ROBSON SERIANI

**Avaliação da toxicidade de partículas da exaustão do diesel em
explantes de traqueia e cultura de células do epitélio
respiratório: estudo da expressão gênica, citotoxicidade e
sinalização celular**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Mariangela
Macchione

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Seriani, Robson

Avaliação da toxicidade de partículas da exaustão do diesel em explantes de tranqueia e cultura de células do epitélio respiratório : estudo da expressão gênica, citotoxicidade e sinalização celular / Robson Seriani. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Mariangela Macchione.

Descritores: 1.Emissões de veículos 2.Mucosa respiratória/citologia 3.Sistema de sinalização das MAP quinases 4.Estresse oxidativo 5.Toxicidade 6.Metais 7.Hidrocarbonetos

USP/FM/DBD-053/15

À minha amada esposa, pais, familiares, sobrinhos e amigos. A simples existência de vocês é um incentivo para fazer uma ciência que possa contribuir para uma sociedade melhor.

Aos meus professores e alunos.

AGRADECIMENTOS

À Dr^a. Mariangela Macchione, agradeço pela oportunidade de desenvolver essa tese sob sua orientação. Com você, tive o privilégio, não apenas de fazer ciência, mas também de observar e aprender com suas atitudes, típicas de uma pessoa carismática, de muita sabedoria e muito humanismo.

À Professora Dr^a. Elnara Marcia Negri, a quem me confiou seu nome durante as fases iniciais da orientação e junto à FAPESP para concessão da bolsa de Doutorado-direto (Processo 2011/50334-7), sem a qual não poderia realizar este estudo.

Aos Professores da disciplina de Patologia: Dr. Paulo Saldiva, Dr^a. Thais Mauad e Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, pelos ensinamentos transmitidos, e pela contribuição nas discussões dos artigos e na minha formação docente durante o estágio PAE.

Às Professoras Dr^a. Iolanda Tibério Calvo e Dr^a. Maria Lucia Bueno Garcia, do Departamento de Clínica Médica, e ao Dr. Nelson Gouvea, do Departamento de Medicina Preventiva, por contribuir na minha formação docente e pelo acolhimento como aluno PAE.

Ao Professor Dr. Adriano M. Alencar, e às pós-graduandas Marcia Zotti e Diana Martinez, por toda ajuda e pela dedicação nas análises da reologia celular.

Aos pesquisadores: Dr^a. Monique Matsuda (LIM33), por todo o auxílio nos protocolos de expressão gênica e auxílio no estabelecimento da cultura celular; Dr Marcelo Seckler, pelas análises de microscopia eletrônica; Dr^a Ana Lucia Garippo (InCor) durante o processamento das amostras na microscopia confocal; Mara de Souza Junqueira (LIM24) , pela padronização e execução do *western blot*; às técnicas de laboratório Kelly e Esmeralda, pelo auxílio no preparo das lâminas de histologia. Aos pesquisadores externos, Dr. Thiago Franco e Dr^a. Ana Paula Loureiro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, e Dr^a Carla Lima e Marcio Ferreira, do Instituto Butantã, pela ajuda com o estabelecimento na cultura celular de BEAS-2B.

Aos professores da UNESP, São Vicente, Dr. Marcos A. Oliveira e Dr Denis Abessa, por toda a contribuição no projeto e nas análises das peroxiredoxinas.

Às pesquisadoras do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, Dr^a. Dolores H. R. Rivero, Dr^a. Ana Julia F. Lichtenfels, Dr^a. Regiani Carvalho-Oliveira e Dr^a. Eliane Tigre, por toda a ajuda e amizade ao longo destes anos. Faltam palavras para expressar o carinho e a gratidão que tenho por vocês.

Aos bioteristas Davi Francisco e Ivandir, pela ajuda no manuseio dos animais, e Luiz Afonso Pires, pelo treinamento e pela obtenção dos animais.

Aos funcionários da faculdade, Tania, Ygor, Vanda, Tiago, Weluma, Nildo, Carlão, Nilda, Ana, Vera, Sonia e Dalva!

