Victor Yuji Yariwake

**Avaliação dos efeitos da exposição à poluição atmosférica sobre o
desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico em camundongos
NZBWF1**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Dra. Mariana Matera Veras

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2020

Victor Yuji Yariwake

**Avaliação dos efeitos da exposição à poluição atmosférica sobre o
desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico em camundongos
NZBWF1**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Dra. Mariana Matera Veras

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2020**

Ficha catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Yariwake, Victor Yuji

Avaliação dos efeitos da exposição à poluição
atmosférica sobre o desenvolvimento de lúpus
eritematoso sistêmico em camundongos NZBWF1 /
Victor Yuji Yariwake. -- São Paulo, 2020.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Mariana Matera Veras.

Descritores: 1. Poluição do ar 2. Lúpus eritematoso
sistêmico 3. Material particulado 4. Nefrite lúpica
5. Autoimunidade 6. Exposição ambiental

USP/FM/DBD-258/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

A todos que foram diagnosticados com LES, como também aos profissionais de saúde e aos parentes que se empenham em cuidar e confortar os acometidos por essa doença.

Agradecimentos

À Dra. Mariana Matera Veras (Mari) pela orientação, pela confiança, pela atenção e por me fazer crescer muito, muito mesmo, tanto profissionalmente quanto pessoalmente durante esses mais de 4 anos de convivência. Obrigado por proporcionar oportunidades, bolsas, desafios e experiências, me fazendo sair da zona de conforto ao assumir responsabilidades cada vez maiores e ao ajudar com as colaborações do laboratório. Obrigado também pelo congresso do Havaí, a experiência mais desafiadora que você proporcionou para mim. Realmente aprendi e continuo aprendendo muito ao seu lado.

À Dra. Sylvia Farhat pela concepção da ideia inicial desse trabalho; por me apresentar à Mari e à linha de pesquisa em poluição atmosférica, pela qual acabei gostando e me interessando bastante; pela orientação e preocupação com o andamento do projeto e por me dar a oportunidade especial de trabalhar com LES.

Ao Prof. Niels Câmara pela continuidade do apoio, do incentivo, da cobrança, do reconhecimento e da orientação desde o começo da Iniciação Científica até agora, no final do Mestrado. Obrigado por deixar as portas do Instituto de Ciências Biomédicas abertas, e por continuar abrindo portas e oportunidades.

Ao Prof. Paulo Saldiva, pela contribuição com o conhecimento que temos hoje em relação aos efeitos da poluição atmosférica na saúde e por ser uma das principais referências na área.

A todos os colegas e ex-colegas do laboratório pelos ensinamentos, amizade, companhia e risadas no laboratório, congressos e bandejões. Com agradecimento especial à Marlise Domenico e à Janaína Torres, que me ensinaram muitas coisas, principalmente no início, à Daiana Lima pelas aventuras nos congressos e à Sarah Benevenuto pelos conselhos e reflexões. Obrigado Iran Neves, Giovanna Costanzo, Paulo Zantut, Prof. Luiz Pereira, Laís Fajersztajn, Nathália Villa, Ana Takano, Dunia Waked, Thamires Moraes, Kellana Santos, Jainara Gonçalves, Gabriel Pereira e demais colegas por todos os momentos de cafés, conversas, desabafos e, claro, de discussões científicas também.

Aos funcionários do laboratório pelo acolhimento e pelo auxílio. Com carinho especial à Zilá Pieroni, Eunilda Cavalcanti, Eliane Tigre, Ana Lichtenfels, Reginaldo Nascimento e Davi Ferreira, sempre muito atenciosos e prestativos.

Aos colegas da pós-graduação e aos grupos dos projetos de colaboração que propiciaram aprendizados novos e bons momentos. Obrigado Carolina Ogawa, Isabela Firigato, Felipe Souza, Letícia Tamashiro, Carla Carletti, Roberta Foster, Bruna Azevedo, Lucas Umesaki, Clara Campolim e demais alunos.

Às professoras do PAE e de monitoria, Prof^a. Fernanda Ortis e Prof^a. Elia Caldini, pelas oportunidades de vivenciar mais de perto a experiência da docência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Experimental, Gisele Souza, Igor Tolgyesi e Prof^a. Elia Caldini pelo suporte administrativo e burocrático necessários ao desenvolvimento da pesquisa.

Ao pessoal da administração, da manutenção e da limpeza da FMUSP e da FFM pelo apoio institucional, pelo suporte na importação de animais NZBWF1 e demais insumos para a pesquisa, pelo auxílio com os reparos do CPA, por manter um ambiente agradável e por resolver eventuais problemas técnicos e burocráticos.

Ao Prof. Luiz Rizzo do Instituto Albert Einstein pela doação de parte dos animais NZBWF1 e à Prof^a. Patricia Prada da UNICAMP pela doação das fêmeas C57BL/6 utilizadas no estudo.

Aos professores, pesquisadores, funcionários e técnicos da FMUSP pelas colaborações: à Regiani Carvalho e à Nathalia Villa do LIM 05 pelo auxílio na utilização do EDX para caracterização de MP_{2,5}; à Caroline Faria do LIM 03 pela ajuda com os hemogramas; à Thais Lima e ao Prof. Francisco Soriano do LIM 51 pelas análises de citometria de fluxo; à Margarete Vendramini e à Cleonice Bueno do LIM17 pelo auxílio com as análises de dosagem do anti-DNA; à Ivone Braga e à Camila Fanelli dos LIM16 e LIM29 pelas dicas e auxílios com os mistérios da técnica de imunohistoquímica.

Aos membros do Laboratório de Imunologia dos Transplantes do ICB, com carinho especial à Aline Ignacio, à Meire Hiyane e à Fernanda Terra pelas dicas e instruções na análise de expressão gênica, e por sempre me acolherem tão bem desde a IC.

Aos membros do Laboratório de Imunologia Celular da UNIFESP, em especial à Amandda Santos e ao Marcos Cenedeze pelo auxílio nas análises de urina.

À equipe da Prof. Katia Angelis, em especial à Sarah Freitas e à Marina Rascio pela ajuda nas análises de estresse oxidativo.

À equipe de Reumatologia do Instituto da Criança, em especial ao Dr. Clóvis Almeida, à Dra. Sylvia Farhat e à Dra. Adriana Sallum pelos incentivos e pelas sugestões.

À banca de qualificação (Dra. Cristiane Bittencourt, Dra. Adriana Sallum e Prof^a. Elia Caldini) e à banca de defesa (Prof^a Karina Marques, Prof. Mauro Vaisberg e Prof. Durvanei Maria) pelas contribuições e críticas construtivas que possibilitaram um direcionamento mais assertivo para a conclusão do trabalho.

À CAPES e à FAPESP (processo 2018/05187-5) pelo fomento da pesquisa e pelo apoio durante a realização da viagem para o 15º Congresso Internacional de Toxicologia em Honolulu.

A todos os camundongos utilizados no estudo, que proporcionaram achados interessantes e relevantes para essa pesquisa.

À Deus por estar sempre me protegendo, me acompanhando, me guiando, me trazendo desafios cada vez mais difíceis para o meu crescimento na jornada da vida e por me cercar de tantas pessoas boas e construtivas.

A meus pais, Paulo Masao e Marina Akemi por tudo o que vocês fizeram e construíram para que eu pudesse chegar até esse momento de defesa do mestrado. Sem a participação de vocês, tudo seria menos possível. Obrigado por serem pessoas tão incondicionalmente boas e preocupadas comigo.

A meus irmãos, Erika Miyuki e Caio Kenji, pelo companheirismo, pela união e por serem meus exemplos de determinação, que me inspiram a correr atrás das coisas sem desistir.

A toda a minha família, incluindo Cacau, ojiichans, obaachans e parentes pelo apoio e pela força, o que permitiu passarmos pelas dificuldades recentes da pandemia com menos sofrimentos e tristezas.

A todos os meus amigos de infância, de adolescência, da faculdade, do Tamashii Taiko e da Seicho-No-Ie, que sempre me incentivam, me divertem e me fazem crescer.

À Kaori Nakayama, minha companheira, por ser meu exemplo de perseverança e de resiliência, por conseguir me confortar apenas com um sorriso e por estar sempre do meu lado, sendo minha fonte de inspiração, admiração e amor.

Normalização

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de siglas	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Poluição atmosférica.....	2
1.2. Lúpus eritematoso sistêmico (LES).....	7
1.3. Poluição atmosférica ambiental e LES.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. MÉTODOS.....	16
3.1. Animais e grupos experimentais.....	16
3.2. Exposição ao MP _{2,5}	16
3.3. Amostragem e caracterização do MP _{2,5}	18
3.4. Delineamento experimental.....	19
3.5. Análise de urina.....	20
3.6. Eutanásia.....	22
3.7. Hemograma.....	23
3.8. Detecção de anti-DNA.....	23
3.9. Análises histológicas.....	23
3.10. Análise imunohistoquímica.....	27
3.11. Análise de expressão gênica.....	28
3.12. Análise de estresse oxidativo.....	29
3.13. Análise estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Caracterização do MP _{2,5}	32
4.2. Sobrevida.....	32
4.3. Peso corporal.....	33
4.4. Peso dos órgãos.....	34

4.4.1. Peso do rim.....	34
4.4.2. Peso do baço.....	35
4.4.3. Peso do fígado.....	35
4.4.4. Peso do coração.....	35
4.4.5. Peso do timo.....	36
4.5. Hemograma.....	36
4.5.1. Eritrograma (série vermelha).....	36
4.5.2. Plaquetas.....	37
4.5.3. Leucograma (série branca).....	37
4.6. Detecção de anti-DNA.....	38
4.7. Análise de urina.....	39
4.7.1. Proteinúria.....	39
4.7.2. Albuminúria.....	40
4.8. Estereologia dos rins (método de Cavalieri).....	41
4.8.1. Volume fracionário dos compartimentos (%).....	41
4.8.2. Volume absoluto dos compartimentos (mm ³).....	41
4.9. Análise histopatológica dos rins.....	42
4.9.1. Análise histopatológica dos túbulos.....	43
4.9.2. Análise histopatológica dos glomérulos.....	43
4.10. Análise de deposição de colágeno.....	44
4.11. Análise imunohistoquímica.....	45
4.12. Análise de expressão gênica.....	47
4.13. Análise de estresse oxidativo.....	48
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES.....	67
7. ANEXOS.....	68
8. REFERÊNCIAS.....	69
Apêndice.....	82

Lista de figuras

Figura 1: Composição do material particulado fino (MP _{2,5}).....	4
Figura 2: Critérios de 2019 da EULAR/ACR para diagnóstico de LES.....	9
Figura 3: Deposição de imunocomplexos nos glomérulos.....	11
Figura 4: Concentrador de partículas ambientais (CPA).....	17
Figura 5: Análise da composição de MP _{2,5}	19
Figura 6: Delineamento experimental do estudo.....	20
Figura 7: Método de Cavalieri.....	24
Figura 8: Análise histopatológica dos glomérulos.....	26
Figura 9: Curva de sobrevivência durante o período de exposições.....	33
Figura 10: Peso corporal (g) dos camundongos durante o período de exposições..	34
Figura 11: Detecção de anticorpos anti-DNA.....	39
Figura 12: Relação proteinúria/creatininúria (RPC) nos 4 meses de exposição.....	40
Figura 13: Relação albuminúria/creatininúria (RAC).....	40
Figura 14: Volume fracionário dos compartimentos renais (%).....	41
Figura 15: Volume absoluto dos compartimentos renais (mm ³).....	42
Figura 16: Análise histopatológica dos rins (escores totais).....	42
Figura 17: Volume médio dos glomérulos (μm ³).....	44
Figura 18: Análise por picrossírius-hematoxilina.....	45
Figura 19: Análise imunohistoquímica de C3 nos rins.....	46
Figura 20: Análise imunohistoquímica de IgG nos rins.....	46
Figura 21: Análise imunohistoquímica de macrófagos nos rins.....	47
Figura 22: Análise de expressão gênica por qRT-PCR (método 2 ^{-ΔΔCT}).....	48
Figura 23: Análise de estresse oxidativo.....	49

Lista de tabelas

Tabela 1: Sequências de primers utilizados no qRT-PCR.....	29
Tabela 2: Composição elementar do MP _{2,5} coletado.....	32
Tabela 3: Peso dos órgãos – peso absoluto (g) e peso relativo (%).....	36
Tabela 4: Análise do hemograma total.....	38
Tabela 5: Análise histopatológica dos túbulos renais.....	43
Tabela 6: Análise histopatológica dos glomérulos renais.....	44

Lista de siglas

ACR: *American College of Rheumatology*

ANA: anticorpos anti-nucleares

ANOVA: análise de variância

BFG: barreira de filtração glomerular

BSA: albumina de soro bovino

CAP: partículas ambientais concentradas (*concentrated ambient particles*)

cDNA: DNA complementar

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CEUA-FMUSP: Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

CPA: concentrador de partículas ambientais

CT: ciclo de reação

DAB: 3,3'-diaminobenzidina

EDX: espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva

ERO: espécies reativas de oxigênio

EULAR: *European League Against Rheumatism*

FA: ar filtrado (*filtered air*)

FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FRAP: *Ferric Reducing Anti-oxidant Power*

HCM: hemoglobina corpuscular média

HE: hematoxilina-eosina

HEPA: *High Efficiency Particulate Arrestance*

HPRT: Hipoxantina guanina fosforiboxiltransferase

IHQ: imunohistoquímica

IL-17: interleucina 17

LES : lúpus eritematoso sistêmico

LESJ: lúpus eritematoso sistêmico juvenil

LFA: *Lupus Foundation of America*

LPAE-LIM05: Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental

MANOVA: análise multivariada

MP: material particulado
MP₁₀: material particulado grosso
MP_{2,5}: material particulado fino
MPUF: material particulado ultrafino
MRL/lpr: *Murphy Roths Large/lymphoproliferation*
mRNA: RNA mensageiro
NZB: *New Zealand Black*
NZW: *New Zealand White*
NZBWF1: *New Zealand Black White F1*
NZM: *New Zealand Mixed*
OMS: Organização Mundial da Saúde
ONU: Organização das Nações Unidas
PAS: ácido periódico – reagente de Schiff
PCR: reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR: PCR quantitativo em tempo real
RAC: relação albuminúria/creatininúria
RMSP: região metropolitana de São Paulo
RPC: relação proteinúria/creatininúria
SAS: Secretaria de Atenção à Saúde
SBR: Sociedade Brasileira de Reumatologia
SLEDAI-2K: *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index – 2000*
SPSS: *Statistical Package for Social Sciences*
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo
VCM: volume corpuscular médio
Va: volume absoluto
Vf: volume fracionário
VT: volume total

Resumo

Yariwake VY. *Avaliação dos efeitos da exposição à poluição atmosférica sobre o desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico em camundongos NZBWF1* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Poluição atmosférica é uma mistura complexa de gases e partículas suspensas na atmosfera que causa impactos negativos sobre a saúde e ao meio ambiente. Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune complexa com manifestações clínicas diversas e etiologia multifatorial, ainda não esclarecida totalmente. Estudos sugerem que a poluição atmosférica pode ser um fator desencadeador do LES, provocando aumento da atividade e da gravidade da doença. No entanto, essa associação não foi investigada a fundo até então. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar se a exposição ao material particulado fino (MP_{2,5}) exerce influência sobre a exacerbação das manifestações do LES (com foco nas complicações renais) em animais espontaneamente predispostos ao desenvolvimento de LES. Para isso, camundongos fêmeas da linhagem NZBWF1 foram submetidas diariamente a uma exposição real (inalação) de 600µg/m³ de MP_{2,5} concentrado, por um período de 4 meses. Durante esse período avaliamos o peso corporal, a proteinúria e a porcentagem de sobrevida destes animais. Finalizadas as exposições os camundongos foram eutanasiados e as seguintes análises realizadas: sorologia (anti-DNA), hemograma (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), peso dos órgãos (rim, timo, baço, fígado e coração), estereologia (volume dos compartimentos renais), histopatologia (dos túbulos e dos glomérulos renais), imunohistoquímica (para C3, IgG e macrófagos nos rins), expressão gênica (de NF-κB e TGF-β no tecido renal) e estresse oxidativo (dosagem de pró-oxidantes (NADPH oxidase e H₂O₂) e anti-oxidantes (FRAP) nos rins). O grupo de fêmeas NZBWF1 expostas ao MP_{2,5} apresentaram menor porcentagem de sobrevida, adiantamento da proteinúria, aumento de neutrófilos circulantes e maior peso dos rins quando comparadas ao grupo de fêmeas NZBWF1 expostas ao ar filtrado. Portanto, esse trabalho sugere que a poluição atmosférica exerce influência sobre algumas das manifestações do LES, no sentido de agravamento da doença em camundongos predispostos ao desenvolvimento de LES. Esses resultados reiteram a necessidade de diminuição dos níveis de poluentes atmosféricos.

Descritores: Poluição do ar; Lúpus eritematoso sistêmico; Material particulado; Nefrite lúpica; Autoimunidade; Exposição ambiental.

Abstract

Yariwake VY. *Evaluation of effects of exposure to air pollution on the development of systemic lupus erythematosus in NZBWF1 mice* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Air pollution is a complex mixture of gases and particles suspended in the atmosphere that impairs negative impacts on health and on environment. Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex autoimmune disease with diverse clinical manifestations and multifactorial etiology that remains not well elucidated. Studies suggest that air pollution can be a triggering factor for SLE, impairing increased disease activity and gravity. However, this association has not been deeply investigated until now. So, the aim of this work was to evaluate whether exposure to fine particulate matter (PM_{2.5}) exerts influence on the exacerbation of SLE manifestations (focusing on kidney impairments) in mice spontaneously prone to SLE development. For this, NZBWF1 female mice were submitted daily to a real exposure (inhalation) of 600µg/m³ of concentrated PM_{2.5} for a period of four months. During this period, body weight, proteinuria and survival rate were assessed. After this period, mice were euthanized and the following analyses were performed: sorology (anti-DNA), hemogram (erythrocytes, leukocytes and platelets), weight of organs (kidneys, thymus, spleen, liver and heart), stereology (volume of kidney compartments), histopathology (of renal tubules and glomeruli), immunohistochemistry (for C3, IgG and macrophages on kidneys), gene expression (of NF-κB and TGF-β on renal tissue) and oxidative stress (dosage of pro-oxidants (NADPH oxidase and H₂O₂) and antioxidants (FRAP) on kidneys). The group of NZBWF1 females exposed to PM_{2.5} presented decreased survival, early onset of proteinuria, increased number of circulating neutrophils and increased kidney weight when compared to the group of NZBWF1 females exposed to filtered air. Therefore, this work suggests that air pollution exerts influence over some SLE manifestations, aggravating the disease in SLE-prone mice. These results reinforce the need of reduction of air pollutants levels.

Descriptors: Air pollution; Lupus erythematosus, systemic; Particulate matter; Lupus nephritis; Autoimmunity; Environmental exposure.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a poluição atmosférica é o maior risco ambiental para a saúde. Os últimos relatórios da OMS mostram que, anualmente, mais de 4 milhões de mortes estão relacionadas com a exposição à poluição atmosférica ambiental, sendo a maioria das mortes causadas por complicações de doenças que afetam os sistemas respiratório e cardiovascular (OMS, 2016; 2018a). Além disso, estudos têm demonstrado que a poluição atmosférica também está associada a uma série de distúrbios neurológicos, endócrinos e reprodutivos, afetando diretamente a qualidade de vida de muitas pessoas ao redor do mundo (Kelly e Fussell, 2015; Thurston et al., 2017). Apesar do conhecimento dessa situação preocupante, poucas medidas são tomadas com a finalidade de diminuir a emissão dos poluentes atmosféricos, em grande parte devido a princípios econômicos, políticos e culturais que são priorizados em relação às questões de saúde pública e meio ambiente (Cutler e Dominici, 2018).

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença crônica de natureza autoimune e de caráter bastante complexo, pois apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas e muita variação entre os indivíduos em relação à intensidade da doença (Oku e Atsumi, 2018). Outra complexidade é a etiologia multifatorial da doença. Fatores genéticos são imprescindíveis para o desenvolvimento do LES, pois a fisiopatologia compreende a produção de autoanticorpos. No entanto, somente a influência de fatores genéticos e a melhoria de diagnóstico não são suficientes para explicar o aumento na incidência de LES. Portanto, fatores ambientais possuem uma contribuição importante na etiologia da doença (Gergianaki et al., 2018; Oku e Atsumi, 2018).

Estudos recentes sugerem que a poluição atmosférica pode ser um fator ambiental importante associado ao LES, atuando como um gatilho para o início das manifestações clínicas ou contribuindo com o agravamento dos sinais, com o aumento da atividade da doença (Zhao et al., 2019a; Gilcrease et al., 2020). Portanto, para entender melhor essa possível associação entre poluição atmosférica e LES surgiu a ideia desse trabalho, um estudo *in vivo* que buscou avaliar se a exposição à poluição atmosférica ambiental exerce influência sobre o curso da

doença em animais predispostos ao desenvolvimento de manifestações características do LES.

1.1. Poluição atmosférica

A poluição atmosférica pode ser definida como uma mistura complexa de gases e partículas suspensas no ar que possuem capacidade de promover consequências negativas sobre a saúde dos seres vivos e sobre a integridade do meio ambiente (Vallero, 2014). Os principais impactos negativos sobre a saúde ocorrem no sistema respiratório e no sistema cardiovascular, provocando complicações como insuficiência respiratória aguda, isquemia cardíaca e acidente vascular cerebral (por aumentos súbitos da concentração de poluentes), assim como doença respiratória obstrutiva crônica e câncer de pulmão (por exposição contínua e prolongada à poluição atmosférica) (OMS, 2016). Já os principais impactos sobre o meio ambiente compreendem a intensificação de fenômenos mais localizados, como as chuvas ácidas (que promovem eutrofização de reservatórios de água e alteração da composição do solo), bem como alterações globais, incluindo destruição da camada de ozônio e aquecimento global (Manisalidis et al., 2020), cujas consequências ameaçam a manutenção de toda a biosfera atual.

Geralmente, a poluição atmosférica é classificada em dois grupos distintos: poluição atmosférica de ambientes internos (*indoor/household air pollution*) e poluição atmosférica ambiental (*outdoor/ambient air pollution*). A poluição *indoor* compreende principalmente gases e partículas gerados dentro de residências devido à queima de lenha e carvão para obtenção de calor e cozimento de alimentos. Por esse motivo, afeta principalmente as comunidades mais carentes do mundo, que ainda dependem desses recursos para sobreviver (OMS, 2018b). De acordo com a OMS, cerca de 3,8 milhões de mortes anuais são atribuídas à poluição *indoor* (OMS, 2020). A poluição *outdoor*, por outro lado, está mais relacionada com a imagem do desenvolvimento econômico urbano, que começa a ganhar força a partir da revolução industrial, com o surgimento de fábricas, usinas de energia e crescimento de cidades, com intensificação do desmatamento e da destruição ambiental. Soma-se a isso a intensa produção e circulação de automóveis, que junto às indústrias são atualmente os grandes responsáveis pela emissão de poluentes no ambiente (OMS, 2018c; Ritchie e Roser, 2019). As consequências da poluição *outdoor*, de acordo

com a OMS, são a perda de 4,2 milhões de vidas por ano em todo o mundo (OMS, 2020).

