto foi verificado pelos níveis elevados de fator anti-núcleo, fator reumatóide e anticorpos anti-células endoteliais; pelo aumento da resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico, dos níveis séricos de Fas ligante solúvel, do número de células Natural Killer e alteração dos níveis das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10 e TGF- β bem como alterações funcionais nos LT pela menor expressão das moléculas regulatórias CTLA-4 e PD-1. Além

disso, nosso estudo sugeriu uma influência genética na expressão do receptor PD-1 pela menor expressão deste na superfície das células T CD4+ em indivíduos com o genótipo GG no estudo do polimorfismo PD1.3 e também demonstrou que a autoimunidade pode ocorrer anteriormente às manifestações clínicas de silicose.

ABSTRACT

Crystalline silica, or quartz, is a mineral abundant in sand, rock and soil which chronic exposure is known to predispose to pulmonary lesions, fibroblasts proliferation and excessive collagen production in the lungs that leads to silicosis, a form of pulmonary fibrosis. Occupational exposure to crystalline silica dust has been examined as a possible risk factor with respect to several autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, scleroderma and systemic lupus erythematosus. In this regard, silica has been known to have an adjuvant effect on immunocomplexes and immunoglobulins production in a non-specific manner, thus reinforcing its relation with the appearance of autoimmunity. However, the relationship between silica exposure and the development of autoimmunity remains to be elucidated because the mechanisms underlying this association are unknown. It is unclear whether silicosis is only a marker for high-level silica dust exposure or whether it represents a pathologic process that may predispose some individuals to the development of autoimmune disease. Therefore, an accurate investigation of the autoimmunity indicators in silicotic individuals is required. Our results present evidences of alterations compatible with autoimmunity in silica-exposed individuals as compared to the control population by demonstrating an activation of humoral and cellular immune responses as well as functional alterations in T lymphocytes (LT). It was shown by the increased levels of antinuclear antibodies, rheumatoid factor and anti-endothelial cell antibodies, by the increased proliferative response of peripheral blood mononuclear cells, augmented levels of serum soluble Fas ligand, number of Natural Killer cells and alterations of IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10 and TGF- β cytokine levels as well as by functional LT alterations by the

lower expression of CTLA-4 and PD-1 regulatory molecules. In addition, our study suggested a genetic influence in the expression of PD-1 receptor by its lower expression in the surface of T CD4+ cells in individuals carrying GG genotype in the study of PD1.3 polymorphism and also demonstrated that autoimmunity can occur before the clinical manifestations of silicosis.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

Há muito tempo, profissionais da área de saúde e cientistas discutem a importância dos fatores ambientais na etiologia de doenças alérgicas e infecciosas. Porém, nos últimos anos, o impacto da exposição ocupacional sobre o desenvolvimento de doenças caracterizadas por uma reatividade exacerbada (tais como as hipersensibilidades e autoimunidade) ou deprimida (imunossupressão e imunodeficiência) responde pela promoção da saúde dos trabalhadores nos países mais desenvolvidos e pelo incremento dos programas de prevenção, de fiscalização, de vigilância em saúde, de educação continuada e de investimento em pesquisa.

O rápido avanço nas áreas de biologia e genética do sistema imune, associado às novas descobertas sobre a natureza das alterações autoimunes vêm possibilitando investigações mais abrangentes relacionadas a estas doenças. Paralelamente, estudos de manifestações autoimunes em animais aumentam nossa compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes nesses processos patológicos e trazem indicações de vários fatores ambientais responsáveis por induzir doenças autoimunes no homem.

A sílica cristalina ou quartzo é um mineral abundante nas rochas, areia e solo (Parks et al., 1999). Tal mineral tem sido utilizado em fábricas de vidro, cerâmica, argila, eletrônicos, abrasivos, e em muitas atividades do ramo da construção (Altindag et al., 2003; Irwin, 2003; Yassin et al., 2005) e pode ser nociva quando inalada como pó (partículas < 5µm) (Parks et al., 1999). Sabe-se que a deposição de sílica cristalina no pulmão pode resultar em um ciclo de dano celular e tecidual, proliferação de fibroblastos e produção excessiva de colágeno, causando fibrose pulmonar ou silicose (Craighead et al., 1998). Após contato com a sílica, os macrófagos alveolares produzem vários fatores inflamatórios

e fibrogênicos como espécies reativas do oxigênio (ROS), mediadores lipídicos, citocinas [interleucina (IL)-1, IL-6, IL-12 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)] e fatores de crescimento derivados de macrófagos, os quais são críticos para a patogênese da sílica (Lapp e Castranova, 1993; Shi et al., 1998). As pneumoconioses, especialmente a silicose e a asbestose, constituem-se, tanto nos países desenvolvidos, como no Brasil, num dos principais problemas em saúde ocupacional (Mossman e Churg, 1998).

Estudos em indivíduos com histórico de exposição ocupacional a altos níveis de sílica demonstram índices aumentados de doenças autoimunes, em comparação com aqueles observados na população em geral. Estudos experimentais demonstram que a sílica pode atuar como adjuvante, aumentando os níveis de anticorpos, imunocomplexos e imunoglobulinas de forma não-específica (revisado por Parks et al., 1999). Este é um dos mecanismos pelo qual a sílica pode estar envolvida no desenvolvimento de doença autoimune.

No entanto, muitas dúvidas permanecem relacionadas à fisiopatologia, etiologia, mecanismos e multiplicidade de efeitos decorrentes da exposição à sílica. Por exemplo, silicose e pneumoconioses têm sido associadas com níveis aumentados de auto-anticorpos, imunocomplexos e imunoglobulinas, mesmo na ausência de indicadores clínicos de doenças autoimunes específicas. Muitos casos de doenças autoimunes em indivíduos expostos à sílica são identificados durante a investigação ou tratamento de silicose. Além disso, em alguns indivíduos expostos à sílica, a doença autoimune se desenvolve anteriormente às manifestações clínicas de silicose. Entretanto, não está claro se a silicose é simplesmente um marcador de exposição a altos níveis de poeira de sílica ou se representa um processo patológico que pode predispor alguns indivíduos ao desenvolvimento de doença autoimune (Parks et al., 1999; Powell et al., 1999).

Até o momento, a maioria dos estudos não prossegue com exames sistêmicos de parâmetros indicadores de autoimunidade em indivíduos expostos à sílica. Para algumas doenças decorrentes de exposições ambientais, como a silicose, ainda não existem marcadores de exposição específicos e validados, daí a relevância da identificação de testes que permitam uma avaliação precoce de alterações imunotoxicológicas produzidas por este tipo de exposição.

1.2. Sílica e autoimunidade

É de conhecimento da comunidade científica que os mecanismos periféricos de tolerância celular são essenciais para o controle das células auto-reativas e a perda ou redução destes mecanismos pode resultar no desenvolvimento de doenças autoimunes (DAIs), as quais caracterizam-se pela reação inapropriada da resposta imune contra antígenos próprios. Portanto, as DAIs se desenvolvem quando linfócitos auto-reativos escapam dos mecanismos de tolerância imunológica, são ativados e começam a atacar os tecidos próprios. Embora os mecanismos pelos quais isso ocorra ainda não estejam completamente elucidados, acredita-se que o desenvolvimento das DAIs é resultante de uma interação entre fatores genéticos e ambientais (revisado por Rioux e Abbas, 2005; revisado por Lleo et al., 2010). Neste sentido, a sílica surge como um fator ambiental envolvido no aparecimento de autoimunidade. Relatos na literatura apontam para a presença de anormalidades imunológicas como hipergamaglobulinemia, aparecimento de autoanticorpos e ocorrência de doenças autoimunes em indivíduos expostos à sílica. (Doll et al., 1981; Sanchez-Roman et al., 1993; Conrad e Mehlhorn, 2000; Subra et al., 2001,).

O aumento na produção de autoanticorpos como Fator Anti-Núcleo (FAN) e Fator Reumatóide (FR) tem sido descrito em indivíduos expostos à sílica (Lippmann et al., 1973;

Soutar et al., 1974; Jones et al., 1976). Além disso, estudos epidemiológicos que avaliam a relação entre exposição à sílica e doença autoimune sugerem associação com lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatóide (AR), esclerodermia, vasculite e glomerulonefrite (revisado por Parks et al., 1999). Sendo assim, a avaliação da presença de autoanticorpos FAN e FR torna-se importante nos indivíduos expostos à sílica, em face da ocorrência freqüente destes anticorpos em indivíduos expostos e da sua relação com doenças autoimunes, como LES e AR (Pitkeathly e Taylor, 1967).

Os anticorpos anti-células endoteliais (AECAs) também são autoanticorpos importantes, visto que são encontrados em diversas patologias incluindo LES, AR e vasculites (Ciéslik et al., 2008). Vasculites de pequenos vasos como a Granulomatose de Wegner e doenças como LES, apesar de distintas, compartilham um grau variável de dano à parede vascular e tal injúria é causada pelos AECAs (Yu et al., 2005). A patogenicidade dos AECAs ainda não está definida, entretanto, têm-se sugerido que, em pacientes com esclerodermia, tais anticorpos podem desempenhar papel importante na ativação de células endoteliais e na expressão de moléculas de adesão (Carvalho et al., 1996).

Acredita-se que as a produção de autoanticorpos observada em indivíduos expostos à sílica ocorra devido à capacidade das partículas de sílica processadas pelas células apresentadoras de antígeno promover uma ativação dos linfócitos que pode levar a anormalidades funcionais (Pernis, 2005). Porém, estudos experimentais têm comprovado que a ativação dos linfócitos pela sílica não gera somente a produção de autoanticorpos, ao observarem que as partículas de sílica foram capazes de promover uma ativação policlonal de células T humanas *in vitro* (Ueki et al., 1994). Baseado no exposto, outro foco importante do presente estudo foi a avaliação da capacidade linfoproliferativa em presença do mitógeno fitohemaglutinina (PHA) e a atividade funcional das células T regulatórias

(TREG) CD4+CD25+, responsáveis pela manutenção da tolerância imunológica periférica, através da determinação de marcadores expressos nestas células. Seleccionamos o fator de transcrição “forkhead box protein” P3 (FoxP3), o receptor de membrana “Programmed cell death” (PD-1) e marcadores como “Cytotoxic T lymphocyte antigen-4” (CTLA-4), os quais estão envolvidos ativamente na manutenção da auto-tolerância imune e imunorregulação das células T regulatórias (Sugimoto et al., 2006; Floess et al., 2007).

As células TREGS são produzidas normalmente pelo timo como uma subpopulação de células T funcionalmente distintas e maduras, e constituem aproximadamente 2-10% da população de células T CD4+ (revisado por Sakaguchi, 2004). A maioria das TREGS são CD4+ e expressam constitutivamente a molécula CD25 (cadeia α do receptor de IL-2, IL-2R α) (Sakaguchi et al., 2005). Além da geração tímica de células TREGS CD4+CD25+, células T periféricas não-TREGS podem adquirir a expressão de Foxp3 e converter-se em células TREGS *in vivo* após estimulação antigénica crónica ou em condições de linfopenia (Walker et al., 2003; Apostolou e Von Boehmer, 2004; Curotto de Lafaille et al., 2004). O fator de transcrição FoxP3 das células T CD4+CD25+ é considerado o marcador mais específico por estar mais diretamente relacionado ao controle do desenvolvimento e função destas células (Lima, 2006; Sugimoto et al., 2006; Floess et al., 2007). Marcadores como o CTLA-4 e o receptor de morte celular, o PD-1, também se destacam pela manutenção da tolerância periférica regulando a ativação de células T e tolerância através de sinais secundários que podem influenciar a ativação, inibição e moderação da responsividade das células T (Kristjansdottir et al., 2010).

O CTLA-4 (CD152) é um receptor da família CD28 expressado nas células T, envolvido na supressão e controle de células T auto-reativas. Tal molécula exerce seus efeitos inibitórios ao se ligar aos mesmos ligantes que a molécula CD28 (B7-1 e B7-2),

porém com maior afinidade. A via co-estimulatória B7-CD28/CTLA-4 exerce um papel dominante na regulação da ativação das células T e os ligantes B7 promovem o sinal principal para o aumento e sustentação das respostas mediadas pelas células T pela interação com CD28, mas transmite sinais inibitórios após se ligar ao CTLA-4 (Sharpe e Freeman, 2002). A deficiência de CTLA-4 resulta em uma linfoproliferação massiva fatal e doença autoimune em camundongos (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995). Além disso, Greenwald e colaboradores (2005) demonstraram que o bloqueio *in vivo* do CTLA-4 inibe a auto-tolerância natural, promovendo autoimunidade e descreve a ligação genética de diversas doenças autoimunes como tireoidite de Hashimoto, artrite reumatóide e esclerose múltipla com o *locus* CTLA-4.

Polimorfismos no gene CTLA-4 têm sido relacionados a várias doenças autoimunes como artrite reumatóide (Rodríguez et al., 2002), diabetes tipo I (kavvoura e Ioannidis, 2005) e granulomatose com poliangite (Granulomatose de Wegener) (Huang et al., 2000a; Giscombe et al., 2002; Zhou et al., 2004; Slot et al., 2008). Além disso, diversos relatos da literatura apontam para uma relação entre estes polimorfismos e uma redução da expressão ou da função inibitória do CTLA-4 (Huang et al., 2000b; Kouki et al., 2000; Ligiers et al., 2001; Kristjansdottir et al., 2010).

PD-1 (CD279) é outro membro da família CD28/B7 de moléculas co-estimulatórias que regulam a tolerância das células T. PD-1 e seus ligantes (PD-L1 e PD-L2) também desempenham uma função inibitória importante na regulação da homeostase imune e na manutenção da tolerância periférica por meio de sinalização co-estimulatória em linfócitos ativados (Dinesh et al., 2010). As interações entre PD-1 e PD-L são importantes para o controle tanto da fase inicial de ativação e expansão de células T auto-reativas quanto das funções efectoras de células T auto-reativas e injúria aos órgãos-alvo (Keir et al., 2007,

2008). Camundongos com deficiência de PD-1-desenvolvem doenças autoimunes espontâneas, indicando assim uma função essencial desempenhada por esta molécula nos mecanismos de tolerância (Dinesh et al., 2010; Nishimura et al., 1998, 1999, 2001). Enquanto que a expressão do CTLA-4 é restrita às células T, a expressão do PD-1 pode ocorrer também nas células B, *Natural killer* T, monócitos, sugerindo um papel mais amplo ao PD-1 na regulação imune (Kristjansdottir et al., 2010).

Diversos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) têm sido descritos no gene PDCD1, responsável pela codificação do PD-1 (Prokunina et al., 2002). Neste sentido, variantes do gene PDCD1 estão associadas a diversas doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla (Kroner et al., 2005; Kristjansdottir et al., 2010). Os polimorfismos no gene PDCD1 têm sido estudados com o objetivo de identificar a patogênese de diversas doenças autoimunes incluindo a diabetes tipo I (Nielsen et al., 2003), lúpus eritematoso sistêmico (LES) (Prokunina et al., 2002; Kristjansdottir et al., 2010), artrite reumatóide (AR) (Lin et al., 2004; Prokunina et al., 2004) e granulomatose com poliangite (Granulomatose de Wegener) (Slot et al., 2008).

Estudo recente demonstrou que CTLA-4 e PD-1 cooperam na manutenção da tolerância periférica frente às células T CD8+ (Probst et al., 2005). Tendo em vista a importância das moléculas CTLA-4 e PD-1 na inibição da ativação dos linfócitos, tais moléculas bem como os genes PDCD1 e CTLA-4 são candidatos para estudos de associação com a exposição ocupacional à sílica, condição na qual ocorre uma resposta imune exacerbada.

A avaliação da ocorrência de autoimunidade em nosso estudo também consistiu no estudo das células *Natural Killer* (NK). Apesar de sua função citotóxica e antiviral bem conhecida, as células NK vêm demonstrando agir como reguladores da imunidade

adaptativa, interagindo e promovendo sinais estimulatórios para os componentes da resposta imune adaptativa como os linfócitos T e células dendríticas. Tal interação confere um amplo papel a estas células no processo imune e um potencial envolvimento em diversas doenças como infecções, câncer e desordens autoimunes. No que diz respeito ao seu envolvimento com autoimunidade, acredita-se que a modulação do número de células NK circulantes parece ser um evento primário que desempenha um papel fundamental na patogênese de uma série de doenças autoimunes (revisado por Perricone et al., 2008). Neste sentido, estudo com trabalhadores expostos ao asbestos, um silicato mineral de comportamento semelhante à sílica, demonstrou um aumento do número e diminuição da função células NK (Froom et al., 2000).

Ainda, tendo em vista a importância da via apoptótica mediada pelo Fas na regulação da autoimunidade envolvendo as células T, focamos no estudo desta via através da determinação dos níveis da forma solúvel do ligante de Fas (sFasL) no soro dos indivíduos expostos à sílica, uma vez que a morte da célula T é desencadeada por uma via que envolve a molécula Fas e o seu ligante (FasL) (Lenardo, 2003; Prasad e Prabhakar, 2003). A regulação anormal da apoptose, particularmente no que diz respeito ao envolvimento da via Fas/FasL, possui importante papel na patogênese das desordens autoimunes (Nagata e Golstein, 1995; Rudin et al., 1996; Lenardo, 2003; Prasad e Prabhakar, 2003). Neste sentido, uma forma solúvel do ligante de Fas (sFasL), naturalmente produzida pela clivagem mediada por enzimas do tipo metalo-proteinases, surge como molécula importante no processo de autoimunidade (Kayagaki et al., 1995; Tanaka et al., 1995). Tal forma solúvel encontra-se presente em concentrações elevadas no soro de indivíduos com diversos tipos de doenças autoimunes, incluindo Síndrome de Sjögren e artrite reumatóide (Nozawa et al., 1997), sendo capaz de promover injúria aos

tecidos e apoptose em células susceptíveis (Suda et al., 1995; Hosaka et al., 1998). Relatos na literatura demonstram haver uma desregulação na via apoptótica mediada pelo Fas em indivíduos expostos à sílica (Otsuki et al., 1998 e 2006) que pode levar à uma sobrevivência celular inadequada e culminar com o desenvolvimento de reações autoimunes.

As citocinas também desempenham um papel importante na resposta imune pela regulação do desenvolvimento e diferenciação dos diferentes tipos celulares envolvidos na resposta imune. Acredita-se que a desregulação da produção ou ação destes mediadores contribua para o desenvolvimento de autoimunidade e doença autoimune (O'Shea et al., 2002). Neste sentido, evidências sugerem o envolvimento da produção alterada de algumas citocinas na relação entre exposição à sílica e doenças autoimunes, como esclerodermia, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide (Frank et al., 1998; Parks et al., 1999). Por exemplo, a secreção elevada de IL-6 nos pulmões de mineiros de carvão parece explicar a freqüente associação com doenças autoimunes, bem como a hipergamaglobulinemia observada nesses indivíduos (Youinou et al., 1985). Da mesma forma, citocinas como interferon gama (IFN- γ) e TNF- α têm sido relacionadas com a patogênese de doenças autoimunes como artrite reumatóide, diabetes mellitus e esclerose múltipla (Yin et al., 1999). Estudo envolvendo mineradores de urânio com esclerodermia sugere a existência de uma regulação diferencial da produção de TNF- α pelos macrófagos após ingestão da sílica, a qual pode estar envolvida na relação entre a exposição à sílica e a ocorrência da doença (Frank et al., 1998). Desta forma, um parâmetro adicional avaliado em nosso estudo consistiu na detecção dos níveis das principais citocinas envolvidas no processo de autoimunidade.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da exposição à poeira de sílica nos diversos parâmetros envolvidos no desenvolvimento de autoimunidade em trabalhadores com histórico de exposição ocupacional à sílica.

2.2. Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral, os seguintes parâmetros foram avaliados:

- a) Presença de sintomas indicativos de doenças autoimunes do tecido conjuntivo pela aplicação do questionário validado intitulado “A Connective Tissue Disease Screening Questionnaire for Population Studies” (CDT), publicado na *Annals of epidemiology-AEP*, vol. 5 (4), 297-302, 1995;
- b) Produção de autoanticorpos através da detecção de fator anti-núcleo (FAN), fator reumatóide (FR) e anticorpos anti-células endoteliais (AECAs);
- c) Atividade de linfócitos pela quantificação de:
 - Proliferação de células mononucleares do sangue periférico em presença de soro com receptor α solúvel para IL-2 (sIL-2R α) ou soro homólogo AB;
 - Número de células T regulatórias CD4+CD25+FoxP3+;
 - Número de células T CD4+ e CD8+ expressando CTLA-4 e PD-1;
 - Número de células *Natural Killer* (NK) CD3-CD16+CD56+;
 - Liberação de molécula de Fas ligante solúvel (sFasL) sérica;
 - Produção das principais citocinas envolvidas no processo de autoimunidade (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e TGF- β);
- d) Estudos genéticos pela tipificação de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) nos genes CTLA-4 (CTLA-4+49, CTLA-4-318) e PDCD1 (PD1.3 e PD1.5).

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População

Para a realização dos experimentos utilizamos sangue periférico de trabalhadores expostos à sílica, conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP (parecer nº: 260/2000, Anexo I), coletado no ambulatório da Medicina do Trabalho do HC da UNICAMP, sob a supervisão do Prof. Dr. Ericson Bagatin e Dr. Alessandro Vito Lido. Todos os indivíduos incluídos no estudo concordaram com a participação, após leitura do termo de consentimento e assinaram o documento para a análise clínica e laboratorial (Anexos II e III).

O presente estudo trata-se de um estudo transversal utilizando-se 103 trabalhadores expostos à sílica. Os indivíduos estudados são trabalhadores (21 mulheres e 82 homens; 57 ± 11 anos) com histórico de exposição ocupacional ao pó de sílica cristalina por 18 ± 9 anos, atuando no ramo da metalurgia, indústria cerâmica, jateamento de areia, marmorarias, etc., da região de Campinas. Os trabalhadores foram encaminhados ao HC/UNICAMP pelo médico da empresa ou pelo sindicato. Os trabalhadores estudados não se protegeram de maneira adequada nem deram atenção especial à segurança pessoal em seu local de trabalho. **Critérios de inclusão:** trabalhadores expostos à sílica (59 silicóticos e 44 não-silicóticos), nas atividades listadas acima por no mínimo 1 ano, mesmo na ausência de anormalidades radiológicas compatíveis com silicose; a exposição à sílica foi confirmada por uma história ocupacional detalhada e confiável e o diagnóstico de silicose baseou-se na confirmação da exposição acompanhada pela presença de alterações no parênquima pulmonar de acordo com a classificação do *International Labour Office* (ILO, 2000). **Critérios de exclusão:** trabalhadores: a) expostos concomitantemente à sílica e a outras

poeiras que podem interferir na resposta imune como asbesto, cobalto, berílio, níquel, cromo, etc; b) em tratamento para doenças infecciosas crônicas como tuberculose, paracoccidioidomicose ou outras micoses do pulmão; c) em tratamento com drogas imunossupressoras.

No grupo controle avaliamos 98 indivíduos para a avaliação dos autoanticorpos e 33 indivíduos para avaliação dos marcadores de linfócitos. Os controles são pacientes sem histórico de exposição à sílica, de mesma faixa etária (54 ± 10 anos), sexo e etnia, que não estavam fazendo uso de medicamentos, fumo e álcool no momento da coleta e que também não apresentavam doenças renais ou pulmonares.

3.2. Avaliação da presença de alterações autoimunes

Para avaliação da presença de alterações autoimunes utilizamos o questionário validado intitulado “A Connective Tissue Disease Screening Questionnaire for Population Studies” (CDT), publicado na AEP, vol. 5 (4), 297-302, 1995. Este questionário foi baseado nos critérios do American College of Rheumatology para Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), artrite reumatóide (AR), e Esclerodermia (SSc) e em itens relacionados aos critérios de classificação para polimiosite ou dermatomiosite e síndrome de Sjögren.

3.3. Avaliação da produção de autoanticorpos

3.3.1. Obtenção do soro

Para a obtenção do soro, coletamos o sangue tanto dos indivíduos expostos à sílica bem como de voluntários sadios por punção da veia antecubital em tubos sem anticoagulante (tubo seco) e em condições estéreis. Aguardamos a retração do coágulo e aliquotamos o soro em *eppendorfs* devidamente identificados.

3.3.2. Determinação dos níveis séricos de FAN e FR

A determinação dos níveis séricos de FAN e FR foi realizada no Instituto Voza de Medicina e Diagnóstico-Campinas/SP. O método empregado para o diagnóstico de FAN foi imunofluorescência indireta (IFI); o soro do paciente foi diluído e colocado sobre o células HEp-2 (antígenos específicos para anticorpos anti-nucleares) fixadas em lâminas de vidro. Em seguida, as lâminas foram incubadas para permitir a formação do complexo antígeno-anticorpo. Após as lavagens, a preparação com o conjugado fluorescente foi incubada e, caso houvesse o anticorpo no soro, o conjugado reagiria com o anticorpo específico para o antígeno. O conjugado não ligado foi removido por lavagens e o preparado foi observado em microscópio de fluorescência. No caso do FR, o método empregado para detecção foi a nefelometria, baseado nas reações de precipitação entre antígeno e anticorpo em soluções diluídas que produzem um aumento da reflexão da luz, a qual pode ser diretamente medida pela dispersão da luz incidente.

3.3.3. Quantificação dos níveis séricos dos anticorpos anti-células endoteliais (“Anti-endothelial cell antibodies”-AECAs)

3.3.3.1. Isolamento e cultivo das células do endotélio vascular humano de cordão umbilical (Human Vascular Endothelial Cells-HUVECs)

Para isolamento das HUVECs, utilizou-se ao menos 2 cordões umbilicais para cada isolamento devido à variação biológica. Os cordões umbilicais eram doados por mães que deram à luz na maternidade do University Hospital Maastricht, Maastricht, Holanda, conforme aprovado pelo Comitê de ética da instituição.

Os cordões umbilicais eram trazidos a temperatura ambiente e então coletados do interior do frasco com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro especialmente moldada para tal. Os cordões eram retirados um a um, colocados sobre a superfície do fluxo laminar devidamente limpa e forrada com papel absorvente e limpos com álcool 70%. Em seguida, cortava-se uma das extremidades do cordão, introduzia-se uma agulha metálica na veia umbilical e à agulha acoplava-se uma seringa de 20 mL contendo PBS estéril. A outra extremidade do cordão era colocada em um frasco estéril de 1 litro e assim que o PBS passava pelo interior da veia umbilical o sangue contido no interior da veia era descartado no frasco. Realizava-se tal operação de lavagem 2 a 3 vezes até o fluido sair limpo, ou seja, até a completa remoção do sangue, sempre tomando cuidado para eventuais vazamentos decorrentes de danos na parede do cordão. Por fim, introduzia-se ar no interior da veia para eliminar resíduos de PBS e uma das extremidades era fechada com uma presilha apropriada para então ser introduzida a quimiotripsina (5 mg/mL, 500 μ L diluída em 50 mL de PBS) até preencher todo o cordão. Após introdução, lacrava-se a outra extremidade também com uma presilha, cortava-se os excessos das extremidades do cordão contendo quimiotripsina e então colocava-se em frasco contendo PBS e incubava-se em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após esse período, os cordões eram novamente limpos com álcool 70% e massageados por 30 segundos a fim de favorecer o desprendimento das células endoteliais da parede do vaso. Uma das extremidades era pinçada com tesoura apropriada na parte anterior à presilha e então a parte do cordão contendo a presilha era cortada e a parte pinçada era aberta para então o líquido ser drenado em tubos de 50 mL contendo 10mL de meio de cultura (RPMI-1640 contendo Glutamax-1). Após coleta do fluido de todos os cordões umbilicais, os tubos contendo o “pool” de células endoteliais eram centrifugados por 10 minutos a 20°C a 400xg. Os sobrenadantes eram descartados e ressuspensava-se o

botão celular em 10 mL de meio de cultura especial (RPMI 1640 contendo Glutamax 1, penicilina-estreptomicina, fator de crescimento de célula endotelial bovino, heparina e soro fetal bovino).