Aos colegas da pós-graduação, pela contribuição intelectual e nas análises de bancada: Aristides Correia, Kelly Yoshizaki, José Mára Brito, Natália Madureira, Larissa Emídio, Luciano Bellotti, Daniela Perrone, Douglas Renê, Francine Maria Alemida, Paloma Grava Krempel, Luciana Duzzolina, Carlos Alexandre Breyer, Paula Regina Pereira Silva, Mara Junqueira, Claudia Emmanuele, Diana Martinez, Camila Villegas e tantos outros que conheci nas disciplinas cursadas e que me falha a memória neste momento, mas que contribuíram direta e indiretamente.

À Valquíria Dias, Assessora Científica, pela atenção e disponibilidade na revisão do português e formatação desta tese.

Aos meus pais e familiares. Obrigado por me apoiarem mesmo sem saber exatamente a que eu estava me dedicando!

Aos amigos da banda IN F.U.G.A., que compuseram a trilha sonora dessa tese e da minha vida nos últimos 17 anos!

Aos meus sobrinhos, Eduardo M. Grillo, Arthur Seriani Nakagomi, Clara Ferrador e aos que estão a caminho...

Ao Gato Branco, Bisteca e aos bichos que também alegam meu dia.

Enfim, à minha esposa Andrea Senatore Grillo, mulher sábia, guerreira e muito amável com quem compartilhei e compartilho as alegrias e as frustrações dos experimentos, das publicações, e de tantas outras conquistas e ensinamentos diários. Esta tese também é sua, assim como todas minhas conquistas! Muito obrigado pela paciência e por acreditar em mim. Muitas outras alegrias e conquistas nos aguardam! Te amo!

Obrigado, Deus, pela vida e por todas as pessoas que colocaste em meu caminho, eu não saberia escolher tão bem.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.
Cora Coralina

*“Um sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só, mas
sonho que se sonha junto é realidade”.*
Raul Seixas

♪ “...for my family, for my friends...”
Agnostic Front

♪ “...your spirit's alive...”
Dropkick Murphys

♪ “...aos que lutam...”
IN F.U.G.A.

♪ “...honor is all we know...”
RANCID

*“O medíocre discute pessoas. O comum discute fatos.
O sábio discute ideias”.*
Provérbio Chinês

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço 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: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	3
1.1 Poluição atmosférica: meio ambiente, saúde e a toxicidade das partículas da exaustão do diesel (DEP)	3
1.2 Sistema respiratório e mecanismos de defesa	7
1.3 Estruturas celulares alvos do DEP no epitélio respiratório: mitocôndrias, membrana celular e citoesqueleto.	11
1.3.1 Mitocôndrias	11
1.3.2 Membrana celular	12
1.3.3 Citoesqueleto	12
1.4 Sinalização celular por proteínas quinases ativadas por mitógenos ou MAPK	13
1.5 Estresse oxidativo, sistema de defesa antioxidante e apoptose.	15
1.6 Explante de traqueias e cultura de células de epitélio brônquico como modelo experimental em estudos de toxicidade do DEP.	18
2 HIPÓTESES	23
3 OBJETIVOS	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Obtenção do DEP	31
4.2 Explante de traqueias	32
4.2.1 Exposição do explante de traqueia ao DEP bruto e DEP tratado com ácido nítrico (DEP/NA) e solventes (DEP/HEX e DEP/MET).	33
4.2.1.1 Estudo da qualidade e quantidade de muco por meio de morfometria com coloração de Azul Alciano e ácido periódico, e reagente de Shiff	33
4.2.1.2 Extratos proteicos	34
4.2.1.3 Dosagem de proteína.....	34
4.2.1.4 Western blot	34