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), mais da metade da população mundial vive em ambientes urbanos (ONU, 2018). Nessas regiões urbanas, a poluição *outdoor* é a mais relevante e preocupante devido ao fato de que os habitantes estão continuamente expostos aos poluentes. Apesar das diferenças existentes na dose inalada por cada indivíduo (que varia de acordo com o local onde reside, com o tipo de ocupação que realiza, por onde transita e por quanto tempo se desloca), de maneira geral, a poluição atmosférica ambiental afeta todos os habitantes das cidades (OMS, 2018d; Takano et al., 2019). Sabendo disso, muitos centros urbanos possuem redes de monitoramento da qualidade do ar e iniciativas para controle e redução dos níveis de poluentes atmosféricos. Na região metropolitana de São Paulo (RMSP), por exemplo, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) realiza um acompanhamento da concentração dos principais poluentes por meio de diversas estações de monitoramento distribuídas pela RMSP (CETESB, 2020). Além disso, medidas de controle como a implementação de rodízio veicular, uso de catalisadores nos automóveis, fiscalização de fábricas e indústrias para controle da emissão de poluentes e divulgação da problemática da poluição atmosférica em meios de comunicação em massa para conscientização da população são alguns exemplos de iniciativas tomadas com o intuito de melhorar a qualidade do ar na RMSP (de Fatima Andrade et al., 2017; Sotto, 2018; CETESB, 2020).

Apesar de todo esse esforço, as concentrações dos poluentes atmosféricos na RMSP ainda permanecem altas, principalmente devido à gigantesca frota veicular que circula incessantemente pelas ruas da metrópole. Diariamente libera-se uma grande quantidade de gases (monóxido de carbono, ozônio, óxidos de enxofre e óxidos de nitrogênio), compostos orgânicos voláteis (hidrocarbonetos e aldeídos), metais (vanádio, níquel e chumbo) e partículas (material particulado), cujas concentrações estão frequentemente acima do recomendado pela OMS (de Fatima Andrade et al., 2017). Por exemplo, o material particulado fino ($MP_{2,5}$), que é o principal componente da poluição atmosférica relacionado com efeitos adversos à saúde, apresenta concentração média anual na RMSP de $28,1\mu g/m^3$, sendo que o recomendado pela OMS é $10\mu g/m^3$ (média anual) e $25\mu g/m^3$ (média 24hs) (Pacheco

et al., 2017). Esse exemplo ilustra a necessidade de manutenção e intensificação das medidas implementadas e de criação de novas regulamentações e determinações para promover mais qualidade de vida e saúde à população.

Dentre os diversos componentes presentes na mistura complexa que é a poluição atmosférica (gases, compostos orgânicos voláteis, metais e material particulado), o $MP_{2,5}$ é o “marcador” mais utilizado para representar os impactos negativos da poluição atmosférica sobre a saúde (Pope e Dockery, 2006). $MP_{2,5}$ são partículas suspensas no ar que possuem menos de $2,5\mu m$ de diâmetro e derivadas principalmente dos processos de combustão de combustíveis fósseis (gasolina, diesel e carvão) e também de nucleação (conversão gás-partícula). Estruturalmente, são compostas por núcleos de carbono elementar que adsorvem nitratos, sulfatos, compostos orgânicos e metais em sua superfície (Figura 1). Portanto, apresentam uma composição química bem diversificada, que varia de acordo com o local e com o tipo de emissão (Pope e Dockery, 2006; Kim et al., 2015; Gautam et al., 2016).

Figura 1: Composição do material particulado fino ($MP_{2,5}$). Representação (sem escala) das substâncias adsorvidas na superfície do $MP_{2,5}$. Adaptado de Stone et al., 2017)

O $MP_{2,5}$ é uma das classes de material particulado. Geralmente, costuma-se dividir o material particulado (MP) em três categorias, de acordo com o diâmetro das partículas e com o potencial de penetração no sistema respiratório: MP grosso (MP_{10}), MP fino ($MP_{2,5}$) e MP ultrafino (MPUF). O MP_{10} compreende as partículas com diâmetro menor que $10\mu m$, derivadas principalmente da ressuspensão de componentes do solo e do desgaste de materiais sólidos, e que geralmente ficam

retidas nas vias aéreas superiores. O $MP_{2,5}$, conforme explicado anteriormente, possui diâmetro menor que $2,5\mu m$ e é derivado da queima de combustíveis fósseis. As partículas dessa classe podem penetrar no sistema respiratório até atingir as vias aéreas inferiores, chegando aos bronquíolos e aos pulmões. Já o MPUF possui um diâmetro menor que $0,1\mu m$, também é derivado dos processos de queima de combustíveis fósseis, e possui capacidade de chegar até os alvéolos, inclusive passando para a corrente sanguínea. No entanto, geralmente se agregam formando $MP_{2,5}$ (Pope e Dockery, 2006; Kim et al., 2015; Losacco e Perillo, 2018).

Apesar do potencial do MPUF de penetrar no organismo atingindo a circulação sanguínea, o $MP_{2,5}$ ainda é o mais estudado e mais relacionado com os efeitos adversos sobre a saúde, em grande parte devido à característica de adsorção dos demais componentes tóxicos da poluição atmosférica em sua superfície e por permanecer um tempo maior em suspensão no ar, o que aumenta a probabilidade de inalação pelos organismos (Pope e Dockery, 2006; Kim et al., 2015; Achilleos et al., 2017). Estudos relacionam o aumento na concentração de $MP_{2,5}$ com diminuição na expectativa de vida e com aumento nas taxas de mortalidade causadas principalmente por complicações cardiovasculares e respiratórias (Pope III et al., 2009; 2019). O mesmo efeito sobre a mortalidade acontece na RMSP, onde um estudo publicado em 2012 mostrou que 10000 mortes por ano estão associadas com a exposição ao $MP_{2,5}$ (de Miranda et al., 2012). Portanto, o $MP_{2,5}$ exerce efeitos negativos importantes sobre a saúde dos indivíduos.

Os principais órgãos a serem afetados pela poluição atmosférica são os do sistema respiratório, os primeiros a entrar contato com o $MP_{2,5}$ do ambiente, e que inicialmente respondem bem à presença das partículas, com retenção e expulsão devido à presença do muco e dos movimentos ciliares das células que revestem o trato respiratório (Tsuda et al., 2011; Losacco e Perillo, 2018). No entanto, em doses elevadas, o $MP_{2,5}$ causa irritação das vias aéreas e, devido ao seu tamanho, consegue chegar até os pulmões, iniciando respostas inflamatórias e aumento de estresse oxidativo (Losacco e Perillo, 2018). A intensificação desse tipo de resposta pela permanência das partículas do organismo compromete a função pulmonar, provocando complicações respiratórias, e gera um estado de inflamação sistêmica, com liberação de mediadores pró-inflamatórios (interleucinas, histaminas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)) e espécies reativas de oxigênio (ERO), que acabam

afetando o sistema cardiovascular por aumento da atividade trombogênica e desregulação da vasomotricidade (Anderson et al., 2012; Jalaludin e Cowie, 2014; Fiordelisi et al., 2017). Eventualmente, as partículas podem se translocar para a circulação sanguínea, ativando mais fatores inflamatórios e trombogênicos, o que compromete a saúde vascular e aumenta a propensão a infartos e arteroscleroses, por exemplo, que são grandes causas de morbidade e mortalidade (Hoek et al., 2013; Fiordelisi et al., 2017; Robertson e Miller, 2018).

Além das complicações respiratórias e cardiovasculares, estudos sugerem que o MP_{2,5} está associado a uma série de consequências negativas sobre outros sistemas do organismo, o que acaba comprometendo a qualidade de vida de muitas pessoas. Efeitos sobre os sistemas nervoso, reprodutor e endócrino são os mais estudados no momento, estando relacionados principalmente com a resposta inflamatória sistêmica e com o aumento de estresse oxidativo causados pelos poluentes (Ghio et al., 2012; Kelly e Fussell, 2015; Thurston et al., 2017). Outros mecanismos sugeridos são: alterações epigenéticas como metilação do DNA e modificação de histonas (Yang et al., 2017; Rider e Carlsten, 2019); efeitos diretos das partículas nos órgãos afetados, podendo funcionar como disruptores endócrinos (Annamalai e Namasivayam, 2015; Darbre, 2018); e no caso específico do sistema nervoso central, indícios de translocação direta para o encéfalo através da passagem das partículas pelo bulbo olfatório (Block e Calderón-Garcidueñas, 2009; Jayaraj et al., 2017). As principais complicações sobre esses sistemas (nervoso, reprodutor e endócrino) associadas com a poluição atmosférica são doenças neurodegenerativas e psiquiátricas (doença de Alzheimer, demência, depressão e ansiedade), alterações reprodutivas (diminuição da qualidade do esperma, nascimentos prematuros e baixo peso ao nascer) e doenças metabólicas (como diabetes e obesidade) (Kelly e Fussell, 2015; Thurston et al., 2017).

Portanto, de modo geral, o MP_{2,5} causa impactos negativos sobre todos os sistemas do organismo, sendo a inflamação sistêmica e o aumento de estresse oxidativo os principais mecanismos associados. Nesse sentido, o sistema imune possui um papel muito importante no balanço da intensidade de resposta que é direcionada contra as partículas. Estudos indicam que o sistema imune contribui, na grande maioria das vezes com uma resposta mais exacerbada, aumentando o número de células, fatores pró-inflamatórios e ERO frente às ameaças

representadas pelas partículas (Schraufnagel et al., 2019; Glencross et al., 2020). Sendo assim, distúrbios como as doenças autoimunes, nas quais há perda de tolerância imunológica a células e tecidos próprios, também poderiam apresentar respostas exacerbadas devido à inflamação sistêmica provocada pelo MP_{2,5}. Baseado em estudos epidemiológicos, a associação entre poluição atmosférica e doenças autoimunes é cada vez mais evidente, sendo os mecanismos de inflamação sistêmica e estresse oxidativo importantes para o desencadeamento e agravamento de algumas dessas doenças, dentre elas o LES (Farhat et al., 2011; Gawda et al., 2016; Gilcrease et al., 2020).

1.2. Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)

O LES é uma doença crônica autoimune que pode afetar diversos órgãos do corpo, principalmente a pele, as articulações, o sangue e os rins. A origem do nome “lúpus” refere-se à erupção cutânea que comumente aparece no rosto dos pacientes, abaixo dos olhos (em formato de borboleta), a qual se assemelha às marcas brancas características do focinho de lobos. O termo “eritematoso” é utilizado para se referir às manchas cutâneas avermelhadas que aparecem pelo corpo. E o “sistêmico” refere-se ao fato de a doença afetar vários órgãos e sistemas (PRINTO-PRES, 2016). Uma das organizações líderes em pesquisa e assistência aos pacientes com lúpus, a *Lupus Foundation of America* (LFA), estima que o LES afeta no mínimo 5 milhões de pessoas no mundo inteiro (LFA, 2020). No entanto, as estimativas são pouco precisas devido à dificuldade de diagnóstico e rastreamento em todos os países. No Brasil, de acordo com a Secretaria de Atenção à Saúde (SAS) do Ministério da Saúde, a incidência de LES é estimada em 8,7 casos para cada 100000 pessoas por ano (SAS, 2013). Segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR), estima-se que haja 65000 pessoas com LES no Brasil, sendo cerca de 6000 presentes somente na cidade de São Paulo (SBR, 2019).

Mulheres em idade reprodutiva são as mais afetadas pelo LES, apresentando uma proporção de prevalência em relação aos homens de nove para um. Atualmente não existe cura para o LES, mas a maioria dos pacientes é tratada com sucesso, sendo que muitos conseguem levar uma vida normal seguindo hábitos saudáveis, com períodos duradouros de remissão da doença (Carter et al., 2016; PRINTO-PRES, 2016). Geralmente, os pacientes em acompanhamento apresentam

sintomas leves a moderados, com a ocorrência de picos esporádicos de atividade da doença (crises). No entanto, há casos de LES mais graves que debilitam bastante o paciente e que necessitam de um tratamento mais agressivo e, eventualmente, indivíduos podem desenvolver uma evolução rápida das manifestações clínicas sistêmicas, que podem ocasionar a morte, principalmente por comprometimento dos rins e do sistema cardiovascular (Tsokos et al., 2011; Carter et al., 2016).

Devido às diversas formas de manifestação, que muitas vezes são comuns a outras doenças, e às variações na gravidade e intensidade da doença, o diagnóstico de LES é complexo, baseado na combinação de 11 critérios que agrupam sinais, sintomas e resultados de exames mais característicos. Formalmente, o paciente deve apresentar no mínimo 4 dos 11 critérios estabelecidos pela *American College of Rheumatology* (ACR) para receber o diagnóstico de LES (ACR, 1997):

- eritema malar;
- eritema discóide;
- fotossensibilidade;
- úlceras orais;
- artrite não erosiva;
- pleurite ou pericardite;
- distúrbios renais (proteinúria ou cilindros celulares);
- distúrbios neurológicos (convulsões ou psicose);
- distúrbios hematológicos (anemia, leucopenia, linfopenia ou trombocitopenia);
- distúrbios imunológicos (anticorpos anti-DNA, anti-Smith ou anti-fosfolípidos);
- anticorpos antinucleares (ANA).

Recentemente, os critérios para diagnóstico foram revisados pela ACR e pela *European League Against Rheumatism* (EULAR), sendo que foram atribuídas mais definições para a caracterização das manifestações clínicas de LES e a presença de ANA se tornou imprescindível para a confirmação do diagnóstico (Figura 2) (Aringer et al., 2019). Para o LES juvenil (LESJ), no entanto, os critérios anteriores ainda são utilizados.

Figura 2: Critérios de 2019 da EULAR/ACR para diagnóstico de LES. Adaptado de Aringer et al., 2019.

O LES é uma doença autoimune na qual há perda de tolerância imunológica a antígenos próprios, caracterizada principalmente pela produção de autoanticorpos por plasmócitos (células B maduras e ativas) autorreativos. Esses

autoanticorpos reconhecem principalmente antígenos nucleares, como DNA e histonas. Associado a essa resposta autoimune, os processos de apoptose celular e *clearance* de debris geralmente estão desregulados no LES, o que explica a presença desses antígenos nucleares no meio extracelular, portanto, acessíveis ao reconhecimento por ANA (Tsokos et al., 2016; Macedo e Isaac, 2016; Mistry e Kaplan, 2017; Yap e Chan, 2019). O principal mecanismo imunofisiopatológico responsável pelo desencadeamento das respostas inflamatórias no LES é a reação de hipersensibilidade do tipo III, na qual há formação de imunocomplexos (complexos de antígeno-anticorpo) circulantes que acabam se depositando em locais específicos do organismo como rins, articulações e vasos. A deposição desses imunocomplexos inicia uma série de processos inflamatórios, como ativação de proteínas do sistema complemento (principalmente C3 e C4) e recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos) que secretam enzimas proteolíticas como metaloproteinases e ERO, o que acaba ocasionando injúria tecidual nos locais de deposição (Anders e Fogo, 2014; Rekvig e Van der Vlag, 2014; Tsokos et al., 2016; Flores-Mendoza et al., 2018).

Os rins são órgãos comumente afetados, em grande parte devido ao tipo de circulação sanguínea na região dos glomérulos, que favorece a deposição de imunocomplexos (Nangaku e Couser, 2005; Tecklenborg et al., 2018). A barreira de filtração glomerular (BFG) é composta pelo endotélio fenestrado dos capilares glomerulares, pela membrana basal e pelos pés dos podócitos (Scott e Quaggin, 2015). Os depósitos de imunocomplexos costumam se acumular na BFG, preferencialmente na região subendotelial, mas também na região mesangial e subepitelial (Figura 3), prejudicando a função da BFG devido à injúria tecidual causada pela inflamação e promovendo o aparecimento de alterações na função renal, como a proteinúria (Nangaku e Couser, 2005; Anders e Fogo, 2014; Tecklenborg et al., 2018). Além disso, pode ocorrer ação de autoanticorpos contra antígenos constituintes dos próprios glomérulos, o que promove a intensificação da glomerulonefrite, caracterizada por alterações histopatológicas evidentes (como morte de podócitos, expansão das células mesangiais e infiltração de células inflamatórias) (Anders e Fogo, 2014; Davidson, 2016; Flores-Mendoza et al., 2018). Além das alterações glomerulares, os túbulos renais também podem ser afetados pela presença de depósitos de imunocomplexos e pelos processos de degeneração

tubular, causados pelo excesso de proteínas no lúmen tubular e pela infiltração de células inflamatórias (Anders e Fogo, 2014; Davidson, 2016; Yu et al., 2017). A progressão da inflamação crônica nos rins leva, em último estágio, à esclerose glomerular, com comprometimento irreversível do glomérulo por fibrose tecidual, o que inviabiliza a função de filtração sanguínea e agrava consideravelmente a saúde do indivíduo (Anders e Fogo; Davidson, 2016; Yu et al., 2017; Flores-Mendoza et al., 2018).

Figura 3: Deposição de imunocomplexos nos glomérulos. Figura representativa dos diferentes tipos de deposição de imunocomplexos (depósitos subendoteliais, subepiteliais e mesangiais). Adaptado de Nangaku e Couser (2005).

Muito do conhecimento e das descobertas sobre a imunofisiopatologia do LES e da nefrite lúpica foram e estão sendo obtidas por meio da utilização de modelos animais que desenvolvem manifestações clínicas semelhantes ao LES de humanos (Richard e Gilkeson, 2018). O primeiro modelo descrito, sendo considerado o modelo animal clássico de LES, são os camundongos da linhagem *New Zealand Black White F1* (NZBWF1), camundongos de cor de pelagem aguti, frutos do cruzamento de fêmeas da linhagem *New Zealand Black* (NZB) com machos da linhagem *New Zealand White* (NZW) (Dubois et al., 1966). Os animais dessa linhagem NZBWF1 desenvolvem espontaneamente muitas características do LES

de humanos, sendo as principais: a produção de ANA, o acometimento dos rins devido à progressão da doença e o fato de se manifestar mais comumente em indivíduos do sexo feminino (Perry et al., 2011; Hahn e Kono, 2013; Richard e Gilkeson, 2018). Existem outros modelos descobertos posteriormente que também desenvolvem espontaneamente manifestações do LES, por exemplo, as linhagens *New Zealand Mixed* (NZM), que compreendem vários cruzamentos entre linhagens *New Zealand*, dando origem a camundongos que desenvolvem a doença mais rapidamente ou cujos machos são mais predispostos à progressão grave da doença e o modelo *Murphy Roths Large/lymphoproliferation* (MRL/lpr), que desenvolve uma nefrite lúpica bem semelhante à de humanos e é mais utilizado para estudos de curta duração (Perry et al., 2011; Hahn e Kono, 2013; Richard e Gilkeson, 2018). Existem ainda os modelos induzidos de LES (por injeção de pristano), animais transgênicos (para expressão de ANA, por exemplo) e camundongos *knockouts* (com ausência de vias de sinalização para bloqueio de ativação de células, por exemplo) (Perry et al., 2011; Hahn e Kono, 2013; Richard e Gilkeson, 2018). Portanto, cada modelo possui características específicas para investigar um mecanismo imunofisiopatológico ou testar algum tipo de tratamento. A escolha do modelo adequado varia de acordo com os objetivos propostos de cada estudo.

Apesar de todo o acúmulo de informações a respeito da fisiopatologia e dos mecanismos relacionados, ainda existem muitas dúvidas sobre o LES, principalmente em relação à etiologia dessa doença. A causa exata do LES não é conhecida, sendo a multifatorialidade (combinação de fatores genéticos e ambientais) a hipótese mais provável (Lisnevskaja et al., 2014; Parks et al., 2017). Estudos indicam que há cerca de 40 genes relacionados com a predisposição ao LES, sendo as variações existentes nos genes *HLA-DR* e nos genes da família dos interferons do tipo I as mais comumente associadas ao desenvolvimento de LES (Ghodke-Puranik e Niewold, 2015; Mohan e Putterman, 2015). No entanto, a taxa de concordância de LES em gêmeos monozigóticos é baixa (menos de 25%), o que descarta a exclusividade de fatores genéticos como responsáveis pelo desencadeamento da doença (Gergianaki et al., 2018; Gulati e Brunner, 2018; Oku e Atsumi, 2018). Portanto, cada vez mais estudos têm investigado fatores de risco que podem ter implicações no desenvolvimento de LES e que podem ajudar a explicar o aumento da incidência observado nas últimas décadas (Gulati e Brunner, 2018;

Leffers et al., 2019). Sabe-se que o LES pode ser desencadeado pelo desequilíbrio hormonal na puberdade (o que pode estar relacionado com a prevalência maior em mulheres) e por fatores ambientais como exposição solar (principalmente devido à incidência de luz ultravioleta), algumas infecções virais (vírus Epstein-Barr), determinados medicamentos (procainamida e hidralazina), hábitos de consumo (álcool e cigarro) e exposições ocupacionais (sílica) (PRINTO-PRES, 2016; Barbhaiya e Costenbader, 2016; Leffers et al., 2019).

1.3. Poluição atmosférica ambiental e LES

Recentemente, a poluição atmosférica ambiental tem sido reportada como um potencial fator de risco para o desenvolvimento ou agravamento de LES (Zhao et al, 2019a; Gilcrease et al., 2020). Estudos epidemiológicos realizados em algumas cidades têm evidenciado um aumento da atividade da doença decorrente do aumento da concentração dos poluentes atmosféricos. Na RMSP, a influência da poluição atmosférica no LES tem sido reportada principalmente em pacientes pediátricos. Crianças já diagnosticadas com LESJ e residentes na RMSP, portanto continuamente expostas à poluição atmosférica ambiental, apresentam alterações no curso da doença. O índice *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index - 2000* (SLEDAI-2K), que quantifica a atividade do LES, apresenta aumento dias após picos de concentração de poluentes atmosféricos (Fernandes et al., 2015). Além da atividade da doença, outros marcadores inflamatórios, como TNF- α e interleucina 17 (IL-17), aparecem em maior concentração no condensado exalado de crianças com LESJ em decorrência do aumento dos níveis de MP_{2,5} na atmosfera (Alves et al., 2018). Esses achados corroboram um estudo realizado na cidade de Montreal (Canadá), que observou, em pacientes adultos com LES, aumento de anticorpos anti-DNA e de complicações renais, ou seja, uma piora da doença, subsequente ao aumento de MP_{2,5} (Bernatsky et al., 2011). Estudos realizados na China também apresentaram resultados semelhantes. Na cidade de Bangbu houve aumento da admissão de pacientes em hospitais por complicações do LES, relacionado a altas concentrações de MP_{2,5} (Zhao et al., 2019b). E na cidade de Taiwan foi observado aumento da incidência de novos casos de LES associado a níveis elevados de alguns poluentes atmosféricos, dentre eles o MP_{2,5} (Jung et al., 2019).