Anteriormente ao processo de extração das células endoteliais, garrafas de cultura de células de 75cm² tinham suas paredes cobertas com 2 a 3 mL de gelatina a 1% e eram incubadas em estufa a 37° C e 5 % de CO₂ por 30 minutos. Aspirava-se então o excesso da gelatina e adicionava-se 10mL da suspensão celular contendo as células endoteliais em às garrafas de cultura, as quais eram incubadas em estufa a 37° C e 5 % de CO₂.

No dia seguinte retirava-se o meio de cultura e a camada de células aderidas era lavada com PBS até a completa remoção das células vermelhas contidas no frasco. Novamente, 10 mL de meio de cultura especial era adicionado e as garrafas novamente incubadas em estufa a 37° C e 5 % de CO₂. As culturas eram verificadas diariamente até a visualização da monocamada celular. Após a completa formação da monocamada celular visualizada com auxílio de microscópio ótico (células endoteliais dispostas de forma coesa e espaiada), realizava-se o procedimento de passagem das células em garrafas de cultura. Tal monocamada é chamada de P0. O procedimento de passagem era realizado aspirando-se o sobrenadante da garrafa contendo a P0, lavando-se a monocamada com PBS e desprendendo as células com 900µL de tripsina/EDTA. Para ter certeza do total desprendimento das células da monocamada, observava-se em microscópio as células desprendidas e assim que ocorria o desprendimento, neutralizava-se com 10mL de meio de cultura. Retirava-se as células da garrafa e dividia-se em duas outras garrafas previamente tratadas com a gelatina, conforme descrito anteriormente. Cultivava-se em estufa até que se verificasse a formação da monocamada e assim tinha-se a P1. As passagens eram realizadas até que tivéssemos a P3 e tais células eram transferidas para placas de 96 cavidades.

3.3.3.2. Ensaio de ELISA para quantificação dos AECAs

Após as placas de 96 cavidades terem sua superfície recoberta pelas células endoteliais da P3 (formação da monocamada), era realizada a técnica de ELISA para a determinação dos anticorpos anti-células endoteliais (AECAs). Primeiramente, as cavidades eram lavadas duas vezes com meio RPMI-1640 (pH 6,0) contendo 1% de soro fetal bovino, (150µL/cavidade) e incubadas por 45 minutos a 4°C com o mesmo volume de meio de cultura. Durante a incubação, o soro dos pacientes e controles, bem como os soros positivos e negativos empregados como controle da reação (soros de referência), eram diluídos 1:100 em meio RPMI-1640 (pH6,0) contendo 1% de soro fetal bovino.

Terminada a incubação, o sobrenadante era descartado por inversão das placas, as amostras de soro diluídas eram adicionadas em triplicata e incubava-se as placas por 1 hora e 30 minutos a 4°C. Então, as placas eram lavadas 3 vezes com meio RPMI-1640 (pH6,0) contendo 1% de soro fetal bovino, adicionava-se 100µL/cavidade do anticorpo anti-IgG humana conjugado com fosfatase alcalina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) diluído 1:2000 em meio RPMI-1640 (pH 6,0) contendo 1% de soro fetal bovino e as placas eram incubadas por 1 hora a 4°C. As placas eram novamente lavadas 3 vezes com PBS, adicionava-se 100 µL do substrato (p-nitrofenilfenofosfato 1mg/mL diluído em dietanolamina) e incubava-se por 1 hora à temperatura ambiente. A reação era interrompida com 100 µL de NaOH 5N e as absorbâncias das placas eram lidas a 405 nm em espectrofotômetro. Considerando-se que este é um bioensaio, foram realizados ao menos três experimentos independentes em células de diferentes isolamentos para garantir a reprodutibilidade dos resultados e validação do experimento.

3.4. Determinação da Resposta Imune Celular

3.4.1. Obtenção das células mononucleares

Para a obtenção das células mononucleares, coletamos o sangue tanto dos indivíduos expostos à sílica bem como de voluntários sadios por punção da veia antecubital em tubos heparinizados e em condições estéreis.

3.4.2. Isolamento das células mononucleares do sangue total

As células mononucleares periféricas foram separadas por gradiente de densidade, utilizando-se a solução de Ficoll-Hypaque ($d=1,077$). Para tal, o sangue total coletado foi homogeneizado por inversão e diluído com meio de cultura RPMI não suplementado, na proporção 1:1 (v/v). O sangue diluído foi colocado lentamente em um tubo de centrifuga contendo 4 mL de Ficoll-Hypaque e centrifugado por 30 min a 1500 rpm refrigerado a 4°C. Em seguida, a nuvem leucocitária foi retirada com pipeta Pasteur e lavada 2 vezes com meio de cultura RPMI 1640 não suplementado. Então, as células mononucleares foram utilizadas para a cultura de células e citometria de fluxo.

3.4.3. Ensaio de proliferação celular

Após o isolamento, as células mononucleares obtidas do sangue total foram ajustadas à concentração de 1×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, penicilina-estreptomicina (Flow lab.-USA), 12,5 mM de tampão HEPES (pH=7.4), 0.2% NaHCO_3 e 10% de soro humano tipo AB ou 10% de soro com níveis elevados de sIL-2R α . Em seguida, as células foram cultivadas em placas de 96 cavidades, na concentração de 2×10^5 por cavidade em triplicata, na ausência ou na presença de fitohemaglutinina (PHA, Sigma-

USA), na concentração de 5 µg/mL. A triplicata sem a presença de mitógeno foi denominada "basal", enquanto que a triplicata estimulada foi denominada "estimulada". As células foram incubadas por 72h para o mitógeno não-específico, em estufa a 37°C e 5% de CO₂; dezoito horas antes do término dos cultivos, 1,0 µCi de Timidina tritiada (³H Thymidine, Amershan Pharmacia Biotech, UK) diluída em meio RPMI 1640 foi adicionada em cada orifício das placas de cultura. Completado o período de incubação, as culturas foram aspiradas com auxílio de coletor de células (Cambridge Tech. MA - USA), sendo o material radioativo incorporado às células em proliferação transferido para membranas de fibra de vidro (Cambridge Technology Inc., USA). As membranas foram colocadas em frascos próprios contendo 2mL de líquido de cintilação cada. A incorporação de Timidina ³H foi determinada em Cintilador Beta (Beckman LS 6000 Series Scintillation System, USA). De acordo com os resultados fornecidos pelo aparelho em contagens por minuto (cpm) da radioatividade incorporada pelas células, foi possível definir se houve ou não ativação e proliferação linfocitária.

A média das cpm de cada triplicata foi calculada, e os resultados, expressos pelo delta. O delta é calculado subtraindo-se a média das cpm das triplicatas estimuladas (com mitógeno PHA) pela média das com das triplicatas basais correspondentes.

Linfoproliferação (delta) = média da triplicata estimulada - média da triplicata basal
--

3.4.4. Quantificação do número absoluto de linfócitos

O número absoluto dos linfócitos foi determinado no sangue total utilizando o contador hematológico Sysmex® (Kobe, Japão).

3.4.5. Quantificação das diferentes populações linfocitárias por citometria de fluxo.

A expressão das moléculas de superfície CD3, CD8, CD4, CD25, CD16, CD56, CTLA-4, PD-1 e da proteína citoplasmática FoxP3, foi determinada pela técnica de citometria de fluxo. As células mononucleares foram obtidas conforme descrito no item 3.4.2.

Brevemente, adicionou-se uma alíquota de 100 µL da suspensão ajustada para 1×10^6 células/mL em tubos próprios para citometria. Adicionou-se então os anticorpos monoclonais específicos (BD-Pharmingen, USA) para a marcação da população celular a ser analisada, conjugado com os fluorocromos FITC, PE, PE-Cy5, PerCP, APC, APC-Cy7 ou Alexa Fluor 647®, dependendo do painel empregado para a fenotipagem celular. As células foram então incubadas por 20 minutos para a marcação dos antígenos de superfície. As células marcadas, assim como as células com os isotipos controles, foram então lavadas e fixadas com paraformaldeído a 2%. No caso da marcação intracelular da proteína citoplasmática FoxP3, após a marcação de superfície com os anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD25, realizamos a permeabilização *overnight* das células em geladeira utilizando-se uma suspensão de 100 µL de PBS adicionado de 10% soro humano do tipo AB e 1% de TritonX-100. Em seguida, as células foram lavadas e adicionou-se o anticorpo anti-FoxP3. As células foram então incubadas por 20 minutos para a marcação do antígeno FoxP3. As células marcadas foram lavadas e fixadas com paraformaldeído a 2%.

A leitura foi feita em citômetro de fluxo (FACS Aria® – BD – Lab. de marcadores celulares do Hemocentro da UNICAMP).

3.4.6. Quantificação dos níveis séricos da forma solúvel do ligante Fas (sFasL)

Para a determinação dos níveis séricos da forma solúvel do ligante Fas, utilizou-se placas de ELISA de 96 wells previamente sensibilizadas e lavadas com tampão de lavagem. Após lavagem, 100µL dos padrões (citocina recombinante) e das amostras foram adicionados aos orifícios da placa e, após a adição de 50 µL do anticorpo monoclonal de detecção marcado com biotina (diluição 1:100) em cada orifício, as placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após incubação, a placa foi lavada e, a seguir, 100 µL de uma solução de streptavidina-peroxidase (diluição 1:200) foram adicionados aos orifícios, incubando-se por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem, 100 µL do substrato foi adicionado em cada cavidade e a placa foi incubada a temperatura ambiente por um período de aproximadamente 20 minutos para o desenvolvimento da cor devido à reação enzimática. A reação foi interrompida adicionando-se 100 µL de solução de parada (H₂SO₄, 4N) em cada orifício. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 450 nm. As concentrações de sFasL presentes nas amostras foram calculadas a partir da curva padrão e os resultados expressos em nanogramas por mililitro (ng/mL).

3.4.7. Quantificação de citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6 e IL-10

As citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6 e IL-10 foram quantificadas nos sobrenadantes de cultura das células mononucleares do sangue periférico utilizando-se o sistema de detecção de citocinas “Beadlyte® Human 22-Plex Multi-Cytokine Detection System” (Upstate, Temecula, CA, USA) de acordo com a recomendação do fabricante,

utilizando-se todos os reagentes e tampões especificados. Primeiramente, 50 µL de sobrenadante da cultura das células mononucleares do sangue periférico de cada um dos indivíduos estudados foram incubados com *beads* revestidas com anticorpos específicos para cada uma das citocinas avaliadas por 2h em temperatura ambiente em agitador de placas (Lab-Line Instrument, Park, IL). Após esse tempo, as *beads* foram incubadas com 25 µL de anticorpos anti-citocinas humanas conjugados com biotina em cada cavidade da placa por 1 hora e 30 minutos no escuro à temperatura ambiente em agitador de placas e em seguida, 25 µL of estreptavidina-ficoeritrina foram adicionadas em cada cavidade e as placas foram incubadas novamente por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente em agitador de placas. As cavidades foram então lavadas e as *beads* ressuspensas em tampão de fluxo específico por 5 minutos para então as amostras serem analisadas no aparelho Luminex 200® (Luminex, Austin, TX, USA). Os níveis de citocinas foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL), calculados a partir de curvas-padrão geradas com concentrações conhecidas de citocinas recombinantes.

3.4.8. Quantificação da citocina TGF-β

Para a determinação dos níveis de TGF-β no sobrenadante de cultura de linfócitos, utilizou-se o método de ELISA (BD OptEIA®) conforme as recomendações do fabricante (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Para a determinação dos níveis desta citocina, utilizou-se placas de ELISA de 96 wells as quais foram sensibilizadas com anticorpo de captura *overnight* a 4°C e em seguida lavadas com tampão de lavagem. Após lavagem, as placas foram bloqueadas com 200µL/cavidade de diluente de ensaio contendo PBS (pH 7,0) e soro fetal bovino em temperatura ambiente por 1 hora. Uma nova lavagem foi realizada e então 100µL dos padrões (citocina recombinante) e das amostras foram

adicionados aos orifícios da placa e as placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após incubação, a placa foi lavada e, a seguir, 100 µL de uma solução de streptavidina-peroxidase e anticorpo de detecção, foram adicionados aos orifícios, incubando-se por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem, 100 µL do substrato foi adicionado em cada cavidade e a placa foi incubada por um período de aproximadamente 30 minutos protegida da luz em temperatura ambiente para o desenvolvimento da cor devido à reação enzimática. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de solução de parada (H₂SO₄, 4N) em cada orifício. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 450 nm. As concentrações de TGF-β presentes nas amostras foram calculadas a partir da curva padrão e os resultados expressos em pg/mL.

3.5. Investigação de polimorfismos genéticos

3.5.1. Isolamento do DNA das células mononucleares do sangue periférico

Para o isolamento do DNA, utilizamos o kit comercial (Roche, Alemanha) e o procedimento foi realizado conforme se segue e segundo a recomendação do fabricante.

A cada tubo tipo “eppendorf” contendo 200 µL de uma suspensão de células mononucleares (1x10⁶ células) em PBS, adicionou-se uma alíquota de 200 µL de tampão de ligação e 40 µL de proteinase K. Os tubos foram então agitados, incubados à 70°C por 10 minutos e 100 µL de isopropanol foi adicionado. Em seguida, o conteúdo de cada tubo foi transferido para tubos com filtro acoplados a tubos coletores e centrifugados por 1 minuto a 8.000xg. Os tubos coletores foram descartados e os tubos filtrantes acoplados a novos tubos coletores. Adicionou-se em seguida 500 µL de tampão inibidor de remoção e procedeu-se à centrifugação por 1 minuto a 8.000xg. Os tubos coletores foram novamente

descartados e os tubos filtrantes foram lavados 2x com 500 µL de tampão de lavagem, sempre centrifugando-se a 8000xg e trocando-se o tubo coletor. Realizou-se então uma centrifugação adicional (13000xg por 10 segundos) a fim de garantir a completa remoção do tampão de lavagem do tubo filtrante.

Por fim, os tubos filtrantes foram acoplados a tubos tipo “eppendorf”, adicionou-se 200µL de tampão de eluição previamente aquecido a 70°C e centrifugou-se por 1 minuto a 8000xg. O tubo “eppendorf” agora contendo o DNA eluído foi devidamente identificado e armazenado até o momento do uso a -20°C.

3.5.2. Tipificação de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) pelo método da PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragments Length Polymorphism*)

3.5.2.1. PD-1.3G/A (+7146G/A)

Um fragmento de 381 bp foi amplificado usando 0,5µL do primer 5′-GATCCACTGTGCCTTCCTTTC-3′ “sense”, 0,5µL do primer 5′-CAAGCTCTCCTGTCTCCAATG-3′ “antisense”, 1 µL de DNA, 0,2µL da Taq DNA polimerase e 0,25µL de dNTP mix (20mM). Após o passo inicial de incubação (10 minutos a 94°C), a reação da polimerase em cadeia (Polimerase Chain Reaction-PCR) foi realizada por 35 ciclos: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 59°C e 30 segundos a 72°C. Uma extensão final de 10 minutos à 72°C completou a reação. O SNP foi determinado pela digestão do produto do PCR com a enzima de restrição Pst1 (10U/µL, Fermentas) por 2 horas à 37°C, resultando em 2 fragmentos de 314 e 67bp se o nucleotídeo G está presente e 3 fragmentos de 216, 98 e 67 bp quando o nucleotídeo A está presente.

3.5.2.2. PD-1.5C/T (+7785C/T)

O polimorfismo PD1.5C/T foi determinado em um fragmento de 329 bp criado utilizando-se 0,5µL do primer 5'-ACGGAGTATGCCACCATTGTC-3' "sense", 0,5µL do primer 5'-CTGTGGGCATTGAGACATGAG-3' "antisense", 1 µL de DNA, 0,2µL da Taq DNA polimerase e 0,25µL de dNTP mix (20mM). Após o passo inicial de incubação (10 minutos a 94°C), a reação de PCR foi realizada por 35 ciclos: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 59°C e 30 segundos a 72°C. Uma extensão final de 10 minutos à 72°C completou a reação. O SNP foi determinado pela digestão do produto do PCR com a enzima de restrição PvuII (10U/µL, Fermentas) por 2 horas à 37°C, resultando em 2 fragmentos de 261 e 68bp se o nucleotídeo T está presente.

3.5.2.3. CTLA-4+49G/A

O polimorfismo CTLA-4+49A/G foi determinado em um fragmento de 162 bp criado utilizando-se o primer 5'-GCTCTACTTCCTGAAGACCT-3' "sense" e o primer 5'-AGTCTCACTCACCTTTGCAG-3' "antisense". Após o passo inicial de incubação (10 minutos a 94°C), a reação de PCR foi realizada por 40 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C e 60 segundos a 72°C. O SNP foi determinado pela digestão do produto do PCR com a enzima de restrição BbvI (2U/µL Fermentas) por 1 hora e meia à 65°C, resultando em 2 fragmentos de 88 e 74bp se o nucleotídeo G está presente e um fragmento de 162bp quando o nucleotídeo A está presente pois não há digestão.

3.5.2.4. CTLA-4-318C/T

O polimorfismo CTLA-4-318C/T foi determinado em um fragmento de 247 bp criado utilizando-se o primer 5'-AAATGAATTGGACTGGATGGT-3' "sense" e o primer

5'-TTACGAGAAAGGAAGCCGTG -3' "antisense". Após o passo inicial de incubação (10 minutos a 94°C), a reação de PCR foi realizada por 40 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C e 60 segundos a 72°C. O SNP foi determinado pela digestão do produto do PCR com a enzima de restrição Tru1L (10U/μL, Fermentas) por 1 hora e meia à 65°C, resultando em 2 fragmentos de 226 e 21bp se o nucleotídeo C está presente e 3 fragmentos de 130, 96 e 21bp quando o nucleotídeo T está presente.

Para todas as análises descritas nos itens (3.5.2.1 a 3.5.2.4.), os produtos da digestão (16μl) foram misturados com 2μl de "loading mix" e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com gel star[®]. A corrida eletroforética geralmente ocorria a 100V no tempo necessário para completa separação dos fragmentos gerados. Utilizava-se um marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas) para facilitar a identificação dos fragmentos presentes em cada amostra. Os géis de agarose foram fotografados para análise do tamanho dos fragmentos.

Para cada PCR, foi inserido um controle negativo que visava detectar possíveis contaminações por DNA. Este controle continha no tubo de reação todos os reagentes da PCR, exceto o DNA genômico. Quando este controle apresentava-se contaminado, todos os produtos de PCR do ensaio em questão eram excluídos da análise.

3.6. Análise Estatística

Os dados foram expressos como mediana e amplitude interquartílica (AI), calculadas pelo programa estatístico SPSS versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). As

comparações estatísticas entre as medianas dos dois grupos em questão neste estudo foram realizadas através do teste de Mann-Whitney. Consideramos estatisticamente significativos os valores de $P < 0,05$.

A frequência dos genótipos para os polimorfismos estudados foram testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando o teste de chi-quadrado (χ^2). A frequência dos alelos e do genótipo foram comparados entre pacientes e controles pelo teste χ^2 usando o programa estatístico SPSS versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Consideramos estatisticamente significativos os valores de $P < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da presença de alterações autoimunes pela análise do questionário “A Connective Tissue Disease Screening Questionnaire for Population Studies”

A avaliação do questionário para pesquisa da presença de alterações autoimunes nos indivíduos expostos à sílica e controles demonstrou que, dentre os 103 indivíduos expostos entrevistados, 42% (n=43) relataram sintomas indicativos da presença de autoimunidade (34 homens e 9 mulheres), sendo que em 12% (n=12) os sintomas eram indicativos de artrite reumatóide, 14% (n=14) de lúpus eritematoso sistêmico, 12% (n=12) de esclerodermia, 23% (n=24) de poliomiosite ou dermatomiosite, 14% (n=14) de síndrome de Sjögren (Apêndice I). Destes 43 indivíduos, 47% (n=20) relataram sintomas compatíveis com duas ou mais doenças autoimunes (13 homens e 7 mulheres). Por outro lado, apenas 3% (n=1) dos indivíduos do grupo controle relataram ter sintomas que caracterizasse qualquer das doenças autoimunes pesquisadas no questionário, no caso, artrite reumatóide.

4.2. Determinação dos níveis séricos de Fator anti-núcleo (FAN) e Fator reumatóide (FR)

Observamos que a porcentagem de autoanticorpos FAN e FR é significativamente maior no grupo de indivíduos expostos à poeira de sílica (26% e 13%, respectivamente) em relação ao grupo controle (3% e 2%, respectivamente). Além disso, se compararmos a incidência desses autoanticorpos com a incidência encontrada nas avaliações anteriores durante o estudo temático do qual deriva este trabalho, podemos que 76% (26 casos) dos 34 casos positivos para FAN e 81% (n=13 casos) dos 21 casos positivos para FR, observados nas duas avaliações anteriores ao presente estudo, confirmaram os resultados na presente

avaliação. Estes valores refletem uma incidência de FAN e FR em aproximadamente 26% e 13%, respectivamente, da população exposta (n=103), comparado à incidência de 3% e 2%, respectivamente, na população controle (n=98), a qual se manteve apresentando a mesma incidência de FAN e FR ao longo das avaliações. Além disso, 5 dos 8 novos casos positivos para FAN e 1 dos 3 novos casos positivos para FR que surgiram durante a segunda avaliação, confirmaram os resultados nesta terceira avaliação e 1 novo caso positivo para FAN surgiu no período entre a segunda e a presente avaliação. Vale ressaltar que 4 dos casos positivos para FAN e 6 dos positivos para FR, nas duas avaliações anteriores, não compareceram na presente avaliação (terceira avaliação). Além disso, dos 7 óbitos observados durante o estudo, apenas um paciente apresentou níveis de FAN e FR aumentados. Consideramos positivo para FAN os soros que apresentavam títulos de anticorpos maiores ou iguais a 1/80, conforme apresentado no Apêndice II e positivo para FR aqueles que apresentavam concentrações acima de 15 UI/mL (Apêndice III).

Tabela 1- Porcentagem de indivíduos expostos à sílica positivos para FAN e FR nas duas primeiras avaliações do estudo temático e no presente estudo

Avaliação/ano	FAN	FR
1ª (n=130)/2004	29 (22%)	18 (14%)
2ª (n=123)/2006	34 (27%)	18 (15%)
3ª (n=103)/2008-2009	27 (26%)	13 (13%)

4.3. Determinação dos níveis séricos dos anticorpos anti-células endoteliais (AECAs)

Conforme representado na Figura 1, o nível sérico médio dos AECAs está significativamente ($P<0,0001$) aumentado nos soros do grupo exposto à sílica comparado ao grupo controle [mediana e amplitude interquartílica (AI)= 0,22nm (0,19-0,27 nm); 0,17nm (0,15-0,21nm), respectivamente].

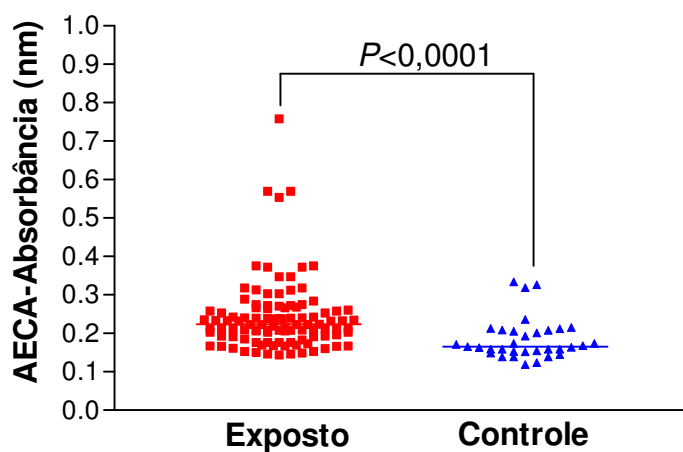


Figura 1. Anticorpos anti-células endoteliais (AECAs) presentes no soro dos indivíduos expostos à sílica. Ensaio realizado em triplicata. Os valores representados para cada paciente representam a mediana das absorbâncias de 3 experimentos independentes em soro de indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33).

4.4. Proliferação de linfócitos em presença de soro com níveis elevados de sIL-2R α ou soro homólogo do tipo AB

Observamos em nosso estudo temático um aumento significativo nos níveis receptores sIL-2R α no soro dos indivíduos expostos, em relação aos controles. No presente estudo avaliamos a capacidade linfoproliferativa frente ao estímulo com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA), em presença de soro com níveis elevados de sIL-2R α ou de soro homólogo do tipo AB. Os resultados estão representados na Figura 2, os quais demonstram um aumento significativo ($P<0,001$) na proliferação de linfócitos no grupo exposto em relação ao grupo controle. Por outro lado, não observamos diferenças no índice de proliferação quando as células obtidas de indivíduos expostos e dos controles foram cultivadas em presença de soro com níveis elevados de sIL-2R α ou soro homólogo do tipo AB [mediana do grupo exposto= 37995 cpm (AI 28172-52089cpm) e 38376cpm (AI=30441-49127cpm), respectivamente; mediana do grupo controle=26192cpm (AI=23075-35030cpm) e 28649cpm (AI=20871-35837cpm), respectivamente]. Os valores individuais estão representados para os indivíduos expostos e controles nos apêndices IV e V, respectivamente.

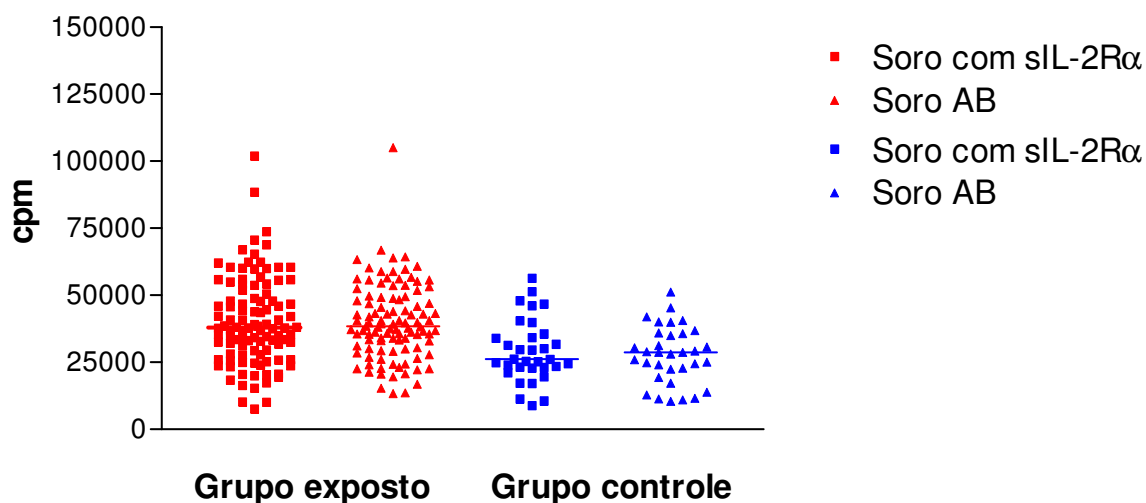


Figura 2. Resposta proliferativa frente à PHA de linfócitos provenientes de indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33) incubados com soro com níveis elevados de sIL-2R α ou soro homólogo do tipo AB. Os resultados estão representados como a mediana e os valores individuais de proliferação. Ensaio realizado em triplicata. PHA= fitohemaglutinina.