4.2.1.5 Análise morfológica	35
4.2.1.6 Teste de apoptose nos explantes de traqueia	36
4.3 Cultura de células epiteliais BEAS-2B	37
4.3.1 Extratos proteicos	38
4.3.2 Teste de citotoxicidade para avaliação da concentração teste	38
4.3.3 Determinação dos oligonucleotídeos de genes de enzimas relacionadas com estresse oxidativo	38
4.3.4 Extração e quantificação de RNA de BEAS-2B expostas ao DEP e DEP/HEX	39
4.3.5 Síntese de cDNA e análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real dos genes envolvidos no estresse oxidativo e apoptose (qPCR)	40
4.3.6 Análise da integridade do citoesqueleto por meio da microscopia confocal e viscoelasticidade celular pelo método de citometria óptica magnética de rotação (OMTC)	41
4.4 Análise Estatística	42
5 RESULTADOS	45
5.1 Caracterização DEP bruto e submetido ao tratamento com ácido e com solventes para remoção de compostos orgânicos e inorgânico; e determinação dos valores de citotoxicidade para BEAS-2B	45
5.1.1 Explantes de traqueias expostos ao DEP – Western Blot	47
5.1.2 Avaliação do perfil das mucinas em explantes de traqueias expostas ao DEP	48
5.1.3 Avaliação do potencial apoptótico do DEP em explantes de traqueias expostas ao DEP	50
5.1.4 Avaliação do perfil das mucinas em explantes de traqueias expostas ao DEP e DEP tratado com ácido nítrico e solvente	51
5.2 Estudos em cultura de células de epitélio brônquico humano: BEAS- 2B	53
5.2.1 Citotoxicidade do DEP e DEP/HEX em BEAS-2B	53
5.2.1.1 LDH	53
5.2.1.2 MTT	54
5.3 Ativação de MAPK em BEAS-2B expostas ao DEP e DEP/HEX	56
5.4 Integridade do citoesqueleto em microscopia confocal	57
5.4.1 Análises da viscoelasticidade celular em BEAS-2B expostas ao DEP e DEP/HEX	58
5.5 Expressão gênica de enzimas antioxidantes, CYP1A' e apoptose	59
6 DISCUSSÃO	65

6.1 Estudo I – Ativação de MAPK, alteração no perfil das mucinas e apoptose em explantes de traqueias expostas ao DEP.	65
6.2 Estudo II - Alteração no perfil das mucinas de explantes de traqueias expostas ao DEP, DEP/NA, DEP/HEX e DEP/MET.....	68
6.3 Estudo III – Enriquecimento inorgânico das partículas do DEP por meio do tratamento com hexano e seus efeitos na viscoelasticidade celular, citotoxicidade e ativação de MAPK em BEAS-2B.....	69
6.4 Estudo IV - Expressão gênica de enzimas antioxidantes, citotoxicidade e viscoelasticidade celular em células expostas ao DEP.....	71
7 CONCLUSÕES	77
8 REFERÊNCIAS.....	81

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
µg/mL	Micrograma por Microlitro
ANFAVEA	Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores
ATP	Trifosfato de Adenosina
BEAS-2B	Células de Epitélio Brônquico Humano
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CO ₂	Dióxido de Carbono
DEP	Partículas da exaustão de motores a diesel
DEP/HEX	DEP tratado com solvente hexano
DEP/MET	DEP tratado com solvente metanol
DEP/NA	DEP tratado com ácido nítrico
DETRAN/SP	Departamento de Trânsito de São Paulo
<i>DMEN-F12</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium Ham's F12</i>
EGFR	Receptores de Fator de Crescimento Epidérmico
ERK	<i>Extracellular-Signal-Regulated Kinases</i>
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IARC	Agência Internacional em Pesquisa de Câncer
JNK	<i>c-Jun N-Terminal Kinases</i>
LAPAE-FMUSP	Laboratório de Poluição Atmosférica da Faculdade de Medicina da USP
LDH	Lactato Dehidrogenase
MAPKs	Proteínas Quinase Ativadas por Mitógeno
MP10	Material Particulado de 10 µm