Os mecanismos levantados para a associação cada vez mais evidente entre poluição atmosférica ambiental e LES em humanos se baseiam principalmente na inflamação sistêmica e no estresse oxidativo, que possuem a capacidade de exacerbar as respostas inflamatórias características do LES intensificando a injúria tecidual (Farhat et al., 2011; Perl, 2013; Zhao et al., 2019a). Além disso, especula-se que o excesso de ERO e alterações epigenéticas possam aumentar respostas autoimunes devido à modificação de epítomos próprios, que podem passar a ser reconhecidos como antígenos exógenos, promovendo a ação de autoanticorpos e intensificando a desregulação imune no LES (Cañas et al., 2016; Smallwood et al., 2018; Zhao et al., 2019a). Um mecanismo semelhante acontece na associação entre poluição atmosférica e artrite reumatóide: a exposição aos poluentes promove citrulinização de antígenos, os quais passam a ser alvos de autoanticorpos (Sigaux et al., 2019). No entanto, ainda há muito a ser investigado para se determinar os meios pelos quais os poluentes atmosféricos promoveriam o agravamento ou o desencadeamento do LES.

A associação entre poluição atmosférica ambiental e LES ainda não foi avaliada em modelos animais, que muitas vezes permitem análises mais detalhadas e minuciosas sobre efeitos toxicológicos de substâncias no organismo. Na literatura, porém, existem alguns estudos in vivo de exposição à poluição atmosférica ocupacional. Nesses estudos, camundongos predispostos ao desenvolvimento de LES (modelos NZBW e NZM) foram expostos à sílica (por instilação), sendo observado o agravamento de algumas manifestações, como aumento de proteinúria, elevação dos níveis séricos de ANA, mais deposição de imunocomplexos e de proteínas do sistema complemento nos rins e maior taxa de mortalidade (Brown et al., 2003; Brown et al., 2004; Bates et al., 2015). Sendo assim, seria interessante a realização de um estudo semelhante a esses, ou seja, com a avaliação da exposição de animais predispostos a desenvolver LES ao MP_{2,5} ao invés da sílica. Com essa pesquisa, será possível analisar com mais detalhes se a poluição atmosférica ambiental promove efeitos negativos sobre as manifestações dessa doença autoimune.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar se a exposição ao MP_{2,5} exerce influência sobre a exacerbação das manifestações do LES (principalmente alterações sistêmicas e renais) em camundongos fêmeas espontaneamente predispostas a desenvolverem LES (linhagem NZBWF1).

2.2. Objetivos específicos

Avaliar se a exposição dos animais NZBW ao MP_{2,5}:

- Altera a progressão das manifestações da doença (acompanhamento da doença e análise da sobrevivência);
- Influencia na atividade sistêmica da doença (quantificação de marcadores sorológicos e hematológicos relacionados ao LES);
- Provoca alterações no peso corporal e/ou no peso de alguns órgãos;
- Causa prejuízo da função renal durante o desenvolvimento da doença (análise bioquímica da urina);
- Promove alterações morfológicas nos rins (análises estereológicas e histopatológicas dos rins);
- Modifica a resposta imune nos rins (análise da expressão gênica e quantificação imunohistoquímica de moléculas relacionadas a processos inflamatórios);
- Altera o balanço redox nos rins (análise de estresse oxidativo).

3. MÉTODOS

3.1. Animais e grupos experimentais

Para o estudo *in vivo* foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) com a idade inicial de 90 dias. Camundongos fêmeas da linhagem *New Zealand Black White F1* (NZBWF1) foram utilizadas como modelo animal que desenvolve espontaneamente manifestações clínicas do LES (n=20). Esses camundongos foram provenientes da empresa Jackson Laboratory (Bar Harbor, EUA). Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J foram utilizadas como controles do estudo (n=16). Cada linhagem foi subdividida em 2 grupos: um grupo exposto ao ar filtrado (FA) e um grupo exposto às partículas ambientais concentradas (CAP). Sendo assim, trabalhamos com 4 grupos:

C57-FA: controle-filtrado (n=8)

C57-CAP: controle-poluído (n=8)

NZBW-FA: LES-filtrado (n=10)

NZBW-CAP: LES-poluído (n=10)

Durante o estudo, os camundongos permaneceram no biotério do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE-LIM05) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) em gaiolas forradas com maravalha de pinus (contendo até 5 animais cada) colocadas em estantes ventiladas com filtros do tipo *High Efficiency Particulate Arrestance* (HEPA). No biotério, os camundongos permaneceram sob ciclo claro/escuro de 12h/12h e receberam água e ração irradiada *ad libitum*. A utilização desses camundongos foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FMUSP (CEUA-FMUSP) (protocolo nº 095/17) (Apêndice).

3.2. Exposição ao MP_{2,5}

A exposição dos camundongos ao MP_{2,5} foi realizada no Concentrador de Partículas Ambientais (CPA) (Figura 4). O CPA é um equipamento que capta e concentra o MP_{2,5} do ambiente e direciona as partículas concentradas para câmaras de exposição, onde são colocadas as gaiolas contendo os animais a serem expostos. Durante a exposição, os camundongos permanecem dentro de suas gaiolas com livre movimentação e acesso à água e ração (Figura 4a).

O CPA possui a capacidade de concentrar o $MP_{2,5}$ aproximadamente 25 vezes a concentração ambiente. Isso ocorre devido à presença de impactadores virtuais dispostos em série que permitem apenas a passagem de partículas menores do que $2,5\mu m$ (Figura 4b). Desse modo há uma concentração do $MP_{2,5}$ que chega às câmaras de exposição com um fluxo de 10L/min. As condições de temperatura e umidade do ar foram mantidas, evitando assim qualquer desconforto aos animais expostos (Sioutas et al., 1995; 1997). Os camundongos expostos ao ar filtrado são alocados em câmaras de exposição sob as mesmas condições, com exceção das partículas concentradas, que ficam retidas em filtros do tipo HEPA.

Figura 4: Concentrador de partículas ambientais (CPA). (a) Câmaras de exposição do CPA onde são colocadas as gaiolas dos animais. (b) Impactadores virtuais do CPA em série (1º, 2º e 3º estágios), os quais concentram o $MP_{2,5}$ da atmosfera.

O CPA está instalado dentro de um container alugado no jardim da FMUSP próximo a um cruzamento com intenso tráfego veicular. Desse modo, a grande maioria das partículas às quais os camundongos foram expostos provinha do tráfego

veicular. Dentro do CPA, os camundongos permaneciam nas câmaras de exposição até atingirem a dose acumulada de $600\mu\text{g}/\text{m}^3$, seguindo protocolos já padronizados do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (Lopes et al., 2018; Di Domenico et al., 2020). Essa dose foi determinada baseada na concentração de $25\mu\text{g}/\text{m}^3$ (valor equivalente à concentração média horária de $\text{MP}_{2,5}$ na RMSP), multiplicada pelas 24 horas do dia ($25\mu\text{g}/\text{m}^3 \times 24 = 600 \mu\text{g}/\text{m}^3$). O cálculo para determinar o tempo de exposição (em minutos) foi determinado de acordo com a seguinte equação:

$$T = (600 / C_c) \times 60$$

sendo que, T é o tempo em minutos; C_c é a concentração dentro das câmaras (valor variável de acordo com a concentração de $\text{MP}_{2,5}$ do dia).

3.3. Amostragem e caracterização do $\text{MP}_{2,5}$

Amostras de $\text{MP}_{2,5}$ foram coletadas no mesmo local onde foi realizada a exposição (jardim da FMUSP). Para isso, filtros de polycarbonato foram acoplados a um impactador virtual de $\text{MP}_{2,5}$. O impactador foi ligado a uma bomba de vácuo que gerava um fluxo de 10L/min. Sendo assim, as partículas ficavam retidas nos filtros (Figura 5a). Esse sistema permanecia ligado amostrando o $\text{MP}_{2,5}$ durante 24hs.

A caracterização da composição do $\text{MP}_{2,5}$ foi realizada por espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDX) (Figura 5b). Os filtros de amostragem foram colocados na câmara de leitura do aparelho para a realização da análise. Nessa câmara, raios X eram disparados e a energia dispersiva era detectada, permitindo a identificação dos elementos presentes nas amostras de $\text{MP}_{2,5}$. Um total de 20 filtros foram utilizados para caracterização do $\text{MP}_{2,5}$.

Figura 5: Análise da composição de $MP_{2.5}$. (a) Filtros de polycarbonato para amostragem de $MP_{2.5}$. (b) EDX - Aparelho utilizado para a caracterização do $MP_{2.5}$.

3.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental com a divisão dos grupos está representado na Figura 6. A exposição ao $MP_{2.5}$ foi iniciada quando os camundongos completaram 90 dias de idade e finalizada com a idade de 210 dias, totalizando um período de 4 meses de exposição. Durante esse período, os camundongos foram acompanhados diariamente em relação a manifestações externas da doença (por exemplo: eriçamento de pelos e comportamento moribundo) e eventuais mortes (sobrevida), semanalmente foi realizada a pesagem corporal e mensalmente era feita a coleta de urina. Ao final do período de exposições, os camundongos foram eutanasiados para a coleta de amostras biológicas.

Figura 6: Delineamento experimental do estudo. Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

3.5. Análise de urina

As amostras de urina foram utilizadas para quantificação de proteinúria, creatininúria e albuminúria, sendo ao final calculados os valores da relação proteinúria/creatininúria (RPC) e da relação albuminúria/creatininúria (RAC). As análises foram realizadas no Laboratório de Imunologia Celular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

A coleta de urina foi realizada pelo método de micção estimulada, seguindo o protocolo proposto por Khosho et al. (1985). As amostras de urina foram coletadas com auxílio de uma pipeta e armazenadas em microtubos a -20°C até o dia das análises.

A dosagem de proteínas totais na urina foi realizada utilizando-se o kit Sensiprot (Labtest, Brasil). Primeiramente as amostras foram descongeladas e diluídas na proporção de 1:5 ($8\mu\text{L}$ de urina em $32\mu\text{L}$ de H_2O destilada). Posteriormente, foram adicionados $25\mu\text{L}$ das amostras diluídas e dos padrões (50mg/dL) em $500\mu\text{L}$ do reagente de cor do kit, seguido de aquecimento em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Após aquecimento, $300\mu\text{L}$ foram pipetados em placas para leitura no espectrofotômetro. As absorbâncias das amostras e dos padrões foram determinadas no comprimento de onda de 600nm . Os cálculos para

quantificação de proteinúria das amostras foram realizados baseados na absorbância dos padrões de acordo com a seguinte fórmula:

$$C_{\text{amostra}} = \text{Abs}_{\text{amostra}} \times C_{\text{padrão}} / \text{Abs}_{\text{padrão}}$$

Sendo que, C_{amostra} é a concentração de proteína nas amostras; $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorbância da amostra; $C_{\text{padrão}}$ é a concentração do padrão do kit (50mg/dL) e $\text{Abs}_{\text{padrão}}$ é a absorbância do padrão.

O valor final da concentração de proteinúria foi determinado multiplicando o valor encontrado (C_{amostra}) pelo fator de diluição (x5).

A dosagem de creatininúria foi realizada utilizando-se o método de Jaffé modificado (Delanghe e Speeckaert, 2011). Primeiramente as amostras foram diluídas na proporção de 1:25 (8µL de urina + 192µL de H₂O destilada) diretamente nas placas de leitura. Preparou-se uma solução contendo 80% de ácido pícrico + 20% de hidróxido de sódio e foram adicionados 100µL dessa solução nos 200µL das amostras diluídas e em 200µL dos padrões de creatinina (5mg/dL). Após incubação à 25°C por 20 minutos, a placa foi lida no espectrofotômetro no comprimento de onda de 520nm para determinação das absorbâncias. Os cálculos para quantificação das amostras foram baseados na absorbância dos padrões (mesma equação para quantificação de proteinúria):

$$C_{\text{amostra}} = \text{Abs}_{\text{amostra}} \times C_{\text{padrão}} / \text{Abs}_{\text{padrão}}$$

sendo que, C_{amostra} é a concentração de creatinina das amostras; $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorbância da amostra; $C_{\text{padrão}}$ é a concentração do padrão de creatinina (5mg/dL); $\text{Abs}_{\text{padrão}}$ é a absorbância do padrão.

O valor final da concentração de creatininúria foi determinado multiplicando o valor encontrado (C_{amostra}) pelo fator de diluição (x25).

A dosagem de albuminúria foi realizada por quantificação em gel de poliacrilamida. Primeiramente foram feitos os géis de separação e empilhamento a 10% de poliacrilamida. Durante a polimerização do gel foi realizada a preparação

(desnaturação) das amostras e do padrão de albumina (125µg/mL) por meio da adição de 5µL de tampão laemmli contendo 5% de β-mercaptoetanol em 10µL de amostra, seguido de aquecimento a 95°C por 5 minutos. Posteriormente, as cubas de eletroforese foram montadas e 15µL das amostras foram aplicadas no gel. A corrida foi iniciada a 80V até as amostras chegarem no gel de separação. Depois a voltagem foi aumentada para 120V até as amostras chegarem ao final do gel. O gel foi retirado da cuba e corado com o corante coomasie blue R250 0,1% por 1h30m. Após a coloração foi dado início ao processo de descoloração com solução descorante (7,5% ácido acético + 25% metanol + 67,5% H₂O destilada) até o gel ficar transparente, permanecendo apenas as bandas de albumina em azul. A revelação do gel foi realizada no fotodocumentador AI-600 e a quantificação de albuminúria foi realizada no programa ImageJ (Media Cybernetics, EUA). Nesse programa, a porcentagem de área do gel marcada pelo corante foi determinada para o padrão e para cada respectiva amostra. O cálculo para determinar a concentração de albumina foi baseado na área corada do gel correspondente ao padrão de albumina:

$$C_{\text{amostra}} = \text{Área}_{\text{amostra}} \times C_{\text{padrão}} / \text{Área}_{\text{padrão}}$$

sendo que, C_{Amostra} é a concentração de albumina da amostra; $\text{Área}_{\text{amostra}}$ é a área corada do gel correspondente à amostra; $C_{\text{padrão}}$ é a concentração do padrão de albumina (125µg/mL); $\text{Área}_{\text{padrão}}$ é a área marcada do gel correspondente ao padrão de albumina.

3.6. Eutanásia

A eutanásia dos camundongos ocorreu ao final dos 4 meses de exposição ao MP_{2,5}, quando os camundongos completaram 210 dias de idade. A eutanásia foi realizada por overdose do anestésico inalatório isoflurano (Cristália, Brasil). Imediatamente após a confirmação da morte, o abdômen dos camundongos foi seccionado e foi realizada a coleta de sangue pela veia cava inferior. Uma parte do sangue (100µL) foi coletada para a análise do hemograma e outra parte (cerca de 900µL) foi coletada para obtenção do plasma. Após a coleta de sangue, os órgãos (rins, baço, fígado, coração e timo) foram coletados, pesados em balança eletrônica e armazenados em formaldeído tamponado a 10% ou congelados a -80°C,

dependendo do tipo de análise à qual eles seriam destinados. As carcaças dos animais foram descartadas seguindo as normas de biossegurança da FMUSP.

3.7. Hemograma

Parte do sangue coletado (100µL) foi destinado para a análise de hemograma. Foram quantificados os elementos figurados do sangue: hemácias, leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos) e plaquetas. Além disso, foi realizada a dosagem de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). O hemograma foi realizado utilizando o analisador hematológico automatizado pocH 100iV (Sysmex) no Laboratório de Análises Especiais (LIM03) da FMUSP.

3.8. Detecção de anti-DNA

Parte do sangue coletado (aproximadamente 900µL) foi destinado para a detecção de anticorpos anti-DNA. Para isso as amostras de sangue foram centrifugadas a 3500rpm por 10 minutos e o sobrenadante (plasma) foi recolhido e armazenado à temperatura de -70°C até o dia das análises. A detecção de anti-DNA foi realizada pelo método de imunofluorescência indireta com o kit NOVA Lite® dsDNA *Crithidia luciliae* (Inova Diagnostics), seguindo as recomendações do fabricante. Como conjugado, foi utilizado o anticorpo *Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488* (Invitrogen, A-11001) na concentração de 1:100. As análises foram realizadas no Laboratório de Investigação em Reumatologia (LIM17) da FMUSP.

3.9. Análises histológicas

Foi realizada a análise histológica dos rins dos camundongos. Para isso, após pesados em balança eletrônica, os rins foram armazenados em formaldeído tamponado a 10% por 24hs. Terminado o período de fixação, trocou-se o formol por etanol 70% até o início do processamento dos órgãos. O processamento se deu pelas etapas de desidratação (banhos em concentrações crescentes de álcool: 70% > 80% > 90% > 100%), diafanização (banhos de xilol) e inclusão (banhos de parafina líquida a 60°C). Ao final do processamento os rins foram emblocados em parafina e

os blocos foram cortados no micrótomo rotativo Leica RM2065 (Leica Instruments, Alemanha). Para cada tipo de análise foram realizadas metodologias de corte, coloração ou preparação específicas.

A análise estereológica, a partir de lâminas histológicas, foi realizada pelo método de Cavalieri, a fim de verificarmos o volume dos órgãos. Para isso, os rins foram seccionados no micrótomo rotativo para obtenção de cortes seriados (com 5µm de espessura) espaçados por 100µm. Esses cortes seriados foram colocados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina-eosina (HE). As lâminas coradas foram montadas em meio entellan e digitalizadas no escâner (3DHistech, EUA). Foram retiradas fotos (aumento 10x) das lâminas digitalizadas e as fotos foram analisadas no programa ImageJ (Media Cybernetics, EUA). O método de Cavalieri consiste na contagem de pontos que incidem sobre um sistema teste de pontos (grid), que é colocado sobre as imagens. Foram contados os pontos que caíram sobre o córtex, medula, papila e pelve renal (Figura 7). Por meio da contagem de pontos é possível estimar o volume fracionário dos compartimentos quando são somados a contagem de pontos de todos os cortes seriados, de acordo com a seguinte fórmula:

$$V_f = E_c/E_t$$

Sendo que V_f é o volume fracionário dos compartimentos (em porcentagem), E_c é a soma dos pontos incidentes sobre o compartimento em todos os cortes seriados e E_t é a soma de pontos incidentes sobre todo o órgão em todos os cortes seriados.

Figura 7: Método de Cavalieri. Representação da realização do método de Cavalieri (contagem de pontos) para determinação do volume fracionário dos rins.

Com o valor do V_f é possível calcular o volume absoluto dos compartimentos multiplicando o valor do V_f pelo volume total do rim (V_T), estimado pelo peso do órgão.

$$V_a = V_v \times V_T$$

Sendo que V_a é o volume absoluto dos compartimentos (mm^3), V_f é o volume fracionário dos compartimentos (%) e V_T é o volume total do rim (mm^3).

Para a análise histopatológica dos rins, cortes aleatórios de $5\mu\text{m}$ de espessura foram colocados em lâminas de vidro e corados pelo método Ácido Periódico - reagente de Schiff (PAS), que deixa bem evidenciado a membrana basal dos glomérulos. As lâminas também foram montadas em meio entellan e digitalizadas. Os arquivos foram abertos no programa de visualização de lâminas digitais Case Viewer (3DHistech, EUA) e nesse programa foi realizada a avaliação histopatológica dos rins e a aferição do diâmetro médio dos glomérulos.

Primeiramente foi feita uma análise (aumento 20x) para observação de alterações tubulares presentes em todo o parênquima renal (presença de depósitos ou acúmulos tubulares, infiltração de células inflamatórias e dilatação tubular). As alterações foram quantificadas por meio de um escore. Posteriormente foi feita uma varredura (aumento 400x) para observação de alterações glomerulares (esclerose, alterações da cápsula, do espaço capsular, da membrana basal ou dos capilares, atrofia, expansão mesangial, presença de crescentes e infiltrados inflamatórios) (Figura 8). Nessa análise foram avaliados 100 glomérulos por animal, que foram classificados segundo um escore. Ao final da leitura dos 100 glomérulos foi atribuído um escore histopatológico para cada animal.

Figura 8: Análise histopatológica dos glomérulos. Imagens representativas de alterações glomerulares observadas durante a análise histopatológica. Objetiva em 40x. Tamanho das barras de escala: 60µm. (a) Glomérulo normal. (b) Glomérulo com hipertrofia capsular. (c) Glomeruloesclerose. (d) Atrofia glomerular e substância hialina no túbulo. (e) Expansão mesangial. (f) Dilatação da junção glomérulo-tubular.

Durante a realização da análise histopatológica dos glomérulos também foi realizada a medição do diâmetro médio dos glomérulos utilizando o programa CaseVeiwier (3DHistech, EUA). Utilizando um aumento de 400x, o diâmetro médio do glomérulo foi estimado e utilizado para calcular o volume médio dos glomérulos por meio da seguinte fórmula (cálculo de volume de uma esfera):

$$V_{\text{GLOMÉRULO}} = 4 \times [\pi \times (D / 2)^3] / 3$$

Sendo que, $V_{\text{GLOMÉRULO}}$ é o volume do glomérulo (μm^3); π é o valor de pi (3,14159...); D é o diâmetro médio do glomérulo (μm).

Para a análise de deposição de colágeno nos rins, cortes aleatórios de 5µm de espessura foram colocados em lâminas de vidro e corados com o corante picrossirius e contra-coradas com o corante hematoxilina, seguindo o protocolo de Montes e Junqueira (1991). As lâminas foram novamente montadas em meio entellan e digitalizadas. Utilizando um aumento de 100x, para cada lâmina, foram retiradas 10 fotos de campos aleatórios. Essas fotos foram analisadas no programa ImageJ (Media Cybernetics, EUA) utilizando a ferramenta de seleção de threshold para selecionar a porcentagem de área positivamente corada com picrossirius.