4.5. Número absoluto de linfócitos

O número absoluto de linfócitos encontrou-se significativamente ($P<0,0001$) reduzido no sangue periférico de trabalhadores expostos à sílica, atingindo níveis 1,3 vezes menores quando comparado aos controles [mediana= 1970 células/mm³ (AI=1600-2395 células/mm³) e 2581 células/mm³ (AI= 2312-2714 células/mm³), respectivamente]. Os valores individuais estão representados para os indivíduos expostos e controles nos apêndices VI e VII, respectivamente.

4.6. Determinação das populações de linfócitos T regulatórios CD4+CD25+FoxP3+

Conforme demonstrado na Figura 3, não houve diferença significativa no número de células da subpopulação linfocitária T_{REG} CD4+CD25+FoxP3+ entre o grupo exposto e o grupo controle [mediana grupo exposto= 23,20 células/mm³ (AI= 11,00-58,25 células/mm³); mediana grupo controle=21,00 células/mm³ (AI=13,00-32,10 células/mm³). Os valores individuais estão representados para os indivíduos expostos e controles nos apêndices VI e VII, respectivamente.

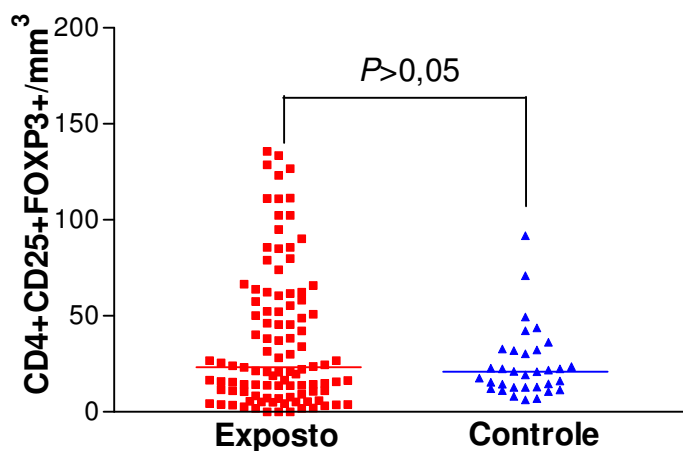


Figura 3. Células CD4+CD25+FOXP3+ presentes no sangue periférico de indivíduos expostos à sílica. Os resultados representam a mediana e os valores individuais do número de linfócitos T regulatórios CD4+CD25+FOXP3+/mm³ provenientes de indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33).

4.7. Expressão do marcador CTLA-4 (CD152) em linfócitos CD4+

Conforme representado na Figura 4, uma redução significativa na expressão do marcador CTLA-4 (CD152) foi observada nas células T CD4+ de indivíduos expostos à sílica. A mediana e amplitude interquartílica (AI) da expressão do marcador nos linfócitos da população exposta e controles foram, respectivamente, 1,28 células/mm³ (0,00-3,50 células/mm³) e 5,39 células/mm³ (0,00-12,44 células/mm³) ($P<0,01$). Os valores individuais estão representados para os indivíduos expostos e controles nos apêndices VI e VII, respectivamente.

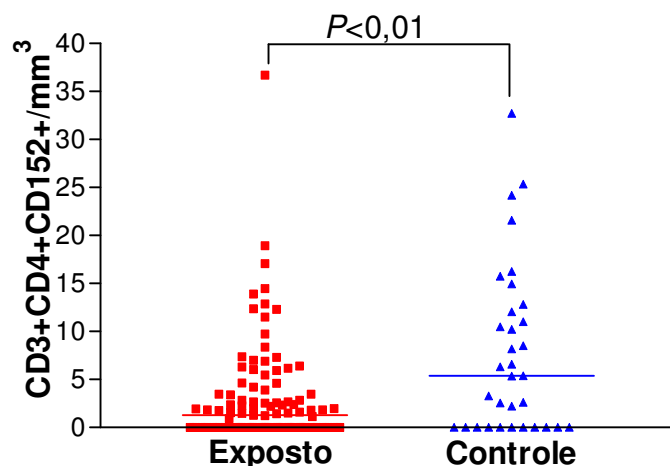


Figura 4. Células CD3+CD4+CD152+ presentes no sangue periférico de indivíduos expostos à sílica. Os resultados representam a mediana e os valores individuais do número de linfócitos T CD3+CD4+CD152+/mm³ provenientes de indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33).

4.8. Expressão do marcador CTLA-4 (CD152) em linfócitos CD8+

Conforme representado na Figura 5, não houve redução significativa ($P>0,05$) na expressão do marcador CTLA-4 (CD152) nas células T CD8+ de indivíduos expostos à sílica comparado aos controles [valores medianos= 1,82 células/mm³ (0,00-4,11 células/mm³) e 2,41 células/mm³ (0,00-6,82 células/mm³), respectivamente]. Os valores individuais estão representados para os indivíduos expostos e controles nos apêndices VI e VII, respectivamente.

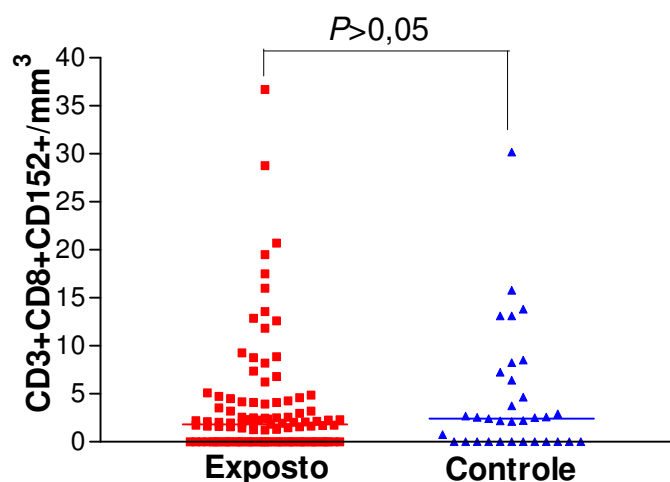


Figura 5. Células CD3+CD8+CD152+ presentes no sangue periférico de indivíduos expostos à sílica. Os resultados representam a mediana e os valores individuais do número de linfócitos T CD3+CD8+CD152+/mm³ provenientes de indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33).

4.9. Expressão do marcador PD-1 (CD279) em linfócitos CD4+

Conforme demonstrado na Figura 6, o número de linfócitos T CD4+ que expressam PD-1 (CD279) está significativamente reduzido ($P<0,0001$) no grupo exposto à sílica comparado ao grupo controle [valores medianos=15,84 células/mm³ (5,96-36,75 células/mm³) e 123,42 células/mm³ (25,99-271,29 células/mm³), respectivamente].

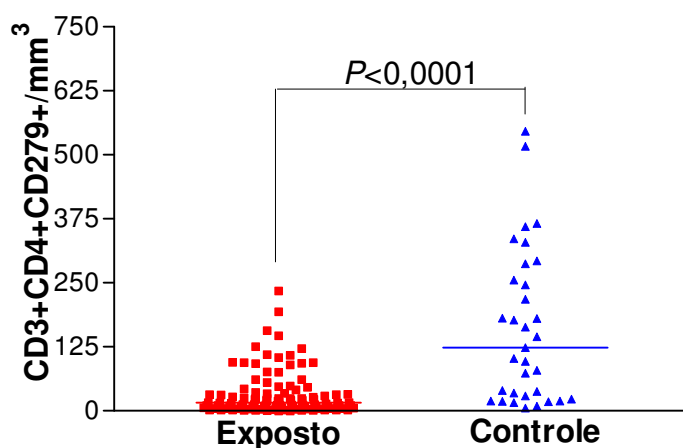


Figura 6. Células CD3+CD4+CD279+ presentes no sangue periférico de indivíduos expostos à sílica. Os resultados representam a mediana e os valores individuais do número de linfócitos T CD3+CD4+CD279+/mm³ provenientes de indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33).

4.10. Expressão do marcador PD-1 (CD279) em linfócitos CD8+

Conforme demonstrado na Figura 7, o número de linfócitos T CD8+ que expressam PD-1 (CD279) está significativamente reduzido ($P<0,0001$) no grupo exposto à sílica comparado ao grupo controle [valores medianos= 14,04 células/mm³ (4,88-31,86 células/mm³) e 120,12 células/mm³ (92,50-214,90 células/mm³), respectivamente].

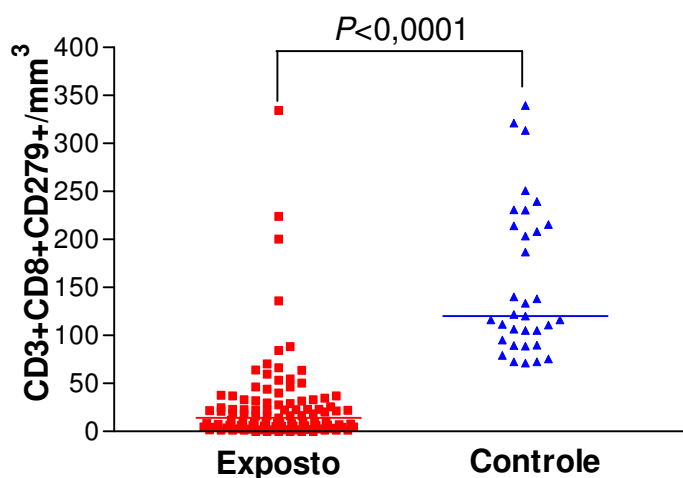


Figura 7. Células CD3+CD8+CD279+ presentes no sangue periférico de indivíduos expostos à sílica. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da porcentagem de linfócitos T CD3+CD8+CD279+ provenientes de indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33).

4.11. Genotipagem e frequência alélica dos SNPs CTLA-4 +49G/A e CTLA-4 -318C/T

Conforme demonstrado na Tabela 2, não encontramos diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) entre o genótipo e a frequência dos alelos no grupo exposto à sílica comparado ao grupo controle.

Tabela 2-Genótipo e frequência alélica dos SNPs CTLA-4 +49G/A e CTLA-4 -318C/T em indivíduos expostos à sílica e controles.

CTLA-4 SNPs	Indivíduos expostos n=70	Indivíduos controle n=30	χ^2	Valor de <i>P</i>
CTLA-4 +49G/A				
<u>Genótipo</u>				
GG	9 (12,9%)	3 (10,0%)	0,649	0,723
GA	29 (41,4%)	15 (50,0%)		
AA	32 (45,7%)	12 (40,0%)		
<u>Alelo</u>				
G	47 (33,6%)	21 (35,0%)	0,038	0,845
A	93 (66,4%)	39 (65,0%)		
CTLA-4 -318C/T				
<u>Genótipo</u>				
CC	63 (90,0%)	27 (90,0%)	0,000	1,000
CT	7 (10,0%)	3 (10,0%)		
TT	—	—		
<u>Alelo</u>				
C	133 (95,0%)	57 (95,0%)	0,000	1,000
T	7 (5,0%)	3 (5,0%)		

4.12. Genotipagem e frequência alélica dos SNPs PD-1.3G/A (+7146G/A) e PD-1.5C/T (+7785C/T)

Embora não tenha havido diferença significativa na frequência dos genótipos observamos no grupo exposto uma predominância de indivíduos com o genótipo GG (91,4%) e a inexistência do genótipo AA (Tabela 3). A baixa frequência do alelo A encontrada no grupo exposto em relação ao grupo controle corrobora estes achados ($P < 0,05$).

Em relação ao SNP PD1.5C/T não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre o genótipo e a frequência dos alelos no grupo exposto à sílica comparado ao grupo controle.

Tabela 3-Genótipo e frequência alélica dos SNPs PD-1.3 e PD-1.5 em indivíduos expostos à sílica e controles.

PDCD1 SNPs	Indivíduos expostos n=70 (%)	Indivíduos controle n=30 (%)	χ^2	Valor de <i>P</i>
PD-1.3				
<u>Genótipo</u>				
GG	64 (91,4%)	23 (76,7%)	5,145	0,060
GA	6 (8,6%)	6 (20,0%)		
AA	——	1 (3,3%)		
<u>Alelo</u>				
G	134 (95,7%)	52 (86,7%)	5,281	0,022*
A	6 (4,3%)	8 (13,3%)		
PD-1.5				
<u>Genótipo</u>				
CC	26 (37,1%)	14 (46,7%)	0,879	0,644
CT	32 (45,7%)	11 (36,7%)		
TT	12 (17,1%)	5 (16,7%)		
<u>Alelo</u>				
C	84 (60,0%)	39 (65,0%)	0,443	0,505
T	56 (40,0%)	21 (35,0%)		

*Valor estatisticamente significativo ($P < 0,05$)

4.13. Comparação da expressão de PD-1 nos indivíduos com genótipo GG e GA

Avaliamos também a expressão de PD-1 nas células T dos indivíduos expostos à sílica apresentando os genótipos PD-1.3G/G e PD-1.3G/A. Para tal, os trabalhadores expostos com o genótipo PD-1.3G/G (n=64) e os que apresentaram o genótipo PD-1.3G/A (n=6) foram comparados entre si e com os controles que apresentaram o genótipo PD-1.3G/A (n=6).

A comparação entre os genótipos PD-1.3G/G e PD-1.3G/A no grupo exposto mostrou menor expressão de PD-1 nas células T CD4 dos indivíduos com genótipo PD-1.3G/G (Figura 8), embora esta diferença não seja estatisticamente significativa ($P>0,05$). Além disso, a comparação dos indivíduos expostos com o genótipo PD-1.3G/A com os controles apresentando o genótipo PD-1.3G/A não apresentou diferença significativa na expressão de PD-1 nas células T CD4.

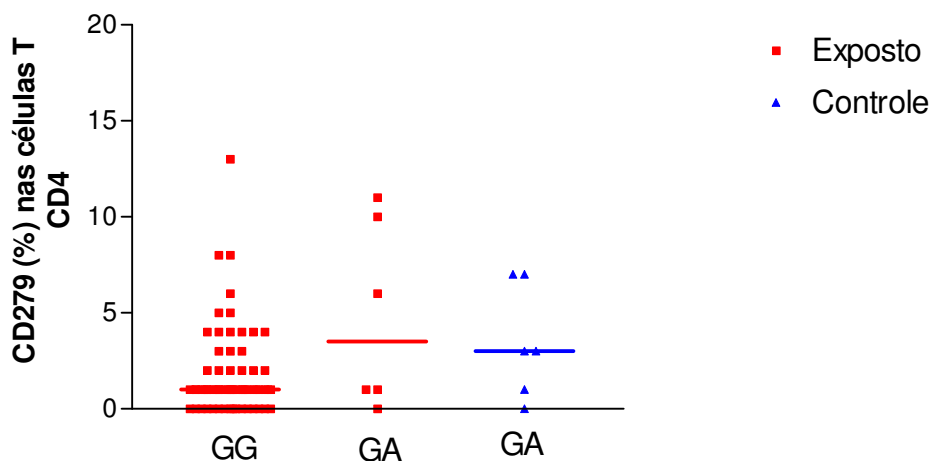


Figura 8. Mediana e valores individuais da porcentagem (%) de expressão de CD279 nas células T CD4 de trabalhadores expostos à sílica apresentando o genótipo GG (n=64) e GA (n=6) e dos controles apresentando o genótipo GA (n=6) na análise do polimorfismo PD1.3. A comparação das medianas não mostrou diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$).

4.14. Determinação das populações de células *Natural Killer* CD3-CD16+CD56+

Conforme representado na Figura 9, observamos um aumento significativo no número de células *Natural Killer* (NK) nos indivíduos expostos à sílica. A mediana de células NK da população exposta e controle foi, respectivamente, 25,30 células/mm³ (AI=15,10-35,6 células/mm³) e 17,60 células/mm³ (AI=12,45-23,35 células/mm³).

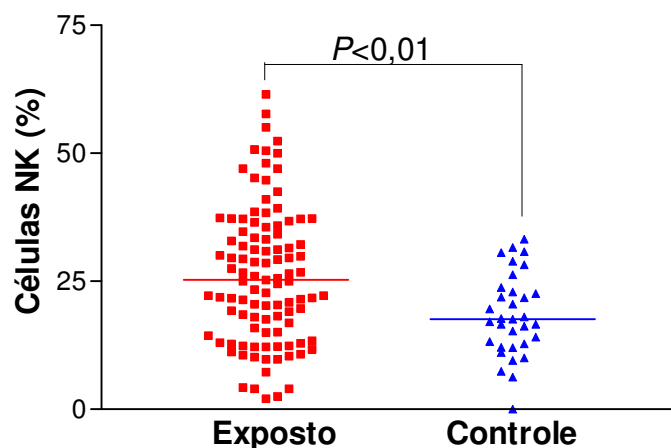


Figura 9. Células NK (CD3-CD16+CD56+) presentes no sangue periférico de indivíduos expostos à sílica. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da porcentagem de células NK CD3-CD16+CD56+ provenientes de indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33).

4.15. Determinação dos níveis séricos da forma solúvel do ligante de Fas (sFasL)

Conforme demonstrado na Figura 10, o nível sérico mediano da molécula solúvel de Fas ligante (sFasL) está significativamente ($P<0,01$) aumentado no grupo exposto à sílica comparado ao grupo controle, atingindo níveis 1,4 vezes maiores em relação controles [mediana=0,10 ng/mL, AI 0,05-0,31ng/mL (exposto), mediana=0,07 ng/mL, AI 0,02-0,09ng/mL (controle)].

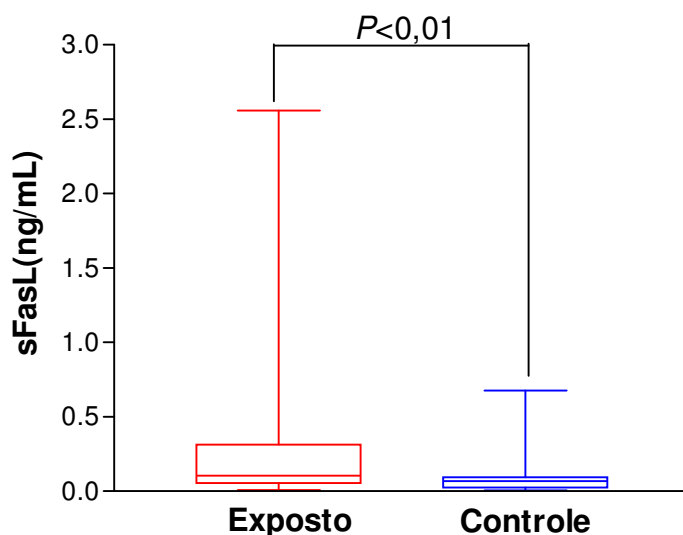


Figura 10. Níveis de Fas ligante solúvel (sFasL) no soro de indivíduos expostos à sílica. Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da concentração sérica em indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33).

4.16. Quantificação das citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares

Os níveis das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10 e TGF- β produzidos pelas células mononucleares do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica estão apresentados na Tabela 4 e Figuras 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17, respectivamente. Nós verificamos que os indivíduos expostos apresentaram um aumento significativo ($P<0,05$) na produção espontânea de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e TGF- β em comparação ao grupo controle. Entretanto, não observamos alterações significativas ($*P>0,05$) nos níveis de produção espontânea de IL-2. Após estimulação com o mitógeno PHA, as citocinas IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10 e TGF- β apresentaram-se significativamente ($*P<0,05$) aumentadas em nosso grupo de estudo, atingindo níveis 3, 3, 9 e 4-vezes, respectivamente, maiores que o grupo controle. Por outro lado, após estímulo, a IL-2 apresentou-se significativamente ($**P<0,01$) diminuída nos trabalhadores expostos à sílica, atingindo níveis 1,5 vezes menores que os controles.

Tabela 4- Produção das citocinas pró e anti-inflamatórias no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico.

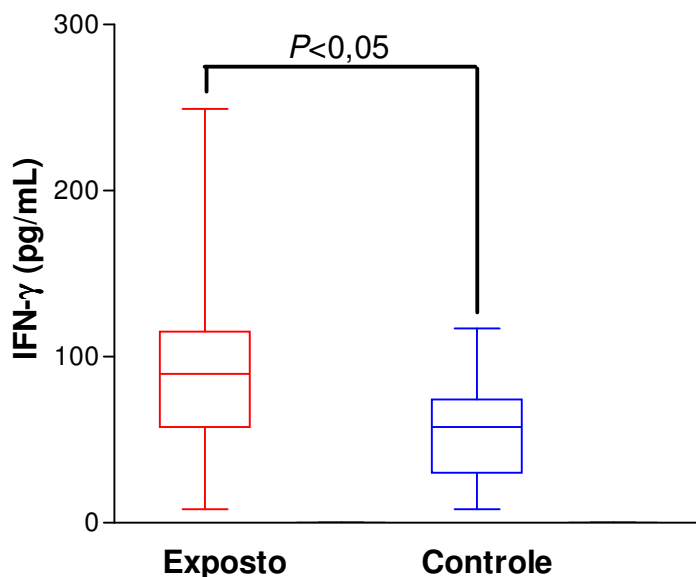
Citocina	Exposto		Controle	
	Espontânea	Estimulada	Espontânea	Estimulada
IFN- γ	89,60 * (57,6-113,1)	4108,00* (2652,8-6017,8)	57,60 (30,1-74,3)	1313,0 (905,5-4230,6)
TNF- α	29,00* (23,4-50,5)	465,10 (302,0-1031,0)	18,10 (14,2-24,2)	389,70 (250,4-541,4)
IL-1 β	45,60* (26,2-277,2)	177,20* (79,2-414,9)	22,70 (18,2-23,5)	58,80 (46,6-79,9)
IL-2	65,80 (46,3-89,6)	291,40** (191,0-432,6)	46,30 (39,5-80,9)	439,30 (372,6-583,1)
IL-6	1064,80* (648,53-7000,0)	7000,00* (4291,6-7000,0)	151,40 (92,8-177,6)	756,80 (598,0-1414,4)
IL-10	109,91* (82,8-414,8)	1416,80* (1126,2-2052,8)	36,13 (11,67-51,0)	350,10 (259,4-517,4)
TGF- β	27,49* (13,07-61,56)	40,61* (26,35-105,42)	12,32 (6,35-21,43)	19,99 (14,34-32,89)

Os valores são expressos em picogramas/mL (pg/mL) e representam a mediana dos valores encontrados nos grupos e amplitude interquartilica;

* $P < 0,05$, significativamente aumentado em relação ao grupo controle;

** $P < 0,05$, significativamente diminuído em relação ao grupo controle.

A)



B)

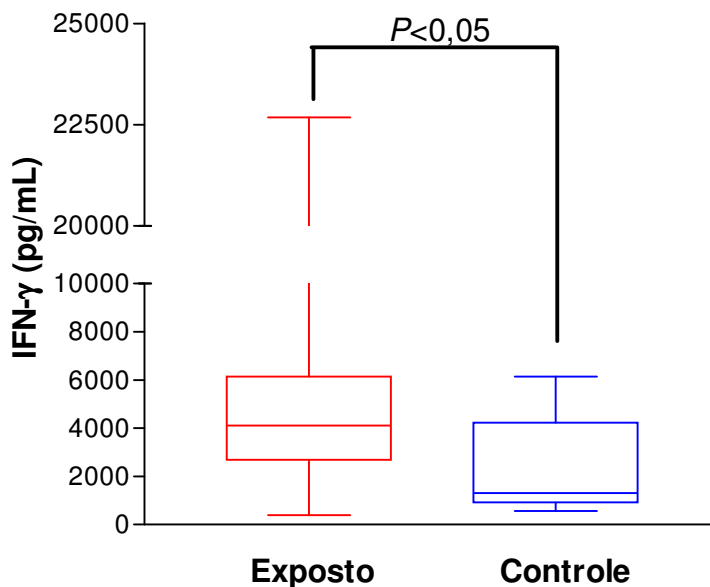
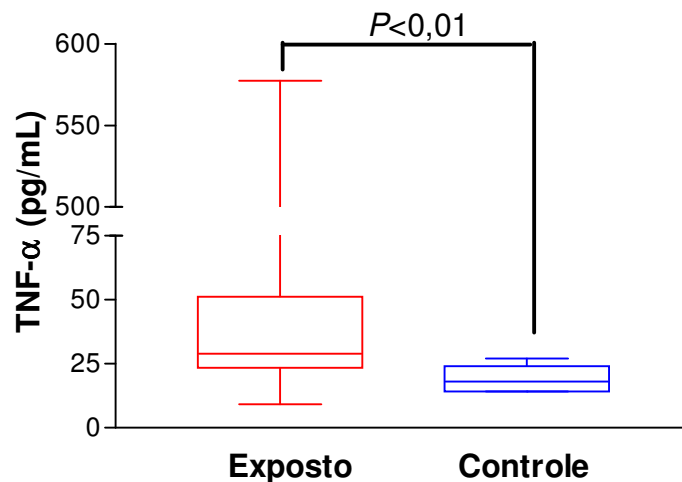


Figura 11. Níveis de IFN- γ no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA). Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e a amplitude interquartilica da concentração da referida citocina em indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33). PHA= fitohemaglutinina.

A)



B)

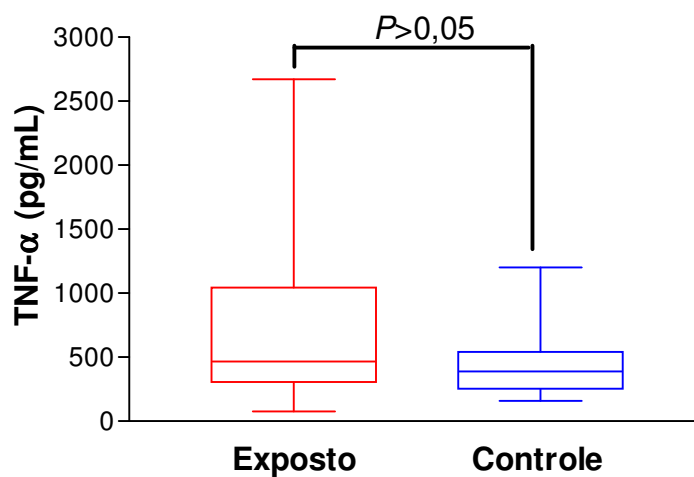
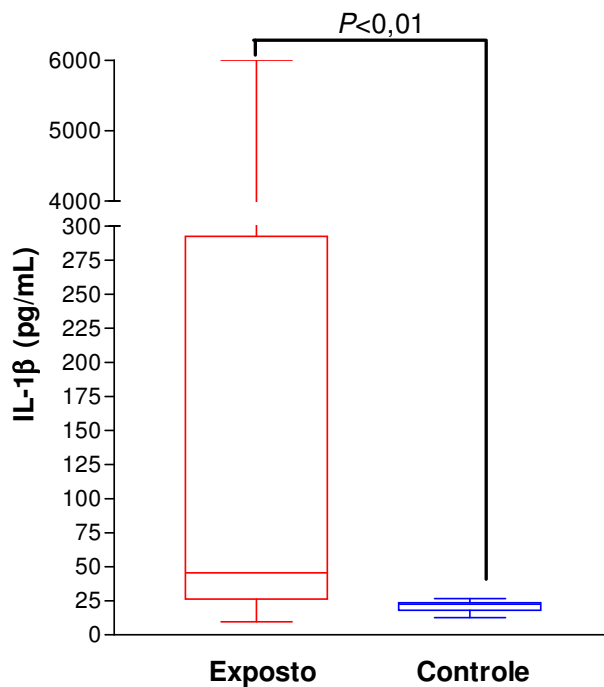


Figura 12. Níveis de TNF- α no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA). Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da concentração da referida citocina em indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33). PHA= fitohemaglutinina.

