ALYNE RIANI MOREIRA

**Estudo do papel dos macrófagos M1 e M2 no desenvolvimento do
enfisema em animais expostos às partículas finas (PM_{2,5})
provenientes da exaustão do combustível diesel**

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

Programa de Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda
Degobbi Tenorio Quirino dos Santos
Lopes

SÃO PAULO
2018

ALYNE RIANI MOREIRA

**Estudo do papel dos macrófagos M1 e M2 no desenvolvimento do
enfisema em animais expostos às partículas finas (PM_{2,5})
provenientes da exaustão do combustível diesel**

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

Programa de Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda
Degobbi Tenorio Quirino dos Santos
Lopes

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

SÃO PAULO

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moreira, Alyne Riani

Estudo do papel dos macrófagos M1 e M2 no desenvolvimento do enfisema em animais expostos às partículas finas (PM 2,5) provenientes da exaustão do combustível diesel / Alyne Riani Moreira. -- São Paulo, 2018.

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

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Fernanda Degobbi Tenório Quirino dos Santos Lopes.

Descritores: 1.Enfisema 2.Macrófagos 3.Inflamação
4.Modelo experimental 5.Poluição 6.Material
particulado 7.Camundongos

USP/FM/DBD-386/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Dedicatória

À Deus

Aos meus pais

Agradecimentos

Á minha orientadora Fernanda Lopes pelos ensinamentos, apoio e os puxões de orelhas muito necessários, você é alguém que me inspira pelo seu amor à ciência e pela sua bondade como ser humano, serei eternamente grata pela sua passagem na minha vida.

Á Clarice por todo apoio e ensinamento ao longo do projeto.

Á Thamires por me ajudar nas exposições e experimentos, sem sua ajuda, este trabalho não poderia ter sido concluído.

Á Julia pela ajuda no projeto e pelo companheirismo, sempre topando qualquer aventura, aprendi a sorrir mais com você.

Á Juliana que por seu intermédio apresentou o LIM-20 e por todo apoio no projeto.

Á Larissa e Tiyaqi pela ajuda em toda etapa do projeto e apoio emocional.

Ao Luciano pela ajuda no Container, quando este não queria funcionar.

Á Jussara pelo apoio enquanto estive no laboratório e depois, sua amizade é muito valiosa.

Ao Davi funcionário dedicado e amigo, pelos cafezinhos entre as pausas e pelas conversas.

Ao Luiz Afonso, responsável pelo biotério e Ivan bioterista pelo cuidado dos animais.

Á Rosana secretaria do LIM 20 sempre disposta ajudar.

Á Beatriz pelas dicas, conselhos e imenso incentivo.

Á professora Carla e a Fernanda Roncon pela ajuda na técnica ELISA.

Aos amigos e companheiros do LIM 20, que tornaram os dias mais leves e fáceis.

Ao LIM 5 - Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental em especial a Mara que veio para me salvar.

Aos animais utilizados, por serem essências para este trabalho.

Aos meus amigos que não são da área, mas que sempre me apoiaram e incentivaram.

Ao meu namorado e amigo Jaílson, que sempre me apoiou e me ensinou a buscar sempre o melhor de mim.

Ao meu pai, irmãos, familiares e especialmente a minha mãezinha exemplo de caráter e bondade, pelas orações e por sempre acreditarem em mim, quando eu mesma duvidava.

Á Deus pelo dom de respirar e me permitir chegar até aqui.

Epígrafe

“Aquele que contemplam a beleza da terra, encontram reservas de força que irão perdurar enquanto a vida durar. Há algo infinitamente curativo nos refrãos repetidos da natureza: a garantia de que o amanhecer vem depois da noite e a primavera depois do inverno”.

Rachel Carson

Este trabalho recebeu apoio financeiro de: FAPESP: Bolsa de Mestrado Regular, Processo nº 2015/19751-1

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas:

- 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*.

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de siglas e abreviaturas

Lista de símbolos

Resumo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Considerações gerais sobre a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)	19
1.2. O efeito dos poluentes na DPOC	20
1.3. Efeito das partículas exauridas pela combustão do combustível Diesel nas doenças respiratórias	21
1.3.1. Células Inflamatórias características da DPOC	22
1.3.2. Polarização de Macrófagos na DPOC	25
1.3.3. Os Efeitos poluentes na polarização de macrófagos M1 e M2	26
2. HIPÓTESE	28
3. OBJETIVO.....	29
4. METODOLOGIA.....	30
4.1. Animais	30
4.2. Indução do Enfisema por instilação de Elastase Pancreática de Porco	30
4.3. Exposição aos poluentes	30
4.3.1. Gerador de Combustíveis (Container Laboratório)	30
4.3.2. Combustível Diesel	32
4.3.3. Delineamento Experimental.....	32
4.3.4. Amostragem e caracterização de PM _{2.5}	33
4.4. Grupos Experimentais.....	35

4.5. Avaliação da Mecânica Respiratória	35
4.6. Análise do LBA.....	36
4.7. Retirada e Fixação dos Pulmões para Histologia.....	36
4.8. Avaliação Morfométrica.....	37
4.8.1 Intercepto Alveolar Médio (Lm)	37
4.8.2. Medida das Fibras de Colágeno e das Fibras de Elástica	37
4.9. Avaliação por ELISA em homogenato de pulmão	38
4.10. Avaliação da expressão dos fenótipos M1 e M2 por PCR em Tempo Real.....	38
4.10.1.Criopreservação de tecidos e Extração de RNA.....	38
4.10.2. Transcrição reversa	39
4.11. PCR em Tempo Real	39
4.12. Digestão pulmonar e citometria de fluxo	40
4.13. Avaliação por imunistoquímica de Caspase -3	41
4.13.1. Técnica de imunistoquímica	41
4.13.2. Contagem de células positivas para caspase-3.....	42
4.14. Análise estatística	43
5. RESULTADOS	44
5.1. Poluentes mensurados em tempo real.....	44
5.2. Intercepto linear médio.....	44
5.3. Lavado Broncoalveolar (LBA)	45
5.4. Mecânica pulmonar	47
5.2.6. Fibras de colágeno e elástica	48
5.5. ELISA.....	48
5.5.1 Resultados para fenótipos M2 – ELISA	48

5.5.2. Resultados para fenótipos M1 – ELISA	49
5.6. RT - PCR	50
5.6.1. Resultados para fenótipos M2 – PCR.....	50
5.6.2. Resultados para fenótipos M1 – PCR.....	51
5.7. Porcentagem de macrófagos por citometria de fluxo	52
5.7.1. Resultado para fenótipos M2 - citometria	53
5.7.2. Resultado para fenótipos M1 – citometria.....	54
5.8. Caspase-3.....	54
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO.....	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
9. ANEXOS	69

Lista de figuras

Figura 1. sistema gerador de partículas de exaustão de diesel, material particulado (PM), óxido de nitrogênio (Nox), pressão interna, litro por minuto(lpm)	32
Figura 2. Valores de intercepto linear médio	45
Figura 3. Os valores do número de células totais, macrófagos, linfócitos e células epiteliais no LBA	46
Figura 4. Parâmetros de Raw, Htis e Gtis	47
Figura 5. Proporção de fibras de colágeno e elástica no parênquima pulmonar.....	48
Figura 6. Parâmetros de IL-4, IL-10 e IL-13 no ELISA	49
Figura 7. Parâmetro de INF- γ no ELISA.....	50
Figura 8. Parâmetros de CD68, Irf-4 e Arg-1 no TR- PCR	51
Figura 9. Parâmetros de Cxcl9, Cxcl10 e Irf-5 no TR-PCR	52
Figura 10. Figura representativa da seleção de macrófagos alveolares no pulmão.	53
Figura 11. Parâmetros de IL-10 na citometria de fluxo.....	53
Figura 12. Parâmetros de TNF- α na citometria de fluxo.....	54
Figura 13. A densidade de células positivas para Caspase-3 no parênquima pulmonar	55

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição elementar do material particulado conforme avaliado pelo Espectrômetro de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva (EDX).	34
Tabela 2. Sequências <i>sense</i> e <i>antisense</i> dos <i>primers</i> utilizados no RT-PCR	40
Tabela 3. Marcador específico de Caspase-3.....	42
Tabela 4. Concentração dos poluentes (MP _{2.5} , NO e NO ₂), temperatura e umidade relativa mensurada em tempo real durante a exposição a exaustão do combustível diesel.....	44

Lista de siglas e abreviaturas

α 1- AT	<i>alpha</i> antitripsina
AF	ar filtrado
ANP	agência nacional do petróleo
ARG-1	proteína arginase
BC	black carbon
CETESB	companhia de tecnologia de saneamento ambiental
CEUA	comitê de ética no uso de animais
COVs	compostos orgânicos voláteis
CXCL9	quimiocinas da família CXC ligante 9
CXCL10	quimiocinas da família CXC ligante 10
DATASUS	departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
EP	erro padrão
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
Filtro HEPA	filtro de alta eficiência para filtração de material particulado do inglês “High efficiency particulated air”
<i>FIZZ</i>	membro da família da quitinase encontrada na zona de inflamação, do inglês found in inflammatory zone
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GM-CSF	fator estimulador de crescimento celular

Gtis	resistência tecidual
HPA	hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
Htis	elastância tecidual
IFN- γ	interferon- <i>gamma</i>
IL	interleucina
IRF-4	fator de transcrição
IRF	fator de transcrição
LBA	lavado broncoalveolar
Lm	intercepto linear médio
MP	material particulado
NF- κ B	fator- κ B nuclear
NO	óxido nítrico
NO _x	óxidos de nitrogênio
NO ₂	dióxido de nitrogênio
OCDE	organização e desenvolvimento econômico
OMS	organização Mundial de Saúde
PBS	tampão fosfato-salino
PCRq	reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
PPE	elastase pancreática de porco
Raw	resistência de vias aéreas
RNA	ácido ribonucleico
RNI	espécies reativas de nitrogênio
ROS	espécies reativas de oxigênio

SO ₂	dióxido de enxofre
TGF-β	fator de transformação do crescimento <i>beta</i>
Th1	linfócito auxiliador do tipo 1, do inglês, T helper 1
Th2	linfócitoT auxiliar do tipo 2, do inglês, T helper 2
TLR	receptor do tipo “toll”
TNF-α	fator de necrose tumoral <i>alfa</i>
WHO	world Health Organization
YM-1	lectina com afinidade para quitina, do inglês, molecule like chitinase type 1
VEF ₁	volume expiratório forçado no primeiro segundo
Zrs	impedância do sistema respiratório

Lista de símbolos

cm	centímetro
cmH ₂ O	centímetro de água
G	Gauge
kg	quilo
L	litro
m ³	metro cúbico
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimol
ppm	partes por milhão
s	segundo
°C	graus Celsius
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrometro
μm ²	micrometro quadrado

Moreira AR. *Estudo do papel dos macrófagos M1 e M2 no desenvolvimento do enfisema em animais expostos às partículas finas (PM_{2,5}) provenientes da exaustão do combustível diesel* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: Os macrófagos são tipos celulares envolvidos na progressão do enfisema pulmonar e podem assumir funções diferentes, dependendo dos estímulos que recebem e do microambiente. Na presença de interferon- γ (IFN- γ) ocorre a polarização de macrófagos M1, reconhecidos como pró-inflamatórios. Entretanto em presença de interleucinas (IL) -4 e IL-13 ocorre a polarização alternativa de macrófagos do tipo M2, reconhecidos por exercerem ação anti-inflamatória e com boa ação fagocítica para microrganismos e células apoptóticas (eferocitose). A progressão do enfisema está associada à redução da atividade da eferocitose e a resposta pulmonar na presença de poluentes depende da ação efetiva dos macrófagos para eliminação destas partículas.

OBJETIVO: verificar a participação dos diferentes fenótipos de macrófagos envolvidos no processo de desenvolvimento do enfisema em camundongos submetidos a poluentes.