3.10. Análise imunohistoquímica

A imunohistoquímica (IHQ) é uma técnica que permite a marcação de moléculas específicas em tecidos histológicos. Nesse trabalho nós realizamos a técnica de IHQ no tecido renal para quantificar a deposição de complemento C3 e de anticorpos IgG. Para isso, cortes aleatórios de 5µm de espessura foram colocados em lâminas de vidro. Esses cortes passaram primeiramente pelo processo de desparafinização (banhos de xilol), seguido pelo processo de hidratação (banhos de álcool com concentração decrescente: 100% > 90% > 70% > 50%). Os cortes então passaram pelo processo de recuperação antigênica em tampão citrato (pH=6,0) a 96°C. Após isso, fizeram-se os bloqueios da peroxidase endógena (com solução de 95% de metanol + 5% de peróxido de hidrogênio) e das ligações inespecíficas (com albumina de soro bovino (BSA) a 2% em tampão fosfato). Os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-C3 (ab200999; 1:2000), anti-IgG (ab190475; 1:250) e *Macrophage Marker* (sc-101447; 1:10) overnight. No dia seguinte os cortes foram incubados com o anticorpo secundário HRP polímero anti-rabbit (ab214880) ou HRP polímero anti-rat (ab214882) e foi adicionado o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) para realizar a marcação. Para finalizar, foi realizado a contracoloração com hematoxilina e as lâminas foram montadas em meio entellan. Em seguida, as lâminas foram digitalizadas pelo escâner e foram retiradas fotos aleatórias de 10 campos no aumento de 100x. Essas fotos foram analisadas no programa ImageJ (Media Cybernetics, EUA) utilizando a ferramenta de deleção de threshold para selecionar a porcentagem de área positivamente marcada pelo cromógeno DAB.

3.11. Análise de expressão gênica

A análise de expressão gênica foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). O método utilizado foi o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), que estima a expressão gênica por meio dos transcritos de RNA mensageiro (mRNA). Realizamos, no tecido renal, a análise de expressão gênica do fator de transcrição NF- κ B e da citocina TGF- β , utilizando como normalizador o gene que codifica a Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HPRT). A análise de expressão gênica foi realizada no Laboratório de Imunologia dos Transplantes no Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Os rins previamente armazenados a -70°C foram utilizados para extração do RNA total. Os rins foram cortados na metade e colocados em tubos contendo 500 μL de trizol (Invitrogen, EUA) + 0,350g de *beads* para realização da maceração do órgão. A maceração foi realizada no mixer Precellys (Bertin Instruments, França). Após a maceração, foram adicionados 100 μL de clorofórmio para a precipitação do DNA. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante transparente contendo o RNA total foi coletado. Posteriormente, 500 μL de isopropanol foram adicionados para a precipitação do RNA. Os tubos foram novamente centrifugados e o sobrenadante foi descartado, restando o pellet de RNA no fundo. Após duas lavagens com etanol 70% o RNA foi ressuscitado em 50 μL de H_2O DEPC e incubado a 60°C por 5 minutos para eluição. A quantificação de RNA total obtido pela extração foi realizada no equipamento Nanodrop (Thermo Scientific, EUA) que fornece a concentração de RNA em ng/ μL .

Foram utilizados 2000ng de RNA total para a síntese de DNA complementar (cDNA). A síntese de cDNA ocorreu em três etapas. A primeira consistiu na degradação dos possíveis DNA contaminantes por meio da reação com DNAase (*RNase-Free DNase* - Promega, EUA). A segunda consistiu na adição de oligodT (Promega, EUA) para ocorrer o anelamento com a cauda poli-A dos mRNA. A terceira consistiu na síntese de cDNA de fato, por meio da adição de dNTPs com a enzima transcriptase reversa (*M-MLV Reverse Transcriptase* - Promega, EUA). Todas as etapas e incubações foram realizadas no termociclador Master Cycler (Eppendorf, Alemanha). O cDNA obtido foi utilizado para a realização dos qRT-PCR.

Para a quantificação em tempo real, foi utilizado o método SYBR, que utiliza sondas que emitem fluorescência quando fitas duplas de DNA são formadas a cada

ciclo de amplificação. A qRT-PCR para cada gene foi realizada com 4,0µL de cDNA diluído (1:4) + 0,5µL do primer senso (*forward*) + 0,5µL do primer anti-senso (*reverse*) + 5,0µL de mastermix SYBR (Invitrogen, EUA). As sequências dos primers estão descritas na Tabela 1. Os ciclos de amplificação foram realizados no aparelho Quantstudio 12K Flex (AppliedBiosystems, EUA).

Tabela 1: Sequências de primers utilizados no qRT-PCR.

Gene	Sequência
<i>Hprt</i>	F: 5' CTCATGGACTGATTATGGAC 3' R: 5' GCAGGTCAGCAAAGAACTTA 3'
<i>Nfkb</i>	F: 5' ATGGCAGACGATGATCCCTACGG 3' R: 5' ATGGGCCATCTGTTGACAGTGGT 3'
<i>Tgfβ</i>	F: 5' CTTGACGTGACAGACGCT 3' R: 5' GCAGGGGCAGTGTAACCTTATT 3'

Para determinar a expressão gênica foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001), Primeiramente é realizada uma comparação dos ciclos da reação (CT) dos genes alvo (NF-κB e TGF-β) em relação ao gene normalizador (HPRT). Depois, os valores de CT dos grupos são comparados aos valores de CT do grupo controle. O valor utilizado para demonstrar a expressão relativa do gene alvo é calculado com a expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo que no grupo controle o valor da expressão relativa é considerado como sendo igual a 1.

3.12. Análise de estresse oxidativo

O tecido renal foi utilizado para diversas análises de estresse oxidativo, dentre elas a dosagem da atividade pró-oxidante (testes H₂O₂ e NADPHox) e da atividade antioxidante (técnica FRAP). As análises de estresse oxidativo foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Translacional da UNIFESP

Os rins previamente armazenados a -70°C foram utilizados para as análises de estresse oxidativo. Primeiramente os rins foram pesados em uma balança eletrônica e colocados em tubos de ensaio. Foram adicionados tampão KCl (proporção 4mL : 1g de tecido) e o inibidor de protease PMSF (proporção 10µL : 1g de tecido). A maceração foi realizada com a ajuda de um homogenizador. O homogenato foi centrifugado e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -70°C para ser utilizado nas análises.

Para a quantificação de proteínas foi utilizado o método de Lowry (Lowry et al., 1951). Primeiramente as amostras foram diluídas (10µL de amostra em 790µL de H₂O). Para a curva-padrão foi utilizada a albumina. Foram, então, adicionados 2mL de reagente C nas amostras diluídas e na curva-padrão, com incubação por 10min. Em seguida, foram adicionados 200µL de folin, com incubação por mais 30 minutos. Após a incubação foi realizada a leitura da absorbância em um espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 625nm. A concentração de proteínas (mg/mL) foi calculada baseada na absorbância das amostras, de acordo com a inclinação da curva-padrão. Os resultados da quantificação de proteína foram utilizados para normalizar as análises subsequentes de estresse oxidativo.

Uma das análises para atividade pró-oxidante é a técnica NADPHox, que mede a atividade da enzima NADPHox presente no tecido por meio da produção de superóxido. Primeiramente foi preparado o tampão de ensaio (50mL tampão fosfato + 0,029g de EDTA + 2,57g solução de sucrose). Foram adicionados, então, 170µL do tampão de ensaio + 10µL de amostra na placa de leitura, que foi lida no espectrofotômetro no comprimento de onda de 340nm a 37°C. Após a primeira leitura, foi adicionado 20µL do substrato NADPH e a placa foi lida novamente em 340nm a 37°C. A placa foi, então, incubada por 10 minutos a 37°C para a realização da próxima leitura, no mesmo comprimento de onda (T₁₀). Posteriormente a placa foi incubada por mais 30 minutos a 37°C para a realização da última leitura (T₃₀). A produção de superóxido foi calculada baseada na diferença das absorbâncias entre T₃₀ e T₁₀.

Outra análise para avaliar a atividade pró-oxidante foi a do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), mensurada a partir da oxidação de vermelho de fenol, mediada pela peroxidase rabanete. Primeiramente foi preparada a solução de peroxidase rabanete (tampão dextrose + vermelho de fenol + peroxidase rabanete tipo II). Para a curva-padrão foram utilizadas concentrações conhecidas de H₂O₂. Foram adicionados 180µL da solução + 70µL de amostra ou da curva-padrão e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 25 minutos. Após a incubação foram adicionados 5µL de hidróxido de sódio para interromper a reação e a placa foi lida em um espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 630nm. A dosagem de peróxido foi calculada a baseada na absorbância das amostras, de acordo com a inclinação da curva-padrão

A análise da atividade antioxidante foi realizada pela técnica FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), que mede a atividade antioxidante não enzimática. Para a realização dessa técnica, primeiramente foi preparado o reativo de FRAP (10 mL tampão acetato de sódio/ácido acético + 1mL solução de TPTZ/HCl + 1mL solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Para a curva-padrão foi utilizado o sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Em uma placa de leitura foram adicionados 10 μL da amostra ou da curva-padrão em 290 μL do reativo de FRAP. A placa foi incubada por 5 min a 37°C e posteriormente lida em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 593nm. A atividade antioxidante não enzimática foi calculada a baseada na absorbância das amostras, de acordo com a inclinação da curva-padrão.

3.13. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa Statistic Package for Social Sciences (SPSS) versão 17.0. Após a tabulação em planilhas de excel, os dados foram transferidos para o SPSS. Primeiramente foi feito uma análise descritiva dos dados, informando médias, desvios padrão e tipos de distribuição (normal ou não). Algumas variáveis com distribuição não normal foram rankeadas para a realização de testes paramétricos. Para comparações de parâmetros entre os 4 grupos foi utilizado o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA), com pós-teste de Tukey (variâncias homocedásticas e n igual nos grupos), Gabriel (variâncias homocedásticas e n diferente nos grupos) ou Games-Howell (variâncias não homocedásticas). Para a realização da comparação entre 2 grupos foi utilizado o teste-T de student. Para algumas variáveis com distribuição não normal, os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis (comparação entre os 4 grupos) ou Mann-Whitney (comparação entre 2 grupos) foram utilizados. Diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$). Para avaliar a influência dos fatores nos desfechos foi utilizada a análise multivariada (MANOVA). A influência dos fatores foi considerada significativa quando $p < 0,05$. Para a análise de sobrevida foi realizado o teste de Kepler-Maier, com valor de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do MP_{2,5}

A análise por EDX permitiu identificar que o MP_{2,5} coletado é constituído principalmente pelos elementos carbono (52,24% $\pm$ 6,24), enxofre (33,59% $\pm$ 2,11) e magnésio (10,19% $\pm$ 8,56), seguidos por bário (1,34% $\pm$ 0,47), cloro (1,00% $\pm$ 0,28), fósforo (0,73% $\pm$ 0,42), ferro (0,34% $\pm$ 0,13) e cálcio (0,28% $\pm$ 0,09) (Tabela 2).

Tabela 2: Composição elementar do MP_{2,5} coletado.

Elemento	%
Carbono (C)	52.24 $\pm$ 6.24
Enxofre (S)	33.59 $\pm$ 2.11
Magnésio (Mg)	10.19 $\pm$ 8.56
Bário (Ba)	1.34 $\pm$ 0.47
Cloro (Cl)	1.00 $\pm$ 0.28
Fósforo (P)	0.73 $\pm$ 0.42
Ferro (Fe)	0.34 $\pm$ 0.13
Cálcio (Ca)	0.28 $\pm$ 0.09
Potássio (K)	0.15 $\pm$ 0.03
Silício (Si)	0.04 $\pm$ 0.07

Valores representados em média (porcentagem) $\pm$ erro. n=20 filtros.

4.2. Sobrevida

Durante a realização do estudo, 4 camundongos do grupo NZBW-CAP (animais com LES expostos à poluição atmosférica) morreram antes do término do período de exposições por acometimento renal. Nesses camundongos, pudemos observar a progressão da doença por meio das características de emagrecimento exacerbado, eriçamento de pelos, curvatura da coluna e comportamento moribundo dias antes da morte. Nos demais grupos (C57-FA, C57-CAP e NZBW-FA) não houve nenhuma morte nem características indicativas de agravamento da doença antes da eutanásia (p=0,007) (Figura 9).

Figura 9: Curva de sobrevivência durante o período de exposições. $n = 8-10$ animais/grupo. Teste estatístico de Kaplan-Meier ($p=0,007$). Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

4.3. Peso corporal

A Figura 10 mostra a evolução do peso corporal dos camundongos durante os 4 meses do período de exposições. As fêmeas da linhagem NZBW apresentaram um peso maior quando comparadas às fêmeas da linhagem C57 durante todo o período ($p<0,001$). Dentro da linhagem C57 não houve diferença de peso corporal entre os grupos expostos ao ar filtrado e ao $MP_{2,5}$. O mesmo se aplica aos camundongos da linhagem NZBW, não havendo diferenças entre os grupos em relação à exposição.

Figura 10: Peso corporal (g) dos camundongos durante o período de exposições. Gráfico de barras expressas em média $\pm$ erro padrão. $n = 8-10$ animais/grupo. Teste ANOVA, seguido de pós-teste Gabriel ou Games-Howell. * $p < 0,01$ (NZBW-FA x C57-FA/C57-CAP e NZBW-CAP x C57-FA/C57-CAP). Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

4.4. Peso dos órgãos

No dia da eutanásia foi realizada a aferição do peso dos seguintes órgãos: rim, baço, fígado, coração e timo. Os pesos absolutos dos órgãos foram divididos pelo peso corporal no dia da eutanásia para a obtenção do peso relativo (porcentagem em relação ao peso corporal). A seguir, para cada órgão específico, estão descritos, respectivamente, os resultados de peso absoluto e peso relativo. Os valores dos pesos absolutos e relativos dos órgãos analisados estão representados na Tabela 3.

4.4.1. Peso do rim

Em relação ao peso absoluto, observamos que o grupo NZBW-CAP apresentou um peso maior quando comparado aos grupos NZBW-FA ($p=0,025$), C57-CAP ($p < 0,001$) e C57-FA ($p < 0,001$). O grupo NZBW-FA também apresentou um peso maior em relação ao grupo C57-FA ($p < 0,001$) e C57-CAP ($p=0,001$).

Porém, na análise do peso relativo, o grupo NZBW-FA apresentou diminuição quando comparado ao grupo C57-FA ($p < 0,001$) e ao grupo C57-CAP ($p < 0,001$). No

entanto, a diferença entre NZBW-FA e NZBW-CAP se manteve: houve maior peso relativo no grupo exposto ao MP_{2,5} ($p < 0,001$).

4.4.2. Peso do baço

Na análise do peso absoluto, o grupo NZBW-CAP apresentou um peso maior quando comparado ao grupo C57-FA ($p = 0,027$) e ao grupo NZBW-FA ($p = 0,046$).

O peso relativo do baço apresentou um comportamento semelhante ao observado com o peso relativo dos rins. O grupo NZBW-FA apresentou peso relativo menor em comparação ao grupo C57-FA ($p = 0,006$) e ao grupo C57-CAP ($p = 0,026$). Comparando apenas os camundongos NZBW, o peso relativo foi maior ($p = 0,029$) nos camundongos expostos ao MP_{2,5}.

4.4.3. Peso do fígado

O peso absoluto do fígado seguiu o comportamento do peso corporal, sendo significativamente maior nos grupos NZBW-FA e NZBW-CAP quando comparados aos grupos C57-FA e C57-CAP ($p < 0,001$).

Em relação ao peso relativo, o grupo NZBW-FA apresentou um peso menor quando comparado ao grupo C57-FA ($p < 0,001$). Considerando apenas os camundongos C57, houve diminuição de peso relativo no grupo C57-CAP ($p = 0,013$). Comparando apenas os camundongos que desenvolvem LES, houve uma tendência de aumento do peso relativo nos camundongos expostos ao MP_{2,5} ($p = 0,052$).

4.4.4. Peso do coração

Em relação ao peso absoluto, o grupo C57-FA apresentou um menor peso em relação aos demais grupos: C57-CAP ($p = 0,008$), NZBW-FA ($p < 0,001$) e NZBW-CAP ($p < 0,001$). O grupo C57-CAP apresentou um peso menor em relação aos grupos NZBW-FA ($p < 0,001$) e NZBW-CAP ($p < 0,001$).

Na análise do peso relativo, o grupo NZBW-FA apresentou um valor menor em relação aos grupos C57-FA ($p = 0,042$) e C57-CAP ($p = 0,004$). Nos camundongos NZBW houve uma tendência de aumento do peso relativo em decorrência da exposição ao MP_{2,5} ($p = 0,099$).

4.4.5. Peso do timo

O peso absoluto do timo foi maior no grupo C57-FA quando comparado aos grupos C57-CAP ($p=0,011$) e NZBW-FA ($p=0,011$). O grupo NZBW-CAP também apresentou um peso maior em relação aos grupos C57-CAP ($p=0,006$) e NZBW-FA ($p=0,006$).

No peso relativo, o grupo C57-FA apresentou maiores valores em relação aos grupos C57-CAP ($p=0,001$), NZBW-FA ($p<0,001$) e NZBW-CAP ($p=0,030$). Comparando apenas os camundongos NZBW, a exposição à poluição atmosférica provocou um aumento de peso relativo do timo ($p=0,007$).

Tabela 3: Peso dos órgãos – peso absoluto (g) e peso relativo (%).

		C57-FA	C57-CAP	NZBW-FA	NZBW-CAP
Absoluto (g)	Rim	0,153 ± 0,008	0,162 ± 0,024	0,203 ± 0,014 ^{a,b}	0,263 ± 0,040 ^{a,b,c}
	Baço	0,082 ± 0,008	0,084 ± 0,015	0,094 ± 0,027	0,173 ± 0,124 ^{a,c'}
	Fígado	1,127 ± 0,107	1,080 ± 0,197	1,549 ± 0,137 ^{a,b}	1,807 ± 0,488 ^{a,b}
	Coração	0,104 ± 0,004	0,120 ± 0,015 ^{a'}	0,157 ± 0,014 ^{a,b}	0,177 ± 0,041 ^{a,b}
	Timo	0,091 ± 0,020	0,057 ± 0,019 ^a	0,059 ± 0,013 ^a	0,106 ± 0,045 ^{b,c}
Relativo (%)	Rim	0,66 ± 0,05	0,66 ± 0,06	0,53 ± 0,04 ^{a,b}	0,80 ± 0,17 ^c
	Baço	0,35 ± 0,02	0,34 ± 0,04	0,24 ± 0,07 ^{a,b}	0,46 ± 0,26 ^{c'}
	Fígado	4,87 ± 0,39	4,36 ± 0,61 ^{a'}	4,06 ± 0,29 ^a	5,17 ± 0,94
	Coração	0,45 ± 0,03	0,49 ± 0,06	0,41 ± 0,03 ^{a,b}	0,54 ± 0,10
	Timo	0,39 ± 0,08	0,23 ± 0,08 ^a	0,15 ± 0,03 ^a	0,25 ± 0,09 ^{a,c}

Valores expressos em média ± desvio padrão. n=7-10 animais/grupo. ANOVA seguido de pós-teste Gabriel ou Games-Howell ou teste-T.

^{a,a'} $p<0,05$ em relação à C57-FA (^a ANOVA; ^{a'} teste-T).

^b $p<0,05$ em relação à C57-CAP.

^{c,c'} $p<0,05$ em relação à NZBW-FA (^c ANOVA; ^{c'} teste-T).

C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

4.5. Hemograma

4.5.1. Eritrograma (série vermelha)

A análise do eritrograma não mostrou diferenças no número de hemácias, na concentração de hemoglobina, no hematócrito e no VCM. Houve diferenças apenas nos parâmetros: HCM e CHCM. Para HCM, o grupo C57-FA apresentou um valor menor quando comparado aos grupos C57-CAP ($p=0,026$) e NZBW-FA ($p=0,008$). Para CHCM, o grupo C57-FA apresentou um média menor comparado aos grupos C57-CAP ($p=0,002$), NZBW-FA ($p<0,001$) e NZBW-CAP ($p<0,001$) e o grupo C57-

CAP apresentou valor menor em relação a NZBW-FA ($p=0,022$) e NZBW-CAP ($p=0,001$). Houve tendência de aumento de CHCM nos camundongos NZBW-CAP em relação ao grupo NZBW-FA ($p=0,060$) (Tabela 4).

4.5.2. Plaquetas

A quantificação de plaquetas apresentou diferença entre os grupos (Tabela 4). O grupo NZBW-FA apresentou uma redução quando comparado ao grupo C57-CAP ($p=0,037$). O grupo NZBW-CAP apresentou uma tendência de diminuição em relação ao grupo C57-CAP ($p=0,088$). Pela análise multivariada, foi possível observar que a linhagem foi um fator determinante para esse desfecho ($p=0,003$).

4.5.3. Leucograma (série branca)

A análise do leucograma mostrou diferenças no número total de leucócitos, linfócitos e neutrófilos, bem como diferenças na porcentagem de neutrófilos e linfócitos (Tabela 4). Não houve diferenças no número e porcentagem de monócitos, eosinófilos e basófilos.

Em relação ao número total de leucócitos, o grupo NZBW-FA apresentou diminuição de 49% quando comparado ao grupo C57-FA ($p=0,018$). O número total de linfócitos também foi diferente entre esses dois grupos, diminuindo 53% ($p=0,006$). Já em relação ao número total de neutrófilos, o grupo NZBW-CAP apresentou um valor 68% maior quando comparado ao grupo NZBW-FA ($p=0,017$).

Em relação à porcentagem de neutrófilos, o grupo NZBW-CAP apresentou um valor maior quando comparado aos grupos C57-FA ($p<0,001$); C57-CAP ($p=0,002$) e NZBW-FA ($p=0,018$)). O contrário foi observado em relação à porcentagem de linfócitos: o grupo NZBW-CAP apresentou valor menor em comparação aos grupos C57-FA ($p=0,001$); C57-CAP ($p=0,002$) e NZBW-FA ($p=0,016$).

Tabela 4: Análise do hemograma total.

	C57-FA	C57-CAP	NZBW-FA	NZBW-CAP
Eritrócitos ¹	9,43 ± 0,30	8,71 ± 0,62	10,39 ± 1,89	7,90 ± 2,03
Hemoglobina (g/dL)	13,8 ± 0,6	13,2 ± 1,0	16,0 ± 2,7	12,7 ± 2,6
Hematócrito (%)	48,1 ± 1,7	43,9 ± 2,8	51,9 ± 9,3	40,3 ± 8,6
VCM (fL)	51,0 ± 0,7	50,4 ± 0,6	49,9 ± 0,5	51,5 ± 3,6
HCM (pg)	14,6 ± 0,2	15,2 ± 0,2 ^a	15,5 ± 0,3 ^a	16,3 ± 1,1
CHCM (g/dL)	28,7 ± 0,5	30,0 ± 0,4 ^a	31,0 ± 0,4 ^{a,b}	31,6 ± 0,3 ^{a,b}
Plaquetas ²	1119,2 ± 115,8	1334,3 ± 396,6	664,8 ± 368,2 ^b	684,0 ± 307,0
Leucócitos ²	3,34 ± 0,96	2,70 ± 0,59	1,72 ± 0,51 ^a	2,70 ± 0,66
Linfócitos ²	2,54 ± 0,74	2,00 ± 0,32	1,20 ± 0,40 ^a	1,50 ± 0,31
Neutrófilos ²	0,71 ± 0,24	0,67 ± 0,28	0,50 ± 0,15	1,13 ± 0,31 ^c
Monócitos ²	0,09 ± 0,08	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,06
Linfócitos (%)	76,00 ± 5,05	74,75 ± 5,12	69,40 ± 5,86	56,00 ± 2,65 ^{a,b,c}
Neutrófilos (%)	21,40 ± 3,91	24,00 ± 5,35	29,40 ± 5,81	41,67 ± 1,53 ^{a,b,c}
Monócitos (%)	2,60 ± 1,67	1,25 ± 0,50	1,20 ± 0,45	2,00 ± 1,73

Valores expressos em média ± desvio padrão. n=3-5 animais/grupo. ANOVA seguido de pós-teste Gabriel ou Games-Howell.