A)



B)

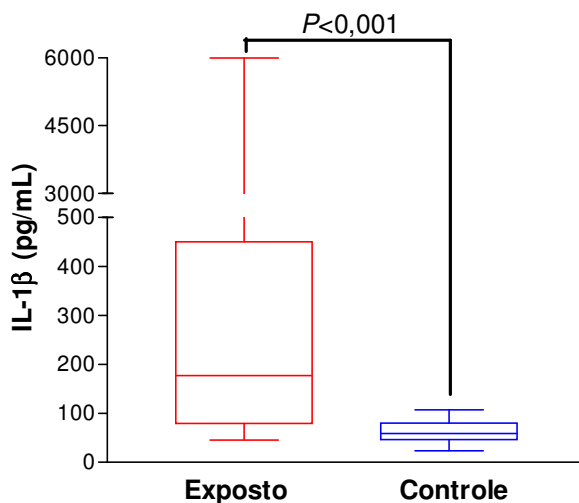
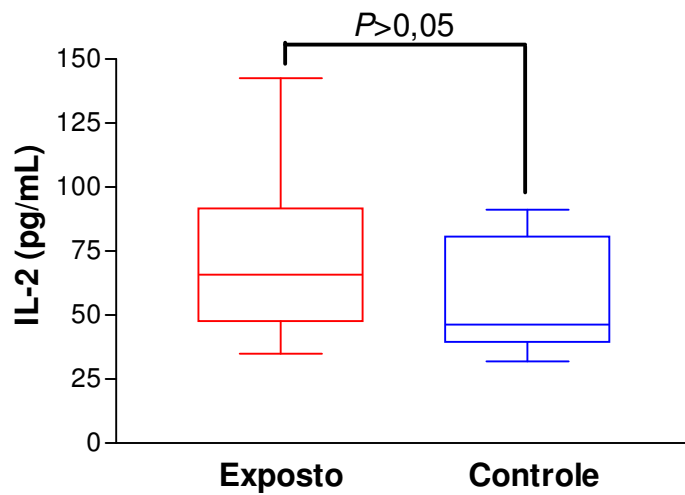


Figura 13. Níveis de IL1- β no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA). Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da concentração da referida citocina em indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33). PHA= fitohemaglutinina.

A)



B)

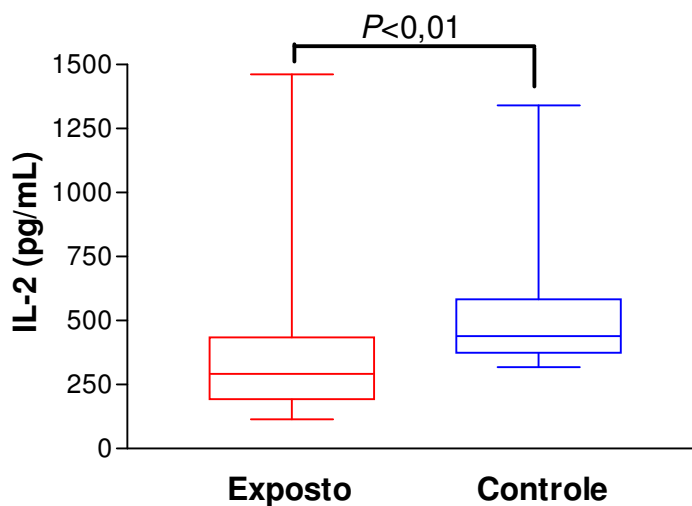
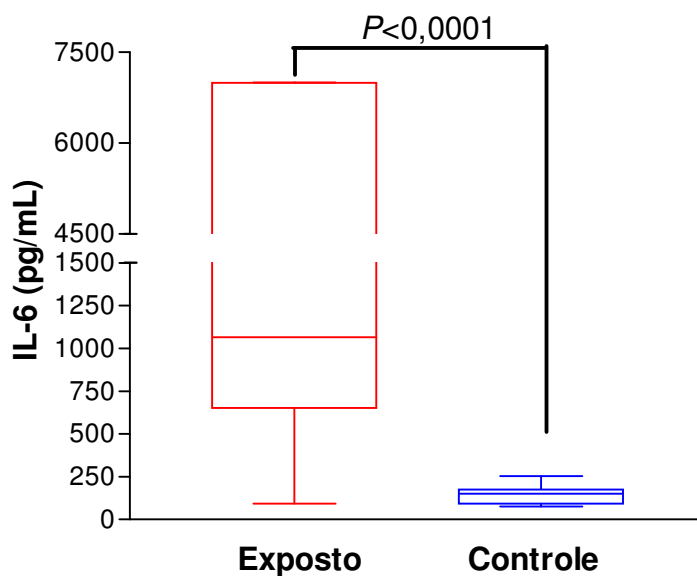


Figura 14. Níveis de IL-2 no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA). Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da concentração da referida citocina em indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33). PHA= fitohemaglutinina.

A)



B)

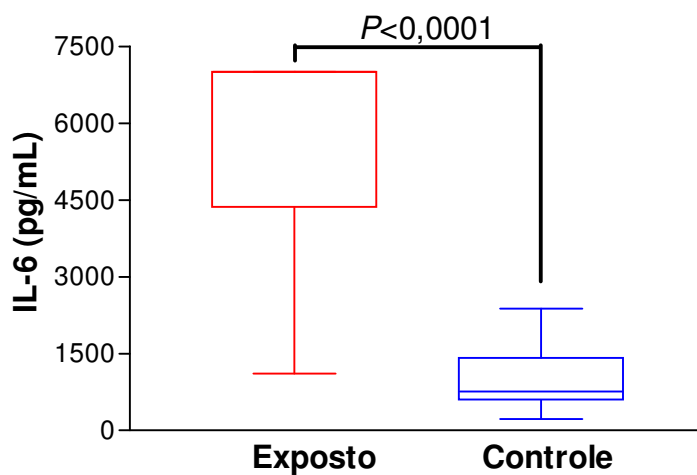
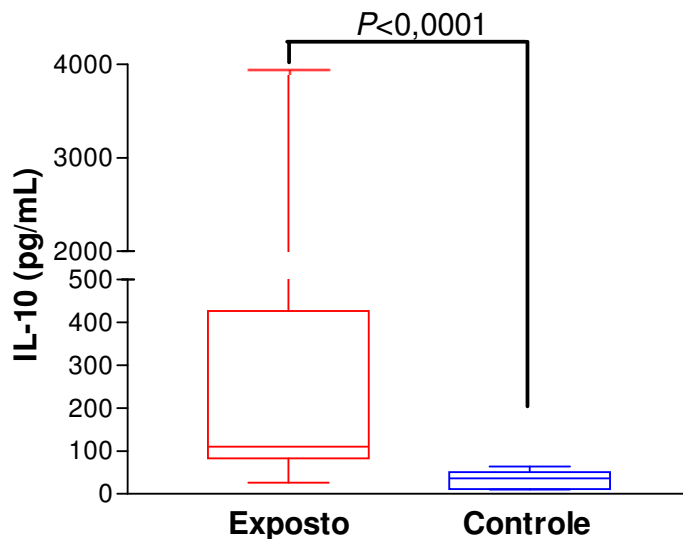


Figura 15. Níveis de IL-6 no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA). Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da concentração da referida citocina em indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33). PHA= fitohemaglutinina.

A)



B)

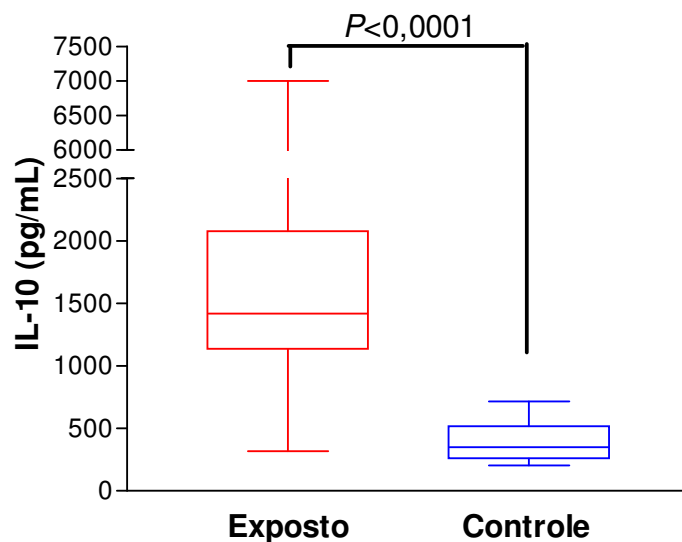
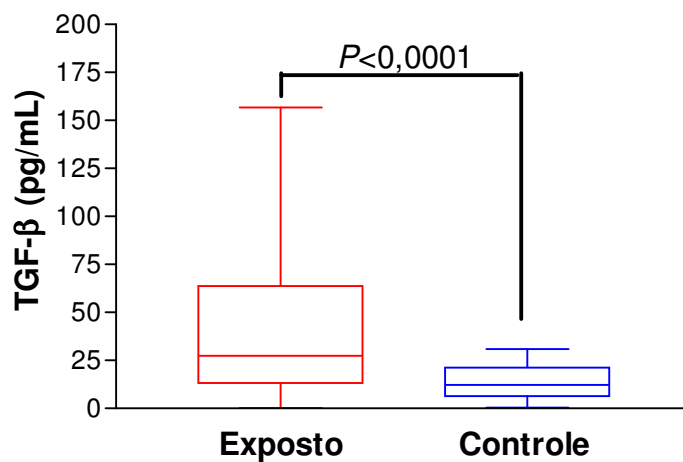


Figura 16. Níveis de IL-10 no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA). Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da concentração da referida citocina em indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33). PHA= fitohemaglutinina.

A)



B)

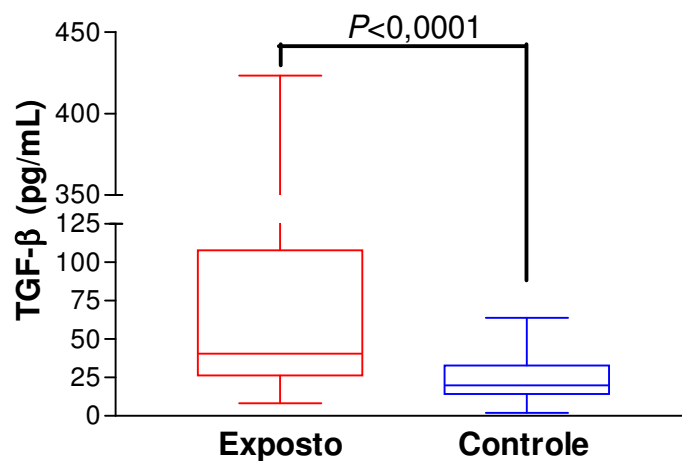


Figura 17. Níveis de TGF- β no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA). Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da concentração da referida citocina em indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=33). PHA= fitohemaglutinina.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Estudos demonstram que a sílica pode agir como adjuvante ativando inespecificamente a resposta imune. Este é um dos mecanismos pelos quais a sílica pode estar envolvida no desenvolvimento de doenças autoimunes (Parks et al., 1999). O risco de desenvolvimento de doenças autoimunes do tecido conjuntivo tem sido reportado com maior frequência em indivíduos expostos à sílica ou com silicose (Rosenman e Moore-Fuller, 1999). Entretanto, os mecanismos celulares e moleculares que resultam em um aumento na prevalência de autoimunidade ainda não foram completamente elucidados (Steenland e Goldsmith, 1995; Cohen Tervaert et al., 1998).

É importante ressaltar que a presença de silicose não foi uma condição determinante para a presença de autoimunidade nos indivíduos estudados, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) entre os indivíduos expostos com e sem silicose em todos os parâmetros avaliados (dados apresentados graficamente no Apêndice X).

Considerando que para o diagnóstico de autoimunidade é importante a confirmação de cronicidade nas alterações imunológicas observadas, realizamos no estudo temático, ao qual o presente trabalho está vinculado, duas avaliações com intervalos médios de dois anos entre elas. Os resultados foram encorajadores ao indicar a confirmação de alterações imunotxicológicas observadas na primeira avaliação, como também o surgimento destas alterações no decorrer do estudo, fato que reflete um período de latência entre a exposição e a produção da resposta autoimune.

Neste sentido, consideramos importante prosseguir com a avaliação da produção de fator anti-núcleo (FAN) e fator reumatóide (FR) no presente estudo. Cronicidade foi observada no aumento da produção de autoanticorpos FAN e FR (Tabela 1), sendo que

76% dos casos positivos para FAN e 81% dos casos positivos para FR, observados nas duas avaliações anteriores ao presente estudo, confirmaram os resultados na presente avaliação. Estes valores refletem uma incidência de FAN e FR em aproximadamente 26% e 13%, respectivamente, da população exposta (n=103), significativamente superior à incidência de 3% e 2%, respectivamente, na população controle (n=98).

É importante ressaltar que, dentre os 130 indivíduos expostos que participaram da primeira avaliação, 123 compareceram na segunda avaliação. Dentre os sete indivíduos ausentes, 2 apresentaram agravamento de problemas respiratórios e 3 foram a óbito (por insuficiência respiratória). Na presente avaliação, 103 indivíduos compareceram. Dentre os indivíduos que não compareceram, 4 foram a óbito por insuficiência respiratória, 3 apresentaram agravamento de problemas respiratórios e os demais por razões diversas, principalmente por dificuldades na convocação por mudança de endereço.

Um aspecto interessante dos nossos estudos foi a ausência de correlação dos níveis aumentados de autoanticorpos com idade, tempo de exposição e tipo de atividade. Em relação à presença de silicose, 65 indivíduos apresentaram silicose, sendo que destes, 52% (34 casos) não apresentaram níveis detectáveis de autoanticorpos. Ausência de alterações compatíveis com silicose foram reportadas em 55 indivíduos. Destes, 25% (14 casos) apresentaram níveis detectáveis de autoanticorpos. Estes resultados demonstram que a presença de silicose não é um fator determinante da presença de autoimunidade. Além disso, estes resultados também sugerem que em alguns indivíduos expostos à sílica, o processo autoimune pode se desenvolver anteriormente às manifestações clínicas de silicose.

Complementando as evidências laboratoriais de autoimunidade, avaliamos a presença de indicadores de autoimunidade pela aplicação de um questionário validado para

a investigação de doenças do autoimunes do tecido conjuntivo. Optamos pelo emprego de tal questionário devido à sua boa reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade para a seleção de sujeitos com potencial para o desenvolvimento de doenças como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerodermia, poliomiosite, dermatomiosite e síndrome de Sjögren. A análise demonstrou que os indivíduos expostos à sílica (idade média= 57 ± 11 anos) apresentam muitos dos sintomas indicativos de doenças autoimunes pesquisados, ao contrário dos indivíduos do grupo controle de mesma faixa etária (idade média= 54 ± 10 anos). Tais resultados corroboram achados da literatura que apontam para um aumento na incidência de sinais indicativos de autoimunidade em indivíduos expostos à sílica, os quais se relacionam ao possível desenvolvimento de esclerodermia, artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico (Sanchez-Roman et al., 1993; Haslam, 1994; Parks et al., 1999).

Ainda, tendo em vista a maior incidência de sintomas relacionados a doenças do tecido conjuntivo no grupo de indivíduos expostos à sílica, quantificamos os anticorpos anti-células endoteliais (AECAs), uma vez que a ocorrência de tais anticorpos tem sido descrita em diversas doenças deste tipo, incluindo lúpus eritematoso sistêmico e vasculite sistêmica (Li et al., 1996; Göbel et al., 1996; Damianovich et al., 1996; Cieřlik, et al., 2008). Apesar de estas desordens autoimunes serem distintas, compartilham um grau variável de dano à parede vascular e tal injúria é causada pelos AECAs (Yu et al., 2005).

Diversas evidências apontam para o dano ao endotélio causado pelos AECAs. Tais anticorpos podem se ligar às células endoteliais e exibir uma citotoxicidade celular dependente de anticorpo, sugerindo que podem contribuir com a injúria aos vasos (Savage et al., 1991). AECAs também podem ativar as células endoteliais e a expressão de moléculas de adesão e induzir a secreção de citocinas e quimiocinas (IL-6, IL-1, IL-8 e

MCP-1), as quais são responsáveis pelo recrutamento de leucócitos e sua adesão (Del Papa et al., 1992). Por sua vez, estas citocinas aumentam a capacidade de ligação dos AECAs ao endotélio.

Conforme representado na Figura 1, o nível sérico médio dos AECAs está significativamente ($P<0,0001$) aumentado no grupo exposto à sílica comparado ao grupo controle, mais uma evidência da relação entre a exposição ocupacional à sílica e o desenvolvimento de autoimunidade.

Outro aspecto interessante do nosso estudo temático foi a observação de que no grupo exposto à sílica há um aumento significativo nos níveis séricos do receptor alfa solúvel para a interleucina(IL)-2 (sIL-2R α). Tais receptores são liberados no sangue pelos linfócitos T ativados constituindo, portanto, medida da ativação imune (Furtado et al., 2002; Setoguchi et al., 2005). Corroboram nossos resultados estudos da literatura que demonstram a presença de níveis elevados desse receptor solúvel em doenças autoimunes como a artrite reumatóide, esclerodermia (Rose et al., 1994; Heaney e Golde, 1996) e poliomiosite (Wolf e Baethge, 1990), além de condições inflamatórias e neoplásicas (Rose et al., 1994; Heaney e Golde, 1996).

Considerando a competição entre o receptor solúvel para IL-2 e o mesmo receptor para IL-2 presente na superfície dos linfócitos T, avaliamos se os níveis séricos aumentados deste receptor solúvel interferem na linfoproliferação. Proliferação celular foi medida pela incorporação de timidina radiomarcada em presença do mitógeno fitohemaglutinina (PHA), o qual estimula a ativação policlonal de linfócitos T (Sanchez et al., 2005). Nossos resultados demonstram que, embora a resposta proliferativa dos linfócitos no grupo exposto tenha sido significativamente maior ($P<0,001$) comparada ao grupo controle (Figura 2), não houve diferença na resposta proliferativa destes linfócitos, tanto da população exposta

quanto dos controles, quando cultivados em presença de soro com níveis elevados de sIL-2R α ou soro homólogo tipo AB (Figura 2). Estes resultados corroboram estudos na literatura que demonstram maior porcentagem de células T ativadas em indivíduos silicóticos (Subra et al., 2001), paralelamente a uma ativação dos macrófagos pela sílica durante a resposta inata (Lapp e Castranova, 1993; Shi et al., 1998). Essa ativação linfocitária pode ser explicada pelo fato de partículas inertes como a sílica serem capazes de ativar inespecificamente os linfócitos atuando como super-antígenos (Ueki et al., 1994). Sendo assim, os níveis elevados de sIL-2R α paralelamente ao aumento da linfoproliferação refletem um estado de ativação imune nos indivíduos expostos à sílica.

Apesar do aumento na resposta linfoproliferativa na população exposta, observamos nestes indivíduos uma redução significativa ($P < 0,001$) no número absoluto de linfócitos, comparado com a população controle. Estes achados corroboram estudo na literatura com indivíduos silicóticos onde 48 dos 53 indivíduos estudados apresentaram linfopenia (Subra et al., 2001) e outros estudos que demonstram o importante papel da linfopenia no desenvolvimento de doenças autoimunes (King et al., 2004), tais como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren (Di Sabatino et al., 2001).

As células T regulatórias (T_{REGS}) são de grande importância no controle das diferentes condições autoimunes. Estas células representam 5 a 10% do total das células CD4+ no sangue periférico, são representadas pelo fenótipo CD4+CD25+FoxP3+ e estão comprometidas com a inibição da ativação e expansão de linfócitos auto-reativos frente a auto-antígenos e antígenos exógenos (Baecher-Allan et al., 2001; Sakaguchi et al., 2001; Sakaguchi, 2004; Cruvinel et al., 2008). A expressão do fator de transcrição FoxP3 é responsável pela regulação da função destas células (Hori et al., 2003; Sugimoto et al., 2006; Lima, 2006; Floess et al., 2007). Tais células caracterizam-se ainda pela expressão de

altos níveis de intensidade do receptor para IL-2 (CD25), o qual é indispensável para a geração e manutenção destas células no organismo (Di Sabatino et al., 2001).

Nossos resultados demonstram não haver diferenças entre o número de células T_{REGS} encontradas no grupo de indivíduos expostos e grupo controle (Figura 3). Estes achados estão de acordo com resultados da literatura que demonstram números normais destas células em pacientes com artrite reumatóide (Cruvinel et al., 2008), diabetes tipo I (Lindley et al., 2005) e indivíduos silicóticos (Wu et al., 2006). Por outro lado, avaliações da expressão do marcador CTLA-4 (CD152) e do receptor de morte celular PD-1 (CD279), fundamentais na manutenção da tolerância periférica, demonstraram redução significativa ($P<0,01$) na expressão de CTLA-4 nas células T CD4+, em relação ao grupo controle (Figura 4). Por sua vez, a expressão desta molécula não estava alterada nos linfócitos T CD8+ (Figura 5). Da mesma forma, conforme ilustrado nas Figuras 6 e 7, diminuição estatisticamente significativa da expressão do marcador PD-1 foi observada tanto nas células T CD4 quanto nas células T CD8 ($P<0,0001$).

A molécula CTLA-4 é capaz de emitir sinal inibitório às células T ativadas para que a resposta proliferativa ao antígeno seja efetivamente interrompida (Lu et al., 1994; Thompson e Allison, 1997). Sendo assim, a diminuição da expressão do marcador CTLA-4 nos linfócitos T CD4+ dos indivíduos expostos pode contribuir para o aparecimento de doenças autoimunes mediadas por linfócitos T (Dornmair et al., 2003). A expressão normal de CTLA-4 nas células T CD8+, pode estar relacionada a uma maior ativação das células T CD8+. Este aspecto, relacionado ao aumento no número de células T CD8+ e redução de células T CD4+ nos indivíduos expostos à sílica, observado em nosso estudo temático, pode contribuir para a maior incidência de manifestações autoimunes observada no grupo exposto. Nos últimos anos, a atuação das células T CD8+ como células auto-reativas vem

recebendo atenção crescente. No diabetes tipo I foi demonstrado que a destruição das células beta (produtoras de insulina) deve-se principalmente à atuação dos linfócitos T CD8+. Recentemente foi descrito o possível papel dos linfócitos T CD8+ como iniciadores da desmielinização na esclerose múltipla e no modelo experimental da encefalomielite autoimune (Brisebois et al., 2006).

CTLA-4 não é a única molécula que manda um sinal inibitório; PD-1 é a segunda molécula regulatória na ativação das células T. O PD-1 é conhecido como um receptor induzido nas células T ativadas e envolvido na morte celular programada (Ishida et al., 1992). A ligação do PD-1 ao seu receptor PD-L promove os sinais inibitórios necessários para a manutenção da tolerância imunológica e conseqüente prevenção de autoimunidade. As interações entre PD e PD-L são importantes no controle tanto da fase inicial da ativação e expansão da população de células T auto-reativas, quanto das funções efetoras das células T auto-reativas e injúria aos órgãos-alvo. Assim sendo, as interações entre PD-1-PD-L1 são necessárias tanto para a indução quanto para a manutenção da tolerância das células T CD4+ periféricas (Sharpe et al., 2007). Estudos envolvendo humanos com doenças autoimunes sugerem funções regulatórias importantes para o PD-1 e seus ligantes. Auto-anticorpos anti-PD-L1 foram encontrados em pacientes com artrite reumatóide (Dong et al., 2003), sugerindo assim que o bloqueio da ligação PD-1-PD-L1 pelos auto-anticorpos pode contribuir para o desenvolvimento de doença autoimune. Estes resultados indicam que a diminuição da expressão dos marcadores CTLA-4 nos linfócitos T CD4+ e PD-1 tanto nos linfócitos T CD4+ quanto nos T CD8+ podem constituir mais um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de autoimunidade nos indivíduos expostos à sílica.

Dando prosseguimento ao nosso estudo, investigamos a presença de polimorfismos nos genes regulatórios CTLA-4 e PDCD1 que devem estar relacionados à diminuição da

expressão de CTLA-4 na superfície das células T CD4+ e de PD-1 na superfície das células T CD4+ e CD8+.

Em relação ao CTLA-4, gene que codifica a molécula de CTLA-4, certos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) têm sido ligados a diversas doenças autoimunes. Tais polimorfismos têm mostrado reduzir a expressão da função inibitória do CTLA-4 (Kouki et al., 2000; Karabon et al., 2009). No caso do PDCD1, o gene que codifica o PD-1, diversos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) têm sido descritos e dois destes, PD-1.3 e PD-1.5, têm sido associados com doença autoimune (Prokunina et al., 2002; Lin et al., 2004; Newby et al., 2007).

Sendo assim, comparamos a frequência de 2 polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) no gene CTLA-4: CTLA-4+49A/G e CTLA-4-318C/T e 2 SNPs no gene PDCD1: PD-1.3 (+7146G/A) e PD-1.5 (+7785C/T) entre os indivíduos expostos à sílica e controles não-expostos.

Conforme apresentado na Tabela 2, em relação aos SNPs CTLA-4+49A/G e CTLA-4-318C/T, não encontramos diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) entre o genótipo e a frequência dos alelos no grupo exposto à sílica comparado ao grupo controle. Da mesma forma, não encontramos relação entre a diminuição da expressão da molécula CTLA-4 na superfície das células T CD4+ e polimorfismos no gene CTLA-4 ($P>0,05$, dados não apresentados).

No que diz respeito ao estudo dos polimorfismos no gene PDCD1, podemos observar na Tabela 3 que não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre o genótipo e a frequência alélica do SNP PD-1.5 entre os indivíduos expostos e controles. No entanto, em relação ao SNP PD-1.3, observamos que a frequência do alelo A foi significativamente maior (13,3%) nos controles, comparado com 4,3 % nos indivíduos expostos à sílica

($P < 0,05$). Além disso, o genótipo homozigoto AA foi encontrado apenas no grupo controle (3,3%). A menor frequência do alelo A no grupo exposto pode estar associada à menor expressão do receptor PD-1 na superfície das células T CD4+ e CD8+.

Resultados contraditórios são encontrados na literatura em relação à frequência do alelo A e aparecimento de autoimunidade. Enquanto que em estudo observou frequência reduzida do alelo A em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (Ferreiros-Vidal et al., 2004), outros demonstraram associação entre a maior frequência do alelo A e lúpus eritematoso sistêmico (Prokunina et al., 2002; Sanghera et al., 2004), artrite reumatóide (Prokunina et al., 2004), diabetes tipo 1 (Nielsen et al., 2003) e esclerose múltipla (Kroner et al., 2005).

Um aspecto que pode conciliar estas diferenças relaciona-se às diferenças populacionais quanto aos haplótipos deste gene, daí a importância de considerar a heterogeneidade genética pela influência que exerce sobre a frequência alélica.