MÉTODOS: Camundongos C57BL/6 machos receberam instilação intranasal de elastase pancreática de porco (PPE) para indução de enfisema e os grupos Controle receberam salina e ambos foram expostos ao ar poluído (PPE+POL e SAL+POL) ou filtrado (PPE+AF e SAL+AF) por 60 dias de acordo com os grupos. Avaliamos mecânica respiratória, perfil inflamatório no lavado broncoalveolar (LBA), intercepto linear médio (Lm), fibras elásticas e de colágeno e também avaliamos a expressão de citocinas IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-13 pela técnica de ELISA em homogenato de pulmão.

RESULTADOS: Os grupos SAL+POL e PPE+AF mostraram um aumento no aumento intecepto alveolar, macrófagos, linfócitos e

células epiteliais no LBA, e nas fibras elásticas e colágenas e nas quantidades de células Caspase 3 positivas e estas respostas foram exacerbadas em animais que receberam PPE e foram expostos a partículas exauridas de diesel. A análise da mecânica respiratória revelou uma diminuição na Htis (resistência tecidual) e Gtis (elastância tecidual) apenas nos grupos PPE, enquanto a expressão de IL-4, IL-10 e IL-13 foi aumentada apenas nos grupos expostos a poluição. RT-PCR e citometria de fluxo mostraram um aumento para os marcadores fenotípicos M2 nos grupos PPE+ AF e SAL+ POL e estas respostas foram exacerbadas no grupo PPE + POL. CONCLUSÃO: A associação entre instilação de PPE e exposição ao diesel exacerbou a resposta inflamatória e o enfisema em camundongos. Além disso, apenas a exposição às partículas poluentes exauridos da queima do diesel já induziu uma resposta inflamatória com desenvolvimento de enfisema mesmo em concentrações que estão de acordo com os padrões internacionais de qualidade do ar ambiente. Ambos os fatores induziram uma polarização do fenótipo M2, provavelmente devido à alta demanda por fagocitose de células apoptóticas.

Descritores: enfisema; macrófagos; inflamação; modelo experimental; poluição; material particulado; camundongos.

Moreira AR. *Study of the role of M1 and M2 macrophages in the development of emphysema in animals exposed to fine particles (PM_{2.5}) from diesel exhaust* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

BACKGROUND: Macrophages are cells involved on progression of pulmonary emphysema and may assume different functions depending on microenvironment. stimuli. In presence of Interferon- γ (IFN- γ) occurs the polarization of macrophages M1, recognized as pro-inflammatory. However, in presence of interleukins-4 (IL-4) and -13 (IL-13), there is an alternative polarization of M2-type macrophages, recognized as anti-inflammatory action and good phagocytic action for microorganisms and apoptotic cells. Considering that the progression of emphysema is associated with the reduction of eferocytosis activity and that the pulmonary response on presence of pollutants depends on the effective action of the macrophages to eliminate these particles.

AIM: To perform a temporal analysis of inflammation progression mediated by immune verify the participation of the different macrophages phenotypes involved in the process development of emphysema in mice submitted to pollutants.

METHODS: C57BL/6 mice received intranasal instillation of elastase for emphysema induction on control groups received saline and exposed to polluted or filtered air for 60 days according to the groups. We evaluated respiratory mechanics, elastic and collagen fibers and in the amounts of Caspase 3 positive cells and inflammatory profile in BAL and evaluation of the mean linear intercept, we also evaluated the expression of IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13 cytokines by ELISA in lung homogenate.

RESULTS: The SAL + POL and PPE + AF groups showed an increase in alveolar intelect enhancement, macrophages, lymphocytes and epithelial cells in BAL, and in elastic and collagen fibers and in the amounts of Caspase 3 positive cells and these responses were exacerbated in animals receiving PPE and were exposed to diesel exhausted particles. The analysis of respiratory mechanics revealed a decrease in tissue elastance and tissue damping only in the PPE groups, whereas IL-4, IL-10 and IL-13 expression was increased only in the groups exposed to pollution. RT-PCR and flow cytometry showed an increase for the

M2 phenotypic markers in the PPE + AF and SAL + POL groups and these responses were exacerbated in the PPE + POL group. **CONCLUSION:** The association between PPE instillation and diesel exposure exacerbated the inflammatory response and emphysema in mice. In addition, only exposure to particulate pollutants exhausted from diesel burning has already induced an inflammatory response with the development of emphysema even at concentrations that are in line with international ambient air quality standards. Both factors induced a polarization of the M2 phenotype, probably due to the high demand for phagocytosis of apoptotic cells.

Descriptors: emphysema; macrophages; inflammation; experimental model; pollution; particulate matter; mice.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença prevenível e tratável, caracterizada pela persistente limitação ao fluxo aéreo geralmente progressiva e associada ao aumento da resposta inflamatória, nos pulmões e nas vias aéreas, a gases ou partículas tóxicas. A exacerbação e a comorbidade contribuem para a intensidade dessa doença em pacientes dependendo dos fatores intrínsecos aos indivíduos, como alterações genéticas e maior exposição a fatores ambientais, como poluição atmosférica¹. As principais manifestações da DPOC são a bronquite crônica e o enfisema pulmonar. A bronquite crônica é caracterizada por obstrução das pequenas vias aéreas e presença de tosse com duração superior a três meses por mais de dois anos consecutivos. No enfisema pulmonar, observa-se o alargamento dos espaços aéreos distais com destruição do parênquima pulmonar, perda da elasticidade pulmonar e fechamento de pequenas vias aéreas sem evidência de fibrose ².

De acordo com a WHO (World Health Organization) a DPOC é considerada a quarta maior causa de morte no mundo e representa um importante desafio para a saúde pública no que diz respeito a seu tratamento e prevenção³. A DPOC também é uma das principais causas de morbidade por doenças crônicas em todo o mundo, muitos sofrem com a doença durante anos e morrem prematuramente em decorrência dela ou de suas complicações¹. Segundo dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) No Brasil, a cada hora três pessoas morrem em consequência desta doença, gerando cerca de 40 mil mortes por ano⁴. Acredita-se que até 2030, a DPOC seja a terceira maior causa de morte mundial⁵, resultante da constante exposição aos fatores de risco para a doença e do envelhecimento populacional⁶.

O principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC é o tabagismo. A inalação da fumaça de cigarro e outras partículas nocivas, como

a fumaça de combustíveis de biomassa, causam uma resposta inflamatória exacerbada nos pulmões, podendo acarretar o desenvolvimento da DPOC. Embora o tabagismo seja o principal fator etiológico da DPOC, visto que 90% dos pacientes com DPOC são ou já foram fumantes, apenas 20% de toda a população tabagista desenvolve a doença, o que indica que fatores intrínsecos do paciente, como susceptibilidade genética, mudanças epigenéticas e estresse oxidativo potencializam a inflamação induzida pela exposição constante à fumaça do cigarro, contribuindo fortemente para a patogênese e progressão desta doença⁷.

Durante muitos anos, considerou-se que apenas 15% dos fumantes desenvolveriam DPOC, no entanto, mais recentemente demonstrou-se que a continuidade do tabagismo determinaria obstrução ao fluxo de ar em vias aéreas em até 50% em indivíduos tabagistas com mais de 70 anos¹. A α -1 antitripsina (α -1 AT) é uma molécula produzida principalmente no fígado e, atinge os pulmões através da circulação, onde vai realizar sua função de antiprotease⁸ que atua inativando a elastase neutrofílica e impede o dano tecidual⁹. A deficiência em α -1 antitripsina (α -1 AT) é outro fator de risco importante para o desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica. Em um estudo desenvolvido por Eriksson¹⁰ demonstrou-se que 2-3% dos pacientes que apresentavam DPOC, também apresentavam deficiência grave em α -1 antitripsina.

1.2. O efeito dos poluentes na DPOC

Embora o tabagismo seja o principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC, fatores ambientais e genéticos estão associados ao aumento da prevalência desta doença no mundo¹¹.

Já está estabelecido, que a exposição por vários dias a elevados níveis ambientais de poluentes promove a exacerbação de doenças respiratórias como a DPOC, com aumento da morbidade e mortalidade^{12, 13}. Também já está demonstrado piora da função pulmonar associada às exposições prolongadas (ao longo dos anos) aos poluentes atmosféricos¹⁴⁻¹⁶ e que a redução nos níveis

destes poluentes atenuou o declínio da função pulmonar e sintomas respiratórios em pacientes com doenças respiratórias^{17, 18}.

Com a crescente urbanização das cidades no mundo, se faz necessário um melhor entendimento dos efeitos deletérios da exposição aos poluentes atmosféricos urbanos, principalmente os provenientes do tráfego de veículos na progressão das doenças, entre elas a DPOC¹². A poluição é resultado principalmente, da queima de combustíveis fósseis como, carvão mineral e derivados do petróleo (gasolina e diesel). A queima destes produtos tem lançado na atmosfera gases voláteis, semivoláteis e material particulado (MP)¹⁷. Tais conhecimentos serão fundamentais para que se façam melhores planejamentos urbanos, além de novas leis, mudanças na conduta do tratamento de pacientes e dos programas de prevenção para as doenças associadas à exposição aos poluentes¹².

Sabe-se que a fração gasosa pode inevitavelmente provocar sérios problemas de saúde, porém, a vasta evidência apresentada na literatura aponta uma forte associação entre os efeitos de saúde e o material particulado emitido pela queima de combustíveis fósseis.

1.3. Efeito das partículas exauridas pela combustão do combustível Diesel nas doenças respiratórias

O diesel é composto por uma mistura de gases e partículas¹⁹, que estão adsorvidos e formam compostos extremamente tóxicos, tais como Black Carbon (BC), Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)²⁰.

De acordo com a Organização e desenvolvimento econômico (OCDE)²¹, em 2050 a dependência de combustíveis fósseis será de 85%, elevando as emissões globais dos gases de efeito estufa, assim, a poluição do ar será a principal causa de mortes prematuras, principalmente em países populosos como a China e Índia.

Dados da CETESB, mostram que a frota automotiva da cidade de São Paulo responde a grande parte das emissões de gases e material particulado.

Sendo que a maior emissão é proveniente da frota de caminhões e ônibus movidos a diesel²².

Todo o material oriundo da exaustão do diesel, pode acarretar inflamação sistêmica aguda e consequente aumento do estresse oxidativo. Nota-se que alguns radicais livres originados do estresse oxidativo são capazes de ativar fatores específicos de transcrição proteica, incluindo o fator- κ B nuclear (NF- κ B) que amplifica a expressão de genes para citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios, indutores de apoptose e necrose de macrófagos e células epiteliais respiratórias, prejudicando a defesa orgânica e elevando a reatividade das vias aéreas²³⁻²⁵.

Já foi demonstrado em alguns estudos prévios em roedores, do laboratório de poluição atmosférica experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que ocorre um processo inflamatório no pulmão, com níveis aumentados de macrófagos e neutrófilos e aumento de citocinas inflamatórias²⁶. Brito e col²⁷ demonstraram que camundongos expostos ao diesel, ao biodiesel 50 e biodiesel 100 apresentaram uma resposta inflamatória pulmonar, evidenciada por um infiltrado de neutrófilos e macrófagos. Os mesmos autores demonstraram em estudo posterior que camundongos expostos às partículas exauridas pela combustão do biodiesel na dose administrada de 600/ μ g/ m^3 também apresentaram resposta inflamatória pulmonar, evidenciada por um infiltrado de neutrófilos no lavado bronco alveolar e no parênquima pulmonar²⁸.

1.3.1. Células Inflamatórias características da DPOC

As principais células inflamatórias envolvidas na fisiopatogênese da DPOC são os neutrófilos, macrófagos e linfócitos T. Essas células são responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios e interagem com as células das vias aéreas e parênquima pulmonar¹.