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
ng/g	Nanogramas por Grama
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
OMTC	Citometria Óptica Magnética de Oscilação
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase
pERK	<i>phospho Extracellular-Signal-Regulated Kinases</i>
pJNK	<i>phospho c-Jun N-Terminal Kinases</i>
ppm	Partes por Milhão
PVDF	<i>Hydrophobic Polyvinylidene Difluoride</i>
rTNF	Receptores de Fatores de Necrose Tumoral
SOD1	Superóxido Dismutase 1
SOD2	Superóxido Dismutase 2
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Contribuição das categorias de veículos na emissão de material particulado no Estado de São Paulo em 2013 (CETESB, 2013).....	5
Figura 2	Emissões relativas por tipo de fonte na Região Metropolitana de São Paulo.	5
Figura 3	Ilustração com características da traqueia e dos brônquios.....	8
Figura 4	Epitélio respiratório com presença de células ciliadas e mucosas.	10
Figura 5	Modelo simplificado da ativação de MAPK ERK, JNK e P38.	15
Figura 6	Preparação do explante de camundongos BALB/c (a). Após a retirada das traqueias, foram mantidas em estufa por 24 horas e, posteriormente, expostas às concentrações de DEP em diferentes tempos.....	33
Figura 7	A) Células de Epitélio Brônquico Humano (BEAS-2B) em aumento de 1000x. B) Cultivo e manejo das células em <i>transwell</i> e remoção do meio de cultura na parte superior do <i>transwell</i> e c) exposição ao DEP e DEP/HEX.	37
Figura 8	Extração do RNA por meio da técnica do Trizol®.	40
Figura 9	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de A) meio de cultura DMEM + F12 + suplementos; B) Concentração de 50 µg/mL de DEP – aumento de 10.000x; C) Concentração de 100 µg/mL de DEP – aumento de 10.000x; e D) Concentração de 100 µg/mL de DEP – aumento de 40.000x.	46
Figura 10	Apresentação gráfica de células expostas ao DEP nas concentrações de 5 a 250 µg/mL durante 60 minutos	47
Figura 11	A e B representam as análises do Western Blot de traqueia expostas ao DEP em concentrações de 50 e 100 µg/mL nos tempos de 30 e 60 minutos	48
Figura 12	Representação gráfica (à esquerda da figura) do perfil de mucinas de explantes de traqueia submetidos à exposição ao DEP.....	49

Figura 13	Imagens e representação gráfica da proporção de focos apoptóticos em explantes de traqueia de camundongo BALB/c.....50
Figura 14	Explantes de traqueia de camundongo BALB/c expostas à DEP e DEP/NA, DEP/HEX e DEP/MET. Estão identificados a presença de muco ácido (AB+), muco misto (PAS/AB+), vacuolização e muco neutro (PAS+).51
Figura 15	Representação gráfica de muco ácido em traqueias expostas a DEP, DEP/NA, DEP/HEX e DEP/MET51
Figura 16	Representação gráfica de muco neutro em traqueias expostas a DEP, DEP/NA, DEP/HEX e DEP/MET52
Figura 17 -	Representação gráfica de traqueias expostos a 50 µg /mL de DEP a 30 minutos (*p=0,007) mostraram um aumento significativo na vacuolização.53
Figura 18	Medida de Lactato de hidrogenase baseado na reação com NADH.....54
Figura 19	Medida de Lactato dehidrogenase baseado na reação com NADH.....54
Figura 20	Análise do MTT de BEAS-2B expostas ao DEP e DEP/HEX.....55
Figura 21	Análise do MTT de BEAS-2B expostas ao DEP por 1 e 2 horas55
Figura 22	Ativação de MAPK ERK e JNK em BEAS-2B, expostas ao DEP e DEP/HEX, e controle.....56
Figura 23	A fotomicroscopia mostra a visualização da integridade do citoesqueleto por meio da análise da coerência das fibras de actina57
Figura 24	Análise da viscoelasticidade celular de BEAS-2B controle, e expostas ao DEP e DEP/HEX.....58
Figura 25	Concentração relativa de mRNA de SOD1 (gene que codifica a produção da enzima superóxido dismutase com atividade antioxidante no citosol) de BEAS-2B controle e expostas a 15 µgmL de DEP por 1 e 2 horas59
Figura 26	Concentração relativa de mRNA de SOD2 (gene que codifica a produção da enzima superóxido dismutase com atividade antioxidante mitocondrial) de BEAS-2B controle e expostas a 15 µgmL de DEP por 1 e 2 horas60

Figura 27	Concentração relativa de mRNA de GPx (gene que codifica a produção da enzima glutathione peroxidase com atividade antioxidante no citosol) de BEAS-2B controle e expostas a 15 µg/mL de DEP por 1 e 2 horas.....	60
Figura 28	Concentração relativa de mRNA de CYP1A1 de BEAS-2B controle e expostas a 15 µg/mL de DEP por 1 e 2 horas	61
Figura 29	Concentração relativa de mRNA de Caspase-3 de BEAS-2B controle e expostas a 15 µg/mL de DEP por 1 e 2 horas	62
Figura 30	Concentração relativa de mRNA de BCL-2 de BEAS-2B controle e expostas a 15 µg/mL de DEP por 1 e 2 horas	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Oligonucleotídeos e suas respectivas sequências39
Tabela 2	Níveis de metais (ppm) do DEP bruto e após tratamento com ácido nítrico (DEP/NA), Hexano (DEP/HEX) e Metanol (DEP/MET).45
Tabela 3	Níveis de hidrocarbonetos (ng/g) do DEP bruto e após tratamento com ácido nítrico (DEP/NA), Hexano (DEP/HEX) e Metanol (DEP/MET).45