Tendo em vista a ocorrência de polimorfismos no *locus* PD1.3 do gene PDCD1, comparamos a expressão de PD-1 nas células T de indivíduos expostos apresentando genótipo PD-1.3G/G com a expressão de PD-1 nas células T de indivíduos com genótipo PD-1.3G/A para verificar se essa diferença genotípica poderia influenciar a expressão do PD-1 na superfície celular. Observamos, embora não estatisticamente significativa, uma menor expressão de PD-1 nas células T CD4 dos indivíduos de genótipo PD-1.3G/G (Figura 8). Além disso, comparando-se os indivíduos expostos de genótipo PD-1.3G/A com os controles PD-1.3G/A observamos que não houve uma diferença significativa na expressão de PD-1 nas células T CD4. Desta forma, nossos achados sugerem que os indivíduos expostos apresentando o genótipo PD-1.3G/G expressam menos PD-1 nas

células T CD4. Porém devemos ser cautelosos ao afirmar isto devido ao reduzido número de indivíduos de genótipo PD-1.3 G/A (n=6).

Em relação à expressão de PD-1 nas células T CD8 dos trabalhadores expostos à sílica e controles portadores do genótipo PD-1.3G/A ou PD-1.3G/G, não observamos diferença na expressão de PD-1, da mesma forma que não encontramos diferença na expressão de PD-1 nas células T CD4 e CD8 de indivíduos expostos e controles de genótipo PD-1.5C/C, PD-1.5C/T ou PD-1.5T/T ($P>0,05$, dados não apresentados).

Outros indicadores da presença de autoimunidade em indivíduos expostos à sílica foram estudados. Observamos na população exposta um aumento significativo ($P<0,01$) das células *Natural killer* 'NK' (CD3-CD16+CD56+) (Figura 9). Esses achados são relevantes, tendo em vista a importância das células NK tanto na promoção do dano tissular na silicose (Oberdorster, 1994), como na evolução da resposta imune adquirida e indução de autoimunidade (Shi e Van Kaer, 2006; Perricone et al., 2008). Da mesma forma que observado anteriormente em nosso estudo temático, observamos aumentos significativos na população de células NK (CD16 e CD56). Nossos resultados corroboram estudo da literatura que demonstra aumento no número de células NK em trabalhadores expostos ao asbestos (Froom et al., 2000), um silicato mineral de comportamento semelhante à sílica. Embora os mecanismos de proliferação das células NK não estejam completamente elucidados, a síntese das citocinas (IL-12, IL-1, IL-6, TNF- α) pelos macrófagos e/ou células dendríticas, ativados pela sílica ou pela resposta inflamatória resultante da exposição, pode explicar o aumento no número dessas células.

Avaliamos ainda os níveis séricos da proteína Fas, uma vez que a apoptose mediada pelo mecanismo Fas-FasL é um processo fundamental na eliminação de células T auto-reativas. Portanto, anormalidades no Fas e em moléculas relacionadas como o seu ligante

(FasL) têm papel crucial na indução de autoimunidade, sendo que tais anormalidades têm sido observadas em doenças autoimunes idiopáticas como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide (Nagata e Golstein, 1995; Hasunuma et al., 1997; Nagata, 1997; Nozawa et al., 1997).

A molécula FasL é expressa nas células T ativadas e células NK (Arase et al., 1995; Tanaka et al., 1996), e sua forma solúvel (sFasL), a qual é clivada por uma metaloproteinase (Kayagaki et al., 1995; Tanaka et al., 1995), está elevada no soro de indivíduos com síndrome de Sjögren e artrite reumatóide (Nozawa et al., 1997). Assim sendo, acredita-se que a molécula FasL esteja envolvida na patogênese das doenças autoimunes (De Maria e Testi, 1998; Suzuki et al., 1998; Stassi et al., 1999), especialmente quando as concentrações de sFasL estão elevadas no soro e líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide severa comparado aos controles normais (Nozawa et al., 1997; Hashimoto et al., 1998).

A fim de determinar o papel do sistema Fas/FasL nas anormalidades imunológicas induzidas pela sílica, nós investigamos os níveis séricos de sFasL. Nossos resultados (Figura 10) corroboram estudos demonstrando anormalidades no sistema Fas/FasL em indivíduos expostos à sílica (Tomokuni et al., 1997) ao demonstrar um aumento nos níveis de sFasL na população exposta ($P<0,01$).

Além disso, evidências apontam para o envolvimento da produção desregulada de citocinas na patogênese das doenças autoimunes (Hoyer et al., 2009), conforme estudos que demonstraram anormalidades na produção de diversas citocinas pelos linfócitos e monócitos de pacientes com diferentes doenças autoimunes (Cavallo et al., 1994). Com base no exposto, outro parâmetro importante avaliado neste estudo consistiu na

quantificação das principais citocinas envolvidas no processo autoimune, como as citocinas pró-inflamatórias: IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6 e anti-inflamatórias: IL-10 e TGF- β .

Em relação às citocinas pró-inflamatórias, observamos um aumento significativo ($P<0,05$) na produção espontânea de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 e no sobrenadante das culturas das células mononucleares (Figuras 11A, 12A, 13A e 15A, respectivamente). Da mesma forma, após estímulo com o mitógeno PHA, as mesmas citocinas, com exceção do TNF- α , encontraram-se significativamente ($P<0,05$) aumentadas em nosso grupo de estudo em comparação aos controles (Figuras 11B, 13B e 15B). Os estudos que relatam a atividade estimulante da sílica em macrófagos pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- α corroboram nossos achados (Driscoll et al., 1997; Davis et al., 1998).

Além disso, após o aumento da produção de citocinas por macrófagos ativados pela sílica, há um aumento na resposta inflamatória e estímulo de outras células como as células *T helper* (Th) (revisado por Parks et al., 1999), sugerindo assim uma ativação imunológica mais ampla à sílica. Nossos resultados demonstram isso claramente ao mostrar a capacidade das células mononucleares de indivíduos expostos à sílica produzir citocinas pró-inflamatórias (Th1).

Tais citocinas, no entanto, estão envolvidas na iniciação e propagação da artrite reumatóide e outras doenças mediadas pelas citocinas Th1 como a esclerose múltipla e diabetes mellitus insulino-dependente. Como exemplo, podemos citar o papel crítico desempenhado pelo TNF- α e IL-1 β no desenvolvimento da artrite reumatóide (revisado por Kim e Moudgil, 2008), a correlação positiva entre a produção de IFN- γ pelas células mononucleares em pacientes com LES e a atividade da doença (Viallard et al., 1999) e os níveis aumentados de IL-6 no plasma de pacientes com nefrite lúpica (Tesar et al., 1998), bem como seu envolvimento no desenvolvimento do LE cutâneo (Nurnberg et al., 1995).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias estudadas, a IL-2 foi a única que não foi detectada em níveis elevados no grupo exposto à sílica, pelo contrário, observamos níveis significativamente diminuídos ($P<0,01$) desta citocina nos indivíduos expostos em comparação aos controles após estímulo com PHA (Figura 14B). As quantidades diminuídas de IL-2 detectadas após estimulação com mitógeno pode ser explicada por uma “exaustão” da habilidade de secreção de IL-2 devido a uma hiperatividade das células produtoras de IL-2 *in vivo*, conforme proposto por Cavallo et al. (1994). Outra explicação plausível para tal diminuição seria a produção excessiva de receptores alfa solúveis para IL-2 (CD25) observada em nosso estudo temático, pois tais receptores se ligam à IL-2 inibindo sua disponibilidade e atividade biológica.

A promoção da tolerância periférica é um das principais funções *in vivo* da IL-2 (O’Shea et al., 2002) e, portanto, a diminuição dos níveis desta citocina nos indivíduos expostos pode ser um dos fatores envolvidos na ruptura da tolerância imunológica que leva à autoimunidade nestes indivíduos. Neste sentido, corroborando nossos achados, Linker-Israeli e colaboradores (1980) observaram uma liberação diminuída de IL-2 pelas células mononucleares de pacientes com lúpus após estimulação com mitógeno.

A produção das citocinas antiinflamatórias IL-10 e TGF- β também foi avaliada em nosso estudo, uma vez que tais citocinas imunossupressoras estão envolvidas na função das células T regulatórias. Verificamos um aumento significativo ($P<0,001$) na produção destas citocinas pelas células mononucleares dos indivíduos expostos à sílica (Figuras 16 e 17, respectivamente). Tais moléculas desempenham importantes funções imunorregulatórias atuando no controle das respostas mediadas pelas citocinas pró-inflamatórias (Opal e De Paolo, 2000). A IL-10 é a mais importante dentre as citocinas com atividade antiinflamatória envolvida na resposta imune em humanos (Opal e De Paolo, 2000) e

também é conhecida pela promoção da resposta imune do tipo Th2 pelos linfócitos através do estímulo à produção de anticorpos pelas células B (Snapper e Mond, 1993). Sendo assim, paralelamente à tentativa de conter a resposta pró-inflamatória promovida pelas partículas de sílica, o aumento desta citocina pode ocasionar uma hiperatividade das células B explicando, portanto, os níveis elevados de autoanticorpos encontrado em nosso estudo e as doenças mediadas por autoanticorpos observadas em trabalhadores expostos à sílica, destacando-se o lúpus eritematoso sistêmico (LES) (revisado por Parks et al., 1999). Neste sentido, estudos demonstram que a IL-10 exerce um papel importante na patogênese do LES, uma vez que observaram uma correlação positiva entre títulos elevados de IL-10 e a atividade da doença em pacientes com LES (Houssiau et al., 1995; Huang e Chen, 2000). Outra evidência do envolvimento desta citocina com o LES é demonstrada por Lacki e colaboradores (1997), os quais observaram concentrações séricas elevadas de IL-10 em pacientes com LES em comparação aos controles. Apesar de apresentar uma atividade inibitória menos potente que a IL-10, o TGF- β é um importante regulador da proliferação celular, diferenciação e formação da matriz extracelular. Ele age suprimindo a proliferação das células B e T e limita a produção de IL-2, IFN- γ e TNF assim como a IL-10 (Litterio e Roberts, 1997). Entretanto, está envolvido na fibroproliferação que acontece nos pulmões em decorrência da exposição a diversos agentes nocivos (Santana et al., 1995) como a sílica. Neste sentido, foi demonstrado que o TGF- β favorece o desenvolvimento de fibrose e formação dos nódulos silicóticos em indivíduos expostos à sílica (Wahl et al., 1989). Tal atividade se deve ao fato deste mediador agir de forma discrepante, apresentando uma ação imunoestimulante nos tecidos e atividade imunossupressora na circulação sistêmica (Opal e De Paolo, 2000). Desta forma, o aumento do TGF- β observado em nosso estudo, pode estar relacionado a uma tentativa de o organismo conter a reação pró-inflamatória, mas que pode

promover injúria ao tecido pulmonar favorecendo a fibrose pulmonar característica da silicose.

Independente dos mecanismos envolvidos, nossos achados indicam efeitos estimulantes no sistema imune mediados pela sílica que podem resultar na quebra da tolerância imune. Desta forma, nossos resultados podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias de prevenção de autoimunidade em trabalhadores expostos à sílica.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados apresentam evidências consistentes de alterações compatíveis com autoimunidade nos indivíduos expostos à sílica, comparado com a população controle, tais como:

- Ativação da resposta imune humoral verificada pelo aumento nos níveis de autoanticorpos (FAN, FR e AECAs);
- Ativação da resposta imune celular pelo aumento da resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico, dos níveis séricos de sFasL, do número de células NK e pela alteração dos níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10 e TGF- β ;
- Alterações funcionais nos linfócitos T pela menor expressão de CTLA-4 e PD-1;
- Influência genética na expressão do receptor PD-1 pela menor expressão deste receptor na superfície das células T CD4+ em indivíduos expostos com genótipo GG no estudo do polimorfismo PD1.3;
- A presença de silicose não é um fator determinante da presença de autoimunidade e a autoimunidade pode ocorrer anteriormente às manifestações clínicas de silicose.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altindag ZZ, Isimer TBA, Sahin G. Neopterin as a new biomarker for the evaluation of occupational exposure to silica. *Int Arch Occup Environ Health* 2003; 76:318-322.

Apostolou I, Von Boehmer, H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 2004; 199(10): 1401-1408.

Arase H, Arase N, Saito T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J Exp Med* 1995; 181:1235-1238

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167:1245-1253.

Brisebois M, Zehntner SP, Estrada J, Owens T, Fournier S. A pathogenic role for CD8⁺ T cells in a spontaneous model of demyelinating disease. *J Immunol* 2006; 177:2403-2411.

Carvalho D, Savage COS, Black CM, Pearson JD. IgG antiendothelial cell antibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. *J Clin Invest* 1996; 97(1):111-119.

Cavallo MG, Pozzilli P, Thorpe R. Cytokines and autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 1994 dez; 96:1-7.

Ciéslik P, Hrycek A, Ktucinski P. Vasculopathy and vasculitis in systemic lupus erythematosus. *Pol Arch Med Wewn* 2008; 118(1-2): 57-62.

Cohen Tervaert JW, Stegeman CA, Kallenberg CGM. Silicon exposure and vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 1998; 10(1):12-17.

Conrad K, Mehlhorn J. Diagnostic and prognostic relevance of autoantibodies in uranium miners. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123:77-91.

Craighead JE, Kleinerman J, Abraham JF, Gibbs AR, Vallyathan NV, Juliano EB. Diseases associated with exposure to silica and non-fibrous silicate minerals. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 112(7):673-720.

Cruvinel WM, Mesquita Jr D, Araújo JAP, Salmazi KC, Kállas EG, Andrade LEC. Células T regulatórias naturais (TREGS) em doenças reumáticas. *Rev Bras Reumatol* 2008; 48(6): 342-355.

Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. CD25⁻ T cells generate CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol* 2004; 173:7259-7268.

Damianovich M, Gilburd B, George J, Del Papa N, Afek A, Goldberg I et al. Pathogenic role of anti-endothelial cell antibodies in vasculitis: An idiotypic experimental model. *J Immunol* 1996; 156:4946-4951.

Davis GS, Pfeiffer LM, Hemenway DR. Persistent overexpression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in murine silicosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1998; 17(2):99-114.

De Maria R, Testi R. Fas-FasL interactions: a common pathogenetic mechanism in organ-specific autoimmunity. *Immunol Today* 1998; 19(3):121-125.

Del Papa N, Meroni PL, Barcellini W, Sinico A, Radice A, Tincani A, et al. Antibodies to endothelial cells in primary vasculitides mediate in vitro endothelial cytotoxicity in the presence of normal peripheral blood mononuclear cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 63(3):267-274.

Di Sabatino A, D'Alò S, Millimaggi D, Ciccocioppo R, Parroni R, Sciarra G et al. Apoptosis and peripheral blood lymphocyte depletion in celiac disease. *Immunology* 2001; 103:435-440.

Dinesh RK, Hahn BH, Singh RP. PD-1, gender, and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2010; 9:583-587.

Doll NJ, Stankus RP, Hughes J, Weill H, Gupta RC, Rodriguez M et al. Immune complexes and autoantibodies in silicosis. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68(4):281-285.

Dong H, Strome SE, Matteson EL, Moder KG, Flies DB, Zhu G, et al. Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2003; 111:363-370.

Dornmair K, Goebels N, Weltzien HU, Wekerle H, Hohlfield R. T-cell-mediated autoimmunity: Novel techniques to characterize autoreactive T-cell receptors. *Am J Pathol* 2003; 163(4):1215-1226.

Driscoll KE, Carter JM, Hassenbein DG, Howard B. Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ Health Perspect* 1997; 105(5):1159-1164.

Ferreiros-Vidal I, Gomez-Reino JJ, Barros F, Carracedo A, Carreira P, Gonzales-Escribano F, et al. Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus: Evidence of population-specific effects. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50(8): 2590-2597.

Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 2007; 5(2):169-178.

Frank KH, Füßel M, Conrad K, Rihs HP, Koch R, Gebhardt B, et al. Different distribution of HLA class II and tumor necrosis factor alleles (TNF-308.2, TNFa2 microsatellite) in

anti-topoisomerase I responders among scleroderma patients with and without exposure to quartz/metal dust. *Arthritis & Rheumatism* 1998; 41(7):1306-1311.

Froom P, Lahat N, Kristal-Boneh E, Cohen C, Lerman Y, Ribak, J. Circulating Natural Killer Cells in Retired Asbestos Cement Workers. *J Occup Environ Med* 2000; 42(1):19-24.

Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille J. Interleukin 2 signaling is required for CD4+ regulatory T cell function. *J Exp Med* 2002; 196(6):851-857.

Giscombe R, Wang X, Huang D, Lefvert AK. Coding sequence 1 and promoter single nucleotide polymorphisms in the CTLA-4 gene in Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol* 2002; 29(5):950-953.

Göbel U, Eichhorn J, Kettritz R, Briedigkeit L, Sima D, Lindschau C, et al. Disease activity and autoantibodies to endothelial cells in patients with Wegener's granulomatosis. *Am J Kidney Dis* 1996; 28(2):186-194.

Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 515-548, 2005.

Hashimoto H, Tanaka M, Suda T, Tomita T, Hayashida K, Takeuchi E, et al. Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41(4):657-662.

Haslam, PL. Basic immunology and immunopathology. In: Parkes WR, ed. *Occupational lung disorders*, 3rd edn. London: Butterworth Heinemann, 1994:50-99.

Hasunuma T, Kayagaki N, Asahara H, Motokawa S, Kobata T, Yagita H, et al. Accumulation of soluble fas in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40(1):80-86.

Heaney ML, Golde DW. Soluble cytokine receptors. *Blood* 1996; 87(3):847-857.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609): 1057-1061.

Hosaka N, Oyaizu N, Kaplan M H, Yagita H, Pahwa S. Membrane and soluble forms of Fas (CD95) and Fas ligand in peripheral blood mononuclear cells and in plasma from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis* 1998; 178(4):1030-1039.

Houssiau FA, Lefebvre C, Vanden Berghe M, Lambert M, Devogelaer JP, Renauld JC. Serum interleukin 10 titres in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus* 1995; 4(5):393–395.

Hoyer KK, Kuswanto WF, Gallo E, Abbas AK. Distinct roles of helper T-cell subsets in a systemic autoimmune disease. *Blood*. 2009; 113(2): 389–395.

Huang C-M, Chen C-L. Elevated interleukin-10 levels correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Mid Taiwan J Med* 2000; 5:37-42.

Huang D, Giscombe R, Zhou Y, Lefvert AK. Polymorphisms in CTLA-4 but not tumor necrosis factor-alpha or interleukin 1beta genes are associated with Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol* 2000a; 27(2):397-401.

Huang D, Giscombe R, Zhou Y, Pirskanen R, Lefvert AK. Dinucleotide repeat expansion in the CTLA-4 gene leads to T cell hyper-reactivity via the CD28 pathway in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2000b; 105:69-77.

International Labour Office, 2000. Guidelines for the use of ILO international classification of radiographs of pneumoconiosis. Occupational safety and health series. 22 (rev). Geneva: ILO.

Irwin, A. Overexposure to crystalline silica in a foundry operation Appl Occup Environ Hyg 2003; 18(1):18-21.

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J 1992; 11(11): 3887-3895.

Jones RN, Turner-Warwick M, Ziskind M, Weill H. High prevalence of antinuclear antibodies in sandblasters' silicosis. Am Rev Respir Dis 1976; 113(3):393-395.

Karabon L, Kosmaczewska A, Bilinska M, Pawlak E, Ciszak L, Jedynak A, et al. The CTLA-4 gene polymorphisms are associated with CTLA-4 protein expression levels in multiple sclerosis patients and with susceptibility to disease. Immunology 2009; 128(1):e787-e796.

Kavvoura FK, Ioannidis JPA. CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: A HuGE review and meta-analysis. Am J Epidemiol 2005; 162(1):3-16.

Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, et al. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. J Exp Med 1995; 182:1777-1783.

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol 2008; 26:677-704.

Keir ME, Francisco LM, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. Curr Opin Immunol 2007; 19:309–314.

Kim EY, Moudgil KD. Regulation of autoimmune inflammation by pro-inflammatory cytokines. Immunol Lett 2008; 120:1–5.

King C, Ilic A, Koelsch K, Sarvetnick N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* 2004; 117:265–277.

Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Grave's disease. *J Immunol* 2000; 165:6606-6611.

Kristjansdottir H, Steinsson K, Gunnarsson I, Gröndal G, Erlendsson K, Alarcón-Riquelme ME. Lower expression levels of the programmed death 1 receptor on CD4+CD25+ T cells and correlation with the PD-1.3A genotype in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010; 62(6):1702-1711.

Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Mäurer M, et al. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2005; 58:50–57.

Lacki, J.K., Leszczynski, P., Kelemen, J., Muller, W., Mackiewicz, S.H. Cytokine concentration in serum of lupus erythematosus patients: the effect on acute phase response. *J. Med.* 1997; 28:99–107.

Lapp NL, Castranova V. How silicosis and coal workers' pneumoconiosis develop- a cellular assessment. *Occup Med* 1993; 8(1):35-56.

Lenardo MJ. Molecular regulation of T lymphocyte homeostasis in the healthy and diseased immune system. *Immunol Res* 2003; 27(2-3):387-397.

Li JS, Liu MF, Lei HY. Characterization of anti-endothelial cell antibodies in the patients with systemic lupus erythematosus: A potential marker for disease activity. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 79(3):211-216, 1996.

Ligers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX, Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun* 2001; 2:145-152.

Lima HC. Papel das células T reguladoras no desenvolvimento de dermatoses. *An Bras Dermatol* 2006; 81(3):269-281.

Lin SC, Yen JH, Tsai JJ, Tsai WC, Ou TT, Liu HW, Chen CJ. Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50(3):770-775.

Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TIM. Defective suppressor function in CD4+CD25+ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54:92-99.

Linker-Israeli M., Quismorio FPJ, Wong DK, Friou GJ. Serum antibodies to human fetal antigens in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *J Immuno.* 1980; 124(3):1154–1159.

Lippmann M, Eckert HL, Hahon N, Morgan WKC. Circulating antinuclear and rheumatoid factors in coal miners: A prevalence study in pensylvania and west virginia. *Ann Intern Med* 1973; 79(6):807-811.

Litterio JJ, Roberts AB. TGF- β : a critical modulator of immune cell function. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84:244-250.

Lleo A, Invernizzi P, Gao B, Podda M, Gershwin ME. Definition of human autoimmunity-autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2010; 9:A259-266.

Lu P, Zhou X, Chen SJ, Moorman M, Morris SC, Finkelman FD, et al. CTLA-4 ligands are required to induce an in vivo interleukin 4 response to a gastrointestinal nematode parasite. *J Exp Med* 1994; 180: 693-698.

Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1666-1680.

Nagata S, Golstein P. The Fas death dactor. *Science* 1995; 267(5203): 1449-1456.

Nagata S. Apoptosis by Death Factor. *Cell* 1997; 88:355-365.

Newby PR, Roberts-Davies EL, Brand OJ, Heward JM, Franklyn JA, Gough SCL, et al. Tag SNP screening of the PDCD1 gene for association with Graves' disease. *Clin Endocrinol* 2007; 67:125–128.

Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen BB, Lillevang ST. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 2003; 62:492-497.

Nishimura H, Minato N, Nakano T, Honjo T. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol* 1998; 10(10):1563–1572.

Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motifcarrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; 11:141–151.

Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 2001; 291:319–322.

Nozawa K, Kayagaki N, Tokano Y, Yagita H, Okumura K, Hasimoto H. Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1997; 40(6):1126-1129.

Nurnberg W, Haas N, Schadendorf D, Czarnetzki BM Interleukin-6 expression in the skin of patients with lupus erythematosus. *Exp Dermatol* 1995; 4(1):52–57.

O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:37–45.

Oberdorster G. Macrophage-associated responses to chrysotile. *Ann Occup Hyg* 1994; 38(4):601-615.

Opal SM, De Paolo VA. Anti-Inflammatory Cytokines. *Chest* 2000; 117:1162–1172.

Otsuki T, Miura Y, Nishimura Y, Hyodoh F, Takata A, Kusaka M, Katsuyama H, Tomita M, Ueki A, Kishimoto T. Alterations of Fas and Fas-related molecules in patients with silicosis. *Exp Biol Med* 2006; 231:522–533.

Otsuki T, Sakaguchi H, Tomokuni A, Aikoh T, Matsuki T, Kawakami Y, Kusaka M, Ueki H, Kita S, Ueki A. Soluble Fas mRNA is dominantly expressed in cases with silicosis. *Immunology* 1998; 94:258–262.

Parks CG, Conrad K, Cooper GS. Occupational exposure to crystalline silica and autoimmune disease. *Environ Health Perspect* 1999; 107(5): 793-802.

Pernis, B. Silica and the immune system. *Acta Biomed* 2005; 2:38-44.

Perricone R, Perricone C, Carolis C De, Shoenfeld Y. NK cells in autoimmunity: A two-edged weapon of the immune system. *Autoimmun Rev* 2008; 7(5): 384–390, 2008.

Pitkeathly DA, Taylor G. Antinuclear factor in rheumatoid arthritis and related diseases *Ann Rheum Dis* 1967; 26:1-9.

Powell JJ, Van de Water J, Gershwin ME. Evidence for the role of environmental agents in the initiation or progression of autoimmune conditions. *Environ Health Perspect* 1999; 107(5):667-672.

Prasad KV, Prabhakar BS. Apoptosis and autoimmune disorders. *Autoimmunity* 2003; 36(6-7):323–330.

Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, Van Den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8⁺ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 2005; 6(3): 280-286.

Prokunina L, Castillejo-López C, Öberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, et al. A regulatory polymorphism in *PDCDI* is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 2002; 32:666-669.

Prokunina L, Padyukov L, Bennet A, Faire U, Wiman B, Prince J, et al. Association of the PD-1.3A Allele of the *PDCDI* Gene in Patients With Rheumatoid Arthritis Negative for Rheumatoid Factor and the Shared Epitope. *Arthritis Rheum* 2004; 50(6):1770-1773, 2004.

Rioux JD, Abbas AK. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature* 2005; 435(7042):584-589.

Rodríguez MR, Núñez-Roldán A, Aguilar F, Valenzuela A, García A, González-Escribano MF. Association of the CTLA4 3' untranslated region polymorphism with the susceptibility to rheumatoid arthritis *Human Immunol.* 63:76-81, 2002.

Rose CD, Fawcett PT, Gibney K, Doughty RA, Singsen BH. Serial measurements of soluble interleukin 2 receptor levels (sIL2-R) in children with juvenile rheumatoid arthritis treated with oral methotrexate. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 471-474.

Rosenman KD, Moore-Fuller M. Connective tissue diseases and silicosis. *Am J Ind Med* 1999; 35: 375-381.

Rudin CM, Van Dongen J, Thompson CB. Apoptotic signaling in lymphocytes. *Curr Opin Hematol* 1996; 3:35–40.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:531-562.

Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol* 2005; 24(3-4):211-226.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001; 182: 18–32.

Sanchez-Roman J, Wichmann I, Salaberri J, Varela JM, Nuñez-Roldan A. Multiple clinical and biological autoimmune manifestations in 50 workers after occupational exposure to sílica. *Ann Rheum Dis* 1993; 52:534-538.

Sanchez APG, Maruta CW, Sato MN, Ribeiro RL, Zomignan CA, RS Nunes, et al. Estudo da proliferação linfocitária em pacientes sensibilizados ao níquel. *An Bras Dermatol* 2005; 80(2):149-158.

Sanghera DK, Manzi S, Bontempo F, Nestlerode C, Kamboh MI. Role of an intronic polymorphism in the PDCD1 gene with the risk of sporadic systemic lupus erythematosus and the occurrence of antiphospholipid antibodies. *Hum Genet* 2004; 115:393–398.