Em estudos feitos por Lacoste e col.²⁹ e Keatings e col.³⁰ foram observados aumento de neutrófilos ativados tanto em amostras de escarro, quanto no lavado bronco alveolar (LBA) de pacientes com DPOC. Estas células inflamatórias são responsáveis pela secreção de proteases, incluindo elastase

neutrofílica, catepsina G, e proteinase-3, envolvidas no aumento da produção de muco pelo epitélio das vias aéreas e na destruição das paredes alveolares^{29, 30}.

Há também um aumento no número total de linfócitos T no parênquima pulmonar e nas vias aéreas centrais e periféricas, principalmente de CD8+, e isso é um diferenciador do enfisema das demais doenças obstrutivas e explica o aparecimento de mediadores inflamatórios específicos que determinam a lesão estrutural característica do enfisema alveolares^{31, 32}. A inflamação mediada por células T no pulmão permanece mesmo anos após a interrupção da exposição ao cigarro³³.

As células epiteliais são, na DPOC, importantes fontes de mediadores inflamatórios, como Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Interleucina (IL) - 8, sendo ativadas pelo fumo do tabaco. Nas pequenas vias aéreas são fonte de Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGF- β), que induz fibrose local³⁴.

Outro tipo celular que está presente nas vias respiratórias, vias aéreas distais, e em amostras de lavado broncoalveolar e escarro de pacientes DPOC, são os macrófagos, células constituintes do sistema imune inato que podem desempenhar várias funções para defesa do tecido não somente no combate às infecções por patógenos, mas também na resposta aos danos teciduais provocados por processos inflamatórios. Isto se dá pelo fato destas células promoverem a fagocitose de agentes externos e de células que entraram em apoptose (eferocitose), além de produzirem uma série de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios, como as citocinas, proteases, inibidores de proteases, espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNI)³⁵⁻³⁷.

Os macrófagos são células que podem assumir fenótipos com funções diferentes, dependendo dos estímulos que recebem do microambiente no qual se encontram³⁸. Alguns estudos demonstraram que em presença de Interferon- γ (IFN- γ), perfil de resposta Th1(Linfócito auxiliador do tipo 1, do inglês, T helper 1), ocorre ativação de macrófagos M1, caracterizados pela liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. *Cxcl-9*(quimiocina ligante, do inglês motif chemokine ligand 9) e *Cxcl-10*(motif chemokine ligand 10) e fator de transcrição *Irf-5* (fator de

regulação de interferon) são reconhecidos por serem liberados por macrófagos que apresentam ação microbicida e tumoricida^{39, 40}.

Já em presença de IL-4, IL-10 e IL-13 ocorre a ativação alternativa de macrófagos para fenótipo M2. Este fenótipo predomina em respostas de perfil Th2(Th2 – Linfócito auxiliar do tipo 2, do inglês, T helper 2), onde ocorre a liberação de fator de transcrição *Irf-4*(fator de transcrição), expressão de enzima *arg-1*(proteína arginase) e das moléculas *FIZZ* (membro da família da quitinase encontrada na zona de inflamação, do inglês found in inflammatory zone) e *YM-1*(lectina com afinidade para quitina, do inglês, molecule like chitinase type 1)^{41, 42}. Os macrófagos de fenótipo M2 são reconhecidos por exercerem uma ação anti-inflamatória, cicatrizante e com boa ação fagocítica para microrganismos e células apoptóticas (eferocitose)³⁶.

A apoptose é um processo de regulação de morte celular, permitindo a eliminação de células infectadas ou danificadas que precisam ser removidas do organismo; no entanto se estas células não forem devidamente eliminadas e permanecerem no tecido ocorrerá o rompimento do citoplasma destas com consequente liberação de mediadores inflamatórios no tecido em questão, aumentando a progressão da doença⁴³.

Imai e col.⁴⁴ observaram aumento de células em pulmões de pacientes enfisematosos, juntamente com aumento da atividade de caspase-3(enzima envolvida na cascata de reações que promovem a apoptose celular). Em modelo experimental, Aoshiba e col⁴³ fizeram administração intratraqueal de caspase-3 em camundongos e observaram apoptose de células das paredes alveolares, e destruição das mesmas e alargamento dos espaços aéreos distais.

A remoção de células apoptóticas, em especial os neutrófilos, é importante para prevenção da progressão da doença, pois quando estas células em apoptose não são removidas entram em processo de necrose e consequente liberação de compostos tóxicos que propiciam o processo de destruição tecidual⁴⁰.

1.3.2. Polarização de Macrófagos na DPOC

Alguns estudos já demonstraram que pacientes com DPOC apresentam alteração da função macrofágica, com diminuição das habilidades destas células em fagocitar e eliminar patógenos e células que entraram em apoptose⁴⁰.

A resposta inflamatória persistente nestes pacientes acarreta aumento das células apoptóticas, o que está associado à piora da atividade macrofágica em pacientes DPOC, mesmo após o abandono do hábito de fumar. Entretanto em fumantes saudáveis, estas características desaparecem após a cessação do tabagismo^{41, 42}.

Não está totalmente esclarecido se os macrófagos alveolares representam principalmente fenótipo M1 ou M2 na DPOC; Hodge e col⁴⁵ descreveram em sangue periférico e LBA de pacientes DPOC um perfil de resposta Th1, sugerindo nestes pacientes a predominância de macrófagos M1. Já Lodfhal e col⁴⁶ demonstraram diminuição da expressão de citocinas correlacionadas ao perfil M1.

Por outro lado, em um estudo desenvolvido pelo mesmo grupo de Hodge e col⁵⁰ descreveram um fenótipo misto, M1 e M2, em lavado broncoalveolar de pacientes com DPOC em comparação com fumantes saudáveis. Neste mesmo estudo, detectaram piora da função fagocítica nestes macrófagos. O aumento do fenótipo M2 observado em pacientes com DPOC pode refletir a deficiência no controle do processo inflamatório mediado pela fagocitose de células apoptóticas. A deficiência na remoção de células apoptóticas piora o processo inflamatório e a progressão dessa doença⁴⁷.

Shaykhiev e col⁴⁸ estudaram a distribuição de macrófagos M1 e M2 em lavado broncoalveolar de fumantes obstrutivos (DPOC) e fumantes não-obstrutivos. Demonstraram que durante o desenvolvimento da DPOC ocorre uma supressão da defesa do paciente com uma diminuição na polarização M1, com um aumento concomitante de fatores imunossupressores, como IL-10 e TGF- β , relacionados à polarização M2.

1.3.3. Os Efeitos poluentes na polarização de macrófagos M1 e M2

Considerando que a principal função dos macrófagos esteja relacionada à fagocitose para promover a remoção de partículas ou agentes patógenos e preservação dos espaços alveolares, este tipo celular é de fundamental importância para a resposta pulmonar em presença de partículas poluentes⁴⁹.

O material particulado (MP) constituinte dos poluentes atmosféricos é classificado de acordo com seu diâmetro aerodinâmico e pode ser denominado como MP₁₀ (partículas grossas entre 2,5 e 10 µm); MP_{2,5} (partículas finas, diâmetro menor que 2,5 µm) e MP_{0,1} (partículas ultrafinas, diâmetro < 0,1 µm). O MP₁₀ é derivado de poeiras de estrada, de solos desgastados, detritos de construções, além de produtos de combustão de óleo. Já as partículas finas e ultrafinas são derivadas dos processos de queima de combustíveis fósseis, como diesel e gasolina e da queima de madeira e carvão⁵⁰.

Apesar de já existirem muitos estudos demonstrando os efeitos deletérios das partículas MP₁₀ e MP_{2,5} para a saúde humana^{51, 52} especialmente em indivíduos que já apresentam doenças pré-existentes, ainda se sabe pouco a respeito dos mecanismos de efeito das partículas finas como as MP_{2,5}. Entretanto, já está descrito na literatura a associação entre a inalação de partículas finas e ultrafinas e o aumento das doenças cardiovasculares^{53, 54}.

Quando este material particulado consegue alcançar as porções mais distais do pulmão e entra em contato com os macrófagos, estas células produzem citocinas pró-inflamatórias e sofrem processo de apoptose⁵⁵. Estudos in vitro demonstraram que os macrófagos conseguem reconhecer o tamanho e formato da partícula de poluente e que dependendo das diferentes formas e tamanhos apresentam diferentes respostas¹⁸. Além do tamanho e da concentração, a toxicidade da partícula depende dos metais e compostos orgânicos e inorgânicos que se encontram associados a estas partículas⁵⁶.

Já está demonstrado que macrófagos em vias aéreas e parênquima são responsáveis pela liberação de TNF-α após fagocitose de material particulado e esta liberação é dose dependente⁵⁷. Outras interleucinas pró-inflamatórias liberadas por estas células em resposta ao contato com material particulado

são IL-1 β e IL-6, assim como IL-8 e fator estimulador de crescimento celular (GM-CSF)^{62,63}. Além disso, já foi demonstrado uma supressão da produção de interleucinas anti-inflamatórias como a IL-10 por estas células na presença de material particulado. Eeden⁵⁸, Mukae⁵⁷ demonstraram em cultura de macrófagos que a exposição à material particulado promoveu a diferenciação de macrófagos para fenótipo M1. Entretanto ainda é necessário entender melhor quais são as características físicas e químicas destes compostos que promovem este tipo de resposta.

Também está demonstrado aumento de apoptose de macrófagos após exposição à material particulado e partículas oriundas da combustão do diesel^{59, 60}. A fagocitose destas células apoptóticas (eferocitose) se torna necessária para diminuição do processo inflamatório e alguns estudos sugerem uma redução deste mecanismo na presença de material particulado^{60, 61}, proporcionando desta forma um ambiente favorável a manutenção do processo inflamatório.

Em estudos desenvolvidos em nosso laboratório, já demonstramos em modelos experimentais que a inalação de poluentes atmosféricos promove uma exacerbação da asma⁶² e do enfisema⁶³. No caso do enfisema pulmonar demonstramos que esta exacerbação da doença nos animais expostos à poluição, esteve associada ao aumento do mecanismo de estresse oxidativo⁶³.

2. HIPÓTESE

Considerando que a progressão da DPOC está associada à redução da atividade da eferocitose exercida pelos macrófagos com consequente aumento da concentração de restos celulares e interleucinas pró-inflamatórias no local da inflamação e que a resposta pulmonar na presença de partículas exógenas, como poluentes urbanos, depende da ação efetiva dos macrófagos para a fagocitose e eliminação destas partículas e que a não remoção efetiva destas partículas propicia a ocorrência do mecanismo de estresse oxidativo, acreditamos que a piora do enfisema pulmonar em animais expostos à poluição, previamente demonstrado em nosso laboratório, possa estar associada a polarização de macrófagos para subtipo M1.

3. OBJETIVO

Torna-se importante verificar os mecanismos envolvidos no processo de desenvolvimento do enfisema pulmonar em camundongos submetidos à exposição às partículas finas exauridas pela queima do diesel, enfatizando um melhor entendimento da participação dos macrófagos com fenótipos M1 e M2 nas possíveis alterações funcionais e morfológica das estruturas pulmonares.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos, com idade de 6-8 semanas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP sob o número de Protocolo 107/15.

4.2. Indução do Enfisema por instilação de Elastase Pancreática de Porco

A indução do enfisema pulmonar foi realizada utilizando elastase pancreática de porco (PPE) (Elastase Type I/ E-1250, Sigma Aldrich). Cada animal foi devidamente anestesiado através de aplicação intramuscular de Xylazina (5 mg/Kg) e Ketamina (40 mg/kg) e recebeu 50 µL de solução de elastase com uma concentração de 0,667UI, através de instilação intranasal. Nos grupos controles, os animais receberam instilação nasal de salina (0,9% NaCl), veículo da elastase.