RESUMO

Seriani R. *Avaliação da toxicidade de partículas da exaustão do diesel em explantes de traqueia e cultura de células do epitélio respiratório: estudo da expressão gênica, citotoxicidade e sinalização celular* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Partículas da exaustão de motores a diesel (DEP) têm propriedades toxicológicas, devido às características físico-químicas. O DEP é capaz de ativar as vias de sinalização intracelular e induzir alterações metabólicas em células e tecidos do sistema respiratório. O objetivo desta tese foi: 1) avaliar o perfil das mucinas e alterações epiteliais em explantes de traqueia de camundongo BALB/c expostos ao DEP e DEP tratado com ácido nítrico e solventes orgânicos; e 2) em cultura de células de epitélio brônquico humano (BEAS-2B) expostas ao DEP e DEP tratado com hexano (DEP/HEX) para avaliar ativação de MAPK (ERK e JNK), citotoxicidade, integridade de citoesqueleto, viscoelasticidade celular e expressão gênica de enzimas envolvidas no estresse oxidativo e apoptose. Os resultados mostraram que, em explantes de traqueia, o DEP causa aumento significativo em relação ao grupo controle na quantidade de muco ácido ($p=0,001$), diminuição no muco neutro ($p=0,001$), diminuição de muco misto ($p=0,001$), aumento de vacuolização ($p=0,001$), aumento de apoptose ($p=0,001$), ora com aumento de pERK e diminuição de pJNK, e vice-versa. Os explantes submetidos à exposição ao DEP e DEP/MET aumentaram significativamente o muco ácido ($p=0,01$) e DEP/HEX provocou aumento da extrusão do muco ($p=0,007$), provavelmente devido à ação do enriquecimento inorgânico. Para as células BEAS-2B, nos resultados obtidos com células epiteliais expostas ao DEP e DEP/HEX, foram observadas alterações na membrana citoplasmática, mitocôndrias e citoesqueleto. As células expostas apenas ao DEP em baixas concentrações (15ug/mL) apresentaram alterações na expressão de genes envolvidos no apoptose (BCL-2 e Caspase-3 ($p=0,05$ e $p=0,01$)) e estresse oxidativo [(SOD1 e SOD2 e GPx. $p=0,01$)], e CYP1A1 ($p=0,01$).

Descritores: Emissões de veículos; Mucosa respiratória/citologia; Sistema de sinalização das MAP quinases; Estresse oxidativo; Toxicidade; Metais; Hidrocarbonetos.

ABSTRACT

Seriani R. *Toxicity tests on tracheal explants and respiratory epithelial cells exposed to diesel exhaust particles: a study on gene expression, cytotoxicity, and cell signaling* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Partículas da exaustão de motores a diesel (DEP) têm propriedades toxicológicas, devido às características físico-químicas. O DEP é capaz de ativar as vias de sinalização intracelular e induzir alterações metabólicas em células e tecidos do sistema respiratório. O objetivo desta tese foi: 1) avaliar o perfil das mucinas e alterações epiteliais em explantes de traqueia de camundongo BALB/c expostos ao DEP e DEP tratado com ácido nítrico e solventes orgânicos; e 2) em cultura de células de epitélio brônquico humano (BEAS-2B) expostas ao DEP e DEP tratado com hexano (DEP/HEX) para avaliar ativação de MAPK (ERK e JNK), citotoxicidade, integridade de citoesqueleto, viscoelasticidade celular e expressão gênica de enzimas envolvidas no estresse oxidativo e apoptose. Os resultados mostraram que, em explantes de traqueia, o DEP causa aumento significativo em relação ao grupo controle na quantidade de muco ácido ($p=0,001$), diminuição no muco neutro ($p=0,001$), diminuição de muco misto ($p=0,001$), aumento de vacuolização ($p=0,001$), aumento de apoptose ($p=0,001$), ora com aumento de pERK e diminuição de pJNK, e vice-versa. Os explantes submetidos à exposição ao DEP e DEP/MET aumentou significativamente o muco ácido ($p=0,01$) e DEP/HEX provocou aumento da extrusão do muco ($p=0,007$), provavelmente devido à ação do enriquecimento inorgânico. Para as células BEAS-2B, nos resultados obtidos com células epiteliais expostas ao DEP e DEP/HEX, foram observadas alterações na membrana citoplasmática, mitocôndrias e citoesqueleto. As células expostas apenas ao DEP em baixas concentrações (15ug/mL) apresentaram alterações na expressão de genes envolvidos no apoptose (BCL-2 e Caspase-3 ($p=0,05$ e $p=0,01$) e estresse oxidativo [(SOD1 e SOD2 e GPx. $p=0,01$)], e CYP1A1 ($p=0,01$).