¹ (milhões/mm³)

² (milhares/mm³)

^a p<0,05 quando comparado a C57-FA

^b p<0,05 quando comparado a C57-CAP

^c p<0,05 quando comparado a NZBW-FA

C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

4.6. Detecção de anti-DNA

A análise semi-quantitativa de detecção de anti-DNA pelo método *Crithidia lucilliae* mostrou que nenhum dos camundongos C57 apresentou reação positiva, ao passo que 10% dos camundongos do grupo NZBW-FA e 14,29% dos camundongos do grupo NZBW-CAP apresentaram positividade para anticorpos anti-DNA. No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 11).

Figura 11: Detecção de anticorpos anti-DNA. Valores expressos em porcentagem de amostras positivas $\pm$ erro padrão. $n=8-10$ animais/grupo. Teste Kruskal-Wallis. Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

4.7. Análise de urina

4.7.1. Proteinúria

Para avaliar a excreção de proteínas na urina durante os meses de acompanhamento dos camundongos foi calculada a relação proteinúria/creatininúria (RPC) (Figura 12). Pudemos observar que inicialmente (mês 0), os camundongos NZBW-CAP ($p<0,001$), NZBW-FA ($p<0,001$) e C57-CAP ($p=0,002$) apresentaram menor RPC em comparação ao C57-FA. O grupo NZBW-FA manteve menor RPC em relação a C57-FA no mês 1 ($p=0,045$) e no mês 2 ($p=0,003$). NZBW-CAP apresentou maior RPC quando comparado ao NZBW-FA no mês 2 ($p=0,001$), mês 3 ($p=0,006$) e mês 4 ($p=0,034$). O grupo NZBW-CAP também apresentou maior RPC quando comparado ao C57-CAP no mês 3 ($p=0,046$) e mês 4 ($p<0,001$). No mês 4, o grupo NZBW-FA apresentou maior RPC quando comparado ao grupo C57-CAP ($p=0,021$), e o grupo NZBW-CAP apresentou maior RPC quando comparado ao grupo C57-FA ($p=0,001$).

Figura 12: Relação proteinúria/creatininúria (RPC) nos 4 meses de exposição. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 5-10$ animais/grupo. $*p < 0,05$ (teste ANOVA, seguido de pós-teste Gabriel). Grupos C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

4.7.2. Albuminúria

Assim como na análise de proteinúria, para avaliar a excreção de albumina na urina também houve a normalização pela dosagem de creatininúria (Figura 13). A análise da relação albuminúria-creatininúria (RAC) mostrou que não houve diferenças significativas entre os grupos, apesar de a média do grupo NZBW-CAP ser bem maior ($1932,0\mu\text{g}/\text{mg}$) em relação aos grupos C57-FA ($342,5\mu\text{g}/\text{mg}$), C57-CAP ($335,7\mu\text{g}/\text{mg}$) e NZBW-FA ($387,2\mu\text{g}/\text{mg}$).

Figura 13: Relação albuminúria/creatininúria (RAC). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 5-9$ animais/grupo. Teste ANOVA, seguido de pós-teste Gabriel. Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

4.8. Estereologia dos rins (método de Cavalieri)

4.8.1. Volume fracionário dos compartimentos (%)

A análise do volume dos compartimentos renais pelo método de Cavalieri mostrou que houve diferenças entre os grupos no volume fracionário do córtex e da medula (Figura 14). Em relação ao córtex, o grupo NZBW-CAP apresentou aumento de volume quando comparado ao grupo C57-FA (de 55,7% para 67,1%; $p=0,032$). Comparando apenas os camundongos C57 houve aumento do córtex ($p=0,035$) e diminuição da medula ($p=0,021$) no grupo exposto ao MP_{2,5}. Não houve diferenças entre os grupos NZBW-FA e NZBW-CAP nem no volume dos demais compartimentos (papila e pelve renal).

Figura 14: Volume fracionário dos compartimentos renais (%). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 5-6$ animais/grupo. * $p<0,05$ (teste ANOVA, seguido de pós-teste Gabriel). ** $p<0,05$ (teste-T). Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

4.8.2. Volume absoluto dos compartimentos (mm³)

Conforme apresentado na Figura 15, houve diferença entre os grupos no volume absoluto apenas do córtex. O grupo NZBW-FA (119,9mm³) apresentou um volume maior em relação ao grupo C57-FA (81,4mm³; $p=0,001$) e o grupo NZBW-CAP apresentou um volume maior (164,4mm³) comparado com todos os demais grupos (C57-FA ($p<0,001$)); C57-CAP (99,0mm³; $p=0,001$); NZBW-FA ($p=0,034$)). Não houve diferenças nos compartimentos medula, papila e pelve renal.

Figura 15: Volume absoluto dos compartimentos renais (mm³). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 5-6$ animais/grupo. * $p < 0,05$ (teste ANOVA, seguido de pós-teste Gabriel ou Games-Howell). Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

4.9. Análise histopatológica dos rins

A análise histopatológica dos rins mostrou diferenças entre os grupos nos escores totais dos túbulos e dos glomérulos (Figura 16). O escore tubular total foi maior no grupo NZBW-FA em relação ao grupo C57-FA ($p=0,044$) e maior no grupo NZBW-CAP em relação ao grupo C57-FA ($p=0,005$), com uma tendência de aumento também em relação ao grupo C57-CAP ($p=0,058$) (Figura 16a). O escore glomerular total foi maior no grupo NZBW-FA em relação aos grupos C57-FA ($p=0,001$) e C57-CAP ($p=0,010$) e maior no grupo NZBW-CAP quando comparado aos grupos C57-FA ($p=0,003$) e C57-CAP ($p=0,025$) (Figura 16b).

Figura 16: Análise histopatológica dos rins (escores totais). (a) Escore histopatológico dos túbulos. (b) Escore histopatológico dos glomérulos. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 5$ animais/grupo. * $p < 0,05$ (teste ANOVA, seguido de pós-teste Tukey HSD). Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

4.9.1. Análise histopatológica dos túbulos

Em relação às alterações histopatológicas observadas nos túbulos, especificamente, houve diferenças nos escores relacionados à inflamação e ao depósito intersticial (Tabela 5). O grupo NZBW-CAP apresentou mais inflamação ($p=0,004$) e mais depósitos ($p=0,048$) em relação ao grupo C57-FA. O grupo C57-CAP também apresentou mais inflamação em relação ao grupo C57-FA ($p=0,044$). Além disso, houve tendência de mais depósitos no grupo NZBW-FA em relação ao grupo C57-FA ($p=0,071$).

Tabela 5: Análise histopatológica dos túbulos renais.

	C57-FA	C57-CAP	NZBW-FA	NZBW-CAP
Inflamação	$0,4 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,6^{a'}$	$1,7 \pm 1,6$	$2,3 \pm 1,2^a$
Depósitos	$0,1 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,8$	$1,3 \pm 0,8^a$
Acúmulos	$0,3 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,4$	$1,2 \pm 2,2$
Dilatação	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 2,2$

Valores de escore (unidades arbitrárias) expressos em média $\pm$ desvio padrão. $n=5$ animais/grupo. Teste ANOVA, seguido de pós-teste Tukey HSD ou Games-Howell ou teste-T.

^{a,a'} $p<0,05$ em relação a C57-FA (^a ANOVA; ^{a'} teste-T).

C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

4.9.2. Análise histopatológica dos glomérulos

Em relação às alterações histopatológicas observadas nos glomérulos, houve diferenças entre os grupos nos escores da cápsula renal, do espaço glomerular, dos crescentes e do mesângio (Tabela 6). A cápsula se apresentou mais alterada no grupo NZBW-FA em relação ao grupo C57-FA ($p=0,042$). O espaço glomerular foi maior no grupo NZBW-CAP quando comparado ao grupo C57-CAP ($p=0,028$) e houve uma tendência de aumento também em relação ao grupo C57-FA ($p=0,078$). O número de crescentes glomerulares foi maior no grupo NZBW-FA em relação aos grupos C57-FA ($p=0,003$) e C57-CAP ($p=0,003$) e também foi maior no grupo NZBW-CAP em relação aos grupos C57-FA ($p=0,011$) e C57-CAP ($p=0,012$). Houve aumento do mesângio no grupo NZBW-FA em relação ao grupo C57-FA ($p=0,042$).

Tabela 6: Análise histopatológica dos glomérulos renais.

	C57-FA	C57-CAP	NZBW-FA	NZBW-CAP
Esclerose	0,1 ± 0,2	0,6 ± 1,1	0,3 ± 0,4	15,1 ± 31,3
Cápsula	2,0 ± 1,3	3,4 ± 1,3	10,1 ± 6,9 ^a	6,9 ± 4,9
Espaço	2,9 ± 1,0	2,1 ± 1,9	4,4 ± 3,0	6,9 ± 3,1 ^b
Atrofia	11,5 ± 5,9	9,1 ± 2,8	6,4 ± 4,8	11,0 ± 11,5
Crescente	1,8 ± 1,4	1,8 ± 1,0	9,4 ± 7,1 ^{a,b}	6,3 ± 2,4 ^{a,b}
Mesângio	24,1 ± 4,8	28,5 ± 7,8	36,5 ± 6,6 ^a	42,1 ± 30,3
Membrana	0,3 ± 0,4	0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,2	3,1 ± 6,1
Capilares	1,7 ± 1,0	4,1 ± 3,1	3,9 ± 2,7	4,0 ± 3,2
Infiltração	4,3 ± 3,5	4,6 ± 2,1	7,7 ± 2,6	5,8 ± 1,6

Valores de escore (unidades arbitrárias) expressos em média ± desvio padrão. ANOVA seguido de pós-teste Tukey HSD ou Games-Howell.

^a p<0,05 em relação a C57-FA.

^b p<0,05 em relação a C57-CAP.

C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

Em relação ao volume médio dos glomérulos, calculado por meio da obtenção do diâmetro médio dos glomérulos, não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 17).

Figura 17: Volume médio dos glomérulos (μm³). Valores expressos em média ± erro padrão. n = 5 animais/grupo. Teste ANOVA, seguido de pós-teste Tukey HSD. Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

4.10. Análise de deposição de colágeno

A análise de deposição de colágeno nos rins realizada pela coloração seletiva com picrossirius-hematoxilina mostrou que não houve diferenças significativas entre

os grupos em relação à porcentagem de área dos rins corada por picrossirius (Figura 18).

Figura 18: Análise por picrossirius-hematoxilina. (A) C57-FA; (B) C57-CAP; (C) NZBW-FA; (D) NZBW-CAP; (E) Área dos rins corada por picrossirius (%). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 5-10$ animais/grupo. Teste ANOVA, seguido de pós-teste Games-Howell. Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

4.11. Análise imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica mostrou que não houve diferenças significativas entre os grupos na porcentagem de área positivamente marcada pelo DAB referente aos depósitos de complemento C3 (Figura 19). Na análise de deposição de imunoglobulina IgG foi possível observar uma tendência de aumento no grupo NZBW-CAP em relação ao grupo C57-CAP ($p=0,063$) (Figura 20), sendo que pela análise multivariada os desfechos observados na deposição de IgG foram influenciados pelo fator linhagem ($p=0,009$). Em relação à quantificação de macrófagos, foi observado um aumento no grupo NZBW-CAP em relação aos

grupos C57-FA ($p=0,007$) e C57-CAP ($p=0,028$) e um aumento no grupo NZBW-FA em relação ao grupo C57-FA ($p=0,023$) (Figura 21).

Figura 19: Análise imunohistoquímica de C3 nos rins. (A) C57-FA; (B) C57-CAP; (C) NZBW-FA; (D) NZBW-CAP; (E) Área marcada por C3 (%). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 5-6$ animais/grupo. $*p < 0,05$ (teste ANOVA, seguido de pós-teste Gabriel). Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

Figura 20: Análise imunohistoquímica de IgG nos rins. (A) C57-FA; (B) C57-CAP; (C) NZBW-FA; (D) NZBW-CAP; (E) Área marcada por IgG (%). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 5-7$ animais/grupo. $*p < 0,05$ (teste ANOVA, seguido de pós-teste Games-Howell). Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

Figura 21: Análise imunohistoquímica de macrófagos nos rins. (A) C57-FA; (B) C57-CAP; (C) NZBW-FA; (D) NZBW-CAP; (E) Área marcada por macrófagos (%). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 5-8$ animais/grupo. $*p < 0,05$ (teste ANOVA, seguido de pós-teste Gabriel). Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

4.12. Análise de expressão gênica

Comparando todos os grupos (considerando a expressão gênica do grupo C57-FA como sendo igual a 1) foi possível observar diferenças significativas na expressão do fator de transcrição NF- κ B (Figura 22a) e TGF- β (Figura 22b). Em relação à NF- κ B, o grupo C57-CAP apresentou menor expressão quando comparado aos grupos C57-FA ($p=0,010$) e NZBW-CAP ($p=0,032$) e uma tendência de diminuição em relação a NZBW-FA ($p=0,069$). Em relação à TGF- β , os grupos NZBW-FA ($p=0,002$) e NZBW-CAP ($p=0,005$) apresentaram menor expressão em comparação à C57-FA, com tendência de diminuição também no grupo C57-CAP ($p=0,057$).

Comparando apenas os grupos NZBW (considerando a expressão gênica do grupo NZBW-FA como sendo igual a 1) não houve diferenças entre os grupos na expressão gênica de NF- κ B e TGF β .

Figura 22: Análise de expressão gênica por qRT-PCR (método $2^{-\Delta\Delta CT}$). (a) Expressão gênica de NF- κ B. (b) Expressão gênica de TGF- β . Valores de expressão relativa plotados em média $\pm$ erro padrão. $n = 5-10$ animais/grupo. * $p < 0,05$ (Teste ANOVA, seguido de pós-teste Gabriel). Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

4.13. Análise de estresse oxidativo

Em relação à atividade pró-oxidante, a análise da atividade da enzima NADPHox mostrou que houve aumento no grupo NZBW-FA quando comparado ao grupo C57-CAP ($p=0,011$) e uma tendência de aumento em relação a C57-FA ($p=0,055$) (Figura 23a). A dosagem de H_2O_2 não apresentou diferenças entre os grupos (Figura 23b).

Já em relação à atividade anti-oxidante, foi observado aumento de FRAP nos camundongos NZBW. Os grupos NZBW-FA ($p=0,048$) e NZBW-CAP ($p=0,021$) apresentaram uma dosagem maior de FRAP em relação ao grupo C57-FA (Figura 23c).

Figura 23: Análise de estresse oxidativo. (a) Atividade de NADPHox. (b) Dosagem de Peróxido (H₂O₂). (c) Quantificação de FRAP. Valores expressos em média ± erro padrão. n = 8-10 animais/grupo. *p<0,05 (teste ANOVA seguido de pós-teste Gabriel ou Games-Howell). Grupos: C57-FA: controle-filtrado; C57-CAP: controle-poluído; NZBW-FA: LES-filtrado; NZBW-CAP: LES-poluído.

5. DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo mostraram que houve influência da exposição à poluição atmosférica nos camundongos NZBWF1. As fêmeas NZBW expostas ao MP_{2,5} apresentaram agravamento de algumas manifestações do LES quando comparadas às fêmeas NZBW expostas ao ar filtrado, sendo que as alterações mais relevantes foram a diminuição da taxa de sobrevivência, o aumento do peso de rins, baço e timo, o aumento de volume do córtex renal, o adiantamento da proteinúria e o aumento de neutrófilos circulantes. Além disso, a exposição ao MP_{2,5} aparentemente potencializou alguns desfechos que apresentaram diferenças entre os grupos NZBW-FA e C57-FA, dentre eles os aumentos do volume do córtex, dos escores histopatológicos indicativos de lesões renais, da quantidade de macrófagos no parênquima renal e da atividade anti-oxidante não enzimática nos rins, bem como anulou outros desfechos característicos como a leucopenia e a linfopenia. Tais resultados reforçam que a exposição à poluição atmosférica é capaz de provocar alterações importantes em camundongos expostos ao MP_{2,5}.

De acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que caracterizou os efeitos da exposição ao MP_{2,5} em camundongos que desenvolvem espontaneamente características do LES. Para realizar a exposição às partículas existem diversas metodologias, dentre elas a instilação, a injeção intraperitoneal ou intravenosa, a inalação do tipo *nose-only* e a inalação de corpo inteiro, que pode ser de partículas ambientais concentradas ou não, cada qual com suas vantagens e desvantagens (Shang e Sun, 2018). Neste estudo, a utilização do CPA foi baseada em três características principais: a eficiência dos impactadores, a constância da dose e a mimetização das condições reais de exposição. Desde 1995, quando foi publicado o primeiro artigo sobre o CPA, reconhece-se a eficiência dos impactadores virtuais alocados em série na concentração de MP_{2,5} sem a ocorrência de muitas perdas por aglomeração de partículas (Sioutas et al., 1995). Além disso, o CPA permite o controle da dose a que os animais são expostos em função do tempo que permanecem nas câmaras. Nos estudos realizados na RMSP, a dose geralmente é fixada em 600µg/m³, valor obtido pela multiplicação da concentração média horária de MP_{2,5} na RMSP (25µg/m³) durante um período de 24hs (25µg/m³ x

24 = 600 μ g/m³). Desse modo é possível garantir que os camundongos foram expostos a uma dose diária constante durante o período de exposições. Outra vantagem da utilização do CPA é a mimetização de uma exposição real, pois os animais inalam o MP_{2,5} concentrado com a composição do MP_{2,5} que está de fato presente na atmosfera da RMSP. Por essas razões, acreditamos que a utilização do CPA foi um meio adequado para responder às questões do estudo.

Estudos apontam que há variação na composição do MP_{2,5} em diferentes regiões do mundo devido às diferenças nas fontes emissoras, condições climáticas e medidas de controle de cada local (de Miranda et al., 2012; Snider et al., 2016). Por esse motivo, neste estudo realizou-se a caracterização da composição do MP_{2,5} coletado no local onde os camundongos foram expostos (jardim da FMUSP). Pela análise da composição do MP_{2,5}, o elemento mais abundante, depois do carbono, foi o enxofre. De acordo com estudos que analisaram o MP_{2,5} na RMSP, o enxofre é um elemento com uma participação significativa na composição do MP_{2,5}, estando bastante relacionado com as emissões veiculares e com o processo de nucleação, que consiste na conversão gás-partícula a partir do dióxido de enxofre (SO₂) e do íon sulfato (SO₄²⁻) (Oyama, 2010; Souza et al., 2014; Andrade et al., 2017; Martins Pereira et al., 2017). Essas informações corroboram nossos achados, já que o local de coleta do MP_{2,5} foi realizado próximo a um cruzamento com intenso tráfego veicular, onde o trânsito fica congestionado em grande parte do dia. Nesses mesmos estudos, porém, observa-se uma participação grande do nitrogênio como um dos principais elementos do MP_{2,5} na forma de nitratos e do íon amônio (NH₄⁺), no entanto não observamos um grande percentual desse elemento em nossos achados. Além disso, a composição dos demais elementos varia bastante de estudo para estudo, possuindo relação com os diferentes locais, períodos de coleta e métodos de análise, sendo que muitas vezes os elementos estão representados na forma de íons, o que dificulta a determinação de uma composição homogênea (Oyama, 2010; Souza et al., 2014; Andrade et al., 2017; Martins Pereira et al., 2017). Apesar de todas essas variações, a composição do MP_{2,5} foi, em grande parte, consistente com os estudos realizados previamente na RMSP.

A escolha de camundongos NZBW fêmeas como modelo animal para a realização do estudo foi feita baseada nas descrições encontradas na literatura. A linhagem NZBW é um modelo experimental de LES bem consolidado, no qual houve

a descoberta de genes relacionados à doença, bem como o entendimento de mecanismos importantes de fisiopatologia (Richard e Gilkeson, 2018). Além disso, muitos estudos terapêuticos para LES utilizam essa linhagem NZBW para avaliar a eficácia de medicamentos antes do início dos testes clínicos (Li et al., 2017). Apesar da ideia geral de que as fêmeas apresentam maior variabilidade devido à influência hormonal do ciclo estral (Wald e Wu, 2010), neste estudo apenas as fêmeas foram utilizadas devido à semelhança com o que ocorre em humanos em relação à prevalência do LES na idade adulta (9 mulheres : 1 homem) (Hahn e Kono, 2013). Existem outros modelos animais de LES, com desenvolvimento da doença mais rápido e com comprometimento renal mais evidente (por exemplo, as linhagens NZM e MRL/lpr) (Hahn e Kono, 2013). No entanto, como esse é um estudo pioneiro, optamos pela utilização da linhagem clássica, que possui mais informações na literatura e características bem definidas de desenvolvimento da doença, no intuito de interpretar melhor os resultados obtidos.

Em nossos resultados, observamos que houve mortes de camundongos da linhagem NZBW durante o período de acompanhamento. A expectativa de início do agravamento (*onset*) das manifestações do LES nas fêmeas NZBW ocorre por volta da 28ª semana de vida (7 meses ou 210 dias) (Hahn e Kono, 2013). Sendo assim, o delineamento experimental foi programado de modo que a eutanásia fosse realizada no *onset*, ou seja, quando os camundongos completassem 7 meses de vida (3 meses de manutenção + 4 meses de exposição). Assim, evitaríamos analisar os camundongos muito precocemente, antes do início das manifestações, e não correríamos o risco de perder muitos animais em decorrência do agravamento do LES após 28 semanas. Desse modo, poderíamos avaliar se a poluição atmosférica seria capaz de alterar o curso da doença ao acelerar o desenvolvimento das manifestações do LES, provocando inclusive a morte dos camundongos. Em um estudo conduzido por Brown et al., observou-se o efeito de diminuição da sobrevivência de camundongos que desenvolvem LES quando expostos à sílica devido a comprometimentos renais como glomerulonefrite avançada e proteinúria elevada (Brown et al., 2003). De fato, a diminuição de sobrevivência também foi observada em nosso estudo. Apenas fêmeas NZBW expostas ao MP_{2,5} (grupo NZBW-CAP) morreram antes do dia programado para a eutanásia por acometimento renal. Além disso, esses camundongos apresentaram um adiantamento de proteinúria quando

comparados aos camundongos NZBW expostos ao ar filtrado, o que corrobora os achados de Brown et al. Contudo, os escores histopatológicos, a deposição de colágeno, complemento C3 e imunocomplexos não apresentaram diferenças entre os camundongos NZBW. Portanto, sugere-se um efeito importante da poluição atmosférica na diminuição da taxa de sobrevivência desses camundongos, cujas condições e mecanismos precisam ser melhor investigados.