4.3. Exposição aos poluentes

4.3.1. Gerador de Combustíveis (Container Laboratório)

O “container” laboratório está dividido em 3 compartimentos:

Sala de exposição: composta por bancada com câmaras de exposição, válvula reguladora da pressão e instrumentação de medição do MP_{2,5}, NO_x, NO₂ e NO;

Sala de Máquinas: composta pelos equipamentos de operação como filtro HEPA, sistema de ar comprimido, sistema de bombeamento e dosagem individual de gases, painéis elétricos, e unidade condensadora do sistema de refrigeração do ar;

Sala do Gerador de partículas e gases dos diferentes combustíveis: nesta área encontra-se o gerador de energia a diesel (BD-2500 CFE; Branco, China), para

gerar os gases e partículas da queima do combustível em estudo (diesel e/ou biodiesel), um saco para armazenamento do gás BAG, mangueiras e dutos de exaustão. Durante 3 minutos, os gases e as partículas provenientes da queima de combustível diesel foram armazenados em um BAG e, durante 3 minutos, o ar atmosférico foi responsável por diluir o ar de exaustão do gerador. A bomba de vácuo capturou o ar externo e dirigiu-o para o sistema de filtração de ar HEPA (número de modelo: VSWPSA 102-90 / 2P-BLR-12M-12M-6F-PLN; Purafil®, St. Louis, MO, USA) em um fluxo de ar de aproximadamente 150 litros por minuto (L / min). Em seguida, os gases e as partículas de BAG foram direcionados para a câmara de inalação, onde os animais foram acomodados. Durante a exposição ao diesel, a concentração de 600 $\mu\text{g} / \text{m}^3$ $\text{PM}_{2,5}$ foi regulada pelo regulador de pressão da bomba de gás pneumático com fluxo de ar entre 8 a 26 L / min. A bomba pneumática injeta na captação da câmara com uma distância de cerca de um metro para homogeneizar os gases e as partículas antes de passar por instrumentos de amostragem. As concentrações $\text{PM}_{2,5}$ (DataRam4™, Thermo Fisher Scientific Inc., Franklin, MA, USA), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrogênio (NO_2) temperatura e umidade relativa (Thermo Fisher Scientific Inc., Franklin, MA) foram monitorados em tempo real. Depois de passar pela câmara, os gases foram direcionados para fora do equipamento por um ventilador (Figura 1).

Durante todo o período de exposição (60 minutos) na câmara de inalação, alguns parâmetros foram monitorados em tempo real: concentração de $\text{PM}_{2,5}$ (TrakPro versão 3.6.1.0, USA), emissões de NO_x , NO_2 , NO (Thermo Scientific) e a pressão dentro da câmara. Os animais dos grupos Elastase+Ar Filtrado e Salina+Ar Filtrado foram mantidos em biotério sob ventilação submetida ao sistema de filtração HEPA.

Figura 1. Sistema gerador de partículas de exaustão de diesel, material particulado (PM), óxido de nitrogênio (Nox), pressão interna, litro por minuto (Lpm) ²⁸.

4.3.2. Combustível Diesel

O combustível utilizado neste estudo foi o diesel metropolitano (10 ppm de enxofre com uma mistura de 5% de biodiesel de soja). O combustível diesel apresentou um aspecto turvo com maiores concentrações de teor de água karl-fischer que não estão de acordo com as especificações recomendadas pela ANP (Anexo 1e 2).

4.3.3. Delineamento Experimental

A concentração média de PM_{2,5} dentro da câmara foi ajustada para 577 μ / m^3 para simular a concentração que os ratos experimentariam com 24 h de exposição. Esta concentração é equivalente a uma média diária de 24 μ / m^3 , que está abaixo da média diária de PM_{2,5} recomendada pela Organização Mundial de Saúde (25 μ / m^3)³.

4.3.4. Amostragem e caracterização de PM_{2.5}

A concentração de 1 hora de PM_{2.5} foi determinada gravimetricamente usando impactadores de Harvard (Air Diagnostics, Harrison, ME) a uma vazão de 10 L m⁻¹. Os impactadores foram equipados com filtros de policarbonato de 37 mm com tamanho de poro de 0,8 μ m (Isopore Membrane Filters policarbonato, 0,8 mm, 37 mm; Millipore). Os elementos Sódio (Na), Magnésio (Mg), Alumínio (Al), Enxofre (S), Potássio (K), Cálcio (Ca), Manganês (Mn), Ferro (Fe), Cooper (Cu), Zinco (Zn), Rubídio (Rb) e Bário (Ba), Cromo (Cr), Arsênico (As), Vanádio (V), Silício (Si), chumbo (Pb) foram quantificados usando um espectrômetro de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDX 700-HS, Divisão de Instrumentos Analíticos Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Este instrumento utiliza um tubo Rh-alvo de baixa potência, tensão de 5 a 50 kV e corrente de 1 a 1.000 μ A. A radiação característica dos raios X foi detectada com um detector de Si (Li). Espectros de emissão de fluorescência de raios X de elementos foram coletados por 400 s, a partir de uma área de amostra de 10 mm sob uma atmosfera de vácuo. As intensidades de amostra medidas foram convertidas em concentrações de elementos (ng.cm²) através de calibração com os materiais de referência padrão NIST 2783 (Air Particulate on Filter Media) (Instituto Nacional de Padrões, Gaithersburg, MD, EUA). Finalmente, o carbono foi utilizado para o balanço de massa^{64, 65}. Dez filtros foram coletados e todas as análises foram realizadas em triplicatas (Tabela 1).

Tabela 1. Composição elementar do material particulado conforme avaliado pelo Espectrômetro de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva (EDX).

Elementos (ng / cm²)	Média	DP	Mínimo	Máximo
Alumínio (Al)	97.2	24.0	61.1	141.0
Arsênico (As)	1.0	0.5	0.0	2.3
Bário (Ba)	1.7	0.5	1.0	2.7
Cálcio (Ca)	22.4	6.7	10.9	36.3
Cromo (Cr)	11.5	31.7	1.3	171.4
Cobre (Cu)	15.0	0.8	12.9	16.9
Ferro (Fe)	59.4	136.8	15.4	746.6
Potássio (K)	35.7	13.3	2.4	55.4
Magnésio (Mg)	6.7	6.2	0.0	18.5
Manganês (Mn)	4.6	7.3	1.0	41.4
Sódio (Na)	170.9	22.0	130.0	217.0
Níquel (Ni)	9.7	4.4	6.6	31.2
chumbo (Pb)	6.9	2.6	1.5	12.9
Titânio (Ti)	5.8	1.3	3.2	8.3
Vanádio (V)	0.5	0.5	0.0	1.0
Zinco (Zn)	12.0	2.8	5.3	16.3
Rubídio (Rb)	1.1	0.2	1.0	1.7
Enxofre (S)	59.7	15.0	31.2	75.7
Silício (Si)	65.3	12.5	43.7	94.0

4.4. Grupos Experimentais

Após a instilação de Salina ou de PPE para indução do enfisema, os animais foram separados em diferentes grupos.

Grupo PPE + Poluição (PPE + POL): Animais que receberam instilação de PPE e foram alocados na câmara que receberá em seu interior, ar ambiente, sem ser filtrado, simulando um ambiente semelhante à poluição urbana da cidade de São Paulo.

Grupo PPE+ Ar Filtrado (PPE+ AF): Animais que receberam instilação de PPE, e foram alocados em biotério que receberam ar ambiente filtrado.

Grupo Salina+ Poluição (SAL + POL): Animais que receberam instilação de salina e alocados na câmara que receberam em seu interior, ar ambiente, sem ser filtrado, simulando um ambiente semelhante à poluição urbana da cidade de São Paulo.

Grupo Salina+ Ar Filtrado (SAL+ AF): Animais que receberam instilação de Salina, e foram alocados em biotério que receberam ar ambiente filtrado.

Os grupos que foram expostos aos poluentes, receberam em uma concentração de 600 µg/m³ de partículas finas do combustível diesel por um período de 1 hora, em 5 dias consecutivos na semana, por 60 dias.

4.5. Avaliação da Mecânica Respiratória

Seguindo o cronograma designado, os animais de cada grupo foram anestesiados com Thiopental (50 mg/kg, por via intraperitoneal), traqueostomizados e conectados a um respirador (flexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá). Os animais foram ventilados com um volume corrente de 10 mL/kg e frequência respiratória de 120 ciclos/minuto. Foi calculada a impedância do sistema respiratório (Zrs) dos animais de cada grupo:

$$Z(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}$$

O R_{aw} é a resistência de vias aéreas, I_{aw} é a inertância das vias aéreas, G_{tis} caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares, H_{tis} caracteriza a energia acumulada nos tecidos do pulmão, i é a unidade

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan\left(\frac{H}{G}\right)$$

imaginária, f é a frequência e

O parâmetro R_{aw} (resistência de vias aéreas), nos permite a análise, isoladamente das vias aéreas, sem a interferência do tecido pulmonar. O parâmetro G_{tis} avalia a resistência tecidual, enquanto que o parâmetro H_{tis} seria a elastância do tecido pulmonar.

4.6. Análise do lavado bronco alveolar (LBA)

Os pulmões foram lavados com 1,5 mL de solução salina 0,9% e grande parte deste volume foi recuperado para posteriores análises dos tipos celulares. Este volume recuperado, o lavado broncoalveolar (LBA), foi então centrifugado a 1000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi armazenado a -20°C e o botão celular ressuspenso em HBSS + 0,1% BSA (bovine serum albumin) para contagem das células em câmara de Neubauer. Alíquotas da suspensão celular foram centrifugadas em lâminas de vidro usando uma citocentrífuga e coradas com Giemsa. A contagem de 300 células foi feita em campos aleatoriamente selecionados. Para obtenção do número absoluto de cada população celular no LBA, as porcentagens foram multiplicadas pelo número total de células encontradas no volume.

4.7. Retirada e Fixação dos Pulmões para Histologia

Os pulmões foram fixados em formaldeído (4%) sob pressão constante de 20 cmH₂O por 24 horas. Após este período foram realizados cortes destes pulmões para análise histológica e morfométrica, com colorações Hematoxilina-Eosina.

4.8. Avaliação Morfométrica

4.8.1 Intercepto Alveolar Médio (Lm)

Para a avaliação do intercepto linear médio (Lm) foi utilizado morfometria convencional, por meio de um retículo de Weibel (100 pontos e 50 retas) acoplado à ocular de um microscópio óptico comum. O Lm é um índice que nos permite avaliar o diâmetro médio dos espaços aéreos distais. Para tanto, foram quantificados o número de vezes que as retas do retículo cruzam as paredes dos alvéolos em 15 campos/lâmina. As medidas foram feitas em aumento de 400X.

4.8.2. Medida das Fibras de Colágeno e das Fibras de Elástica

Para quantificação de fibras colágenas e elásticas utilizamos a técnica de contagem de pontos, utilizando o retículo de Weibel (100 pontos e 50 retas). Para tanto, foram contados o número de pontos que incidiam sobre as fibras de colágeno e de elástica e também os pontos que incidiam no parênquima remanescente 50. Para o cálculo, utilizou-se a seguinte equação:

Proporção de Fibras de Colágeno e Elástica no Parênquima Remanescente = número de pontos que incidiam nas fibras de colágeno (ou elástica) / número de pontos que incidiam no parênquima.

Foram contados 15 campos por lâmina com um aumento de 400X.

4.9. Avaliação por ELISA em homogenato de pulmão

Vinte quatro horas após o último dia do protocolo de exposição aos poluentes os pulmões foram rapidamente removidos e armazenado em gelo picado em tubos devidamente etiquetados. Em seguida foram individualmente homogeneizados com polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, modeloPT 10/35) em 1mL de tampão de extração de proteína (2mM Trisma pH7.5;1 mM EDTA pH 8,00;10% de Glicerol;20mM de Fluoreto de sódio;30 mM de Pirofosfato de sódio tetra hidratado,0,5% de Deoxicolato de sódio,1mM de Ortovanadato de sódio;5 uM aprotinina,1 mM de Parametil Sulfonilfluoreto (PMSF) e água destilada). A seguir as amostras foram centrifugadas a 12.000G/4°C por 15 minutos para remoção do material insolúvel.