Santana A, Saxena B, Noble NA, Gold LI, Marshall BC. Increased expression of transforming growth factor β Isoforms $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ in bleomycin induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol BioI* 1995; 13:34-44.

Savage COS, Pottinger BE, Gaskin G, Lockwood C, Pusey CD, Pearson JD. Vascular damage in Wegener's granulomatosis and microscopic polyarteritis: presence of anti-endothelial cell antibodies and their relation to anti-neutrophil cytoplasm antibodies. *Clin Exp Immunol* 1991; 85:14-19.

Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *JEM* 2005; 201(5):723–735.

Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nature Rev Immunol.* 2002; 2(2):116-126.

Sharpe AH, Wherry E, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection *Nature Immunol* 2007; 8(3): 239.

Shi FD, Van Kaer L. Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells *Nature Rev Immunol* 2006; 6:751-760.

Shi X, Castranova V, Halliwell B, Vallyathan V. Reactive oxygen species and silica-induced carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health* 1998; 1:181-197.

Slot MC, Sokolowska MG, Savelkoul KG, Janssen RGJH, Damoiseaux JGMC, Tervaert JWC. Immunoregulatory gene polymorphisms are associated with ANCA-related vasculitis. *Clin Immunol* 2008; 128:39-45.

Snapper CM, Mond JJ. Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunol Today* 1993; 14(1):15–17.

Soutar CA, Turner-Warwick M, Parkes WR. Circulating antinuclear antibody and rheumatoid factor in coal pneumoconiosis. *BMJ* 1974; 3:145-152.

Stassi G, Di Felice V, Todaro M, Cappello F, Zummo G, Farina F, et al. Involvement of Fas/FasL System in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases and Wilson's Disease. *Arch Immunol Ther Exp* 1999; 47(3):129-133.

Steenland K, Goldsmith DF. Silica exposure and autoimmune diseases. *Am J Ind Med* 1995; 28(5):603-608.

Subra JF, Renier G, Reboul P, Tollis F, Boivinet R, Schwartz P, Chevailler A. Lymphopenia in occupational pulmonary silicosis with or without autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2001; 126:540-544.

Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, et al. Expression of the Fas Ligand in Cells of T Cell Lineage. *The Journal of Immunol* 1995; 154(8):3806-3813.

Sugimoto N, Oida T, Hirota K, Nakamura K, Nomura T, Uchiyama T, et al. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol* 2006; 18(8):1197-1209.

Suzuki N, Ichino M, Mihara S, Kaneko S, Sakane T. Inhibition of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of lymphocytes in vitro by circulating anti-fas ligand autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus *Arthritis Rheum* 1998; 41(2):344-353.

Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 1995; 14(6):1129-1135.

Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K, Kimura F. Fas ligand in human serum. *Nat Med* 1996; 2(3):317-322.

Tesar V, Jirsa M Jr, Masek Z, Bartunková J, Stejskalová A, Dostál C, et al. Soluble cytokinin receptors in renal vasculitis and lupus nephritis. *Cas Lek Cesk* 1998; 137(9):271–275.

Thompson CB, Allison JP. The Emerging Role of CTLA-4 as an Immune Attenuator. *Immunity* 1997; 7: 445-450.

Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone J, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995; 3:541-547.

Tomokuni A, Aikoh T, Matsuki T, Isozaki Y, Otsuki T, Kita S, et al. Elevated soluble Fas/APO- 1 (CD95) levels in silicosis patients without clinical symptoms of autoimmune diseases or malignant tumours. *Clin Exp Immunol* 1997; 110:303-309.

Ueki, A, Yamaguchi M, Ueki H, Watanabe Y, Ohsawa G, Kinugawa K, et al. Polyclonal human T-cell activation by silicate *in vitro*. *Immunology* 1994; 82:332-335.

Viallard JF, Pellegrin JL, Ranchin V, Schaefferbeke T, Dehais J, Longy-Boursier M et al. Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN- γ) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 1999; 115:189–195.

Wahl SM, McCartney-Francis N, Mergenhagen SE. Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF- β . *Immunol Today* 1989; 10(8):258–261.

Walker MR, Kasproicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. *J Clin Invest*. 2003; 112(9):1437-1443.

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science*. 1995; 270: 985-988.

Wolf RE, Baethge BA. Interleukin-1 alpha, interleukin-2, and soluble interleukin-2 receptors in polymyositis. *Arthritis Rheum* 1990; 33(7):1007-1014.

Wu P, Miura Y, Hyodoh F, Nishimura Y, Hatayama T, Hatada S, et al. Reduced function of CD4+25+ regulatory T cell fraction in silicosis patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; 19(2):357-68.

Yassin A, Yebesi F, Tingle R. Occupational Exposure to Crystalline Silica Dust in the United States, 1988–2003. *Environ Health Perspect* 2005; 113:255-260.

Yin Z, Siegert S, Neure L, Grolms M, Liu L, Eggens U, et al. The elevated ratio of interferon gamma-/interleukin-4-positive T cells found in synovial fluid and synovial membrana of rheumatoid arthritis patients can be changed by interleukin-4 but not by interleukin-10 or transforming growth factor beta. *Rheumatol* 1999; 38:1058-1067.

Youinou P, Ferec C, Cledes J, Zabbe C, Philippon P, Dewitte JD, et al. Immunological effect of silica dust analyzed by monoclonal antibodies. *J Clin Lab Immunol* 1985; 16(4):207-10.

Yu F, Zhao M-H, Zhang Y-K, Zhang Y, Wang H-Y. Anti-endothelial cell antibodies (AECA) in patients with propylthiouracil (PTU)-induced ANCA positive vasculitis are associated with disease activity. *Clin Exp Immunol* 2005; 139(3): 569-574.

Zhou Y, Huang DR, Paris PL, Sauter CS, Prock KA, Hoffman GS. An Analysis of CTLA-4 and Proinflammatory Cytokine Genes in Wegener's Granulomatosis. *Arthritis Reum* 2004; 50(8):2645-2650.

ANEXOS



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas-S.P.
☎ 0 19 7888936
fax 0 19 7888925

cep@head.fcm.unicamp.br

CEP. 30/04/01

PARECER PROJETO: N° 260/2000

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ALTERAÇÕES IMUNOTOXICOLÓGICAS E ESTRESSE OXIDATIVO DE ERITRÓCITOS E NEUTRÓFILOS EM TRABALHADORES EXPOSTOS À SÍLICA”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Mary L. S. Queiroz

INSTITUIÇÃO: Departamento de Farmacologia/Hemocentro/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 14/08/2000

II - OBJETIVOS

O presente projeto tem por objetivo investigar as alterações imunotoxicológicas da sílica sobre a resposta imunológica humoral e celular através das dosagens de imunoglobulinas (IgA, IgG, IgE, IgM) e interleucinas (IL-2, IL-2Rs, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α). Também será realizada a pesquisa de auto-anticorpos (fator anti-nuclear, anticorpo anti-DNA, anticorpo anti-fosfolípide e presença do fator reumatóide) e a determinação de linfócitos T e B, células NK, marcadores celulares CD25 e HLA-DR (citometria de fluxo), no sangue periférico de trabalhadores expostos à sílica. Além disso, serão avaliados os efeitos da sílica sobre o estresse oxidativo nos eritrócitos de pacientes com silicose pulmonar, mediante dosagem das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione dismutase. Será também estudada a peroxidação lipídica da membrana das células eritróides e verificadas as possíveis alterações na capacidade funcional das células polimorfonucleares através da produção do radical superóxido nesses pacientes expostos à sílica.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um estudo prospectivo, observacional, não-intervencionista, em que serão estudados 100 pacientes expostos à sílica. Para os experimentos, que serão realizados “in vitro”, será utilizado o sangue periférico de trabalhadores expostos à sílica. Quanto aos aspectos éticos, estão contemplados na proposta clara e objetiva de tão somente realizar a

coleta de 50ml de sangue periférico e/ou 50 ml de urina dos pacientes recrutados e controles, sem intervenções terapêuticas de nenhuma espécie no presente estudo.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto encontra-se em conformidade com as resoluções acima. Trata-se de estudo prospectivo, de caráter investigativo diagnóstico e fisiopatológico, de risco mínimo para os pacientes. O protocolo é bem estruturado e há critérios claros de inclusão e exclusão. O projeto é de grande relevância clínica e científica, e pode haver benefícios diretos para os participantes e outros com doença semelhante na busca de alternativas eficientes para prevenir as doenças causadas pela exposição. Há um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a ser obtido dos pacientes que irão participar do estudo e outro destinado exclusivamente aos controles não expostos à sílica. O presente projeto obedece às normas da resolução CNS-MS – 196/96 e complementares.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado os termos do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP em 12 de setembro de 2000.
Parecer retificado “ad referendum” em 30 de abril de 2002.


Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo II

**TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS INFORMAÇÃO PARA O GRUPO
VOLUNTÁRIO/CONTROLE
“ESTUDO DE PARÂMETROS IMUNOTOXICOLÓGICOS EM
TRABALHADORES EXPOSTOS À SÍLICA”**

Nome do voluntário: _____
Idade: _____ RG: _____
Endereço: _____

Nome do responsável legal (se voluntário menor): _____
Idade: _____ RG: _____
Grau de parentesco: _____ Prova documental: _____
Endereço: _____

Eu, abaixo assinado, aceito participar voluntariamente de um estudo sobre a imunotoxicidade da sílica em trabalhadores expostos.

Estou ciente que para participar deste estudo serei submetido à coleta de até 50mL de sangue e/ou 50 mL de urina.

Fui informado que não será administrado nenhum medicamento em meu organismo em decorrência desta pesquisa.

Fui informado que serei beneficiado com esse estudo na busca de alternativas eficientes para prevenir as doenças causadas pela exposição.

Sei que posso sair do estudo a qualquer momento. Sei ainda que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador.

Se tiver dúvidas sobre o exame, poderei procurar a pesquisadora responsável: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz no Departamento de Farmacologia/Hemocentro da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, telefone (19) 3521-8752.

Poderei ainda entrar em contato com a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa para alguma reclamação pelo telefone (19) 3521-8936.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo, e recebi esclarecimentos sobre minhas dúvidas oralmente.

Campinas, ____/____ de 2009.

Assinatura do voluntário

Assinatura do responsável legal

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz
Departamento de Farmacologia e Hemocentro-FCM/UNICAMP
Pesquisadora responsável

Anexo III

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS INFORMAÇÃO PARA O GRUPO DE PACIENTES “ESTUDO DE PARÂMETROS IMUNOTOXICOLÓGICOS EM TRABALHADORES EXPOSTOS À SÍLICA”

Nome do paciente: _____
Idade: _____ RG: _____
Endereço: _____

Nome do responsável legal (se paciente menor): _____
Idade: _____ RG: _____
Grau de parentesco: _____ Prova documental: _____
Endereço: _____

Eu, abaixo assinado, aceito participar voluntariamente de um estudo sobre a imunotoxicidade da sílica em trabalhadores expostos.

Estou ciente que para participar deste estudo serei submetido à coleta de até 50mL de sangue e/ou 50 mL de urina.

Fui informado que não será administrado nenhum medicamento em meu organismo em decorrência desta pesquisa e que o meu tratamento não será prejudicado.

Fui informado que serei beneficiado com esse estudo na busca de alternativas eficientes para prevenir as doenças causadas pela exposição. Fui informado que terei acesso ao resultado da análise realizada.

Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isso não vai prejudicar meu tratamento na Unicamp. Sei ainda que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador.

Se tiver dúvidas sobre o exame, poderei procurar a pesquisadora responsável: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz no Departamento de Farmacologia/Hemocentro da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, telefone (19) 3521-8752.

Poderei ainda entrar em contato com a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa para alguma reclamação pelo telefone (19) 3521-8936.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo, e recebi esclarecimentos sobre minhas dúvidas oralmente.

Campinas, ____/____ de 2009.

Assinatura do paciente

Assinatura do responsável legal

Prof. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz
Departamento de Farmacologia e Hemocentro-FCM/UNICAMP
Pesquisadora responsável

APÊNDICES

Apêndice I

**Apresenta a positividade ou negatividade para as
doenças autoimunes pesquisadas no questionário
aplicado aos indivíduos expostos.**

- :Negativo

+ :Positivo

Iniciais	Sexo	Atrite reumatóide	Lúpus eritematoso sistêmico	Esclerodermia	Poliomiosite ou dermatomiosite	Síndrome de Sjögren
AI	M	-	-	-	-	-
ARS	M	-	-	-	+	-
AJC	M	-	-	-	-	-
AMP	F	-	+	-	-	-
AAM	M	-	-	-	-	-
AB	M	-	-	-	-	-
ABA	M	-	-	-	-	-
ABS	M	-	-	-	-	-
ACG	M	-	-	+	-	-
AJS	M	-	-	-	-	-
AJP	M	-	+	+	+	-
AAG	M	-	-	-	-	-
BML	M	-	-	-	-	-
CBABF	F	-	-	-	-	-
CAM	F	-	+	-	-	+
ECV	F	-	+	-	-	-
EAHC	M	-	+	-	-	-
FCM	M	-	-	-	-	-
GPS	M	-	-	-	-	-
HMS	F	+	-	-	-	-
HFA	M	-	-	-	-	-
IFDS	F	+	-	+	-	-
IMN	F	-	+	+	+	-
JFCS	M	+	-	-	-	-
JJS	M	+	+	+	-	-
JRA	M	-	-	-	-	+

Iniciais	Sexo	Atrite reumatóide	Lúpus eritematoso sistêmico	Esclerodermia	Poliomiosite ou dermatomiosite	Síndrome de Sjögren
JGO	M	-	+	-	+	-
JI	M	-	-	-	-	+
JVS	M	-	-	+	+	+
JAGM	M	-	-	-	-	-
LHO	M	-	+	+	+	+
LVOC	F	+	-	+	+	+
MELS	F	-	-	-	-	-
MBC	M	+	-	-	-	-
MDS	M	-	-	-	-	-
OBF	M	-	-	-	-	-
RCR	F	-	-	-	-	-
SCO	M	-	-	+	-	-
AP	M	-	-	+	+	+
BCP	F	-	-	-	-	-
BPT	M	-	-	-	+	-
BPM	M	-	-	-	-	-
BRC	M	-	-	-	-	-
CEA	M	+	-	-	-	-
DMBV	F	+	+	+	+	+
DDS	M	-	-	-	-	-
DCI	M	+	-	-	+	-
MF	M	-	-	-	-	-
MLMM	F	-	-	-	-	-
MJLC	F	+	-	-	-	+
LFF	M	-	-	-	-	-
MCZC	F	-	-	-	-	-
MSS	M	-	-	-	-	-

Iniciais	Sexo	Atrite reumatóide	Lúpus eritematoso sistêmico	Esclerodermia	Poliomiosite ou dermatomiosite	Síndrome de Sjögren
JAP	M	-	-	-	-	-
JGC	M	-	-	-	-	-
JFO	M	-	-	-	-	-
JJA	M	-	-	-	-	-
JCBA	M	-	-	-	+	+
DLGS	M	-	-	-	+	+
DSP	M	-	-	-	-	-
HBN	M	-	-	-	-	-
EFC	M	-	-	-	-	-
FCC	M	-	-	-	-	-
MR	M	-	-	-	-	-
PSNS	M	-	-	-	+	-
PSN	M	-	-	-	+	+
MBP	M	-	-	-	-	-
DAS	M	-	+	-	-	-
DTS	M	-	-	-	-	-
PR	M	-	-	-	-	-
JCS	M	+	+	-	+	-
SM	M	-	+	-	-	-
VD	M	-	-	-	+	-
TFC	M	-	-	-	-	-
SS	M	-	-	-	-	-
SG	M	-	-	-	-	-
WF	M	-	-	-	-	-
SRPN	M	-	-	-	-	+
PF	M	-	-	-	-	-
SE	M	-	-	-	-	-

Iniciais	Sexo	Atrite reumatóide	Lúpus eritematoso sistêmico	Esclerodermia	Poliomiosite ou dermatomiosite	Síndrome de Sjögren
OBF	M	-	-	-	-	-
OVP	M	-	-	-	-	+
OAS	M	-	-	-	-	-
AAB	M	-	-	-	-	-
ALS	M	-	-	-	+	-
ASS	M	-	-	+	+	-
MIAT	F	-	-	-	-	-
SAL	F	-	-	-	-	-
WSS	M	-	-	-	-	-
JCO	M	-	+	-	+	-
ET	M	-	-	-	-	-
STGR	F	-	-	-	-	-
JP	M	-	-	-	-	-
OT	M	-	-	-	+	-
TIB	F	-	-	-	-	-
AIS	M	-	-	-	-	-
AAC	M	-	-	-	-	-
LOL	F	-	-	-	-	-
APS	M	-	-	-	+	-
MJCM	F	-	-	-	-	-
JFS	M	-	-	-	+	-
CFS	M	+	-	-	+	-
ACV	M	-	-	-	-	-
Total		12	14	12	24	14

Apêndice II

**Apresenta os valores numéricos apresentados pelos
indivíduos expostos à sílica para o teste de Fator
Anti-Núcleo (FAN).**

Resultados em **vermelho-Positivo à partir da primeira avaliação**

Resultados em **rosa-Positivo à partir da segunda avaliação**

Resultados em **azul-Positivo na terceira avaliação**

NC-Não compareceu

Exame: Fator anti-núcleo-FAN				
Nº	PACIENTES	1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação
001	A S S	-	-	-
002	A I	-	-	-
003	A C	-	-	-
004	A D I	1/320	1/80	NC
005	A C V	-	-	NC
006	A R S	-	-	-
007	A A B	-	-	-
008	A A C	-	-	-
009	A J C	1/160	1/320	Não confirmou
010	A M P	-	-	-
011	A A F	-	Óbito	Óbito
012	A A M	-	1/80	1/320
013	A B	-	-	-
014	A B A	-	1/640	1/640
015	A B S	1/320	1/80	1/160
016	A C G	1/80	1/160	1/160
017	A D	-	-	NC
018	A I S	-	-	-
019	A J S	-	-	-
020	A J P	-	1/320	1/320
021	A P S	-	NC	-
022	A L S	-	-	-
023	A A G	-	-	-
024	A P	-	-	-
025	B C P	-	-	-
026	B A	-	Óbito	Óbito
027	B M L	1/160	1/80	1/160
028	B P T	-	-	-
029	B P M	-	-	-
030	B R C	-	-	-
031	B R S	-	-	NC
032	C P	-	-	NC
033	C E A	-	-	-
034	C F S	-	-	-
035	C B A B F	-	1/80	Não confirmou
036	C M R	-	-	NC
037	C S R	-	-	NC
038	C A M	1/320	1/80	1/80
039	D S B B	-	-	NC
040	D M B V	-	-	-

041	D T S	-	-	-
042	D D S	-	-	-
043	D C I	-	-	-
044	D S P	-	-	-
045	D A S	1/80	Não confirmou	-
046	D L G S	-	-	-
047	E T	-	-	-
048	E C V	1/640	1/640	1/640
049	E A H C	1/160	1/80	1/160
050	E F C	-	-	-
051	E R	-	-	NC
052	F C C	-	-	-
053	F C M	1/160	1/160	1/320
054	G O	1/160	1/640	NC
055	G P S	1/320	1/640	1/640
056	H M S	-	-	-
057	H P S	-	-	Óbito
058	H B N	-	-	-
059	H Z	-	-	Óbito
060	H F A	1/320	1/640	1/640
061	I F D S	1/160	1/320	1/160
062	I K	-	-	NC
063	I M N	1/160	1/320	1/640
064	J C O	-	-	-
065	J C P	-	Óbito	Óbito
066	J F C S	-	-	-
067	J J S	1/280	1/640	1/640
068	J N S	-	-	NC
069	J R A	1/160	Não confirmou	-
070	J G O	1/1280	1/640	1/640
071	J G C	-	-	-
072	J A P	-	-	-
073	J C B	-	-	Óbito
074	J C B A	-	-	-
075	J C S	-	-	-
076	J P	-	-	-
077	J D F	-	NC	NC
078	J F S	-	1/640	1/640
079	J F O	-	-	-

080	J I	-	-	1/80
081	J J A	-	-	
082	J L R T	-	-	NC
083	J S A	-	-	NC
084	J T G	1/1280	1/1280	Óbito
085	J V S	1/1280	1/320	1/320
086	J A G M	1/80	1/320	1/160
087	L O L	-	-	-
088	L F F	-	-	-
089	L H O	-	1/160	Não confirmou
090	L V O C	Volume de sangue insuficiente		-
091	M B P	-	-	-
092	M C Z C	-	NC	-
093	M L M M	-	-	-
094	M E L S	-	-	-
095	M I A T	-	-	-
096	M J C M	-	-	-
097	M J L C	1/1280	1/1280	1/640
098	M B C	-	1/160	1/640
099	M O D	-	-	NC
100	M F L	-	NC	NC
101	M S S	-	-	-
102	M R	-	-	-
103	M F	-	-	-
104	M D S	1/160	1/80	1/320
105	O T	-	-	-
106	O B F	1/280	1/80	1/160
107	O A S	-	-	-
108	O B F	-	-	-
109	O V P	1/1280	1/640	1/320
110	P F	-	-	-
111	P R	-	-	-
112	P S N S	-	-	-
113	P S N	1/160	1/160	1/320
114	R C R	1/160	1/80	1/80
115	S M	-	-	-
116	S C O	-	-	-
117	S E	1/80	Não confirmou	-
118	S P S	1/1280	1/1280	NC

119	S G	-	-	-
120	S M	-	1/80	NC
121	S R P N	-	-	-
122	S S	-	-	-
123	S A L	-	-	-
124	S T G R	-	-	-
125	T I B	-	-	-
126	T F C	-	-	-
127	V D	-	-	-
128	W F	-	-	-
129	W S S	-	-	-
130	W A Z	-	-	NC

Apêndice III

**Apresenta os valores numéricos apresentados pelos
indivíduos expostos à sílica para o teste de Fator
Reumatóide (FR).**

Resultados em **vermelho-Positivo à partir da primeira avaliação**

NC-Não compareceu

EXAME: Fator Reumatóide (FR)

Nº	PACIENTES	1ª Avaliação Até 15 UI/mL	2ª Avaliação Até 15 UI/mL	3ª Avaliação Até 15 UI/mL
001	A S S	-	-	-
002	A I	-	-	-
003	A C	-	37,6	NC
004	A DI	37,70	25,8	NC
005	A C V	-	-	-
006	A R S	-	-	-
007	A A B	-	-	-
008	A A C	-	-	-
009	A J C	-	-	-
010	A M P	-	-	-
011	A A F	-	Óbito	Óbito
012	A A M	-	-	-
013	A B	-	35,7	Não confirmou
014	A B A	-	-	-
015	A B S	-	-	-
016	A C G	-	-	-
017	A D	-	-	NC
018	A I S	-	-	-
019	A J S	-	-	-
020	A J P	36,50	27,9	18,2
021	A P S	86,60	NC	60,9
022	A L S	-	-	-
023	A A G	-	-	-
024	A P	-	-	-
025	B C P	-	-	-
026	B A	-	Óbito	Óbito
027	B M L	41,40	20,5	17,7
028	B P T	-	-	-
029	B P M	-	-	-
030	B R C	-	-	-
031	B R S	-	-	NC
032	C P	-	-	NC
033	C E A	-	-	-
034	C F S	-	-	-
035	C B A B F	-	-	-

036	C M R	-	-	NC
037	C S R	-	-	NC
038	C A M	-	-	-
039	D S B B	18,00	20,5	NC
040	D M B V	-	-	-
041	D T S	-	-	-
042	D D S	-	-	-
043	D C I	-	-	-
044	D S P	-	-	-
045	D A S	-	-	-
046	D L G S	-	-	-
047	E T	-	-	-
048	E C V	-	-	-
049	E A H C	-	-	-
050	E F C	-	-	-
051	E R	-	-	NC
052	F C C	-	-	-
053	F C M	-	-	-
054	G O	-	-	NC
055	G P S	-	-	-
056	H M S	148,00	163,0	206,00
057	H P S	-	-	Óbito
058	H B N	-	-	-
059	H Z	-	-	Óbito
060	H F A	28,40	109,0	165,00
061	I F D S	-	-	-
062	I K	-	-	NC
063	I M N	-	-	-
064	J C O	-	-	-
065	J C P	-	Óbito	Óbito
066	J F C S	24,70	20,00	21,4
067	J J S	207,00	236,0	240,00
068	J N S	-	-	NC
069	J R A	-	-	-
070	J G O	31,00	234,0	148,00
071	J G C	-	-	-
072	J A P	-	-	-
073	J C B	-	-	Óbito
074	J C B A	-	-	-
075	J C S	-	-	-
076	J P	-	-	-
077	J D F	17,00	NC	NC
078	J F S	-	-	-
079	J F O	-	-	-
080	J I	-	21,3	32,3

081	J J A	-	-	-
082	J L R T	-	-	NC
083	J S A	-	-	NC
084	J T G	240,00	NC	Óbito
085	J V S	-	-	-
086	J A G M	-	-	-
087	L O L	-	-	-
088	L F F	-	-	-
089	L H O	-	-	-
090	L V O C	415,00	415,00	336,00
091	M B P	-	-	-
092	M C Z C	-	NC	-
093	M L M M	-	-	-
094	M E L S	-	-	-
095	M I A T	-	-	-
096	M J C M	-	-	-
097	M J L C	36,40	NC	22,4
098	M B C	-	-	-
099	M O D	-	-	NC
100	M F L	91,60	NC	NC
101	M S S	-	-	-
102	M R	-	-	-
103	M F	-	-	-
104	M D S	-	-	-
105	O T	-	-	-
106	O B F	-	-	-
107	O A S	-	-	-
108	O B F	-	-	-
109	O V P	-	-	-
110	P F	-	-	-
111	P R	-	-	-
112	P S N S	-	-	-
113	P S N	98,80	60,8	121,5
114	R C R	-	-	-
115	S M	-	-	-
116	S C O	24,90	20,00	27,5
117	S E	-	-	-
118	S P S	24,90	NC	NC
119	S G	-	-	-
120	S M	-	-	NC
121	S R P N	-	-	-
122	S S	-	-	-
123	S A L	-	-	-
124	S T G R	-	-	-
125	T I B	-	-	-

126	T F C	-	-	-
127	V D	-	-	-
128	W F	-	-	-
129	W S S	-	-	-
130	W A Z	-	-	NC

Apêndice IV

Apresenta os índices de proliferação de linfócitos dos indivíduos expostos em presença de soro com níveis elevados de sIL-2R α e soro heterólogo do tipo AB.