Conforme apresentado nos resultados, pudemos acompanhar visualmente a progressão da doença nos camundongos que morreram. Porém, com exceção desses animais, não houve diferenças visuais perceptíveis entre camundongos NZBW expostos e não expostos à poluição atmosférica. A ausência de diferenças durante o período de exposição é uma característica que se repetiu no acompanhamento de peso corporal. A exposição ao MP_{2,5} parece não afetar o peso corporal dos camundongos, embora estudos sugiram que a poluição atmosférica pode estar relacionada com o aumento de obesidade (Wei et al., 2016; An et al., 2018). Contudo, houve diferenças bastante significativas em relação às diferentes linhagens utilizadas. As fêmeas NZBW apresentaram um peso maior desde o começo até o final do estudo em relação às fêmeas C57, o que era esperado devido à característica da linhagem NZBW (JAX, 2020). A utilização de uma linhagem diferente como controle do estudo pode ser justificada pela existência de trabalhos já publicados que realizaram a comparação entre animais NZBW e C57 (Haas et al., 2010; Bates et al., 2015; Zhou et al., 2016). Além disso, o estudo concomitante dessas duas linhagens permite avaliar se os resultados da exposição à poluição observados em animais modelos de LES se comportam de maneira semelhante ou antagônica aos resultados de animais sem predisposição à doença, cujos efeitos decorrentes da exposição à poluição atmosférica já foram amplamente descritos na literatura (Cho et al., 2018).

Uma das características mais importantes para confirmar o diagnóstico de LES em humanos é a detecção de anticorpos anti-DNA em testes sorológicos (Aringer et al., 2019). Geralmente os estudos que utilizam modelos animais de LES realizam a quantificação de anti-DNA como um parâmetro importante (Brown et al., 2003; Bates et al., 2015, 2018). Sabendo disso, realizamos a análise semi-quantitativa para a detecção de anticorpos nas amostras coletadas. Esperava-se obter um aumento de anticorpos anti-DNA nos camundongos NZBW expostos ao

MP_{2,5}, no entanto isso não foi observado. Apesar de não haver diferenças estatísticas significativas entre os grupos, apenas os camundongos NZBW apresentaram anticorpos anti-DNA, porém sem distinção entre o grupo exposto e não exposto ao MP_{2,5}, o que sugere a ausência de influência da poluição atmosférica na produção de anti-DNA, diferentemente dos estudos com sílica, em que houve aumento de anti-DNA nos camundongos expostos (Brown et al., 2003; Bates et al., 2015, 2018). Assim como foi feito com a análise do peso corporal e da urina, seria interessante a realização da detecção de anti-DNA de modo temporal, mês a mês, para avaliar a atividade da doença de modo progressivo. No entanto, preferiu-se não adotar métodos de extração de sangue com camundongos ainda vivos de modo a não causar estresse e desconforto aos camundongos e por causa da dificuldade de trabalhar com o modelo. Por esses motivos, a coleta de sangue foi realizada apenas uma vez, após a eutanásia, sendo que as amostras foram utilizadas para a dosagem dos anticorpos anti-DNA e para a observação de possíveis alterações hematológicas.

Geralmente, pacientes com LES são mais propensos a desenvolverem algumas alterações hematológicas como, por exemplo, anemias (Giannouli et al., 2006). Porém, na análise do eritrograma, não houve alterações significativas indicativas de anemia nos camundongos NZBW. As únicas observações com diferença estatística significativa foram valores mais altos de HCM e CHCM, ou seja, maior concentração de hemoglobina por número e volume de eritrócitos, respectivamente, nos camundongos da linhagem NZBW expostos ao MP_{2,5} quando comparados aos camundongos C57. Porém, não achamos explicações para esses achados na literatura. Um estudo que analisou o hemograma de camundongos NZBW expostos a benzo(a)pireno mostrou menor quantidade de eritrócitos e hemoglobina e maior quantidade de VCM, resultados indicativos de anemia (Booker e White, 2005). Apesar de as médias desses parâmetros se comportarem de maneira semelhante em nosso estudo (quando comparamos o grupo NZBW-CAP com o grupo NZBW-FA), não observamos diferenças estatísticas significativas que possam inferir a ocorrência de anemia em decorrência da exposição ao MP_{2,5}.

Outra característica hematológica comum de pacientes com LES é a trombocitopenia, ou seja, a diminuição do número de plaquetas no sangue, o que aumenta a frequência de hemorragias. O principal mecanismo é a produção de

autoanticorpos contra glicoproteínas presentes na membrana das plaquetas (Fayyaz al., 2015). A ocorrência de trombocitopenia não é relatada em camundongos NZBW. No entanto, em nosso estudo observamos uma diminuição de plaquetas no grupo NZBW-FA e uma tendência de diminuição no grupo NZBW-CAP quando comparados a um dos grupos controle (C57-CAP). Porém, não há diferença entre os grupos NZBW, o que sugere a ausência da interferência do MP_{2,5} no LES. Apesar de a poluição atmosférica estar frequentemente associada com um aumento da atividade pró-trombótica (Robertson e Miller, 2018), não observamos diferenças entre camundongos expostos ou não ao MP_{2,5}, tanto em camundongos controle (C57), quanto em camundongos que desenvolvem LES (NZBW).

Achados interessantes em relação às condições hematológicas foram encontradas na análise do leucograma. Um grande número de pacientes com LES apresenta leucopenia (diminuição de leucócitos totais), sendo a linfopenia (diminuição de linfócitos) a condição mais comum (ACR, 1997; Fayyaz et al., 2015). Isso foi observado em nossos achados: leucopenia e linfopenia no grupo NZBW-FA em relação aos controles (C57-FA). Já o grupo NZBW-CAP (exposto ao MP_{2,5}) apresentou resultados diferentes. Não houve diminuição significativa no número total de leucócitos nem de linfócitos; houve um aumento no número de neutrófilos, que foi significativo em relação ao grupo NZBW-FA. Esse aumento expressivo de neutrófilos (neutrofilia) se mostrou ainda maior em valores de porcentagem, no qual foi possível observar diferença em relação a todos os grupos. Por outro lado, houve diminuição da porcentagem de linfócitos em relação a todos os grupos, mas de acordo com os resultados de número absoluto, essa diminuição percentual não causou linfopenia no grupo NZBW-CAP. Com esses resultados, inferimos que os camundongos NZBW expostos ao MP_{2,5} apresentaram uma expansão de leucócitos, principalmente neutrófilos, contrariando a característica natural da linhagem, de leucopenia. Um estudo recente observou que a razão neutrófilos/linfócitos pode ser um biomarcador indicativo de maior atividade da doença em pacientes com LES (Ma et al., 2019). Portanto, a exposição à poluição atmosférica nos camundongos que desenvolvem LES causou alterações no leucograma, sugerindo um pior prognóstico nos camundongos expostos ao MP_{2,5}.

De modo geral, o peso absoluto (peso fresco) dos órgãos dos camundongos NZBW foi maior do que os camundongos C57, o que já era esperado, pois os

camundongos NZBW apresentaram um peso corporal maior. Porém, realizando o cálculo para obter o peso relativo (divisão pelo peso corporal), obtivemos resultados interessantes. O grupo NZBW-FA apresentou pesos relativos menores do que o grupo controle (C57-FA) em todos os órgãos analisados. Já o grupo NZBW-CAP obteve um valor de peso relativo mais alto, significativamente maior do que o grupo NZBW-FA em todos os órgãos, exceto o coração (no qual houve tendência de aumento). Como não houve diferenças no peso corporal entre esses grupos, o aumento no peso dos órgãos no grupo NZBW-CAP foi significativo, o que indica que a exposição ao MP_{2,5} foi determinante nesses achados.

Dos órgãos analisados, o timo foi o único que apresentou uma diferença entre os animais C57: animais expostos ao MP_{2,5} apresentaram uma diminuição em relação aos expostos ao ar filtrado. O timo é um órgão linfóide primário responsável pela maturação de linfócitos T. Durante os primeiros anos de vida em humanos, e durante as primeiras semanas de vida em camundongos sua atividade é bastante intensa. Porém, apresenta uma involução natural com o avanço da idade, sendo que em camundongos fêmeas C57, há um declínio significativo a partir do 3º mês de vida (Gui et al., 2012; Rezzani et al., 2014). Aparentemente, a poluição atmosférica provocou uma involução mais acelerada do timo, que pode ser explicada por fatores como citocinas pró-inflamatórias (Lynch et al., 2009), as quais podem estar elevadas devido à exposição ao MP_{2,5}. Já nos camundongos NZBW, observou-se o oposto: a exposição ao MP_{2,5} provocou um aumento do timo. Hahn e Kono, ao descreverem os camundongos NZBW, relatam atrofia cortical do timo a partir do 6º mês de idade (Hahn e Kono, 2013), o que pode explicar o baixo peso no grupo NZBW-FA. No entanto, camundongos NZBW expostos à poluição atmosférica apresentaram um aumento do peso relativo do timo, sugerindo uma inibição do processo natural de involução tímica. A hiperplasia do timo pode ocorrer após a indução de algum estresse ou devido ao aumento de folículos linfóides, condições que podem ocorrer em doenças como o LES (Nishino et al., 2006). A poluição atmosférica poderia, portanto, ser um fator desencadeador dessa hiperplasia no timo, contribuindo com a manutenção da atividade tímica e, possivelmente, indicando maior atividade do LES. No entanto, mais análises são necessárias para chegarmos a essas conclusões.

Os resultados de peso relativo do baço e do fígado foram semelhantes entre si. O grupo NZBW-CAP apresentou pesos maiores em relação ao grupo NZBW-FA,

o que corrobora um estudo realizado com camundongos expostos ao benzo(a)pireno (o mesmo estudo que avaliou características do eritrograma de camundongos NZBW), no qual foi observado maior peso do fígado e do baço no grupo exposto (Booker e White, 2005). A esplenomegalia (aumento do tamanho do baço) é uma manifestação do LES tanto em pacientes humanos, quanto em modelos animais, e que está relacionada com o aumento de atividade da doença (Zhang et al., 2020). O baço é um órgão linfóide secundário, no qual há proliferação e diferenciação de linfócitos, que se localizam nos folículos linfóides constituintes da polpa branca do baço (Harris et al., 2009; Zhang et al., 2020). Um dos mecanismos levantados para explicar o aumento do baço é o aumento da função do órgão (semelhante ao que ocorre com outros órgãos linfóides, como as amídalas), que passa a apresentar maior proliferação de linfócitos, caracterizado pela intumescência da polpa branca e dos centros germinativos (locais de concentração de plasmócitos, onde ocorre produção de anticorpos) (Zhang et al., 2020). Semelhantemente ao observado no timo, comparando apenas os camundongos NZBW, os expostos ao MP_{2,5} apresentaram um aumento de peso relativo do baço que pode estar relacionado com a hiperplasia dos folículos linfóides desse órgão, promovendo maior produção de anticorpos e maior atividade do LES. Esses resultados do peso relativo do baço sugerem que a exposição à poluição atmosférica pode alterar esse desfecho em camundongos que desenvolvem LES. No entanto, outras análises, como a avaliação histológica do baço, por exemplo, são necessárias para confirmar essas suposições.

Muitas vezes associada com a esplenomegalia, a hepatomegalia (aumento do fígado) é um achado comum em pacientes com LES, no entanto, as causas para explicar o aumento do fígado ainda não estão muito claras, podendo estar associadas a alterações vasculares, deposição de gordura, doenças metabólicas, hepatite autoimune e uso de medicamentos hepatotóxicos (Guariento et al., 2014). Além disso, sabe-se que há alterações no fígado que não estão diretamente relacionadas à hepatomegalia, mas que estão associadas ao LES, como a hiperplasia nodular difusa (aparecimento de nódulos linfáticos no parênquima hepático) e deposição de imunocomplexos com consequente ativação de inflamação sistêmica (Cojocar et al., 2013; Fang et al., 2018). Em nossos achados, houve aumento do peso relativo do fígado nos animais NZBW expostos ao MP_{2,5} em relação aos NZBW não expostos, o que nos mostra que a poluição atmosférica teve

um papel importante no aumento do peso do órgão nos camundongos que desenvolvem LES. Futuramente, com uma análise mais detalhada do fígado, será possível investigar mais a fundo as alterações observadas para desvendar quais mecanismos ocasionaram esse aumento.

No coração, a poluição atmosférica está relacionada com infarto do miocárdio, hipertrofia, fibrose e alterações funcionais (Liu et al., 2015). Wold e colegas observaram aumento do peso relativo do coração em animais C57 expostos ao MP_{2,5} concentrado, bem como aumento dos marcadores de hipertrofia e fibrose (Wold et al., 2012). Porém, diferentemente, nossos achados mostraram ausência de diferença significativa do peso relativo do coração entre os grupos C57-FA e C57-CAP. Também não houve diferença significativa entre os camundongos NZBW, apenas uma tendência de aumento no grupo exposto ao MP_{2,5}. As alterações cardíacas mais características da linhagem NZBW são depósitos de imunocomplexos, presença de infiltrados inflamatórios, e fibrose das válvulas cardíacas (Sanghera et al., 2019). Portanto, pretendemos posteriormente avaliar se a exposição ao MP_{2,5} foi capaz de agravar ou intensificar essas alterações no coração dos camundongos NZBW. Com isso será possível verificar se a poluição atmosférica exerce efeitos nesse órgão, apesar da ausência de diferença no peso relativo.

Pelo fato de o trabalho ter sido realizado dando ênfase na avaliação sistêmica e, principalmente, nas manifestações renais (discutidas a seguir), os achados em relação ao timo, baço e fígado e coração não foram investigados a fundo, apesar de apresentarem resultados interessantes. No entanto, esses achados abrem possibilidades para que sejam investigados futuramente, de forma a complementar esta dissertação no sentido de fornecer melhor compreensão sobre a influência da poluição atmosférica no LES.

Os rins são um dos órgãos mais afetados pelo LES, inicialmente, devido à deposição de imunocomplexos nos glomérulos, o que tem como consequência a ativação de respostas inflamatórias que ocasionam destruição da BFG e aumento de fibrose tecidual (Yung e Chan, 2015). Para avaliar a progressão da doença nos rins durante o período de exposições, ou seja, com os animais ainda vivos, foi realizada a análise bioquímica da urina para detecção da excreção de proteínas totais (proteinúria) e de albumina (albuminúria). Ambos os testes, quando normalizados

pela creatinina excretada (creatininúria), são bons indicadores da excreção de proteínas 24hs, mesmo as amostras sendo de urinas isoladas (Cheetham et al., 2009; Pandya e Hayden, 2014). Em nosso estudo, os camundongos não foram colocados em gaiolas metabólicas primeiramente para evitar o estresse e também porque eles não poderiam ficar 24hs nas gaiolas, já que eles tinham que ser expostos ao MP_{2,5} diariamente. Tanto a RPC quanto a RAC são utilizadas como marcadores de lesão renal, sendo a principal diferença a especificidade da RAC na detecção de albumina, que é a principal proteína excretada quando há prejuízo da função renal. Em alguns estudos, porém, a RAC se mostra menos sensível do que a RPC (Fisher et al., 2013; Pandya e Hayden, 2014). Em nossos achados, não observamos diferenças significativas entre os grupos na RAC. O grupo NZBW-CAP até apresentou uma média aparentemente maior, porém houve um desvio muito grande dentro desse grupo. Portanto, observando apenas a RAC, a exposição ao MP_{2,5} não foi um fator que contribuiu com uma piora da lesão renal nos camundongos NZBW. Nessa análise, a linhagem também não foi um fator relevante, pois camundongos NZBW e C57 não apresentaram diferenças.

Já na análise da RPC, houve diferenças significativas entre os grupos em todos os meses de acompanhamento. No mês 0 e no mês 1 o grupo C57-FA apresentou RPC maior em relação aos grupos NZBW. Camundongos são animais que naturalmente desenvolvem proteinúria (Bernstein, 1966), sendo que a RPC nas fêmeas C57 tem um valor aproximado de 4,9 (Cheetham et al., 2009). Supomos que nesses meses iniciais as fêmeas NZBW ainda não haviam iniciado o processo de injúria renal. A piora da função renal, com o aparecimento de proteinúria é uma característica do modelo NZBW, sendo comum aparecer entre 5 a 7 meses de idade (Hahn e Kono, 2013), o que equivale ao período compreendido entre o mês 2 e o mês 4, já que o início da exposição (mês 0) ocorreu aos 90 dias de idade (3 meses de idade). De fato, no mês 2 o grupo NZBW-CAP começou a apresentar um aumento da RPC, significativamente maior ao grupo NZBW-FA, o que sugere um adiantamento do início do *onset* de proteinúria nos camundongos NZBW que foram expostos ao MP_{2,5}. No mês 3 houve aumento da RPC no grupo NZBW-CAP, enquanto a RPC do grupo NZBW-FA permaneceu constante, o que corrobora a hipótese de adiantamento do *onset* de proteinúria no grupo LES-poluído. No mês 4, porém, o grupo NZBW-FA apresentou um aumento expressivo da RPC, anulando a

diferença em relação ao grupo LES-poluído, que continuou com um valor alto de RPC. Portanto, pelos resultados da RPC, a exposição ao MP_{2,5} aparentemente provocou alteração no curso da doença nos camundongos NZBW em relação à função renal: o *onset* de proteinúria no grupo LES-poluído ocorreu cerca de dois meses antes do *onset* no grupo LES-filtrado.

Na literatura, há alguns estudos epidemiológicos cujos resultados corroboram essa hipótese de piora da função renal devido à exposição ao MP_{2,5} (Bernatsky et al., 2011; Xu et al., 2016; Goulart et al., 2020). Recentemente, em um estudo realizado com crianças e adolescentes diagnosticadas com LESJ residentes na cidade de São Paulo, foi observado um aumento de proteinúria, leucocitúria (presença de leucócitos na urina) e hematúria (presença de hemácias na urina) subsequentes a aumentos na concentração de MP_{2,5}, o que sugere que a poluição atmosférica pode estar associada com a ativação de respostas inflamatórias nos rins de pacientes com LESJ, prejudicando a função renal dessas crianças expostas continuamente aos poluentes (Goulart et al., 2020). Semelhantemente, outros estudos observaram comprometimento da função renal em pacientes adultos de LES associado à exposição ao MP_{2,5} (Bernatsky et al., 2011) e aumento do risco de nefropatias, incluindo a nefrite lúpica, decorrente da exposição a longo termo ao poluentes atmosféricos (Xu et al., 2016). Em relação a modelos experimentais utilizando animais, ainda não foram realizados estudos para avaliar os efeitos da exposição atmosférica na piora da função renal no LES. O que se tem de semelhante são trabalhos que observaram aumento de proteinúria em camundongos predispostos ao desenvolvimento de LES como efeito da exposição à sílica (Brown et al., 2003, 2004; Bates et al., 2015). Além disso, nesses estudos, a análise mais detalhada dos rins mostrou alterações importantes, como alterações histológicas, por exemplo, que corroboraram os resultados de proteinúria, reforçando a hipótese de prejuízo da função renal causada pela exposição à sílica (Brown et al., 2003, 2004; Bates et al., 2015). Em nosso estudo, também realizamos análises mais minuciosas em relação ao rim, que nos forneceram resultados interessantes e que serão discutidos nos parágrafos seguintes.

Primeiramente, em relação ao peso relativo do rim, seguindo os resultados de baço, fígado e timo, novamente houve diferença significativa entre animais NZBW: o grupo exposto ao MP_{2,5} apresentou um peso maior quando comparado ao grupo

exposto ao ar filtrado. De acordo com Craig e colegas, o aumento no peso absoluto dos rins é um parâmetro importante a ser considerado na avaliação de doenças renais, possuindo forte relação com a gravidade das lesões observadas na histopatologia desse órgão (Craig et al., 2015). Em nosso estudo, utilizamos o valor de peso relativo dos órgãos devido ao fato de termos o grupo controle com peso corporal médio diferente da linhagem NZBW, o que inviabilizaria a comparação do peso absoluto entre as diferentes linhagens. Para os rins, de fato, a diferença é bem grande. Os camundongos C57 apresentam um peso médio que varia entre 0,153-162g, ao passo que os NZBW tem um peso médio entre 0,203-0,262g. Porém, no intuito de comparar apenas os grupos que desenvolvem LES, sabendo que eles não possuem diferença no peso corporal, realizamos a análise do peso absoluto do rim, e observamos que os camundongos expostos ao MP_{2,5} apresentam um peso significativamente maior em relação aos expostos ao ar filtrado. Portanto, a poluição atmosférica provocou um aumento significativo do peso absoluto do rim nos camundongos NZBW, sugerindo, de acordo com Craig et al., que as alterações histopatológicas características do LES poderiam estar mais agravadas nesses camundongos.

Uma das análises realizadas para investigar mais a fundo o aumento de peso dos rins foi a aferição do volume dos compartimentos renais (córtex, medula, pelve e papila) pelo método estereológico de Cavalieri. Observamos com essa análise que os camundongos NZBW expostos ao MP_{2,5} apresentaram um aumento do volume do córtex em valores de proporção (em relação ao controle) e em valores absolutos (em relação a todos os grupos, incluindo o grupo NZBW-FA). O aumento do córtex renal pode ocorrer devido à hipertrofia dos néfrons, caracterizada por glomérulos maiores e túbulos mais largos (Denic et al., 2016). Essa condição está associada com uma maior taxa de filtração glomerular e com uma ocorrência mais frequente de albuminúria (Elsherbiny et al., 2014; Denic et al., 2016). A hipertrofia dos néfrons pode ocorrer por mecanismos compensatórios, quando há perda de néfrons devido à progressão da doença. Os néfrons remanescentes, então, se tornam hipertróficos, o que aumenta a taxa de filtração glomerular e permite a passagem de proteínas pela barreira, aumentando a propensão ao desenvolvimento de complicações como a esclerose glomerular (Kriz e Lehir, 2005; Schnaper, 2017). Em nossos achados, porém, não observamos diferenças significativas entre os grupos no volume médio

dos glomérulos, o que sugere que o aumento do volume do córtex não foi causado pela hipertrofia dos glomérulos. No entanto, outros mecanismos podem estar afetados.