Para a detecção dos níveis de citocinas de IL-12, INF- γ (Citocinas características da polarização M1); IL-4; IL-10 e IL-13 (Citocinas características da polarização M2) nas amostras foram determinados por ELISA (OptEIA, BD PharMingen, Oxford, UK) onde microplacas (Costar, Cambridge, MA, USA) para cada citocina foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos. Após lavagem e distribuição das amostras, foram adicionados anticorpos específicos para as diferentes citocinas conjugados à biotina. Para a revelação da ligação, solução reveladora contendo conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase, substrato e cromógeno foi adicionada. A leitura da reação foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro M2 (Spectramax L, Molecular Devices). As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes.

4.10. Avaliação da expressão dos fenótipos M1 e M2 por PCR em Tempo Real

4.10.1.Criopreservação de tecidos e Extração de RNA

O tecido pulmonar foi homogeneizado em presença de 1 ml de mistura de extração de RNA (TRIzol, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) com o

auxílio de um homogeneizador de alta frequência (Precellys 24, Bertin) utilizando tubos preenchidos com pérolas de cerâmica (Precellys CK14 2 ml Tubes) e armazenados em *freezer* -80°C. O isolamento do RNA foi completado pelo método de extração em coluna através de *Kit* em etapa única (Qiagen, Roermond, Netherlands). A quantidade e a qualidade dos RNAs produzidos foram verificadas pela espectrofotometria e pela eletroforese em gel de agarose nativo.

4.10.2. Transcrição reversa

Os RNAs totais que passaram pelo controle de qualidade foram submetidos à transcrição reversa para síntese do DNA complementar (cDNA), que a partir de 1 µg de RNA total e iniciador (*primer*) oligo dT. A reação foi catalizada pela transcriptase reversa (SuperScript III, Invitrogen Life Technologies) em presença de dNTPs.

4.11. PCR em Tempo Real

A expressão gênica foi avaliada pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCRq) em termociclador *Rotor Gene* (Qiagen) e kit *Syber Green* como marcador fluorescente (Qiagen). As reações aconteceram nas seguintes etapas: 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 5 segundos (desnaturação) e 60°C por 10 segundos (anelamento e extensão). Os produtos do PCR foram submetidos à corrida em gel de agarose para confirmação dos tamanhos dos fragmentos e especificidade da reação. Os *primers* foram desenhados e utilizados para quantificar os RNA mensageiros (RNAm) codificados pelos genes listados no quadro 1. A análise dos resultados foi realizada através do *software* disponibilizado pelo fabricante. Resumidamente, o número arbitrário de cópias dos genes de interesse e constitutivos foram calculados pela fórmula $(1000000/2^{CT})$ para cada amostra, onde CT é o número de ciclos de amplificação necessários para atingir o limiar

determinado na fase exponencial da curva. Os valores foram apresentados como número de cópias relativas ao controle após correção com o constitutivo GAPDH (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências *sense* e *antisense* dos *primers* utilizados no PCRq.

Gene	5' Primer (5'-3')	3' Primer (5'-3')
Irf5	AATACCCACACCTTTTGA	TTGAGATCCGGGTTTGAGAT
Irf4	CAAAGCACAGAGTCACCTGG	TGCAAGCTCTTTGACACACA
Cd68	TTCTGCTGTGGAAATGCAAG	AGAGGGGCTGGTAGGTTGAT
Cxcl9	TGCACGATGCTCCTGCA	AGGTCTTTGAGGGATTTGTAGT GG
Cxcl10	GACGGTCCGCTGCAACTG	GCTTCCCTATGGCCCTCATT
Arg1	GCACTCATGGAAGTACACGAGGAC	CCAACCCAGTGATCTTGACTGA
Gapdh	CCACCACCCTGTTGCTGTAG	CTTGGGCTACACTGAGGACC

4.12. Digestão pulmonar e citometria de fluxo

Vinte quatro horas após o último dia do protocolo de exposição aos poluentes os pulmões foram rapidamente removidos, lavados em PBS frio e colocados em tubos de 50 ml (Thermo Fisher Scientific) contendo 5 ml de meio R-10 frio (24 horas após a instilação do LPS). (RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal), L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 1 mM, solução de aminoácidos não essenciais de 1% vol / vol, solução de vitamina a 1% vol / vol (todos da Thermo Fisher Scientific), 100 U / ml de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 55 mM de 2-ME (Thermo Fisher Scientific). Os pulmões foram então transferidos para tubos de 50 ml contendo 4 ml de solução de digestão pré-aquecida - meio R-10, collagenase de tipo IV (Thermo Fisher Scientific) a 0,5 mg / ml e ADNase de 30 µg / ml (Sigma-Aldrich) - cortada em

pequenos pedaços (1 mm) com tesoura e colocados em um agitador a 180 rpm e 37 ° C durante 1 h. A solução de digestão foi passada através de filtros de células de 40 µm (BD Biosciences) colocados em novos tubos de 50 ml, e os pedaços restantes foram esmagados com pulverizadores de seringas até todos os tecidos serem dissolvidos. Os filtros de células foram lavados com 5 ml de PBS frio e os tubos de 50 ml foram centrifugados a 1500 rpm e 4 ° C durante 5 min. Os sobrenadantes foram descartados, os glóbulos vermelhos foram interrompidos com 1 ml de tampão de lise ACK (Thermo Fisher Scientific) e os tubos foram centrifugados a 1500 rpm a 4 ° C durante 5 min. Os sobrenadantes foram descartados e as células pulmonares ressuspensas em 500 µl de meio R-10 para prosseguir com a cultura celular. As suspensões de células foram colocadas numa placa de 96 poços de fundo plano (Corning) num volume final de 200 µl por poço e estimuladas com LPS (1 µg / ml) durante 4 h. Brefeldin A (eBioscience) foi adicionado após 1 h de estimulação. A placa foi centrifugada a 1500 rpm a 4 ° C durante 5 min e as células foram fixadas e permeabilizadas com citofix / citoperm (BD Biosciences) durante 15 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas com perm/wash e coradas com anti-CD45 PercP, anti-CD11b APCCy7, anti-CD11c BV421, anti-CD64 PE, anti-IL-10 APC e anti-TNF-α PECy7 (todos de BD Biosciences). As amostras foram adquiridas com FACs Canto II (BD Biosciences) e analisadas com FlowJo Software (Tree Star).

4.13. Avaliação por imunistoquímica de Caspase -3

4.13.1. Técnica de imunistoquímica

Para avaliar a presença de citocinas e tipos celulares da imunidade inata e adaptativa no tecido epitelial realizamos marcações específicas pela técnica de imuno-histoquímica. Para tanto, as lâminas silanizadas foram desparafinizadas em xilol quente a 60-65°C e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol, água corrente e água destilada. Os epítomos antigênicos foram recuperados por alta temperatura em solução de citrato 10 mM (pH=6,0) e os sítios inespecíficos reativos à oxidação foram bloqueados

com peroxidase endógena em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo primário e após este período, os cortes foram lavados com tampão fosfato (PBS - pH=7,5) e incubados com anticorpo secundário de acordo com a origem do anticorpo primário a 37 °C. Finalmente, para a revelação foi utilizada solução de cromógeno diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich) e Hematoxilina de Harris. (Merck, Darmstadt, Alemanha) para contra corar. Para controles negativos, o anticorpo primário foi omitido do procedimento e a BSA foi utilizada nas amostras de tecido.

A caspase-3 é uma das enzimas envolvida na cascata de reações que promovem a apoptose celular. Para o marcador específico foi utilizado um anticorpo primário com seu respectivo anticorpo secundário, o qual está descrito no quadro abaixo (Tabela 3).

Tabela 3. Marcador específico de Caspase-3

Marcador	Anticorpo primário	Anticorpo Secundário	Diluição	Especificação
Caspase-3	Policlonal produzido em coelho IgG	Anti-rabbit	1:500	SC-7148 Rabbit Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, Ca, USA

4.13.2. Contagem de células positivas para caspase-3

O número de células que expressam o marcador analisado foi contado no parênquima pulmonar com ajuda de um retículo de Weibel (100 pontos e 50 retas) com área conhecida (62.500 μm^2 no aumento de 400X). Foi contado o número de pontos que caíam no parênquima para cada campo escolhido, sendo 20 campos por lâmina. A densidade de células foi determinada pela seguinte equação: *Densidade de células positivas = número de células positivas/número de pontos que incidiam no parênquima. O resultado está expresso como células/ μm^2 .*

4.14. Análise estatística

Foi realizado para o resultado dos poluentes o Teste de Amostras Independentes de Mann-Whitney U, pois apresentou distribuição não normal. O pacote estatístico utilizado foi o SPSS versão 21; SPSS Inc.®, Chicago, IL. O nível estatístico de significância adotado foi de 5%.

Para todas as outras análises estatísticas foram realizadas por meio do software SigmaStat e utilizamos o teste de Análise de Variância para dois fatores (Two Way ANOVA) seguido pelo teste de múltiplas comparações (Holm-Sidak). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Poluentes mensurados em tempo real

As concentrações de NO e NO₂ estão de acordo com os padrões internacionais de qualidade do ar ambiente (WHO). A temperatura e a umidade dentro da câmara foram semelhantes entre os grupos e de acordo com os padrões de cuidados para roedores (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração dos poluentes (MP_{2.5}, NO e NO₂), temperatura e umidade relativa mensurada em tempo real durante a exposição a exaustão do combustível diesel nos tempos de 60 dias.

Parâmetros	Tempo			
	60 dias			
	Média	DP	Mínimo	Máximo
MP _{2.5} (µg/m ³)	577	112	317	867
NO (µg/m ³)	16	18	1	72
NO ₂ (µg/m ³)	141	243	0	1120
Temperatura (°C)	21	4	14	30
Umidade (%)	69	9	38	83

5.2. Intercepto linear médio

Ao avaliarmos os valores de Lm, observamos que a instilação de PPE bem como a poluição atmosférica, por si só, já promoveram aumento deste índice, contudo houve um aumento ainda maior quando os animais receberam instilação de PPE e foram expostos aos poluentes (Figura 2).

Figura 2. Valores de intercepto linear médio. (Lm)* $p = 0,001$ comparado com os grupos SAL + AF e SAL + POL. ** $p \leq 0,004$ comparado com os grupos SAL + AF e PPE + AF. # $p = 0,023$ comparado com os grupos PPE + AF e SAL + POL. Os valores são expressos como média $\pm$ EP. (Grupo SAL + AF: $n = 7$, grupo PPE + AF: $n = 8$, grupo SAL + POL: $n = 11$ e grupo PPE + POL: $n = 10$.)

5.3. Lavado Broncoalveolar (LBA)

A análise de células totais no LBA revelou um aumento do processo inflamatório somente pela instilação de PPE ou somente pela exposição aos poluentes, além de um efeito somatório da instilação de PPE e exposição aos poluentes. Observamos este mesmo comportamento para as análises de macrófagos, células epiteliais e linfócitos. Entretanto as análises de neutrófilos demonstram aumento deste tipo celular somente nos animais que receberam instilação de PPE (Figura 3).