Descriptors: Vehicle emissions; Respiratory mucosa/cytology; MAP kinase signalling system; Oxidative stress; Toxicity; Metals; Hydrocarbons.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Poluição atmosférica: meio ambiente, saúde e a toxicidade das partículas da exaustão do diesel (DEP)

A poluição atmosférica é um tema pertinente e muito discutido em convenções internacionais em que se procura debater e estabelecer políticas públicas de sustentabilidade em centros urbanos, e padrões para a emissão de substâncias que comprometem a saúde, o clima e o equilíbrio dos ecossistemas.

Substâncias presentes das emissões na atmosfera, como o enxofre, por exemplo, culminam na precipitação de chuva ácida que afetam o solo, as águas superficiais, a germinação de sementes, a fotossíntese, e, também, as estruturas de construções e monumentos (Driscoll *et al.*, 2001, Singh & Agrawal, 2007). Além desse, outros poluentes, como o dióxido de carbono, compostos nitrogenados, metano, hidrocarbonetos, etc., contribuem consideravelmente para o aquecimento global que afeta, direta e indiretamente, a produção de alimentos e a saúde humana (Wheeler & Von Braun, 2013; Franchini & Mannucci, 2015).

Os gases e o material particulado são encontrados em altas concentrações nos centros urbanos e em regiões industrializadas. Essa classe de poluentes atmosféricos é considerada como importante desencadeadora da ativação de vias metabólicas, que causam o aparecimento de várias doenças na população, como câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica, doenças cardiovasculares, distúrbios endócrinos, baixo peso fetal, dentre outras morbidades (Saldiva *et al.*, 2002; Pope & Dockery, 2006, Jasinki *et al.*; Sergio-Chiarelli *et al.*, 2011; Romão *et al.*; Yorifuji & Kashima; Gan *et al.*; Altuğ *et al.*, 2013; Schikowski *et al.*, 2014).

Transformando esses relatos da saúde em custos para os cofres públicos, estudos realizados por Bell *et al.* (2006) estimam que os gastos com internações e visitas médicas, principalmente de crianças com crises asmáticas, tendem a crescer em, aproximadamente, 4 milhões/ano nas

grandes cidades da América Latina, como Santiago, México e São Paulo. Segundo estes autores, o investimento em tecnologias e, conseqüentemente, na melhoria nos padrões de emissão de poluentes atmosféricos podem poupar de 21 e 165 bilhões de dólares/ano.

Do mesmo modo, os estudos de Miraglia *et al.* (2005) comprovaram que o custo da poluição na saúde de crianças e idosos, apenas na cidade de São Paulo, é de U\$ 3.222.676,00/ano. Neste contexto, podemos observar que a poluição atmosférica não é apenas um problema de saúde pública, mas também de grande importância econômica.

A deterioração da qualidade do ar em São Paulo é decorrente das emissões atmosféricas, e grande parte é proveniente dos veículos (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB, 2013).

Segundo os dados do Departamento de Trânsito de São Paulo (DETRAN/SP - outubro/2014), a frota circulante no Estado de São Paulo é 26.316.053. Na capital, há em torno de 7.800.000 veículos, dentre estes, cerca 1.100.000 são movidos a diesel.

Estima-se que os veículos movidos a diesel contribuem para o lançamento de, aproximadamente, 4.640 toneladas/ano de material particulado no Estado de São Paulo e 1.500 toneladas/ano na região metropolitana (CETESB, 2013). Portanto, ainda que a quantidade de automóveis e motocicletas juntos (6.636.227) seja maior do que os veículos pesados (1.120.133), a contribuição na emissão de material particulado destes é apenas de 7% contra 93% daqueles movidos a diesel (Figura 1).