O alargamento da junção glomérulo-tubular é uma das consequências do aumento da filtração glomerular, que pode estar associada com a formação de crescentes nessa região da junção, sendo que a porção inicial do túbulo proximal passa a ser incorporada pelo crescente (Kriz e Lehir, 2005). Essa alteração na junção glomérulo-tubular foi uma das principais características observadas em nossa análise histopatológica. De fato, as alterações glomerulares com significância estatística (crescentes, hipertrofia capsular e dilatação do espaço), que foram mais frequentes nos grupos NZBW-FA e NZBW-CAP, estavam predominantemente situadas nessa região da junção glomérulo-tubular. As outras alterações que foram estatisticamente significantes na análise histopatológica foram a presença de infiltrados inflamatórios e de depósitos hialinos no interstício (principalmente na região da medula renal), bem como uma maior quantidade de macrófagos (mais frequentes nos infiltrados e ao redor da cápsula renal) também mais frequentes nos grupos NZBW-FA e NZBW-CAP. A região túbulo-intersticial é afetada pela passagem de proteínas não filtradas, que em excesso ativam e geram um estresse muito grande às células tubulares induzindo a liberação de citocinas, ERO e marcadores de hipóxia. Essas moléculas promovem um estado pró-inflamatório e pró-fibrótico com recrutamento de células imunes e deposição de matriz extracelular, cuja progressão causa a perda do néfron devido aos processos de destruição tecidual e fibrose (Kriz e Lehir, 2005; Schnaper, 2017). Portanto, nossos achados em relação às alterações histopatológicas nos camundongos NZBW podem estar relacionados com esses mecanismos de injúria tecidual nos glomérulos e nos túbulos renais.

De modo geral, na análise histopatológica não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à exposição ao MP_{2,5} tanto nos camundongos controles quanto nos camundongos que desenvolvem LES. As diferenças foram mais influenciadas pela linhagem, sendo os camundongos NZBW os que apresentaram uma maior quantidade de alterações indicativas de pior prognóstico. Também não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à quantidade de macrófagos e à deposição de complemento C3, de imunoglobulina IgG e de

colágeno, avaliadas pelas técnicas de imunohistoquímica e picrossirius-hematoxilina, respectivamente. Esperava-se um aumento da quantificação de imunocomplexos e de fibrose nos camundongos NZBW, pois a progressão da nefrite lúpica é marcada por essas alterações características (Anders e Fogo, 2014). Outras lesões características de nefrite lúpica, como espessamento de membrana basal e expansão das células mesangiais, também não apresentaram diferenças entre os grupos. Portanto, apesar do *onset* de proteinúria ser adiantado, a exposição à poluição atmosférica, pela análise histológica, não modifica a progressão da nefrite lúpica nos camundongos NZBW.

Nos últimos anos, alguns trabalhos têm estudado mais detalhadamente os efeitos dos poluentes atmosféricos sobre os rins, que são órgãos suscetíveis aos efeitos tóxicos dos poluentes devido a sua função de filtração (Xu et al., 2018). Busso e colegas observaram exacerbação da inflamação, aumento de infiltrados inflamatórios e fibrose tecidual em camundongos submetidos à exposição ao MP_{2,5} (Busso et al., 2018). Semelhantemente, Nemmar e colegas observaram aumento de estresse oxidativo, inflamação e danos ao DNA em camundongos expostos a partículas (Nemmar et al., 2016). Os mecanismos mais evidentes de injúria renal causada poluição atmosférica estão relacionados principalmente com o aumento das respostas inflamatórias e do estresse oxidativo. No entanto, mecanismos indiretos causados pelos poluentes (como alteração do sistema nervoso autônomo, aumento de pressão sanguínea e maior viscosidade plasmática, por exemplo) também podem afetar a vascularização dos rins, comprometendo a função renal (Afsar et al., 2019). Na nefrite lúpica, os principais mecanismos também estão relacionados com a inflamação, caracterizada pela deposição de imunocomplexos e evolução para fibrose (Anders e Fogo, 2014). E cada vez mais se estuda o papel do estresse oxidativo nas lesões renais do LES (Jiang et al., 2014; Bona et al., 2020). Portanto, para investigar possíveis mecanismos relacionados com as alterações histopatológicas observadas nos rins, realizamos a análise de expressão gênica de mediadores inflamatórios e a quantificação de moléculas relacionadas com o balanço de estresse oxidativo, cujos achados serão discutidos a seguir.

Um dos marcadores inflamatórios analisados foi o NF- κ B. O NF- κ B é um fator de transcrição cujo aumento de expressão em células do sistema imune, principalmente macrófagos, está relacionada com a síntese de citocinas pró-

inflamatórias, as quais contribuem para a progressão da nefrite lúpica devido ao recrutamento de mais células inflamatórias e ativação de mecanismos de injúria tecidual (Jiang et al., 2014; Chalmers et al., 2019). Estudos apontam que o NF- κ B também pode ser expresso pelas próprias células do parênquima renal (incluindo podócitos, células mesangiais e células tubulares). A ativação do NF- κ B nessas células está correlacionada com a progressão de processos inflamatórios por um mecanismo de retroalimentação positiva, o que intensifica as lesões e o acometimento das funções renais (Sanz et al., 2010; Zhang e Sun, 2015). Em nossos achados, observamos aumento da expressão de NF- κ B no grupo NZBW-CAP em relação ao grupo C57-CAP, o que sugere aumento da atividade desse fator de transcrição na linhagem que desenvolve LES. Porém não houve diferença significativa entre camundongos NZBW, sugerindo que a cascata de sinalização celular ativada por NF- κ B não foi influenciada pela exposição ao MP_{2,5} nos camundongos que desenvolvem LES.

A expressão de TGF- β não apresentou diferenças entre os grupos analisados, o que corrobora os achados da análise da deposição de colágeno feita com a coloração picrossirius-hematoxilina. TGF- β é uma citocina considerada como principal reguladora da fibrose renal. Suas principais ações incluem aumento da síntese de proteínas da matriz extracelular, inibição da degradação dessas proteínas e transformação de células epiteliais residentes em mesangiais, o que promove a progressão da fibrose no parênquima renal (Meng et al., 2016; Isaka, 2018). Além disso, o TGF- β também possui um papel importante protetor ao agir como uma citocina anti-inflamatória, induzindo a apoptose das células lesionadas e diminuindo a destruição tecidual causada pelas metaloproteinases e pela ativação de NF- κ B com a finalidade de reparar os danos causados pela inflamação (Sureshbabu et al., 2016; Gu et al., 2020). Era esperado um aumento da expressão de TGF- β nos camundongos com maior lesão renal, no caso, os camundongos NZBW. Porém, isso não foi observado em nossos achados. Considerando a análise das alterações histopatológicas, em que os camundongos NZBW apresentaram maiores escores indicativos de maior lesão tecidual, sugerimos que as respostas pró-inflamatórias estavam mais exacerbadas em relação às respostas pró-fibróticas, por isso não houve aumento de TGF- β . No entanto, mais análises são necessárias para chegarmos a essas conclusões.

Em relação à análise pró-oxidante (atividade de NADPHox e dosagem de H_2O_2) não houve diferenças entre os grupos, apesar da tendência de aumento nos camundongos NZBW. A atividade da enzima NADPHox consiste na transferência de elétrons no NADPH para o oxigênio, o que leva à formação de ERO, como o superóxido, por exemplo, que é bastante reativo (Sedeek et al., 2013; Shah et al., 2014). O superóxido, por ação da enzima superóxido dismutase é convertido em peróxido. O peróxido, por sua vez, pode ocasionar a formação de mais ERO, dentre elas o radical hidroxila, que também é bastante nocivo (Shah et al., 2014). Nos rins, o aumento de NADPHox está relacionado com o aumento de estresse oxidativo e injúria renal (Sedeek et al., 2013). Baseado em estudos prévios, era esperado um aumento da atividade pró-oxidante nos camundongos expostos ao $MP_{2.5}$ (Nemmar et al., 2016; Hsu et al., 2019). Contudo, isso não foi observado em nossos achados. Além disso, também era esperado um aumento de atividade pró-oxidante no LES, como consequência do aumento da atividade da doença relacionada aos processos inflamatórios e de injúria tecidual (Perl, 2013; Smallwood et al., 2018). No entanto, não houve diferenças significativas indicativas de aumento de ERO nesses camundogños.

Contrariamente, porém, houve aumento da atividade antioxidante não enzimática, medida pela técnica FRAP, nos camundongos NZBW quando comparados aos controles do estudo. Nessa técnica, os agentes oxidantes não enzimáticos reduzem o ferro Fe^{3+} para Fe^{2+} ocasionando uma mudança de cor que é detectada pelo espectrofotômetro. Trata-se, portanto, de uma técnica que mede a atividade antioxidante geral. Os principais agentes antioxidantes que reagem com o ferro nessa técnica são principalmente vitaminas (C e E), ácido úrico, bilirrubina, catequinas e flavonóides (Benzie e Devaki, 2017). Com o aumento das lesões renais era esperado o aumento da ação pró-oxidante e diminuição da ação antioxidante, situação favorável à geração de ERO causadoras de danos teciduais (Shah et al., 2014). No entanto, observamos o oposto, o aumento da atividade antioxidante nos camundongos com mais alterações histopatológicas (camundongos NZBW). Há a possibilidade de que tenha ocorrido o aumento da atividade antioxidante para compensar e controlar a atividade pró-oxidante, o que explicaria a ausência de diferenças entre os grupos na dosagem de substâncias pró-oxidantes. No entanto, mais análises, por exemplo, da atividade de enzimas antioxidantes, como catalase e

glutathiona, por exemplo, são necessárias para elucidar melhor esse desfecho observado.

Por fim, devido ao caráter espontâneo de desenvolvimento do LES nos camundongos NZBW, houve uma variabilidade considerável em relação ao aparecimento das manifestações dentro dos grupos de camundongos NZBW, o que levou à apresentação, em alguns casos, de resultados com grandes erros e desvios padrões. Além disso, apesar de ser um assunto controverso, a utilização de somente fêmeas pode ter potencializado essa variabilidade devido à variação hormonal relacionada ao ciclo estral, a qual pode influenciar os desfechos observados (Wald e Wu, 2010). Essas variações intra-grupo dificultaram a análise estatística e a obtenção de resultados mais robustos e significativos (de fato, em muitos desfechos houve tendências de diferença de um grupo em relação ao outro, sem significância estatística). Apesar dessas dificuldades e limitações, foi possível observar alguns efeitos negativos decorrentes da exposição ao $MP_{2,5}$ nos camundongos NZBW, corroborando, em parte, achados de estudos epidemiológicos nos quais se demonstra um aumento da atividade do LES. Portanto, de modo geral, os dados apontam para a direção de que a poluição atmosférica exerce influência sobre o agravamento do LES, provocando alterações no curso dessa doença.

6. CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que a poluição atmosférica exerce influência sobre a exacerbação de algumas manifestações do LES em animais predispostos ao desenvolvimento dessa doença, sendo a menor taxa de sobrevida, o aumento do peso dos rins, o adiantamento de proteinúria e o aumento de neutrófilos circulantes as alterações mais relevantes. Desse modo, podemos afirmar que houve alterações no curso da doença devido à exposição ao MP_{2,5}, com mecanismos a ser melhor investigados. Nesse sentido, ressalta-se a importância de estudos complementares para melhor entendimento da relação entre poluição atmosférica e LES e uma atenção maior para iniciativas e intervenções com objetivo de diminuição dos níveis de poluentes atmosféricos, os quais podem acarretar consequências negativas importantes para pacientes diagnosticados com LES.

7. ANEXOS

Justificativa do trabalho

Tendo em vista a necessidade de estudos que investiguem a associação entre poluição atmosférica e LES, esse trabalho se mostra relevante para auxiliar em uma melhor compreensão sobre esse tema. A poluição atmosférica é um problema mundial sério que afeta bilhões de pessoas pelo mundo. Esses indivíduos estão expostos continuamente aos poluentes, portanto os efeitos da exposição sobre a saúde precisam ser melhor esclarecidos. O LES é uma dentre várias desordens que parecem ser exacerbadas pela poluição atmosférica. Porém, ainda não existem estudos detalhando quais são as alterações provocadas pelos poluentes que poderiam agravar as manifestações clínicas dessa doença autoimune. Portanto, esse trabalho, que utiliza um modelo animal que desenvolve espontaneamente manifestações clínicas do LES, permite investigar de modo mais minucioso as possíveis alterações causadas pela exposição à poluição atmosférica, além de levantar hipóteses de possíveis mecanismos associados. Assim, pretendemos contribuir com a formação de conhecimento nessa área, agregando informações com outros estudos para elucidar melhor a associação entre poluição atmosférica e LES e para enfatizar a necessidade de diminuição dos poluentes.

8. REFERÊNCIAS

Achilleos S, Kioumourtzoglou MA, Wu C, Schwartz JD, Koutrakis P, Papatheodorou SI. Acute effects of fine particulate matter constituents on mortality: A systematic review and meta-regression analysis. *Environ Int*. 2017;109:89-100. doi: 10.1016/j.envint.2017.09.010.

Afsar B, Afsar RE, Kanbay A, Covic A, Ortiz A, Kanbay M. Air pollution and kidney disease: review of current evidence. *Clin Kidney J*. 2019;12(1):19-32. doi: 10.1093/ckj/sfy111

Alves AGF, Giacomini MFA, Braga ALF, Sallum AME, Pereira LAA, Farhat LC, et al. Influence of air pollution on airway inflammation and disease activity in childhood-systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2018;37(3):683-90. doi: 10.1007/s10067-017-3893-1.

American College of Rheumatology (ACR). 1997 Update of the 1982 American College of Rheumatology Revised Criteria for Classification of Systemic Lupus Erythematosus [PDF]. 1997. Disponível em: <https://www.rheumatology.org/Portals/0/Files/1997%20Update%20of%201982%20Revised.pdf>.

An R, Ji M, Yan H, Guan C. Impact of ambient air pollution on obesity: a systematic review. *Int J Obes (Lond)*. 2018;42(6):1112-26. doi: 10.1038/s41366-018-0089-y.

Anders H, Fogo AB. Immunopathology of lupus nephritis. *Semin Immunopathol*. 2014;36(4):443-59. doi: 10.1007/s00281-013-0413-5.

Anderson JO, Thundiyil JG, Stolbach A. Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *J Med Toxicol*. 2012;8(2):166-75. doi: 10.1007/s13181-011-0203-1.

Andrade MF, Kumar P, Freitas ED, Ynoue RY, Martins J, Martins LD, et al. Air quality in the megacity of São Paulo: Evolution over the last 30 years and future perspectives. *Atmos Environ*. 2017;159:66-82. doi: 10.1016/j.atmosenv.2017.03.051.

Annamalai J, Namasivayam V. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: their effects on humans and wildlife. *Environ Int*. 2015;76:78-97. doi: 10.1016/j.envint.2014.12.006.

Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(9):1400-12. doi: 10.1002/art.40930.

Barbhaiya M, Costenbader KH. Environmental exposures and the development of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2016;28(5):497-505. doi: 10.1097/BOR.0000000000000318.

Bates MA, Akbari P, Gilley KN, Wagner JG, Li N, Kopec AK, et al. Dietary docosahexaenoic acid prevents silica-induced development of pulmonary ectopic

germinal centers and glomerulonephritis in the lupus-prone NZBWF1 mouse. *Front Immunol.* 2018;9:2002. doi: 10.3389/fimmu.2018.02002.

Bates MA, Brandenberger C, Langohr I, Kumagai K, Harkema JR, Holian A, Pestka JJ. Silica triggers inflammation and ectopic lymphoid neogenesis in the lungs in parallel with accelerated onset of systemic autoimmunity and glomerulonephritis in the lupus-prone NZBWF1 mouse. *PLoS One.* 2015;10(5):e0125481. doi: 10.1371/journal.pone.0125481.

Benzie IF, Devaki M. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: Concepts, procedures, limitations and applications. In: Apak R, Capanoglu E, Shahidi F. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications*. Nova Jersey: John Wiley & Sons; 2018. Chap.5, p.77-106. doi: 10.1002/9781119135388.

Bernatsky S, Fournier M, Pineau CA, Clarke AE, Vinet E, Smargiassi A. Associations between ambient fine particulate levels and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Environ Health Perspect.* 2011;119(1):45-9. doi: 10.1289/ehp.1002123.

Bernstein SE. Physiological Characteristics. In: Green EL. *Biology of the Laboratory Mouse*. 2nd ed. New York: Dover Publications; 1966. Chap.16.

Block ML, Calderón-Garcidueñas L. Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. *Trends Neurosci.* 2009;32(9):506-16. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.009.

Bona N, Pezzarini E, Balbi B, Daniele SM, Rossi MF, Monje AL, et al. Oxidative stress, inflammation and disease activity biomarkers in lupus nephropathy. *Lupus.* 2020;29(3):311-23. doi: 10.1177/0961203320904784.

Booker CD, White Jr KL. Benzo (a) pyrene-induced anemia and splenomegaly in NZB/WF1 mice. *Food Chem Toxicol.* 2005;43(9):1423-31. doi: 10.1016/j.fct.2005.03.018.

Brown JM, Archer AJ, Pfau JC, Holian A. Silica accelerated systemic autoimmune disease in lupus-prone New Zealand mixed mice. *Clin Exp Immunol.* 2003;131(3):415-21. doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02094.x.

Brown JM, Pfau JC, Holian A. Immunoglobulin and lymphocyte responses following silica exposure in New Zealand mixed mice. *Inhal Toxicol.* 2004;16(3):133-9. doi: 10.1080/08958370490270936.

Busso IT, Mateos AC, Juncos LI, Canals N, Carreras HA. Kidney damage induced by sub-chronic fine particulate matter exposure. *Environ Int.* 2018;121(Pt 1):635-42. doi: 10.1016/j.envint.2018.10.007.

Cañas CA, Canas F, Bonilla-Abadía F, Ospina FE, Tobón GJ. Epigenetics changes associated to environmental triggers in autoimmunity. *Autoimmunity.* 2016;49(1):1-11. doi: 10.3109/08916934.2015.1086996.

Carter EE, Barr SG, Clarke AE. The global burden of SLE: prevalence, health disparities and socioeconomic impact. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(10):605-20. doi: 10.1038/nrrheum.2016.137.

Chalmers SA, Garcia SJ, Reynolds JA, Herlitz L, Putterman C. NF- κ B signaling in myeloid cells mediates the pathogenesis of immune-mediated nephritis. *J Autoimmun*. 2019;98:33-43. doi: 10.1016/j.jaut.2018.11.004.

Cheetham SA, Smith AL, Armstrong SD, Beynon RJ, Hurst JL. Limited variation in the major urinary proteins of laboratory mice. *Physiol Behav*. 2009;96(2):253-61. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.10.005.

Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD. Liver involvement in patients with systemic autoimmune diseases. *Maedica (Buchar)*. 2013;8(4):394-7.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). *Qualidade do Ar*. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/ar/>. Acesso: 03 de maio de 2020.

Conticini E, Frediani B, Caro D. Can atmospheric pollution be considered a co-factor in extremely high level of SARS-CoV-2 lethality in Northern Italy? *Environ Pollut*. 2020; 261:114465. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114465.

Craig EA, Yan Z, Zhao QJ. The relationship between chemical-induced kidney weight increases and kidney histopathology in rats. *J Appl Toxicol*. 2015;35(7):729-36. doi: 10.1002/jat.3036.

Cutler D, Dominici F. A breath of bad air: cost of the Trump environmental agenda may lead to 80 000 extra deaths per decade *JAMA*. 2018;319(22):2261-2. doi: 10.1001/jama.2018.7351.

Darbre PD. Overview of air pollution and endocrine disorders. *Int J Gen Med*. 2018;11:191-207. doi: 10.2147/IJGM.S102230.

Davidson A. What is damaging the kidney in lupus nephritis? *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(3):143-53. doi: 10.1038/nrrheum.2015.159.

Delanghe JR, Speeckaert MM. Creatinine determination according to Jaffe—what does it stand for? *NDT Plus*. 2011;4(2):83-6. doi: 10.1093/ndtplus/sfq211.

Denic A, Alexander MP, Kaushik V, Lerman LO, Lieske JC, Stegall MD, et al. Detection and clinical patterns of nephron hypertrophy and nephrosclerosis among apparently healthy adults. *Am J Kidney Dis*. 2016;68(1):58-67. doi: 10.1053/j.ajkd.2015.12.029.

Domenico MD, Benevenuto SGM, Tomasini PP, Yariwake VY, Alves NO, Rahmeier FL, et al. Concentrated ambient fine particulate matter (PM_{2.5}) exposure induce brain damage in pre and postnatal exposed mice. *Neurotoxicology*. 2020;79:127-41. doi: 10.1016/j.neuro.2020.05.004.

Dubois EL, Horowitz RE, Demopoulos HB, Teplitz R. NZB/NZW mice as a model of systemic lupus erythematosus. *JAMA*. 1966;195(4):285-9.

Elsherbiny HE, Alexander MP, Kremers WK, Park WD, Poggio ED, Prieto M, Lieske JC, Rule AD. Nephron hypertrophy and glomerulosclerosis and their association with kidney function and risk factors among living kidney donors. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(11):1892-902. doi: 10.2215/CJN.02560314.

Fang X, Zaman MH, Guo X, Ding H, Xie C, Zhang X, Deng G. Role of hepatic deposited immunoglobulin G in the pathogenesis of liver damage in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol*. 2018;9:1457. doi: 10.3389/fimmu.2018.01457.

Farhat SCL, Silva CA, Orione MAM, Campos LMA, Sallum AME, Braga ALF. Air pollution in autoimmune rheumatic diseases: a review. *Autoimmun Rev*. 2011;11(1):14-21. doi: 10.1016/j.autrev.2011.06.008.

Fayyaz A, Igoe A, Kurien BT, Danda D, James JA, Stafford HA, Scofield RH. Haematological manifestations of lupus. *Lupus Sci Med*. 2015;2(1):e000078. doi: 10.1136/lupus-2014-000078.

Fernandes EC, Silva CA, Braga ALF, Sallum AME, Campos LMA, Farhat SCL. Exposure to Air Pollutants and Disease Activity in Juvenile-Onset Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015;67(11):1609-14. doi: 10.1002/acr.22603.

Fiordelisi A, Piscitelli P, Trimarco B, Coscioni E, Iaccarino G, Sorriento D. The mechanisms of air pollution and particulate matter in cardiovascular diseases. *Heart Fail Rev*. 2017;22(3):337-47. doi: 10.1007/s10741-017-9606-7.

Fisher H, Hsu C, Vittinghoff E, Lin F, Bansal N. Comparison of associations of urine protein-creatinine ratio versus albumin-creatinine ratio with complications of CKD: a cross-sectional analysis. *Am J Kidney Dis*. 2013;62(6):1102-8. doi: 10.1053/j.ajkd.2013.07.013.

Flores-Mendoza G, Sansón SP, Rodríguez-Castro S, Crispín JC, Rosetti F. Mechanisms of tissue injury in lupus nephritis. *Trends Mol Med*. 2018;24(4):364-78. doi: 10.1016/j.molmed.2018.02.003.

Gautam S, Yadav A, Tsai C, Kumar P. A review on recent progress in observations, sources, classification and regulations of PM 2.5 in Asian environments. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016;23(21):21165-75. doi: 10.1007/s11356-016-7515-2.