Figura 3. Os valores do número de células totais, macrófagos, linfócitos, células epiteliais e neutrófilos no LBA. Células totais (A), macrófagos (B), linfócitos (C) e células epiteliais (D) neutrófilos (E). Os valores estão expressos como média $\pm$ EP. (A) * $p \leq 0,001$ comparado com os grupos SAL + AF e SAL + POL. ** $p \leq 0,001$ comparado com os grupos SAL + AF e PPE + AF. # $p < 0,001$ comparado com os grupos PPE + AF e SAL + POL (grupo SAL + AF: $n = 10$, grupo PPE + AF: $n = 10$, grupo SAL + POL: $n = 14$ e grupo PPE + POL: $n = 13$.) (B) * $p = 0,043$ comparado com os grupos SAL + AF e SAL + POL. ** $p = 0,028$ comparado com os grupos SAL + AF e PPE + AF. # $p = 0,012$ comparado com os grupos PPE + AF e SAL + POL (grupo SAL + AF: $n = 10$, grupo PPE + AF: $n = 10$, grupo SAL + POL: $n = 14$ e grupo PPE + POL: $n = 13$.) (C) * $p = 0,009$ comparado com os grupos SAL + AF e SAL + POL. ** $p = 0,007$ em comparação com os grupos SAL + AF e PPE + AF. # $p = 0,002$ comparado com os grupos de PPE + AF e + POL. (Grupo SAL + AF: $n = 10$, grupo PPE + AF: $n = 10$, grupo SAL + POL: $n =$

14 e grupo PPE + POL n = 13.) (D) * p = 0,020 comparado com o SAL + FA e SAL + POL. ** p = 0,033 comparado com os grupos SAL + AF e PPE + AF. # p <0,006 comparado com os grupos PPE + AF e SAL + POL (grupo SAL + AF: n = 10, grupo PPE + AF: n = 10, grupo SAL + POL: n = 14 e grupo PPE + POL n = 13) (E) * p = 0,039 comparado com os grupos SAL + FA e SAL + POL. (Grupo SAL + AF: n = 10, grupo PPE + AF: n = 9, grupo SAL + POL: n = 13 e grupo PPE + POL: n = 12.)

5.4. Mecânica pulmonar

Houve uma diminuição nos valores Htis (elastância tecidual) e Gtis (resistência tecidual), observamos uma diminuição desses parâmetros nos grupos que receberam instilação de PPE, comparado aos grupos que não receberam (SAL+ AF e SAL + POL), sem evidências do efeito somatório da poluição e instilação de elastase. Novamente, não observamos diferenças entre os grupos para o parâmetro Raw (resistência das vias aéreas) (Figura 4).

Figura 4. Parâmetros de Raw, Htis e Gtis. Raw (A), Htis (B) e Gtis (C). (A) Não houve diferença estatística para a análise de Raw. (B) * p = 0,008 comparado com os grupos SAL + AF e SAL + POL (C) * p = 0,026 comparado com a SAL + AF e PPE + AF. Os valores são expressos

como média $\pm$ SE. (Grupo SAL + FA: n = 9, grupo PPE + AF: n = 9, grupo SAL + POL: n = 14 e grupo PPE + POL: n = 10.)

5.2.6. Fibras de colágeno e elástica

Ao analisarmos a porcentagem de fibras colágenas e elásticas (Figura 14) no parênquima pulmonar, observamos que houve um aumento das fibras, para os grupos que receberam instilação de elastase e foram expostos aos poluentes, porém houve um efeito somatório dos dois fatores no grupo PPE + POL, apenas nas fibras de colágeno (Figura 5).

Figura 5. Proporção de fibras de colágeno e elástica no parênquima pulmonar. Fibras de colágeno (A) e elástica (B) no parênquima pulmonar. (A) *p= 0,001 comparado aos grupos SAL+ AF e SAL + POL, **p< 0,001 e #p=0,001 comparado aos grupos SAL e PPE. (B) *p< 0,001 comparado aos grupos SAL+ AF e SAL + POL, **p< 0,001 e #p< 0,001 comparado aos grupos SAL + AF, PPE + AF e PPE + POL. Valores expressos como média $\pm$ EP. (Grupo SAL + AF n=8, PPE + AF n= 8, SAL + POL n=11 e PPE+ POL n=10).

5.5. ELISA

5.5.1 Resultados para fenótipos M2 – ELISA

Ao avaliarmos os valores das interleucinas IL-4, IL-10 e IL-13, observamos um aumento nos grupos que foram expostos aos poluentes, comparado aos grupos que não sofreram exposição aos poluentes (SAL + AF e PPE + AF), sem efeitos adicionais a instilação da elastase (Figura 6).

Figura 6. Parâmetros de IL-4, IL-10 e IL-13 no ELISA. IL-4 (A), IL-10 (B) e IL-13 (C). (A) * $p = 0,038$ comparado com os grupos SAL + AF e PPE + AF. (Grupo SAL + AF: $n = 10$, grupo PPE + AF: $n = 9$, grupo SAL + POL: $n = 9$ e grupo PPE + POL: $n = 9$.) (B) * $p = 0,032$ comparado com o SAL + AF e PPE + AF. # $p < 0,004$ comparado com os grupos PPE + AF e SAL + POL. (Grupo SAL + AF: $n = 8$, grupo PPE + AF: $n = 10$, grupo SAL + POL: $n = 9$ e grupo PPE + POL: $n = 10$.) (C) * $p = 0,036$ comparado com o SAL + AF e PPE + AF. (Grupo SAL + AF: $n = 10$, grupo PPE + AF: $n = 8$, grupo SAL + POL: $n = 9$ e grupo PPE + POL: $n = 8$.) Os valores estão expressos como média $\pm$ EP.

5.5.2. Resultados para fenótipos M1 – ELISA

Ao avaliarmos o valor do marcador IFN- γ , não observamos diferenças entre os grupos estudados (Figura 7).

Figura 7. Parâmetro de IFN- γ no ELISA. Não observamos diferença estatística entre os grupos experimentais.

As amostras com os marcadores IL-12 e TNF- α quando passadas no espectrofotometro, apresentaram valores negativos e por isso não estão representados em forma de gráfico.

5.6. RT - PCR

5.6.1. Resultados para fenótipos M2 – PCR

Ao avaliarmos os parâmetros de CD68 e *Irf-4*, observamos um aumento nos grupos que foram expostos aos poluentes, comparado aos grupos que não sofreram exposição aos poluentes (SAL + AF e PPE + AF), sem efeitos adicionais a instilação da elastase, apenas Arg-1 teve efeito somatório da elastase e da poluição. (Figura 8).

Figura 8. Parâmetros de CD68, Irf-4 e Arg-1 no RT-PCR. CD68 (A), Irf-4 (B) e Arg-1 (C). ((A) * $p = 0,040$ comparado com os grupos SAL + AF, SAL + POL e PPE + POL. (Grupo SAL + AF: $n = 9$, grupo PPE + AF: $n = 6$, grupo SAL + POL: $n = 11$ e grupo PPE + POL: $n = 6$.) (B) * $p = 0,048$ comparado com o SAL + AF e SAL + POL. (Grupo SAL + AF: $n = 9$, grupo PPE + AF: $n = 6$, grupo SAL + POL: $n = 11$ e grupo PPE + POL: $n = 6$.) (C) * $p = 0,005$ comparado com o SAL + AF e PPE + AF e # $p = 0,004$ comparado com os grupos SAL + AF e SAL + POL. # $p \leq 0,009$ comparado com os grupos PPE + AF e SAL + POL. (Grupo SAL + FA: $n = 9$, grupo PPE + AF: $n = 6$, grupo SAL + POL: $n = 11$ e grupo PPE + POL: $n = 6$.) Os valores estão expressos como média $\pm$ EP.

O parâmetro *Fizz* não amplificou, por isso não estão representados em forma de gráfico.

5.6.2. Resultados para fenótipos M1 – PCR

Ao avaliarmos os parâmetros *Cxcl9*, *Cxcl10* e *Irf-5*, não observamos diferenças entre os grupos estudados (Figura 9).

Figura 9. Parâmetros de Cxcl9, Cxcl10 e Irf-5 no TR-PCR. Cxcl9 (A), Cxcl10 (B) e Irf-5 (C) (Grupo SAL + AF n=9, PPE + AF n= 6, SAL + POL n=11 e PPE+ POL n=6). Não observamos diferença estatística entre os grupos experimentais.

Os parâmetros YM-1 e IL-12b não amplificaram, por isso não estão representados em forma de gráfico.

5.7. Porcentagem de macrófagos por citometria de fluxo

A figura abaixo é uma representação esquemática das regiões onde estão localizados os macrófagos alveolares (Figura 10).

Figura 10. Figura representativa da seleção de macrófagos alveolares no pulmão. As partes sinalizadas são as regiões onde estão localizados os macrófagos alveolares.

5.7.1. Resultado para fenótipos M2 - citometria

Ao avaliarmos a porcentagem de macrófagos expressando IL-10 no pulmão, observamos o aumento da mesma nos grupos que receberam instilação de elastase e dos grupos que foram expostos aos poluentes, com um aumento maior com a associação dos dois fatores (Figura 11).

Figura 11. Parâmetros de IL-10 na citometria de fluxo. IL-10. * $p = 0,005$ comparado com os grupos SAL + AF e SAL + POL. ** $p = 0,019$ comparado com os grupos SAL + AF e PPE + AF. # $p \leq 0,031$ comparado com os grupos PPE + FA e SAL + POL. (Grupo SAL + FA: $n = 9$, grupo PPE + AF: $n = 6$, grupo SAL + POL: $n = 11$ e grupo PPE + POL: $n = 6$.) Os valores estão expressos como média $\pm$ EP.

5.7.2. Resultado para fenótipos M1 – citometria

Ao avaliarmos a porcentagem de macrófagos expressando TNF- α no pulmão, não foi observado diferença estatística para este marcador (Figura 12).

Figura 12. Parâmetros de TNF- α na citometria de fluxo. Não observamos diferença estatística entre os grupos experimentais. (Grupo SAL + AF n=9, PPE + AF n= 6, SAL + POL n=11 e PPE+ POL n=6).

5.8. Caspase-3

A quantificação de caspase-3 no parênquima pulmonar, demonstrou um aumento na desidade pela instilação de PPE ou somente pela exposição aos poluentes, além de um efeito somatório da instilação de PPE e exposição aos poluentes (Figura 13).

Figura 13. A densidade de células positivas para Caspase-3 no parênquima pulmonar. Expresso como média $\pm$ EP * $p < 0,001$ comparado com os grupos SAL + AF e SAL + POL. ** $p = 0,039$ comparado com os grupos SAL + AF e PPE + AF. # $p \leq 0,005$ comparado com os grupos PPE + AF e SAL + POL (grupo SAL + AF: $n = 10$, grupo PPE + AF: $n = 9$, grupo SAL + POL: $n = 13$ e grupo PPE + POL: $n = 12$).

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados revelaram que a associação da instilação de elastase e da exposição às partículas exauridas pela combustão do diesel após 60 dias induziu aumento do processo inflamatório com piora da lesão do parênquima pulmonar associado à polarização de macrófagos para fenótipo M2. É importante ressaltar que as concentrações de material particulado (MP_{2,5}) durante o tempo de exposição são consideradas dentro dos padrões toleráveis pela WHO (Tabelas 4), mas já foram suficientes para induzir o desenvolvimento de enfisema pulmonar nos animais expostos apenas aos poluentes.

O processo inflamatório foi caracterizado pelo aumento de macrófagos, linfócitos e células epiteliais observado no LBA. Andersen e col demonstraram que o aumento do período de exposição à NO₂ e NO_x aumentou a incidência de DPOC. Estes poluentes atmosféricos emitidos em grande quantidade devido à queima do diesel estão associados ao aumento do desenvolvimento da DPOC, em especial, o NO₂. O NO₂ é um irritante das vias aéreas, que mesmo em baixas concentrações pode causar infecções do trato respiratório, por ser reativo e interagir com o sistema imunológico, acarretando inflamação pulmonar¹².

O aumento do número de indivíduos expostos por longos períodos à concentrações consideradas toleráveis pela Organização Mundial da Saúde de dióxido de enxofre (SO₂), dióxido de nitrogênio (NO₂) e PM menor ou igual a 10 µm no diâmetro aerodinâmico (PM₁₀) está associado ao aumento da mortalidade por exacerbação em pacientes com DPOC⁵⁴.