Nº	INICIAIS	Proliferação - soro com níveis elevados de sIL-2R α	Proliferação - soro heterólogo do tipo AB
001	A S S	17.467	19.558
002	A I	39.204	49.127
003	A C	NC	NC
004	A DI	NC	NC
005	A C V	29.481	24.168
006	A R S	34.447	39.202
007	A A B	39.315	39.672
008	A A C	20.375	26.375
009	A J C	48.887	36.840
010	A M P	25.018	34.083
011	A A F	Óbito	Óbito
012	A A M	44.665	64.263
013	A B	56.067	36.751
014	A B A	27.935	39.661
015	A B S	56.923	46.924
016	A C G	60.238	29.356
017	A D	NC	NC
018	A I S	25.350	23.037
019	A J S	28.172	36.149
020	A J P	34.352	20.741
021	A P S	19.585	40.455
022	A L S	43.675	45.860
023	A A G	35.621	35.579
024	A P	33.545	53.598
025	B C P	32.659	38.043
026	B A	Óbito	Óbito
027	B M L	55.918	38.168
028	B P T	31.265	49.392
029	B P M	40.981	55.722
030	B R C	65.404	52.495
031	B R S	NC	NC
032	C P	NC	NC
033	C E A	47.813	16.837
034	C F S	24.797	56.122
035	C B A B F	50.614	36.553
036	C M R	NC	NC
037	C S R	NC	NC
038	C A M	10.357	36.204
039	D S B B	NC	NC
040	D M B V	36.248	43.130
041	D T S	37.888	63.995
042	D D S	60.574	56.047
043	D CI	53.757	43.130

044	D S P	38.211	66.811
045	D A S	68.955	28.445
046	D L G S	37.117	37.732
047	E T	47.935	40.557
048	E C V	88.612	15.258
049	E A H C	15.435	29.103
050	E F C	37.795	54.516
051	E R	NC	NC
052	F C C	62.462	42.708
053	F C M	37.522	42.935
054	G O	NC	NC
055	G P S	31.894	60.796
056	H M S	46.835	30.095
057	H P S	Óbito	Óbito
058	H B N	20.095	35.308
059	H Z	Óbito	Óbito
060	H F A	46.100	43.947
061	I F D S	70.735	63.373
062	I K	NC	NC
063	I M N	55.073	33.414
064	J C O	35.393	44.148
065	J C P	Óbito	Óbito
066	J F C S	29.745	31.079
067	J J S	26.110	33.940
068	J N S	NC	NC
069	J R A	38.249	13.325
070	J G O	23.831	55.670
071	J G C	62.141	58.867
072	J A P	60.571	22.249
073	J C B	Óbito	Óbito
074	J C B A	18.486	24.371
075	J C S	20.618	24.007
076	J P	20.728	35.872
077	J D F	NC	NC
078	J F S	34.999	48.250
079	J F O	55.739	45.472
080	J I	44.342	37.477
081	J J A	46.033	47.912
082	J L R T	NC	NC
083	J S A	NC	NC
084	J T G	Óbito	Óbito
085	J V S	40.770	60.144
086	J A G M	55.961	39.755
087	L O L	43.971	40.572
088	L F F	38.661	30.441

089	L H O	26.007	46.809
090	L V O C	40.974	53.637
091	M B P	62.490	49.723
092	M C Z C	60.012	105.061
093	M L M M	102.112	56.705
094	M E L S	59.924	33.365
095	M I A T	27.868	53.181
096	M J C M	54.365	58.770
097	M J L C	52.089	35.718
098	M B C	33.193	48.872
099	M O D	NC	NC
100	M F L	NC	NC
101	M S S	42.252	29.981
102	M R	36.924	35.553
103	M F	32.973	59.665
104	M D S	60.624	20.556
105	O T	10.144	37.131
106	O B F	33.416	42.737
107	O A S	47.918	35.423
108	O B F	34.702	22.747
109	O V P	37.995	40.569
110	P F	42.143	37.178
111	P R	32.215	56.462
112	P S N S	67.019	39.253
113	P S N	46.788	51.788
114	R C R	73.772	38.376
115	S M	54.245	21.364
116	S C O	38.529	27.774
117	S E	25.974	32.919
118	S P S	NC	NC
119	S G	32.571	42.925
120	S M	NC	NC
121	S R P N	45.795	33.977
122	S S	33.606	41.894
123	S A L	35.052	13.614
124	S T G R	7.686	26.806
125	T I B	16.408	22.556
126	T F C	23.381	26.027
127	V D	24.104	22.556
128	W F	25.656	33.124
129	W S S	23.825	55.136
130	W A Z	NC	NC

Apêndice V

Apresenta os índices de proliferação de linfócitos dos indivíduos controle em presença de soro com níveis elevados de sIL-2R α e soro heterólogo do tipo AB.

Nº	INICIAIS	Proliferação - soro com níveis elevados de sIL-2Rα	Proliferação - soro heterólogo do tipo AB
001	A S S	48.054	40.120
002	A I	56.489	40.615
003	A C	34.320	28.951
004	A DI	19.735	11.511
005	A C V	25.358	25.930
006	A R S	35.740	36.859
007	A A B	23.158	25.048
008	A A C	29.838	34.928
009	A J C	31.812	28.749
010	A M P	22.992	11.324
011	A A F	11.389	13.865
012	A A M	26.192	10.401
013	A B	24.623	28.649
014	A B A	17.250	30.426
015	A B S	10.635	12.833
016	A C G	29.743	22.835
017	A D	8.944	10.922
018	A I S	25.380	17.145
019	A J S	30.140	24.066
020	A J P	17.179	19.309
021	A P S	40.544	31.166
022	A L S	21.191	29.136
023	A A G	23.619	28.111
024	A P	46.244	41.885
025	B C P	24.882	30.674
026	B A	23.366	45.368
027	B M L	26.279	24.469
028	B P T	31.486	22.434
029	B P M	51.457	51.151
030	B R C	46.873	35.698
031	B R S	34.060	35.977
032	C P	24.037	24.807
033	C E A	39.958	39.950

Apêndice VI

Apresenta os números absolutos de linfócitos no sangue periférico, de células T regulatórias (CD4+CD25+FoxP3+) e de células T supressoras CD4+ e CD8+ expressando os marcadores PD-1(CD279) e CTLA-4 (CD152), assim como a incidência de silicose, idade e sexo dos indivíduos expostos.

*** Na tabela:**

NC - Não compareceu

? - Investigação de silicose

- -Exposição ocupacional à sílica, porém não apresenta silicose pulmonar

+ - Silicose pulmonar

QUADRO GERAL DOS RESULTADOS – INDIVÍDUOS EXPOSTOS

Nº	Iniciais	Sexo	Idade	Silicose	Tempo	Linfócitos/ mm³	CD4+CD25+ FoxP3+/mm³	CD3+CD4+ CD152+/mm³	CD3+CD8+ CD152+/mm³	CD3+CD4+ CD279+/mm³	CD3+CD8+ CD279+/mm³
1	ASS	M	61	+	5	2100,0	8,40	8,40	4,20	12,60	6,30
2	AI	M	32	?	7	2553,0	0,00	0,00	0,00	0,00	2,74
3	AC	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
4	AD	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
5	ACV	M	51	-	31	3400,0	34,00	3,40	6,80	3,40	5,94
6	ARS	M	68	-	9,5	2088,6	60,57	0,00	0,00	27,15	10,68
7	AAB	M	64	-	24	4110,0	16,44	12,33	28,77	32,88	20,55
8	AAC	M	46	-	20	1560,0	15,60	1,56	6,24	1,56	7,80
9	AJC	M	46	-	12,5	2587,2	5,17	2,59	2,59	5,17	1,95
10	AMP	F	63	+	41	1590,0	128,79	0,00	1,59	11,13	22,95
11	AAF	M	-----	ÓBITO	5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
12	AAM	M	52	+	10	1980,0	19,80	1,98	0,00	1,98	2,26
13	AB	M	60	+	15	2672,8	2,67	2,67	0,00	8,02	3,64
14	ABA	M	58	-	21	1284,8	5,14	1,28	2,57	3,85	4,92
15	ABS	M	74	?	20	1663,2	38,25	0,00	1,66	61,54	34,95
16	ACG	M	57	+	14,5	1600,0	62,40	1,6	1,6	94,40	18,63
17	AD	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
18	AIS	M	68	-	20	2670,0	26,70	2,67	0,00	5,34	5,34
19	AJS	M	67	-	2,5	1070,0	50,29	0,00	0,00	2,14	4,88
20	AJP	M	57	+	19	1969,5	5,91	1,97	1,97	1,97	0,00
21	APS	M	41	+	8,5	1380,0	13,80	6,9	0,00	13,8	16,56
22	ALS	M	56	-	22	2310,0	9,24	4,62	4,62	9,24	4,62
23	AAG	M	61	-	24	1670,0	133,60	0,00	0,00	10,02	8,64
24	AP	M	63	-	25	1740,0	13,92	3,48	1,74	20,88	136,00
25	BCP	F	42	-	13	2330,0	11,65	0,00	0,00	18,64	18,70
26	BA	M	-----	ÓBITO	12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
27	BML	M	66	-	5	2066,4	2,07	0,00	2,07	0,00	2,93
28	BPT	M	74	+	30	2070,0	14,49	0,00	0,00	41,4	46,48

Nº	Iniciais	Sexo	Idade	Silicose	Tempo	Linfócitos/ mm³	CD4+CD25+ FoxP3+/mm³	CD3+CD4+ CD152+/mm³	CD3+CD8+ CD152+/mm³	CD3+CD4+ CD279+/mm³	CD3+CD8+ CD279+/mm³
29	BPM	M	71	+	19	1220,0	0,00	0,00	0,00	12,2	29,10
30	BRC	M	51	+	14	1490,0	4,47	0,00	2,98	5,96	16,59
31	BRS	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
32	CP	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
33	CEA	M	62	+	15,5	1900,0	3,80	0,00	0,00	20,9	25,74
34	CFS	M	64	+	1	2230,0	22,30	0,00	0,00	2,23	6,69
35	CBABF	F	44	+	24	2648,8	15,89	0,00	0,00	5,30	1,66
36	CMR	F	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
37	CSR	F	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
38	CAM	F	50	+	26	1949,4	3,90	0,00	1,95	3,90	1,60
39	DSBB	F	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
40	DMBV	F	48	+	6	1880,0	1,88	0,00	0,00	20,68	37,80
41	DTS	M	67	+	19	1700,0	79,90	0,00	1,70	11,90	16,8
42	DDS	M	46	+	23,5	1780,0	7,12	0,00	0,00	7,12	21,40
43	DC	M	56	+	10	2050,0	0,00	0,00	0,00	12,30	23,20
44	DSP	M	57	+	9,5	2560,0	102,40	2,56	5,12	23,04	59,74
45	DAS	M	69	+	13,5	1610,0	111,09	14,49	0,00	11,27	21,98
46	DLGS	M	54	+	17,5	1780,0	5,34	1,78	8,90	8,90	24,70
47	ET	M	37	+	16	2150,0	10,75	12,90	12,90	15,05	8,60
48	ECV	F	57	+	33	1610,0	20,93	0,00	3,22	32,20	8,54
49	EAHC	M	50	+	30	1314,0	5,26	0,00	1,31	1,31	6,44
50	EFC	M	52	+	28	1530,0	85,68	1,53	0,00	10,71	30,00
51	ER	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
52	FCC	M	51	+	25	2440,0	90,28	17,08	4,88	7,32	27,96
53	FCM	M	46	+	4,3	2394,6	7,18	2,39	2,39	2,39	0,00
54	GO	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
55	GPS	M	50	+	15	2496,6	14,98	0,00	2,50	4,99	0,00
56	HMS	F	49	+	19	1845,9	11,08	0,00	0,00	1,85	0,00
57	HPS	F	-----	ÓBITO	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
58	HBN	M	37	+	5	2160,0	95,04	36,72	36,72	12,96	54,90

Nº	Iniciais	Sexo	Idade	Silicose	Tempo	Linfócitos/ mm³	CD4+CD25+ FoxP3+/mm³	CD3+CD4+ CD152+/mm³	CD3+CD8+ CD152+/mm³	CD3+CD4+ CD279+/mm³	CD3+CD8+ CD279+/mm³
59	HZ	M	-----	ÓBITO	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
60	HFA	M	50	+	23,8	2406,8	14,44	0,00	0,00	2,41	0,00
61	IFDS	F	66	+	35	1960,0	37,24	0,00	1,96	1,96	1,49
62	IK	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
63	IMN	F	63	+	21	3081,0	55,46	0,00	0,00	27,73	46,60
64	JCO	M	45	+	10	1510,0	10,57	6,04	13,59	34,73	1,51
65	JCP	M	-----	ÓBITO	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
66	JFCS	M	39	+	10,5	2365,2	63,86	2,37	2,37	193,95	66,66
67	JJS	M	67	+	6,5	1260,0	40,32	0,00	2,52	22,68	32,30
68	JNS	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
69	JRA	M	64	+	9	1490,0	46,19	1,49	1,49	95,36	63,92
70	JGO	M	66	+	21	820,0	18,86	0,00	0,00	109,06	224,28
71	JGC	M	54	+	32	1840,0	11,04	0,00	0,00	3,68	10,09
72	JAP	M	56	+	29,5	2000,0	30,00	0,00	0,00	34,00	37,17
73	JCB	M	-----	ÓBITO	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
74	JCBA	M	52	+	13	550,0	3,30	0,00	0,00	15,95	70,40
75	JCS	M	61	+	1	1600,0	25,60	0,00	3,20	11,20	16,44
76	JP	M	58	+	25	1260,0	13,86	0,00	2,52	8,82	10,08
77	JDF	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
78	JFS	M	49	+	15	1840,0	16,56	1,84	0,00	1,84	1,51
79	JFO	M	47	+	24	1660,0	16,60	0,00	0,00	61,42	88,35
80	JI	M	76	+	51	2738,4	57,51	5,48	8,22	125,97	64,26
81	JJA	M	58	+	19,5	1455,0	4,37	1,45	1,45	24,74	6,90
82	JLRT	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
83	JSA	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
84	JTG	M	-----	ÓBITO	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
85	JVS	M	60	+	19	1952,0	62,46	1,95	0,00	76,13	22,97
86	JAGM	M	55	+	30,5	2260,8	79,13	0,00	4,52	90,43	22,26
87	LOL	F	38	+	14	2560,0	38,40	0,00	0,00	2,56	0,00
88	LFF	M	46	+	22	2370,0	23,70	18,96	11,85	146,94	44,10
89	LHO	M	84	+	12	1820,0	45,50	1,82	1,82	76,44	8,56

Nº	Iniciais	Sexo	Idade	Silicose	Tempo	Linfócitos/ mm³	CD4+CD25+ FoxP3+/mm³	CD3+CD4+ CD152+/mm³	CD3+CD8+ CD152+/mm³	CD3+CD4+ CD279+/mm³	CD3+CD8+ CD279+/mm³
90	LVOG	F	64	+	10	1640,0	50,84	0,00	1,64	157,44	40,08
91	MBP	M	61	+	26	2060,0	111,24	6,18	2,06	24,72	1,70
92	MCZC	F	52	+	16	1430,0	14,30	2,86	4,29	92,95	84,35
93	MLMM	F	55	+	23	3150,0	31,50	6,3	12,6	94,50	334,56
94	MELS	F	67	+	5,5	1850,0	66,60	0,00	0,00	5,55	33,12
95	MIAT	F	58	+	24	1750,0	3,50	7,00	17,50	36,75	1,75
96	MJCM	F	68	+	32,5	4226,2	42,26	4,23	0,00	8,45	3,90
97	MJLC	F	51	+	17	2140,0	21,40	6,42	2,14	55,64	23,29
98	MBC	M	73	+	31	1162,8	126,75	1,16	0,00	122,09	53,65
99	MOD	F	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
100	MFL	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
101	MSS	M	35	+	7,5	2320,0	23,20	13,92	9,28	104,40	200,45
102	MR	M	64	+	16,5	1570,0	26,69	0,00	1,57	11,00	6,40
103	MF	M	51	+	12	1300,0	20,80	3,9	1,3	11,70	5,70
104	MDS	M	66	+	22	2930,2	111,35	0,00	8,79	234,42	50,46
105	OT	M	67	+	21	1840,0	5,52	1,84	1,84	12,88	7,36
106	OBF	M	68	+	21	2330,0	58,25	4,66	2,33	48,93	22,55
107	OAS	M	62	+	24	2300,0	135,70	11,5	20,7	29,90	18,16
108	OBF	M	59	+	21	1747,5	52,43	3,50	1,75	8,74	1,84
109	OVP	M	75	?	12	3660,0	65,88	7,32	0,00	47,58	10,24
110	PF	M	61	+	24,5	1261,4	61,81	1,26	1,26	6,31	21,13
111	PR	M	66	+	10,5	950,0	45,60	0,95	4,75	25,65	23,10
112	PSNS	M	47	+	16	4130,0	102,37	12,39	4,13	24,78	10,20
113	PSN	M	69	+	14	3200,0	123,20	0,00	16,00	32,00	14,04
114	RGR	F	47	+	13	2222,2	48,89	2,22	2,22	20,00	33,28
115	SM	M	62	+	11	2270,0	52,21	0,00	2,27	43,13	6,45
116	SCO	M	66	+	24	3060,0	85,68	0,00	0,00	110,16	37,03
117	SE	M	67	+	14	2850,0	74,10	2,85	0,00	31,35	10,68
118	SPS	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
119	SG	M	82	+	15	2300,0	85,10	2,3	2,3	9,20	1,38
120	SM	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
121	SRPN	M	58	+	18,5	1050,0	15,75	0,00	2,1	1,05	4,46
122	SS	M	49	+	26	2410,0	24,10	2,41	0,00	4,82	2,52

Nº	Iniciais	Sexo	Idade	Silicose	Tempo	Linfócitos/ mm³	CD4+CD25+ FoxP3+/mm³	CD3+CD4+ CD152+/mm³	CD3+CD8+ CD152+/mm³	CD3+CD4+ CD279+/mm³	CD3+CD8+ CD279+/mm³
123	SAL	F	58	+	---	1950,0	7,80	9,75	19,50	93,60	11,70
124	STGR	F	54	+	32	3540,0	28,32	0,00	3,54	24,78	7,08
125	TIB	F	29	+	10	1870,0	1,87	0,00	0,00	16,83	5,61
126	TFC	M	81	+	32	2460,0	24,60	7,38	7,38	24,60	22,08
127	VD	M	59	+	32,5	1370,0	13,70	0,00	4,11	16,44	31,86
128	WF	M	73	+	35	2110,0	21,10	0,00	2,11	46,42	22,44
129	WSS	M	31	+	4	1980,0	3,96	5,94	3,96	15,84	1,98
130	WAZ	M	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

Apêndice VII

Apresenta os números absolutos de linfócitos no sangue periférico, de células T regulatórias (CD4+CD25+FoxP3+) e de células T supressoras CD4+ e CD8+ expressando os marcadores PD-1(CD279) e CTLA-4 (CD152), assim como a idade e sexo dos indivíduos controle.

QUADRO GERAL DOS RESULTADOS –INDIVÍDUOS CONTROLE

Nº	Iniciais	Sexo	Idade	Linfócitos /mm ³	CD4+CD25+ FoxP3+/mm ³	CD3+CD4+ CD152+/mm ³	CD3+CD8+ CD152+/mm ³	CD3+CD4+ CD279+/mm ³	CD3+CD8+ CD279+/mm ³
1	LEAR	F	52	2624,0	23,62	10,50	13,12	359,49	230,91
2	VMFC	F	62	2630,0	21,04	2,63	15,78	144,65	71,01
3	EAR	F	59	2550,0	12,75	2,55	0,00	328,95	214,20
4	APR	M	76	3085,0	70,95	21,60	0,00	546,05	339,35
5	MLAG	F	62	2750,0	19,25	11,00	8,25	365,75	313,50
6	JE	M	68	1640,0	11,48	8,20	13,12	96,76	111,52
7	GZ	M	67	2590,0	36,26	0,00	2,59	246,05	230,51
8	NMAE	F	67	1602,0	22,43	12,82	6,41	217,87	203,45
9	MHAZ	F	61	2516,0	30,19	32,71	30,19	163,54	110,70
10	MHDS	F	52	2516,0	17,61	0,00	2,52	5,03	75,48
11	LCS	M	54	2581,0	12,91	0,00	0,00	18,07	116,15
12	MILA	F	52	2929,0	14,65	0,00	2,93	73,23	79,08
13	CA	M	53	2553,0	12,77	10,21	2,55	79,14	89,36
14	AZ	F	56	3740,0	22,44	14,96	3,74	123,42	89,76
15	AR	M	51	2320,0	20,88	16,24	4,64	34,80	116,00
16	SSS	F	55	2835,0	22,68	8,51	8,51	39,69	121,91
17	DAF	M	59	2196,0	15,37	6,59	2,20	8,78	72,47
18	AOS	F	54	2697,0	8,09	5,39	0,00	37,76	140,24
19	LMFA	F	56	2627,0	10,51	15,76	0,00	15,76	105,08
20	VBN	F	54	2419,0	21,77	24,19	2,42	19,35	106,44
21	JPA	M	78	2304,0	6,91	25,34	13,82	23,04	138,24
22	ATA	F	36	2673,0	16,04	5,35	2,67	18,71	133,65

Nº	Iniciais	Sexo	Idade	Linfócitos /mm ³	CD4+CD25+ FoxP3+/mm ³	CD3+CD4+ CD152+/mm ³	CD3+CD8+ CD152+/mm ³	CD3+CD4+ CD279+/mm ³	CD3+CD8+ CD279+/mm ³
23	MMO	F	44	2412,0	14,47	12,06	7,24	28,94	72,36
24	ECMS	F	34	2106,0	6,32	6,318	2,11	18,95	105,30
25	VCFS	F	51	2450,0	31,85	0,00	0,00	335,65	215,60
26	DMCD	F	46	3290,0	49,35	3,29	0,00	180,95	88,83
27	NNS	F	51	2225,0	42,28	2,23	2,23	287,03	186,90
28	RMP	M	55	2920,0	43,80	0,00	0,00	516,84	321,20
29	AS	M	40	2200,0	11,00	0,00	0,00	292,60	250,80
30	MISL	F	46	3060,0	91,80	0,00	0,00	180,54	208,08
31	PJ	F	43	2690,0	32,28	0,00	0,00	255,55	239,41
32	SCO	F	50	750,0	12,00	0,00	0,75	102,00	95,25
33	SQS	M	44	2730,0	32,76	0,00	0,00	177,45	120,12

Apêndice VIII

Apresenta os genótipos dos indivíduos expostos.

Nº	INICIAIS	CTLA-4+49	CTLA-4-318	PD-1.3	PD-1.5
002	A I	AG	CC	GG	CT
005	A C V	AA	CT	GG	CT
006	A R S	AA	CC	GA	CC
007	A A B	GG	CC	GG	CC
008	A A C	AA	CC	GG	CC
010	A M P	AG	CC	GG	CT
012	A A M	GG	CC	GG	TT
014	A B A	AA	CT	GG	TT
015	A B S	AG	CT	GG	TT
016	A C G	AA	CC	GA	CC
018	A I S	AA	CC	GG	CT
019	A J S	AG	CC	GG	CC
021	A P S	AA	CC	GG	CT
022	A L S	AG	CT	GG	CC
024	A P	AA	CC	GG	CT
025	B C P	AG	CC	GG	CC
028	B P T	AG	CC	GG	CT
029	B P M	GG	CC	GG	CT
041	D T S	AA	CC	GG	TT
042	D D S	AA	CC	GG	CT
043	D C I	AA	CC	GG	CC
044	D S P	AG	CC	GG	CT
045	D A S	AA	CC	GG	CT
046	D L G S	AG	CC	GG	CC
048	E C V	AG	CC	GG	CT
050	E F C	AG	CC	GG	CT
052	F C C	AG	CT	GG	CT
055	G P S	AA	CC	GG	CT
056	H M S	AA	CC	GG	TT
060	H F A	AA	CC	GG	TT
061	I F D S	GG	CC	GG	CC
063	I M N	AA	CC	GG	CT
066	J F C S	AG	CC	GG	CT
067	J J S	AA	CC	GG	CC
069	J R A	AG	CC	GG	TT
070	J G O	AA	CC	GG	CT
074	J C B A	AA	CT	GG	CC
076	J P	AG	CC	GG	TT
078	J F S	AG	CC	GG	CC
079	J F O	AG	CC	GG	CT
080	J I	GG	CC	GG	CT
085	J V S	AA	CC	GG	CC
086	J A G M	AA	CC	GG	TT
089	L H O	GG	CC	GG	CT

090	L V O C	AG	CC	GA	CC
091	M B P	AG	CC	GA	CC
093	M L M M	AA	CT	GG	CT
096	M J C M	AA	CC	GA	CT
097	M J L C	AA	CC	GG	CC
098	M B C	AG	CC	GA	CT
102	M R	GG	CC	GG	CC
103	M F	AG	CC	GG	CC
104	M D S	AA	CC	GG	CC
105	O T	AG	CC	GG	CT
106	O B F	AA	CC	GG	CT
107	O A S	AA	CC	GG	CC
108	O B F	AG	CC	GG	TT
109	O V P	AA	CC	GG	CC
110	P F	AG	CC	GG	CC
112	P S N S	AA	CC	GG	CC
113	P S N	AG	CC	GG	CT
114	R C R	AA	CC	GG	CC
115	S M	AG	CC	GG	CT
116	S C O	GG	CC	GG	TT
119	S G	AA	CC	GG	CC
121	S R P N	AG	CC	GG	TT
125	T I B	GG	CC	GG	CT
126	T F C	AG	CC	GG	CT
127	V D	AA	CC	GG	CT
128	W F	AG	CC	GG	CT

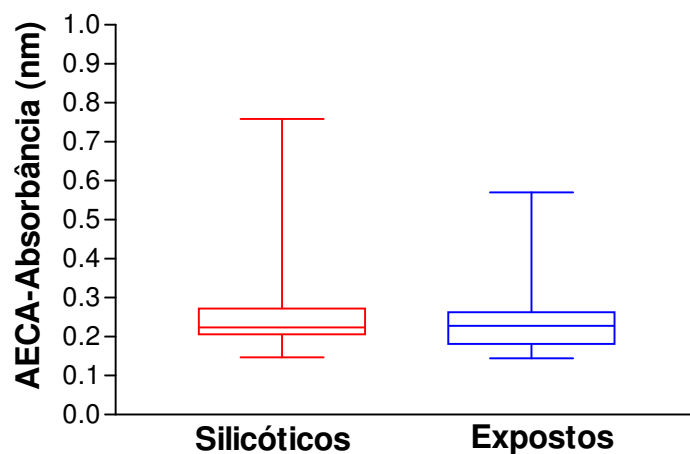
Apêndice IX

Apresenta os genótipos dos indivíduos controle.