Gawda A, Majka G, Nowak B, Marcinkiewicz J. Air pollution, oxidative stress, and exacerbation of autoimmune diseases. *Cent Eur J Immunol*. 2017;42(3):305-12. doi: 10.5114/ceji.2017.70975.

Gergianaki I, Bortoluzzi A, Bertsias G. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2018;32(2):188-205. doi: 10.1016/j.berh.2018.09.004.

Ghio AJ, Carraway MS, Madden MC. Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2012;15(1):1-21. doi: 10.1080/10937404.2012.632359.

Ghodke-Puranik Y, Niewold TB. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: a comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015;64:125-36. doi: 10.1016/j.jaut.2015.08.004.

Giannouli S, Voulgarelis M, Ziakas PD, Tzioufas AG. Anaemia in systemic lupus erythematosus: from pathophysiology to clinical assessment. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(2):144-8. doi:10.1136/ard.2005.041673

Gilcrease GW, Padovan D, Heffler E, Peano C, Massaglia S, Roccatello D, et al. Is air pollution affecting the disease activity in patients with systemic lupus erythematosus? State of the art and a systematic literature review. *Eur J Rheumatol.* 2020;7(1):31-4. doi: 10.5152/eurjrheum.2019.19141.

Glencross DA, Ho T, Camiña N, Hawrylowicz CM, Pfeffer PE. Air pollution and its effects on the immune system. *Free Radic Biol Med.* 2020;151:56-68. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.179.

Goulart MFG, Alves AGF, Farhat J, Braga ALF, Pereira LAA, Lichtenfels AJFC, et al. Influence of air pollution on renal activity in patients with childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Pediatr Nephrol.* 2020;35(7):1247-55. doi: 10.1007/s00467-020-04517-3.

Gu Y, Liu X, Huang X, Yu X, Lan H. Diverse Role of TGF- β in Kidney Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:123. doi: 10.3389/fcell.2020.00123.

Guariento A, Silva MFC, Tassetano PSF, Rocha SMS, Campos LMA, Valente M, Silva CA. Liver and spleen biometrics in childhood-onset systemic lupus erythematosus patients. *Rev Bras Reumatol.* 2015;55(4):346-51. doi: 10.1016/j.rbr.2014.12.010

Gui J, Mustachio LM, Su D, Craig RW. Thymus size and age-related thymic involution: early programming, sexual dimorphism, progenitors and stroma. *Aging Dis.* 2012;3(3):280-90.

Gulati G, Brunner HI. Environmental triggers in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 2018;47(5):710-7. doi: 10.1016/j.semarthrit.2017.10.001.

Haas KM, Watanabe R, Matsushita T, Nakashima H, Ishiura N, Okochi H, Fujimoto M, Tedder TF. Protective and pathogenic roles for B cells during systemic autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J Immunol.* 2010;184(9):4789-800. doi: 10.4049/jimmunol.0902391.

Hahn BH, Kono D. Animal models of SLE. In: Wallace DJ, Hahn BH. *Dubois' lupus erythematosus and related syndromes*. 8th ed. Philadelphia: Saunders; 2013. Chap.17, p.190-236. doi: 10.1016/C2010-0-66018-4.

Harris AA, Kamishima T, Horita T, Atsumi T, Fujita N, Omatsu T, et al. Splenic volume in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2009;18(12):1119-20. doi: 10.1177/0961203309104430.

Hoek G, Krishnan RM, Beelen R, Peters A, Ostro B, Brunekreef B, Kaufman JD. Long-term air pollution exposure and cardio-respiratory mortality: a review. *Environ Health*. 2013;12(1):43. doi: 10.1186/1476-069X-12-43.

Hsu Y, Chuang H, Lee Y, Lin Y, Chen Y, Hsiao T, Wu M, Chiu H. Traffic-related particulate matter exposure induces nephrotoxicity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2019;135:235-44. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.008

Isaka Y. Targeting TGF- β signaling in kidney fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2532. doi: 10.3390/ijms19092532

Jalaludin B, Cowie C. Particulate air pollution and cardiovascular disease—it is time to take it seriously. *Rev Environ Health*. 2014;29(1-2):129-32. doi: 10.1515/reveh-2014-0031.

Jayaraj RL, Rodriguez EA, Wang Y, Block ML. Outdoor ambient air pollution and neurodegenerative diseases: the neuroinflammation hypothesis. *Curr Environ Health Rep*. 2017;4(2):166-79. doi: 10.1007/s40572-017-0142-3.

Jiang T, Tian F, Zheng H, Whitman SA, Lin Y, Zhang Z, Zhang N, Zhang DD. Nrf2 suppresses lupus nephritis through inhibition of oxidative injury and the NF- κ B-mediated inflammatory response. *Kidney Int*. 2014;85(2):333-43. doi: 10.1038/ki.2013.343.

Jung C, Chung W, Chen W, Lee R, Hwang B. Long-term exposure to traffic-related air pollution and systemic lupus erythematosus in Taiwan: A cohort study. *Sci Total Environ*. 2019;668:342-9. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.018.

Kelly FJ, Fussell JC. Air pollution and public health: emerging hazards and improved understanding of risk. *Environ Geochem Health*. 2015;37(4):631-49. doi: 10.1007/s10653-015-9720-1.

Khosho FK, Kaufmann RC, Amankwah KS. A simple and efficient method for obtaining urine samples from rats. *Lab Anim Sci*. 1985;35(5):513-4.

Kim K, Kabir E, Kabir S. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environ Int*. 2015;74:136-43. doi: 10.1016/j.envint.2014.10.005.

Kriz W, Lehir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases - insights from animal models. *Kidney Int*. 2005;67(2):404-19. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.67097.x.

Leffers HCB, Lange T, Collins C, Ulf-Møller CJ, Jacobsen S. The study of interactions between genome and exposome in the development of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2019;18(4):382-92. doi: 10.1016/j.autrev.2018.11.005.

Li W, Titov AA, Morel L. An update on lupus animal models. *Curr Opin Rheumatol*. 2017;29(5):434-41. doi: 10.1097/BOR.0000000000000412.

Lisnevskaja L, Murphy G, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 2014;384(9957), 1878–88. doi:10.1016/s0140-6736(14)60128-8.

Liu Y, Goodson JM, Zhang B, Chin MT. Air pollution and adverse cardiac remodeling: clinical effects and basic mechanisms. *Front Physiol.* 2015;6:162. doi: 10.3389/fphys.2015.00162.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods.* 2001;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Lopes TBM, Groth EE, Veras M, Furuya TK, Costa NSX, Júnior GR, et al. Pre-and postnatal exposure of mice to concentrated urban PM_{2.5} decreases the number of alveoli and leads to altered lung function at an early stage of life. *Environ Pollut.* 2018;241:511-20. doi: 10.1016/j.envpol.2018.05.055.

Losacco C, Perillo A. Particulate matter air pollution and respiratory impact on humans and animals. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018;25(34):33901-10. doi: 10.1007/s11356-018-3344-9.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

Lupus Foundation of America (LFA). *Lupus facts and statistics*. Disponível em: <https://www.lupus.org/resources/lupus-facts-and-statistics>. Acesso: 02 de abril de 2020.

Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MRM, Boyd R, Sempowski GD. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol.* 2009;30(7):366-73. doi: 10.1016/j.it.2009.04.003.

Ma L, Zeng A, Chen B, Chen Y, Zhou R. Neutrophil to lymphocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio in patients with systemic lupus erythematosus and their correlation with activity: A meta-analysis. *Int Immunopharmacol.* 2019;76:105949. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105949.

Macedo ACL, Isaac L. Systemic lupus erythematosus and deficiencies of early components of the complement classical pathway. *Front Immunol.* 2016;7:55. doi: 10.3389/fimmu.2016.00055.

Manisalidis I, Stavropoulou E, Stavropoulos A, Bezirtzoglou E. Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Front Public Health.* 2020;8:14. doi: 10.3389/fpubh.2020.00014.

Meng X, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12(6):325-38. doi: 10.1038/nrneph.2016.48.

Miranda RM, Andrade MF, Fornaro A, Astolfo R, Andre PA, Saldiva P. Urban air pollution: a representative survey of PM 2.5 mass concentrations in six Brazilian cities. *Air Qual Atmos Health.* 2012;5(1):63-77. doi: 10.1007/s11869-010-0124-1.

Mistry P, Kaplan MJ. Cell death in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Clin Immunol.* 2017;185:59-73. doi: 10.1016/j.clim.2016.08.010.

Mohan C, Putterman C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(6):329-41. doi: 10.1038/nrneph.2015.33.

Montes GS, Junqueira LC. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86(3):1-11. doi: 10.1590/s0074-02761991000700002.

Nangaku M, Couser WG. Mechanisms of immune-deposit formation and the mediation of immune renal injury. *Clin Exp Nephrol.* 2005;9(3):183-91. doi: 10.1007/s10157-005-0357-8.

Nemmar A, Karaca T, Beegam S, Yuvaraju P, Yasin J, Hamadi NK, Ali BH. Prolonged pulmonary exposure to diesel exhaust particles exacerbates renal oxidative stress, inflammation and DNA damage in mice with adenine-induced chronic renal failure. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(5):1703-13. doi: 10.1159/000443109..

Nishino M, Ashiku SK, Kocher ON, Thurer RL, Boisselle PM, Hatabu H. The thymus: a comprehensive review. *Radiographics.* 2006;26(2):335-48. doi: 10.1148/rg.262045213.

Oku K, Atsumi T. Systemic lupus erythematosus: nothing stale her infinite variety. *Mod Rheumatol.* 2018;28(5):758-65. doi: 10.1080/14397595.2018.1494239.

Organização das Nações Unidas (ONU). *World Urbanization Prospects: The 2018 Revision* [PDF]. United Nations; 2018. Disponível em: <https://population.un.org/wup/Publications/Files/WUP2018-KeyFacts.pdf>.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *9 out of 10 people worldwide breathe polluted air, but more countries are taking action* [website]. World Health Organization; 2018d. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/detail/02-05-2018-9-out-of-10-people-worldwide-breathe-polluted-air-but-more-countries-are-taking-action>.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Air pollution* [website]. Disponível em: <https://www.who.int/airpollution/en/>. Acesso: 17 de abril de 2020.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Ambient (outdoor) air pollution* [website]. World Health Organization; 2018c. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health).

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease* [report]. Geneva: World Health Organization; 2016. ISBN: 9789241511353.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Burden of disease from the joint effects of household and ambient Air pollution for 2016* [PDF]. World Health Organization; 2018a. Disponível em: https://www.who.int/airpollution/data/AP_joint_effect_BoD_results_May2018.pdf.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Household air pollution and health* [website]. World Health Organization; 2018b. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/household-air-pollution-and-health>.

Oyama BS. *Identificação de fontes de partículas finas na atmosfera urbana de São Paulo* [dissertação]. São Paulo: Instituto de Astronomia e Geofísica, Universidade de São Paulo; 2010.

Pacheco MT, Parmigiani MMM, Andrade MF, Morawska L, Kumar P. A review of emissions and concentrations of particulate matter in the three major metropolitan areas of Brazil. *J Transp Health*. 2017;4:53-72. doi: 10.1016/j.jth.2017.01.008.

Paediatric Rheumatology InterNational Trials Organisation (PRINTO) - Paediatric Rheumatology European Society (PRES). *Systemic Lupus Erythematosus. Information on Paediatric Rheumatic Diseases* [PDF]. 2016. Disponível em: <https://www.printo.it/pediatric-rheumatology//Systemic-Lupus-Erythematosus>.

Pandya B, Hayden K. *Albumin Creatinine Ratio vs. Protein Creatinine Ratio for Nephrology Referral in Primary Care*. ASN Kidney Week; 2014; Philadelphia.

Parks CG, Santos ASE, Barbhaiya M, Costenbader KH. Understanding the role of environmental factors in the development of systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017;31(3):306-20. doi: 10.1016/j.berh.2017.09.005.

Pereira GM, Teinilä K, Custódio D, Santos AG, Xian H, Hillamo R, et al. Particulate pollutants in the Brazilian city of São Paulo: 1-year investigation for the chemical composition and source apportionment. *Atmos Chem Phys Discuss*. 2017;17:11943-69. doi: 10.5194/acp-17-11943-2017.

Perl A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(11):674-86. doi: 10.1038/nrrheum.2013.147.

Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng Y, Morel L. Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:271694. doi: 10.1155/2011/271694.

Pope III CA, Coleman N, Pond ZA, Burnett RT. Fine particulate air pollution and human mortality: 25+ years of cohort studies. *Environ Res*. 2020;183:108924. doi: 10.1016/j.envres.2019.108924.

Pope III CA, Dockery DW. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air Waste Manag Assoc*. 2006;56(6):709-42. doi: 10.1080/10473289.2006.10464485.

Pope III CA, Ezzati M, Dockery DW. Fine-particulate air pollution and life expectancy in the United States. *N Engl J Med*. 2009;360(4):376-86. doi: 10.1056/NEJMsa0805646.

Rekvig OP, Van der Vlag J. The pathogenesis and diagnosis of systemic lupus erythematosus: still not resolved. *Semin Immunopathol*. 2014;36(3):301-11. doi: 10.1007/s00281-014-0428-6.

Rezzani R, Nardo L, Favero G, Peroni M, Rodella LF. Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview. *Age (Dordr)*. 2014;36(1):313-51. doi: 10.1007/s11357-013-9564-5.

Richard ML, Gilkeson G. Mouse models of lupus: what they tell us and what they don't. *Lupus Sci Med*. 2018;5(1):e000199. doi: 10.1136/lupus-2016-000199.

Rider CF, Carlsten C. Air pollution and DNA methylation: effects of exposure in humans. *Clin Epigenetics*. 2019;11(1):131. doi: 10.1186/s13148-019-0713-2.

Ritchie H, Roser M. *Outdoor Air Pollution* [website]. Our World in Data; 2019. Disponível em: <https://ourworldindata.org/outdoor-air-pollution>.

Robertson S, Miller MR. Ambient air pollution and thrombosis. *Part Fibre Toxicol*. 2018;15(1):1. doi: 10.1186/s12989-017-0237-x.

Sanghera C, Wong LM, Panahi M, Sintou A, Hasham M, Sattler S. Cardiac phenotype in mouse models of systemic autoimmunity. *Dis Model Mech*. 2019;12(3):dmm036947. doi: 10.1242/dmm.036947.

Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. NF- κ B in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(8):1254-62. doi: 10.1681/ASN.2010020218.

Schnaper HW. The tubulointerstitial pathophysiology of progressive kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2017;24(2):107-16. doi: 10.1053/j.ackd.2016.11.011.

Schraufnagel DE, Balmes JR, Cowl CT, Matteis SD, Jung S, Mortimer K, et al. Air pollution and noncommunicable diseases: A review by the Forum of International Respiratory Societies' Environmental Committee, Part 2: Air pollution and organ systems. *Chest*. 2019;155(2):417-26. doi: 10.1016/j.chest.2018.10.041.

Scott RP, Quaggin SE. The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol*. 2015;209(2):199-210. doi: 10.1083/jcb.201410017.

Secretaria de Atenção à Saúde (SAS). *Lúpus Eritematoso Sistêmico* [Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas]. Secretaria de Atenção à Saúde, Ministério da Saúde; 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0100_07_02_2013.html.

Sedeek M, Nasrallah R, Touyz RM, Hébert RL. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(10):1512-8. doi:10.1681/ASN.2012111112.

Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci*. 2014;21(1):23. Published 2014 Mar 17. doi:10.1186/1423-0127-21-23.

Sigaux J, Biton J, André E, Semerano L, Boissier M. Air pollution as a determinant of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2019;86(1):37-42. doi: 10.1016/j.jbspin.2018.03.001.

Sioutas C, Koutrakis P, Burton RM. A technique to expose animals to concentrated fine ambient aerosols. *Environ Health Perspect.* 1995;103(2):172-7. doi: 10.1289/ehp.95103172.

Sioutas C, Koutrakis P, Godleski JJ, Ferguson ST, Kim CS, Burton RM. Fine particle concentrators for inhalation exposures—effect of particle size and composition. *J Aerosol Sci.* 1997;28(6):1057-71. doi: 10.1016/S0021-8502(96)00493-4.

Smallwood MJ, Nissim A, Knight AR, Whiteman M, Haigh R, Winyard PG. Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radic Biol Med.* 2018;125:3-14. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.086.

Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR). *Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)* [website]. 2019. Disponível em: <https://www.reumatologia.org.br/doencas-reumaticas/lupus-eritematoso-sistemico-les/>.

Sotto D. *The legal framework of air pollution control in São Paulo*. Klimapolis Workshop; 2018; São Paulo. doi: 10.13140/RG.2.2.21645.79840.

Souza DZ, Vasconcellos PC, Lee H, Aurela M, Saarnio K, Teinilä K, Hillamo R. Composition of PM_{2.5} and PM₁₀ collected at urban sites in Brazil. *Aerosol Air Qual Res.* 2013;14(1):168-76. doi: 10.4209/aaqr.2013.03.0071.

Stone V, Miller MR, Clift MJD, Elder A, Mills NL, Møller P, et al. Nanomaterials versus ambient ultrafine particles: an opportunity to exchange toxicology knowledge. *Environ Health Perspect.* 2017;125(10):106002. doi: 10.1289/EHP424.

Sureshbabu A, Muhsin SA, Choi ME. TGF- β signaling in the kidney: profibrotic and protective effects. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;310(7):F596-606. doi: 10.1152/ajprenal.00365.2015.

Takano APC, Justo LT, Santos NVD, Marquezini MV, André PA, Rocha FMM, et al. Pleural anthracosis as an indicator of lifetime exposure to urban air pollution: An autopsy-based study in Sao Paulo. *Environ Res.* 2019;173:23-32. doi: 10.1016/j.envres.2019.03.006.

Tecklenborg J, Clayton D, Siebert S, Coley SM. The role of the immune system in kidney disease. *Clin Exp Immunol.* 2018;192(2):142-50. doi: 10.1111/cei.13119.

The Jackson Laboratory (JAX). *Body weight information for NZBWF1/J (100008)* [website]. Disponível em: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-100008>. Acesso: 15 de abril de 2020.

Thurston GD, Kipen H, Annesi-Maesano I, Balmes J, Brook RD, Cromar K, et al. A joint ERS/ATS policy statement: what constitutes an adverse health effect of air pollution? An analytical framework. *Eur Respir J.* 2017;49(1):1600419. doi: 10.1183/13993003.00419-2016.

Tsokos GC, Lo MS, Reis PC, Sullivan KE. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(12):716-30. doi: 10.1038/nrrheum.2016.186.

Tsokos GC. Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med*. 2011;365(22):2110-21. doi: 10.1056/NEJMra1100359.

Tsuda A, Henry FS, Butler JP. Particle transport and deposition: basic physics of particle kinetics. *Compr Physiol*. 2013 Oct;3(4):1437-71. doi: 10.1002/cphy.c100085.

Vallero DA. *Fundamentals of air pollution*. 5th ed. Cambridge: Academic press; 2014. ISBN: 9780124017337. doi: 10.1016/C2012-0-01172-6.

Wei Y, Zhang JJ, Li Z, Gow A, Chung KF, Hu M, et al. Chronic exposure to air pollution particles increases the risk of obesity and metabolic syndrome: findings from a natural experiment in Beijing. *FASEB J*. 2016;30(6):2115-22. doi: 10.1096/fj.201500142.

Wold LE, Ying Z, Hutchinson KR, Velten M, Gorr MW, Velten C, et al. Cardiovascular remodeling in response to long-term exposure to fine particulate matter air pollution. *Circ Heart Fail*. 2012;5(4):452-61. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.966580.

Wu X, Nethery RC, Sabath BM, Braun D, Dominici F. Exposure to air pollution and COVID-19 mortality in the United States. *medRxiv*. 2020;2020.04.05.20054502. doi: 10.1101/2020.04.05.20054502.

Xu X, Nie S, Ding H, Hou FF. Environmental pollution and kidney diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(5):313-24. doi: 10.1038/nrneph.2018.11.

Xu X, Wang G, Chen N, Lu T, Nie S, Xu G, et al. Long-term exposure to air pollution and increased risk of membranous nephropathy in China. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(12):3739-46. doi: 10.1681/ASN.2016010093.

Yang D, Yang X, Deng F, Guo X. Ambient air pollution and biomarkers of health effect. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1017:59-102. doi: 10.1007/978-981-10-5657-4_4.

Yap DYH, Chan TM. B Cell Abnormalities in Systemic Lupus Erythematosus and Lupus Nephritis - Role in Pathogenesis and Effect of Immunosuppressive Treatments. *Int J Mol Sci*. 2019;20(24):6231. doi: 10.3390/ijms20246231.

Yu F, Haas M, Glasscock R, Zhao M. Redefining lupus nephritis: clinical implications of pathophysiologic subtypes. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(8):483-95. doi: 10.1038/nrneph.2017.85..

Yung S, Chan TM. Mechanisms of kidney injury in lupus nephritis—the role of anti-dsDNA antibodies. *Front Immunol*. 2015;6:475. doi: 10.3389/fimmu.2015.00475.

Zhang H, Sun S. NF- κ B in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci*. 2015;5:63. doi: 10.1186/s13578-015-0056-4.

Zhang Q, Xiang L, Zaman MH, Dong W, He G, Deng G. Predominant role of immunoglobulin G in the pathogenesis of splenomegaly in murine lupus. *Front Immunol*. 2020;10:3020. doi: 10.3389/fimmu.2019.03020.

Zhao C, Mei Y, Wu G, Mao Y, Wu Q, Dan Y, Pan H. Effect of air pollution on hospital admissions for systemic lupus erythematosus in Bengbu, China: a time series study. *Lupus*. 2019;28(13):1541-8. doi: 10.1177/0961203319882503.

Zhao C, Xu Z, Wu G, Mao Y, Liu L, Wu Q, et al. Emerging role of air pollution in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2019;18(6):607-14. doi: 10.1016/j.autrev.2018.12.010.

Zhou Z, Ma J, Xiao C, Han X, Qiu R, Wang Y, et al. Phenotypic and functional alterations of pDCs in lupus-prone mice. *Sci Rep.* 2016;6:20373. doi: 10.1038/srep20373.

Apêndice

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação da aceleração do desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico em modelo animal de exposição à poluição atmosférica”, registrada com o nº 095/17, sob a responsabilidade de Mariana Matera Veras e Victor Yuji Yariwake, apresentada pelo Departamento de Patologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 27.09.2017

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 27-03-2017 Término: 27-03-2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico New Zealand BWF ₁ /J Camundongo isogênico C57
Nº de animais	20 New Zealand BWF ₁ /J 10 Camundongo isogênico C57
Peso/Idade	90 dias
Sexo	fêmeas
Origem	New Zealand BWF ₁ /J - Instituto Israelita C57 - Unicamp

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 27 de Setembro de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br