As partículas liberadas pela queima do diesel (DEP) são responsáveis por iniciar a apoptose das células e pode acarretar o aumento da produção de IgE e consequente produção de citocinas de perfil Th2⁶⁰.

Neste estudo, observamos que o macrófago foi o tipo celular predominante, também detectamos um aumento do alargamento dos espaços aéreos distais intensificado pela ação conjunta da instilação de elastase e da exposição aos poluentes (grupo PPE + POL) comparados aos valores dos grupos SAL + POL e PPE + AF, demonstrando um efeito, muito embora não tenhamos detectado piora da função respiratória.

O processo de remodelamento tecidual, observado durante o desenvolvimento da DPOC, é caracterizado por um aumento da deposição das fibras de colágeno e elástica, na tentativa de reparar a destruição das fibras do parênquima, por ação das metaloproteases. No entanto este processo ocorre de forma desordenada, comprometendo o comportamento funcional das fibras do parênquima⁶⁶.

Neste estudo, observamos que as proporções em volume de fibras de colágeno e elástica no parênquima estão aumentadas nos grupos que foram expostos aos poluentes e que receberam instilação de elastase, com associação dos dois fatores intensificando.

Tais resultados corroboram com estudo prévio, desenvolvido por nosso grupo, no qual verificamos que os animais expostos aos níveis ambientais de poluentes da cidade de São Paulo apresentaram uma intensificação do processo de remodelamento das fibras colágenas e não das elásticas, após indução de enfisema por instilação de papaína intranasal⁶⁷.

Robertoni e col⁶⁷ desenvolveram um temporal para avaliação de algumas metaloproteases envolvidas na destruição das fibras constituintes do parênquima pulmonar em modelo experimental de indução de enfisema por instilação intranasal de elastase, como em nosso estudo. Eles observaram um aumento da expressão de metaloprotease-13, uma colagenase, em momento anterior ao observado para a metaloprotease-12, envolvida principalmente na destruição das fibras elásticas. Além disto, os autores descrevem um aumento em proporção de volume para colágeno tipo III muito superior ao observado para a elastina. Possivelmente, em nosso estudo, não detectamos aumento da deposição das fibras elásticas devido ao tempo maior requerido por estas fibras para o processo de remodelamento, comparado às fibras de colágeno.

As análises das interleucinas demonstraram que a exposição aos poluentes, por si só, promoveu polarização de macrófagos para fenótipo M2, caracterizada pelo aumento da expressão de IL-4, IL-10 e IL-13. No caso da IL-10, a associação da instilação de elastase e a exposição aos poluentes exacerbou o aumento desta interleucina. Não detectamos aumento destas mesmas interleucinas nos animais instilados com PPE e que não foram expostos aos poluentes.

As interleucinas envolvidas na polarização M1 não apresentaram alterações significativas ao compararmos os diferentes grupos. Inclusive não conseguimos detectar níveis consideráveis de IL-12 e TNF- α em nossas amostras.

Hiemstra e col⁴⁰ demonstraram que em fumantes a expressão de TLR3 em macrófagos alveolares é diminuída quando comparados aos não fumantes, acompanhada por uma redução na produção de Cxcl10 e que a expressão de genes relacionados à polarização M1 estava diminuída em macrófagos de fumantes revelando um desvio para polarização M2⁴⁰.

Shaykhiev e col⁴⁸ demonstraram que o tabagismo induz em macrófagos alveolares de fumantes saudáveis polarização para fenótipo M2, caracterizado por uma substancial redução da maioria dos genes associados à polarização M1.

Também avaliamos os fenótipos M1 e M2 em homogenato de pulmão baseados no estudo de Misharin e col.⁶⁸ e observamos que o fenótipo M2 era o predominante em nossas amostras.

Os macrófagos de fenótipo M2 são reconhecidos por sua ação fagocítica, especialmente a fagocitose de células que sofreram apoptose (eferocitose). Alguns estudos que avaliaram o papel dos macrófagos na eliminação de partículas poluentes revelaram que estas células são responsáveis pela eliminação das partículas que não foram processadas pelo sistema mucociliar⁶⁹⁻⁷². Muitos estudos já demonstraram o quanto as partículas com tamanhos menores oferecem maior perigo à integridade pulmonar por conseguirem alcançar porções mais distais e em grande quantidade⁷³⁻⁷⁵.

Além disso, também já foi demonstrado que quando a concentração destas partículas atinge níveis muito altos, ocorre uma diminuição da ação fagocítica dos macrófagos, uma vez que estas células não conseguem fagocitar um volume maior que 60% de seu volume total^{76, 77}. Outro fator importante é a constituição destas partículas, a qual poderá acarretar a apoptose destas células, com consequente liberação de agentes pró-inflamatórios no sítio pulmonar, intensificando e prolongando este processo inflamatório⁶¹.

Em relação à polarização dos macrófagos para fenótipos M1 e M2, embora não exista um consenso, a maior parte dos estudos demonstra que com a progressão da DPOC ocorre uma supressão de polarização M1 e aumento de polarização para M2 e isto ocorre como uma resposta do sítio pulmonar na tentativa de reduzir o processo inflamatório via produção de interleucinas anti-inflamatórias como a IL-10. Entretanto, nossos resultados demonstraram que a poluição por si só promoveu a polarização para fenótipo M2, uma vez que o aumento de IL-4, IL-10 e IL-13 ocorreram nos animais expostos aos poluentes independentemente de terem recebido ou não a instilação de elastase.

Hiura e col⁶⁰ demonstraram em cultura de macrófagos de murinos que a presença de partículas derivadas do diesel (DEP) acarretou o aumento da produção de radicais livres por estas células, associado ao aumento da demanda por fagocitose destas partículas pelos macrófagos, o que acarretou a ativação de cascatas de reações envolvendo as caspases resultando em aumento de morte celular.

Nosso grupo demonstrou em estudo prévio que animais que receberam instilação de elastase e foram mantidos em níveis ambientais de poluentes apresentaram uma exacerbação do enfisema comparados aos que receberam o mesmo tratamento e foram mantidos em câmaras que recebiam ar filtrado, sem poluentes e que tais achados se deram principalmente devido ao aumento do mecanismo de estresse oxidativo comprovado pelo aumento da produção de isoprostano no parênquima pulmonar⁷⁸.

Em nosso estudo é possível que a progressão e manutenção do processo inflamatório e aumento da lesão tecidual estejam associados a não remoção efetiva das partículas de poluentes, especialmente as menores como as PM_{2,5}, que conseguem atingir as porções mais distais do trato respiratório, uma vez que já está amplamente demonstrado que o aumento dos níveis de poluente acarreta exacerbação de doenças respiratórias como asma e DPOC, principalmente na presença de PM₁₀ e PM_{2,5}⁶¹.

Embora tenha havido uma polarização para fenótipo M2 estas células não estão sendo efetivas na remoção das partículas dos poluentes devido ao

aumento do processo de apoptose e consequente aumento das reações de estresse oxidativo.

A avaliação da densidade de células positivas para caspase, através da técnica de imuno-histoquímica, revelou aumento da densidade de células positivas nos grupos que receberam elastase e foram expostos a poluição, sugerindo aumento de apoptose celular.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que a exposição aos poluentes por si só já promoveu um processo inflamatório e o desenvolvimento do enfisema e que as condições inflamatórias foram exacerbadas nos animais previamente instilados com PPE. O predomínio de macrófagos do tipo M2 provavelmente ocorreu em decorrência do aumento da demanda por fagocitose, e que o acúmulo de partículas no sítio pulmonar resultou em aumento de apoptose e manutenção do processo inflamatório propiciando aumento do alargamento dos espaços aéreos distais e aumento da deposição de fibras colágenas e elásticas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2018 (GOLD 2018) - Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD 2018. [cited 2018 mai 21]. Available from: <http://www.goldcopd.org/>.
2. Barnes PJ: Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2013:887-898.
3. WHO. World Health Organization, 2005. Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Global update 2005. Summary of Risk Assessment. Geneva.
4. US Ddld. Bronquite crônica causa 40 mil mortes a cada ano, revela dados do DATASUS [cited 2018 16 maio 2018]. Available from: <http://datasus.saude.gov.br/nucleos->
5. Decramer M, Janssens W, Miravittles M: Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* 2012, 379:1341-1351.
6. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, Schmid V, Buist S: Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J* 2006, 27:397-412.
7. Fletcher C, Peto R: The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1977, 1:1645-1648.
8. American Thoracic S, European Respiratory S: American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 168:818-900.
9. Camelier AA, Winter DH, Jardim JR, Barboza CE, Cukier A, Miravittles M: [Alpha-1 antitrypsin deficiency: diagnosis and treatment]. *J Bras Pneumol* 2008, 34:514-527.
10. Eriksson S: Pulmonary Emphysema and Alpha1-Antitrypsin Deficiency. *Acta Med Scand* 1964, 175:197-205.
11. Salvi SS, Barnes PJ: Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet* 2009, 374:733-743.
12. Andersen ZJ, Hvidberg M, Jensen SS, Ketzel M, Loft S, Sorensen M, Tjonneland A, Overvad K, Raaschou-Nielsen O: Chronic obstructive pulmonary disease and long-term exposure to traffic-related air pollution: a cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 2011, 183:455-461.
13. Sint T, Donohue JF, Ghio AJ: Ambient air pollution particles and the acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Inhal Toxicol* 2008, 20:25-29.

14. Schikowski T, Sugiri D, Ranft U, Gehring U, Heinrich J, Wichmann HE, Kramer U: Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women. *Respir Res* 2005, 6:152.
15. Sunyer J: Lung function effects of chronic exposure to air pollution. *Thorax* 2009, 64:645-646.
16. Kan H, Heiss G, Rose KM, Whitsel E, Lurmann F, London SJ: Traffic exposure and lung function in adults: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Thorax* 2007, 62:873-879.
17. Bunker J, Krahel J, Munack A, Ruschel Y, Schroder O, Emmert B, Westphal G, Muller M, Hallier E, Bruning T: Strong mutagenic effects of diesel engine emissions using vegetable oil as fuel. *Arch Toxicol* 2007, 81:599-603.
18. Downs SH, Schindler C, Liu LJ, Keidel D, Bayer-Oglesby L, Brutsche MH, Gerbase MW, Keller R, Kunzli N, Leuenberger P, Probst-Hensch NM, Tschopp JM, Zellweger JP, Rochat T, Schwartz J, Ackermann-Lieblich U, Team S: Reduced exposure to PM10 and attenuated age-related decline in lung function. *N Engl J Med* 2007, 357:2338-2347.
19. EPA, 2002. Analysis of Biodiesel Impacts on Exhaust Emissions Draft Technical Report.118. United States Environ. Prot. Agency (doi:EPA420-P-02-001).
20. Jalava PI, Aakko-Saksa P, Murtonen T, Happonen MS, Markkanen A, Yli-Pirila P, Hakulinen P, Hillamo R, Maki-Paakkanen J, Salonen RO, Jokiniemi J, Hirvonen MR: Toxicological properties of emission particles from heavy duty engines powered by conventional and bio-based diesel fuels and compressed natural gas. *Part Fibre Toxicol* 2012, 9:37.
21. development Ofec-oa: Environmental Outlook to 2050: the consequences of Inaction.2012. 2012.
22. CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo -2016. Cetesb 125p., São Paulo,2016.
23. Ghio AJ, Hall A, Bassett MA, Cascio WE, Devlin RB: Exposure to concentrated ambient air particles alters hematologic indices in humans. *Inhal Toxicol* 2003, 15:1465-1478.
24. Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC, Jr., Tager I, Expert Panel on P, Prevention Science of the American Heart A: Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* 2004, 109:2655-2671.
25. Rhoden CR, Lawrence J, Godleski JJ, Gonzalez-Flecha B: N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation

- exposure to concentrated ambient particles. *Toxicol Sci* 2004, 79:296-303.
26. Almeida NM: **Efeitos hemodinâmicos, inflamatórios e histológicos após a exposição a exaustão do combustível diesel em modelo experimental de hipertensão arterial.** Faculdade de Medicina da USP, 2017.
 27. Brito JM, Belotti L, Toledo AC, Antonangelo L, Silva FS, Alvim DS, Andre PA, Saldiva PH, Rivero DH: Acute cardiovascular and inflammatory toxicity induced by inhalation of diesel and biodiesel exhaust particles. *Toxicol Sci* 2010, 116:67-78.
 28. de Brito JM, Mauad T, Cavalheiro GF, Yoshizaki K, de Andre PA, Lichtenfels A, Guimaraes ET, Rivero D, Antonangelo L, Oliveira LB, Pedroso LRM, Macchione M, Saldiva PHN: Acute exposure to diesel and sewage biodiesel exhaust causes pulmonary and systemic inflammation in mice. *Sci Total Environ* 2018, 628-629:1223-1233.
 29. Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, Van Vyve T, Simony-Lafontaine J, Lequeu N, Vic P, Enander I, Godard P, Michel FB: Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1993, 92:537-548.
 30. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ: Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 153:530-534.
 31. Costa HC: **células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da dpoc.** Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2009.
 32. Barnes PJ: Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 2008, 8:183-192.
 33. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallero G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM: CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 160:711-717.
 34. Barnes PJ: New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Med* 2003, 54:113-129.
 35. Bourdin A, Burgel PR, Chanez P, Garcia G, Perez T, Roche N: Recent advances in COPD: pathophysiology, respiratory physiology and clinical aspects, including comorbidities. *Eur Respir Rev* 2009, 18:198-212.
 36. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M: Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 2013, 229:176-185.