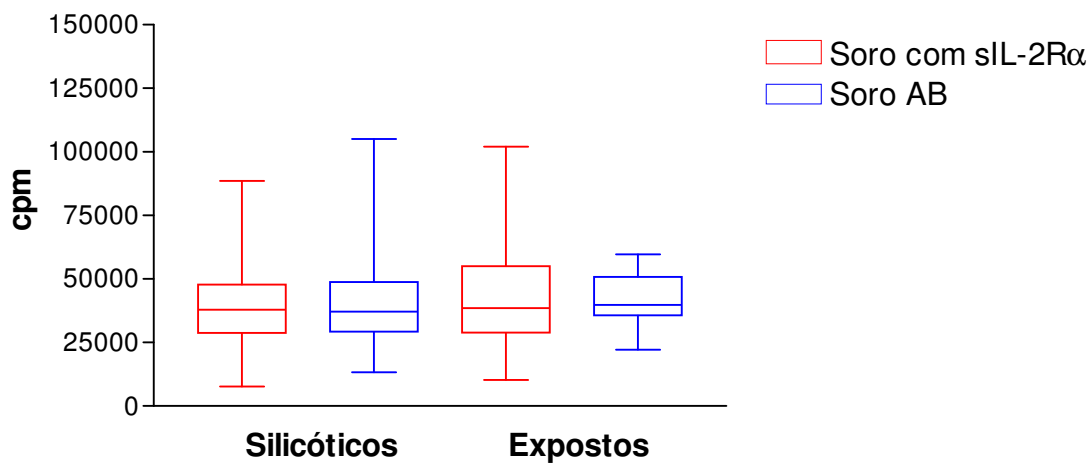
Nº	INICIAIS	CTLA-4+49	CTLA-4-318	PD-1.3	PD-1.5
001	LEAR	GG	CC	GG	CT
002	VMFC	AA	CT	GG	TT
003	EAR	AA	CC	GG	CT
004	APR	AA	CC	GG	TT
005	MLAG	AG	CC	GG	CC
006	JE	AG	CC	GG	TT
007	GZ	AG	CC	GG	CT
008	NMAE	AG	CC	GG	CT
009	MHAZ	AG	CC	GA	CC
010	MHDS	AG	CC	GA	CC
011	LCS	AA	CC	GG	CT
012	MILA	AG	CC	GA	CC
013	CA	AA	CC	GG	CC
014	AZ	AG	CC	GA	CT
015	AR	AA	CC	GG	CT
016	SSS	AA	CC	GG	CT
017	DAF	AG	CC	GG	CC
018	AOS	AG	CC	GG	CC
019	LMFA	AG	CC	GG	TT
022	ATA	AA	CC	GA	CC
023	MMO	AA	CC	GG	CC
024	ECMS	AG	CC	GG	CC
025	VCFS	AG	CC	GG	CT
026	DMCD	AA	CT	GG	CC
027	NNS	AA	CT	GG	TT
028	RMP	GG	CC	AA	CC
029	AS	AG	CC	GG	CT
030	MISL	GG	CC	GG	CC
032	SCO	AG	CC	GG	CT
033	SQS	AA	CC	GA	CC

Apêndice X

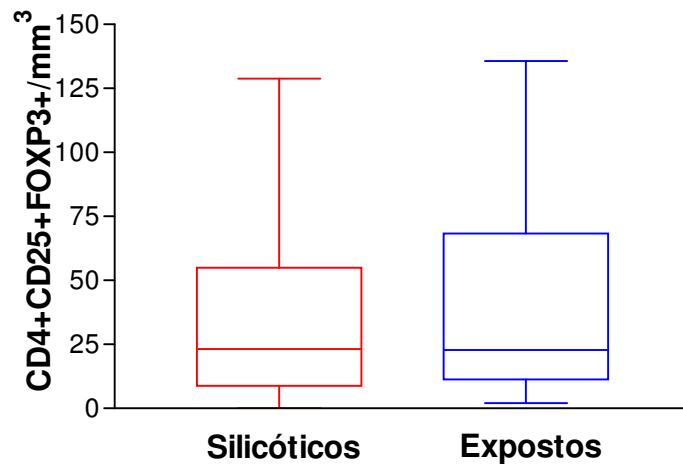
**Apresenta os gráficos para os
parâmetros avaliados neste estudo comparando
indivíduos silicóticos e expostos sem silicose.**



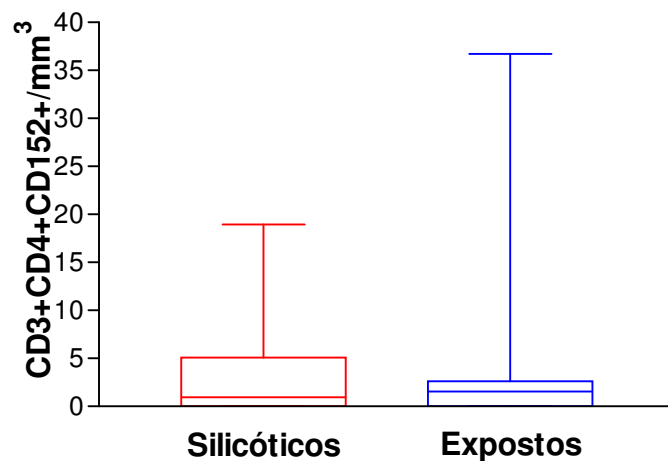
Anticorpos anti-células endoteliais (AECAs) presentes no soro dos indivíduos silicóticos e expostos à sílica. Ensaio realizado em triplicata. Os valores representados para cada paciente representam a mediana das absorvâncias de 3 experimentos independentes em soro de indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44). $P>0,05$



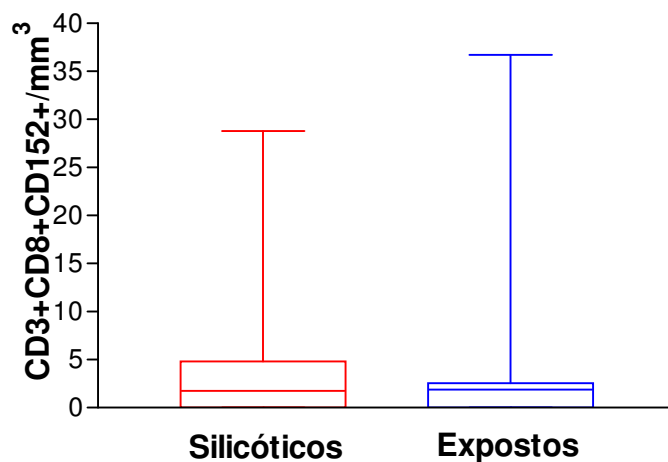
Resposta proliferativa frente à PHA de linfócitos provenientes de indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44) incubados com soro com níveis elevados de sIL-2Rα ou soro homólogo do tipo AB. Os resultados estão representados como a mediana e os valores individuais de proliferação. Ensaio realizado em triplicata. PHA= fitohemaglutinina. $P > 0,05$.



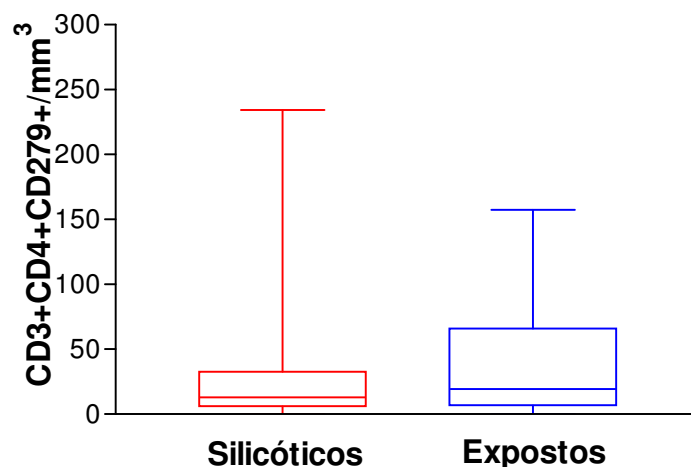
Células CD4+CD25+FOXP3+ presentes no sangue periférico de indivíduos silicóticos e expostos à sílica. Os resultados representam a mediana e os valores individuais do número de linfócitos T regulatórios CD4+CD25+FOXP3+/mm³ provenientes de indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44). $P>0,05$.



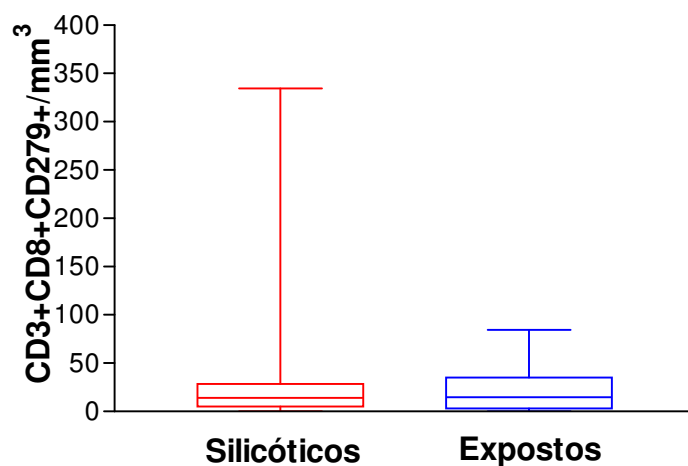
Células CD3+CD4+CD152+ presentes no sangue periférico de indivíduos silicóticos e expostos à sílica. Os resultados representam a mediana e os valores individuais do número de linfócitos T CD3+CD4+CD152+/mm³ provenientes de indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44). $P>0,05$.



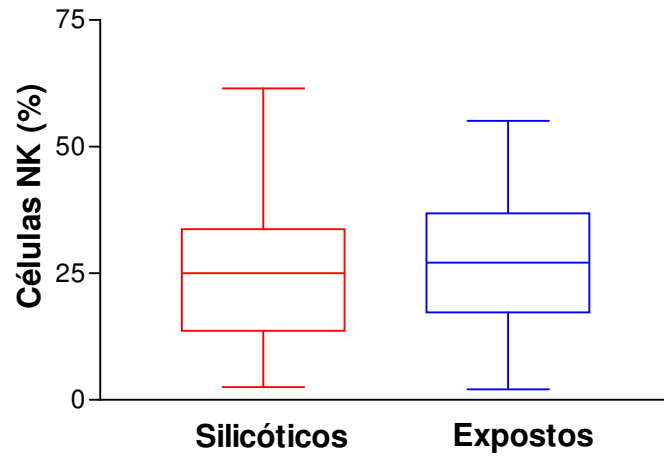
Células CD3+CD8+CD152+ presentes no sangue periférico de indivíduos silicóticos e expostos à sílica. Os resultados representam a mediana e os valores individuais do número de linfócitos T CD3+CD8+CD152+/mm³ provenientes de indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44). $P>0,05$.



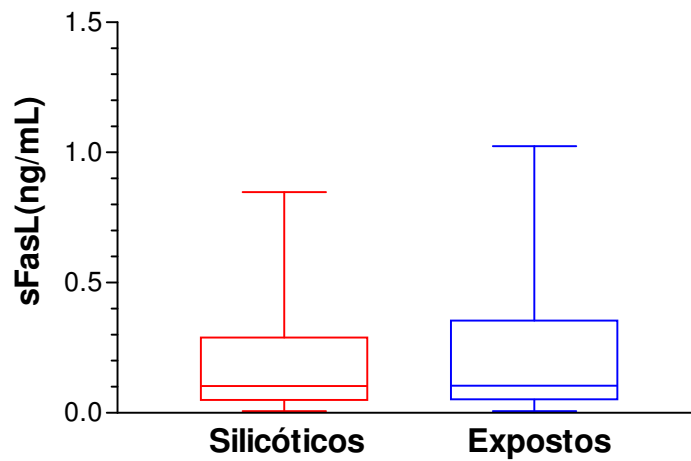
Células CD3+CD4+CD279+ presentes no sangue periférico de indivíduos silicóticos e expostos à sílica. Os resultados representam a mediana e os valores individuais do número de linfócitos T CD3+CD4+CD279+/mm³ provenientes de indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44). $P>0,05$.



Células CD3+CD8+CD279+ presentes no sangue periférico de indivíduos silicóticos e expostos à sílica. Os resultados representam a mediana e os valores individuais do número de linfócitos T CD3+CD8+CD279+/mm³ provenientes de indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44). $P>0,05$.

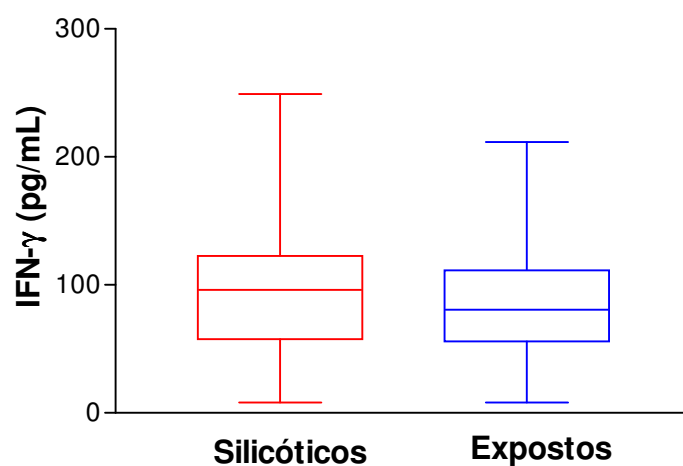


Células NK (CD3-CD16+CD56+) presentes no sangue periférico de indivíduos silicóticos e expostos à sílica. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da porcentagem de células NK CD3-CD16+CD56+ provenientes de indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44). $P>0,05$.

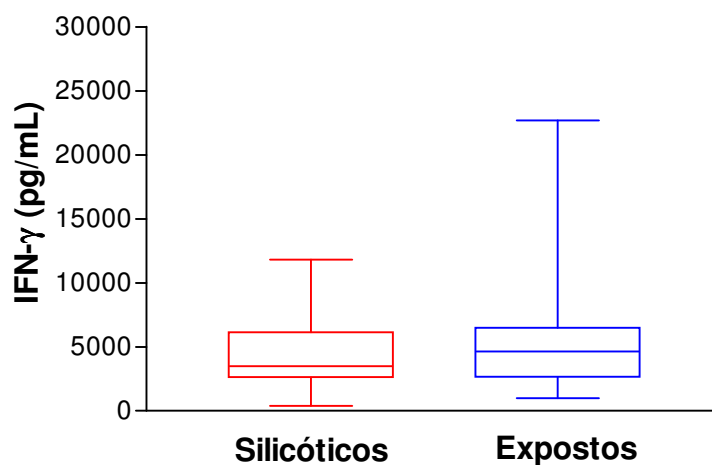


Níveis de Fas ligante solúvel (sFasL) no soro de indivíduos silicóticos e expostos à sílica. Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da concentração sérica em indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44). $P > 0,05$.

A)

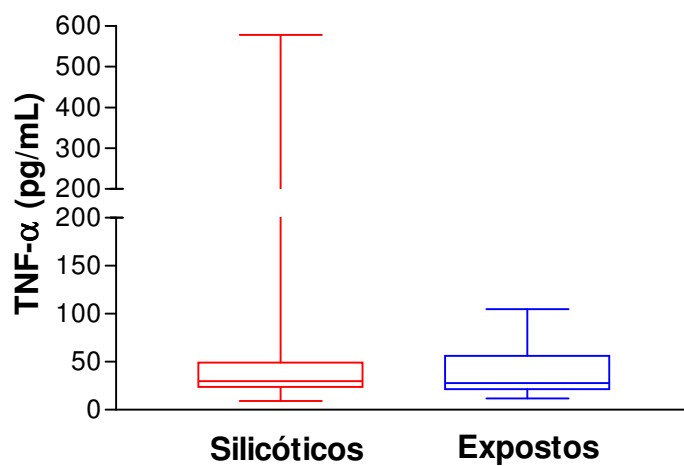


B)

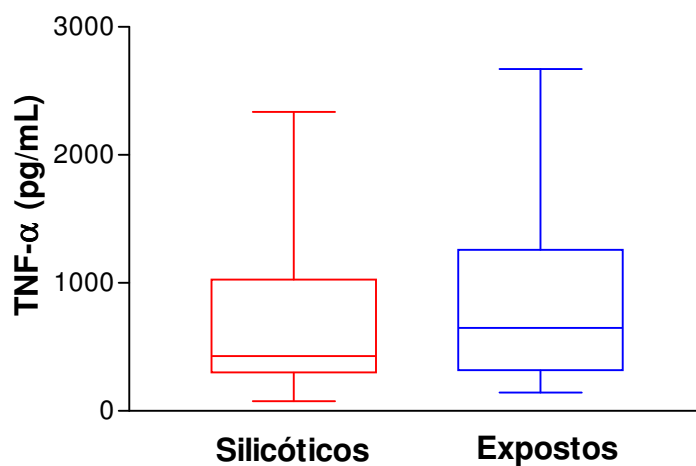


Níveis de IFN- γ no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos silicóticos e expostos à sílica e controles na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA). Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e a amplitude interquartílica da concentração da referida citocina em indivíduos expostos à sílica (n=103) e controles (n=44). PHA= fitohemaglutinina. $P>0,05$.

A)

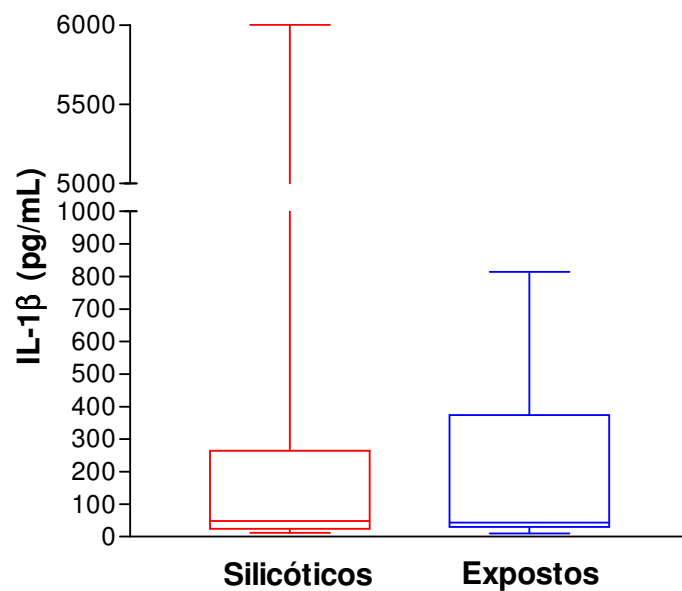


B)

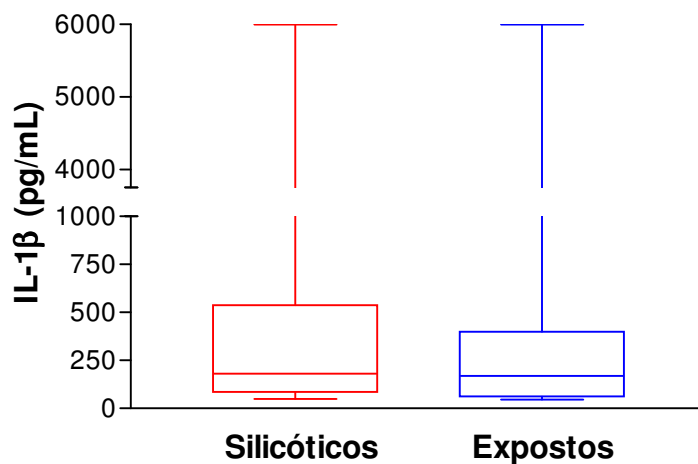


Níveis de TNF- α no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos silicóticos e expostos à sílica na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA). Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da concentração da referida citocina em indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44). PHA= fitohemaglutinina. $P>0,05$.

A)

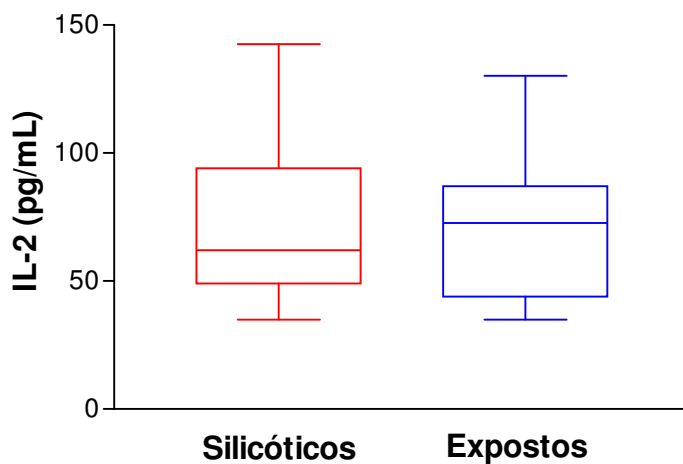


B)

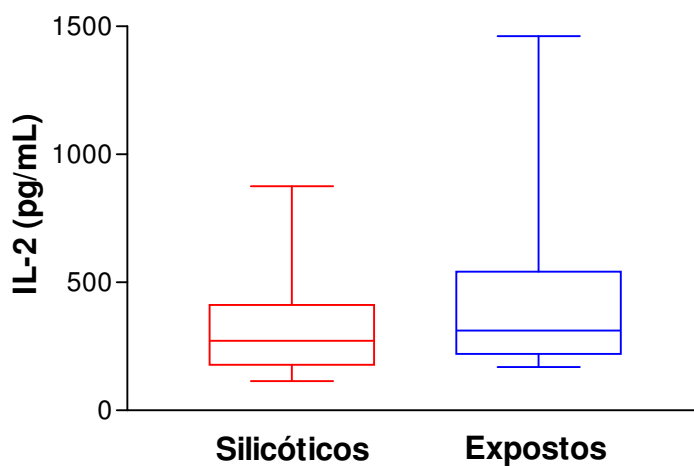


Níveis de IL1- β no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos silicóticos e expostos à sílica na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA). Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da concentração da referida citocina em indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44). PHA= fitohemaglutinina. $P>0,05$.

A)

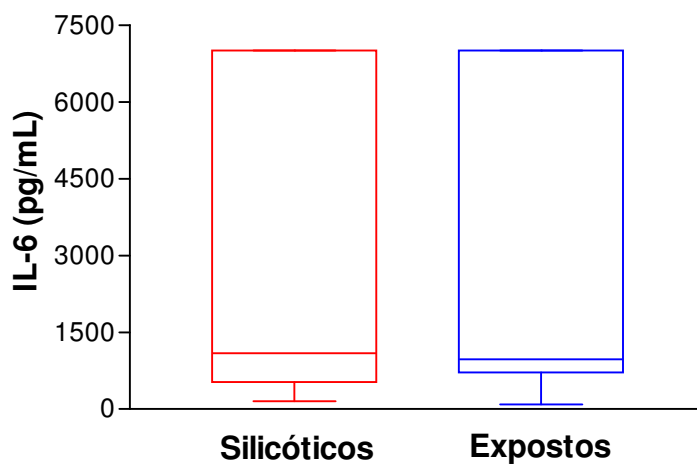


B)

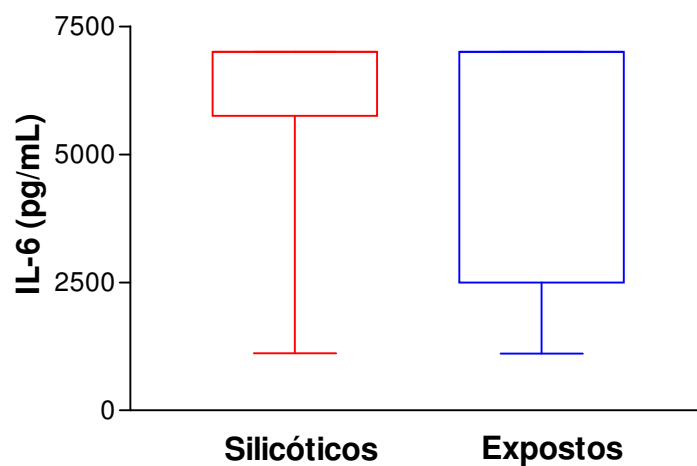


Níveis de IL-2 no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos silicóticos e expostos à sílica na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA). Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da concentração da referida citocina em indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44). PHA= fitohemaglutinina. $P>0,05$.

A)

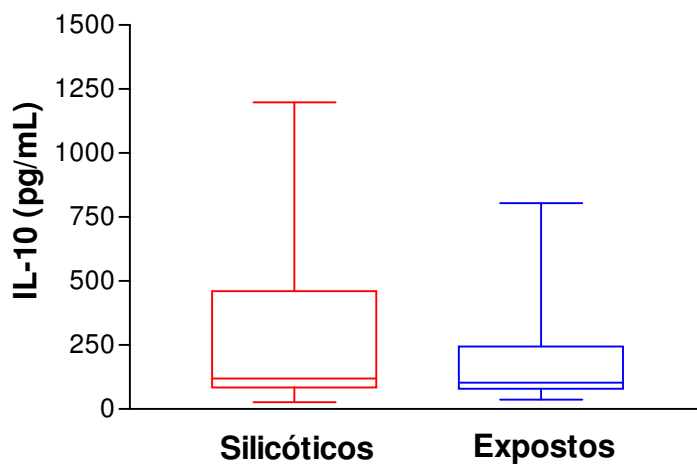


B)

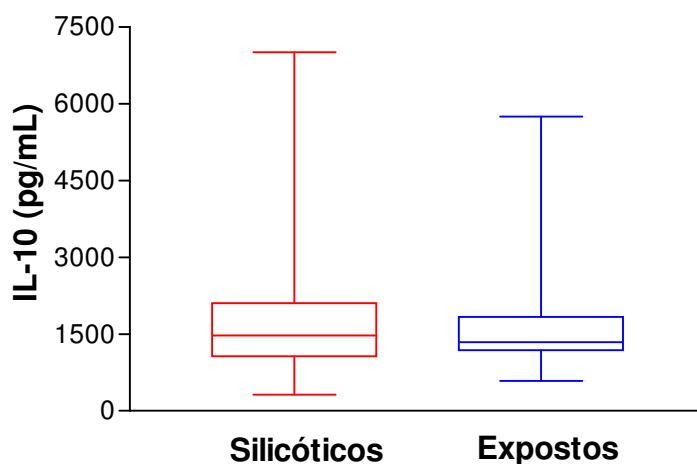


Níveis de IL-6 no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos silicóticos e expostos à sílica na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA). Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da concentração da referida citocina em indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44). PHA= fitohemaglutinina. $P>0,05$.

A)

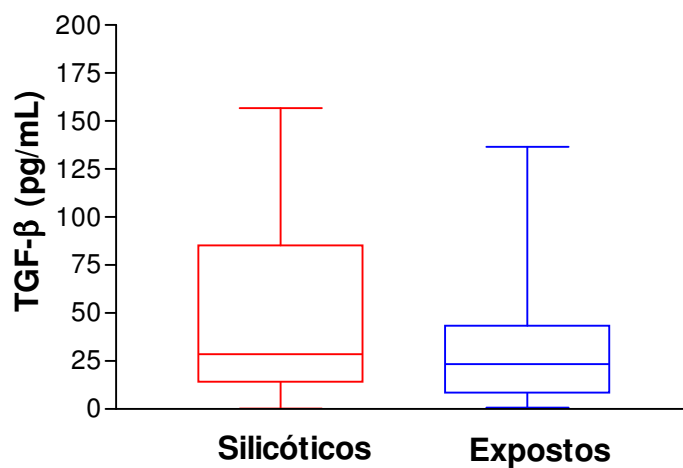


B)

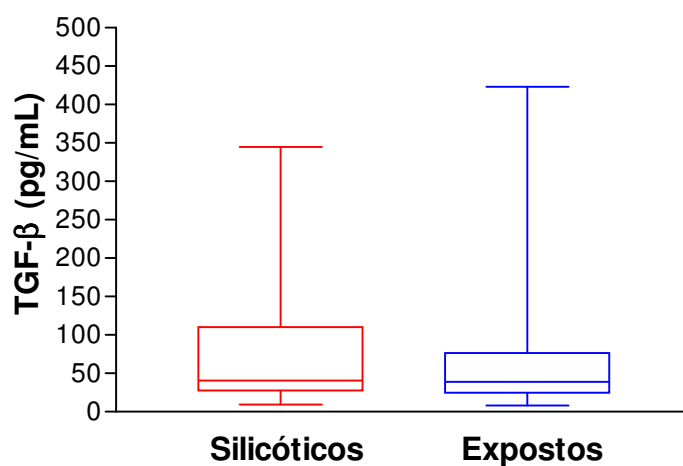


Níveis de IL-10 no sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes do sangue periférico de indivíduos silicóticos e expostos à sílica na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA). Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da concentração da referida citocina em indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44). PHA= fitohemaglutinina. $P>0,05$.

A)



B)



Níveis de TGF- β no sobrenadante de cultura de linfócitos provenientes do sangue periférico de indivíduos silicóticos e expostos à sílica na ausência (A) e na presença (B) de estímulo (PHA). Ensaio realizado em triplicata. Os resultados representam a mediana e os valores individuais da concentração da referida citocina em indivíduos silicóticos (n=59) e expostos à sílica (n=44). PHA= fitohemaglutinina. $P>0,05$.