37. Bratton DL, Henson PM: Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol* 2011, 32:350-357.
38. Sica A, Mantovani A: Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012, 122:787-795.
39. Gordon S, Mantovani A: Diversity and plasticity of mononuclear phagocytes. *Eur J Immunol* 2011, 41:2470-2472.
40. Hiemstra PS: Altered macrophage function in chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Am Thorac Soc* 2013, 10 Suppl:S180-185.
41. George L, Upadhyay S, Ganguly K, Stoeger T: Macrophage Polarization in Lung Biology and Diseases. 2014.
42. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004, 25:677-686.
43. Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A: Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 28:555-562.
44. Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM: Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J* 2005, 25:250-258.
45. Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, Holmes M: Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 2003, 81:289-296.
46. Lofdahl JM, Wahlstrom J, Skold CM: Different inflammatory cell pattern and macrophage phenotype in chronic obstructive pulmonary disease patients, smokers and non-smokers. *Clin Exp Immunol* 2006, 145:428-437.
47. Hodge S, Matthews G, Mukaro V, Ahern J, Shivam A, Hodge G, Holmes M, Jersmann H, Reynolds PN: Cigarette smoke-induced changes to alveolar macrophage phenotype and function are improved by treatment with procysteine. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011, 44:673-681.
48. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-Barel Y, Harvey BG, O'Connor TP, Crystal RG: Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 2009, 183:2867-2883.
49. Hiraiwa K, van Eeden SF: Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants. *Mediators Inflamm* 2013, 2013:619523.

50. Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, Bernstein IL, Bernstein JA, Nel A, Peden D, Diaz-Sanchez D, Tarlo SM, Williams PB: Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol* 2004, 114:1116-1123.
51. Nordenhall C, Pourazar J, Ledin MC, Levin JO, Sandstrom T, Adelroth E: Diesel exhaust enhances airway responsiveness in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 2001, 17:909-915.
52. Ohta K, Yamashita N, Tajima M, Miyasaka T, Nakano J, Nakajima M, Ishii A, Horiuchi T, Mano K, Miyamoto T: Diesel exhaust particulate induces airway hyperresponsiveness in a murine model: essential role of GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol* 1999, 104:1024-1030.
53. Stolzel M, Breitner S, Cyrus J, Pitz M, Wolke G, Kreyling W, Heinrich J, Wichmann HE, Peters A: Daily mortality and particulate matter in different size classes in Erfurt, Germany. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2007, 17:458-467.
54. Franck U, Odeh S, Wiedensohler A, Wehner B, Herbarth O: The effect of particle size on cardiovascular disorders--the smaller the worse. *Sci Total Environ* 2011, 409:4217-4221.
55. Huang YC, Li Z, Harder SD, Soukup JM: Apoptotic and inflammatory effects induced by different particles in human alveolar macrophages. *Inhal Toxicol* 2004, 16:863-878.
56. Schins RP, Lightbody JH, Borm PJ, Shi T, Donaldson K, Stone V: Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004, 195:1-11.
57. Mukae H, Hogg JC, English D, Vincent R, van Eeden SF: Phagocytosis of particulate air pollutants by human alveolar macrophages stimulates the bone marrow. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, 279:L924-931.
58. van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, Qui D, Vincent R, Hogg JC: Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164:826-830.
59. Hogg JC, Van Eeden S: Pulmonary and systemic response to atmospheric pollution. *Respirology* 2009, 14:336-346.
60. Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N, Nel AE: Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol* 1999, 163:5582-5591.
61. Ling SH, van Eeden SF: Particulate matter air pollution exposure: role in the development and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2009, 4:233-243.

62. Costa FM: **Efeitos do resíduo da queima de óleo diesel (ROFA) e da inflamação pulmonar alérgica crônica em três linhagens de camundongos.** Faculdade de Medicina da USP, 2007.
63. Lopes FD, Pinto TS, Arantes-Costa FM, Moriya HT, Biselli PJ, Ferraz LF, Lichtenfels AJ, Saldiva PH, Mauad T, Martins MA: Exposure to ambient levels of particles emitted by traffic worsens emphysema in mice. *Environ Res* 2009, 109:544-551.
64. Carvalho-Oliveira R, Pires-Neto RC, Bustillos JO, Macchione M, Dolhnikoff M, Saldiva PH, Garcia ML: Chemical composition modulates the adverse effects of particles on the mucociliary epithelium. *Clinics (Sao Paulo)* 2015, 70:706-713.
65. Mauad T, Rivero DH, de Oliveira RC, Lichtenfels AJ, Guimaraes ET, de Andre PA, Kasahara DI, Bueno HM, Saldiva PH: Chronic exposure to ambient levels of urban particles affects mouse lung development. *Am J Respir Crit Care Med* 2008, 178:721-728.
66. Shifren A, Mecham RP: The stumbling block in lung repair of emphysema: elastic fiber assembly. *Proc Am Thorac Soc* 2006, 3:428-433.
67. Robertoni FS, Olivo CR, Lourenco JD, Goncalves NG, Velosa AP, Lin CJ, Flo CM, Saraiva-Romanholo BM, Sasaki SD, Martins MA, Teodoro WR, Lopes FD: Collagenase mRNA Overexpression and Decreased Extracellular Matrix Components Are Early Events in the Pathogenesis of Emphysema. *PLoS One* 2015, 10:e0129590.
68. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Mutlu GM, Budinger GR, Perlman H: Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013, 49:503-510.
69. Obot CJ, Morandi MT, Beebe Jr TP, Hamilton RF, Holian A: Surface Components of Airborne Particulate Matter Induce Macrophage Apoptosis through Scavenger Receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2002, 184:98-106.
70. Stern ST, Adiseshaiah PP, Crist RM: Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part Fibre Toxicol* 2012, 9:20.
71. Monick MM, Powers LS, Walters K, Lavan N, Zhang M, Gerke A, Hansdottir S, Hunninghake GW: Identification of an autophagy defect in smokers' alveolar macrophages. *J Immunol* 2010, 185:5425-5435.
72. Kreyling WG: Intracellular particle dissolution in alveolar macrophages. *Environ Health Perspect* 1992, 97:121-126.
73. Geiser M: Morphological aspects of particle uptake by lung phagocytes. *Microsc Res Tech* 2002, 57:512-522.

74. Bowden DH: The alveolar macrophage. *Environ Health Perspect* 1984, 55:327-341.
75. Brain JD: Mechanisms, measurement, and significance of lung macrophage function. *Environ Health Perspect* 1992, 97:5-10.
76. MacNee W, Donaldson K: Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *European Respiratory Journal* 2003, 21:47S-51s.
77. Morrow PE: Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs. *Fundam Appl Toxicol* 1988, 10:369-384.
78. Lopes FD, Toledo AC, Olivo CR, Prado CM, Leick EA, Medeiros MC, Santos AB, Garippo A, Martins MA, Mauad T: A comparative study of extracellular matrix remodeling in two murine models of emphysema. *Histol Histopathol* 2013, 28:269-276.

9. ANEXOS

Anexo 1

Propriedades físicas do diesel.

Determinação	Métodos	Especificações *	Resultados
Aspecto	NBR 14954	Limpo e sem água e material particulado	turvo sem água e material particulado
Cor visual	Visual	Amarelo	Amarelo
Cor ATSM	NBR 14483	-	Cor ASTM 1.5
Teor de biodiesel (% vol. / Vol.)	NBR 15568	7.5 – 8.5	8.0
Enxofre (mg / kg)	ASTM D5453	máx. 10	5.5
Destilação	NBR 9619	-	-
Destilação 10% vol. Recuperado (° C)	NBR 9619	mín. 180	199.6
Destilação 50% vol. Recuperado (° C)	NBR 9619	245 - 295	261.2
Destilação 85% vol. Recuperado (° C)	NBR 9619	-	319.7
Destilação 90% vol. Recuperado (° C)	NBR 9619	-	328.9
Destilação 95% vol. Recuperado (° C)	NBR 9619	máx. 370	342.0
Massa específica para 20 ° C (kg / m ³)	NBR 14065	815 -850	833.1
Ponto de inflamação (° C)	NBR 14598	mín. 38	59.0
Visibilidade cinemática a 40 ° C (mm ² /	NBR 10441	2 - 5	2.466
Ponto de entupimento (° C)	NBR 14747	-	-19
Resíduo de carbono Ramsbottom em 10% da destilação final (% m / m)	NBR 14318	máx. 0.25	<0.15
Cinzas (% m / m)	NBR 9842	máx. 0.010	0.002
Corrosividade ao cobre (3 horas e 50 °	NBR 14359	máx. 1	1A
Teor de água Karl-Fischer (mg / kg)	ASTM D6304	máx. 200	282
Contaminação total (mg / kg)	EN 12662	máx. 24	14
Teor de água e sedimento (% vol. / Vol.)	ASTM D 2709	máx. 0.05	0.02
Índice de neutralização (mg KOH / g)	NBR 14248	note	0.04
Lubrificação (μ)	ASTM D6079	máx. 520	185
Condutividade elétrica (pS / m)	ASTM D2624	mín. 25	1480

* Resolução ANP nº 50/2013. Estabelecer especificações para o uso rodoviário de diesel e as obrigações relativas ao controle de qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional. Fonte: ANP, 2013.

Anexo 2

Certificado do diesel

Anexo 04 PE-LEL-013

Relatório de Ensaio nº NA 4959/17

Informações do Cliente	
Cliente:	FUNDAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA
Endereço:	AV. REBOUÇAS, 381 - JD. PAULISTA - SÃO PAULO - SP
Contato:	JOSÉ MARIA BRITO

Informações da Amostra	
Identificação da amostra:	DIESEL S10 - EVOLUX

Informações da amostra	
Tipo de combustível:	DIESEL S10
Data de coleta:	-
Ponto de coleta:	-
Outras informações:	-

Identificação da Amostra	
Nº da amostra:	4959/17
Data do recebimento:	01/06/2017
Data da realização:	21/06/2017

Condições da Amostra	
Enviada em frasco de vidro fornecido pelo cliente com aprox.	1000 mL

Relatório de Ensaio emitido em: 21/06/2017

Escola SENAI Conde José Vicente de Azevedo
 Rua Moreira de Godói, 226 - Ipiranga - São Paulo - CEP: 04266-060
 Tel.: (11) 2066 1988 - e-mail: leico@sp.senai.br - site: automobilstica.sp.senai.br