Além disso, a frota diesel é responsável por 35,3% da contribuição relativa de todo o material particulado presente na atmosfera na região metropolitana de São Paulo (Figura 2).

Figura 1 - Contribuição das categorias de veículos na emissão de material particulado no Estado de São Paulo em 2013 (CETESB, 2013)

Figura 2 - Emissões relativas por tipo de fonte na Região Metropolitana de São Paulo

Diante do exposto, em relação aos custos ambientais e de saúde pública, observa-se uma melhoria na qualidade do diesel por meio da redução dos níveis de enxofre.

Historicamente, os níveis de enxofre no óleo diesel já foram de 13.000 ppm no Brasil (Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores - ANFAVEA, 2012). A PETROBRÁS introduziu, em 2005, nas regiões metropolitanas de São Paulo, Santos, Campinas e São José dos Campos, o óleo diesel S500, com teor máximo de 500 ppm de enxofre, que veio substituir o óleo diesel metropolitano com 2.000 ppm de enxofre, trazendo inegáveis vantagens ambientais pela retirada de 75% em massa do enxofre contido no óleo diesel e o equivalente potencial de redução na emissão de óxidos de

enxofre e de fumaça em todos os veículos a diesel na frota, independente da tecnologia construtiva do motor (CETESB, 2011).

Atualmente, óleo diesel S10 (10 ppm de enxofre) representa 15% do volume total de óleo diesel vendido no país. Essa mudança na composição do óleo diesel consumido no país está de acordo com as medidas previstas no Programa de Controle de Poluição do Ar por Veículos Automotores – Proconve – e atende à Resolução ANP nº 65, de 09/11/2012 (ANFAVEA, 2012).

De modo geral, os efeitos deletérios à saúde atribuídos às partículas da exaustão do diesel estão associados aos diversos compostos orgânicos e inorgânicos adsorvidos na sua superfície. Metais, enxofre e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são os principais, e, assim, os efeitos isolados destes componentes têm sido discutidos a fim de determinar quais características influenciam na toxicidade da partícula, e não apenas a toxicidade dependente da massa ou concentração (Saldiva *et al.*, 2002; Takenaka *et al.*, 2004; Laks *et al.*, 2008, Happono, *et al.*, 2010).

Outro fator importante no que se refere à composição elementar do DEP não é apenas a do teor de enxofre, como discutido anteriormente, mas também a composição que é diretamente proporcional ao desempenho e à idade do motor, e modo de operação do condutor (Saldiva *et al.*; Li *et al.*, 2002; Li *et al.*; Pozzi *et al.*, 2003; Takenaka *et al.*, 2004; Ntziachristos *et al.*, 2007, Laks *et al.*, 2008, Delfino *et al.*, 2009, Happono, *et al.*, 2010, Gurbani *et al.*, 2013).

A presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) associados ao material particulado de 10 µm (MP10), na cidade de São Paulo, já foram relatados por De Martinis *et al.* (2002) e Vasconcellos *et al.* (2003). Estes autores relatam valores da ordem de 95,5 ng/m³ a 122 µg/m³ que podem estar ligados diretamente ao aumento do tráfego urbano de veículos movidos a diesel (Bourotte *et al.*, 2005). Além disso, estes compostos possuem alta toxicidade e estão relacionados diretamente com a incidência de câncer de pulmão, distúrbios endócrinos e até como estrógeno ambiental. Igualmente, apontados como causadores da diminuição da fertilidade em machos de várias espécies de aves e mamíferos (Perera, 1997). Ademais, segundo a Agência Internacional em Pesquisa de Câncer (IARC), os hidrocarbonetos presentes na

combustão do diesel são classificados como altamente carcinogênicos (IARC, 2012).

Metais também são adsorvidos na superfície do material particulado e responsáveis por diversos processos catalíticos que geram oxidantes e induzem à resposta inflamatória (Pritchard *et al.*, 1996). A maioria dos metais que sofre "*ciclo redox*" têm potencial para produzir quantidades apreciáveis de O_2^- , H_2O_2 e OH, que podem se sobrepor à proteção dada pelos diferentes mecanismos de defesa antioxidante causando estresse oxidativo (Block & Calderón-Garcidueñas, 2009).

Além das propriedades de gerar oxidantes, os metais podem desencadear respostas celulares mediadas pela ativação das vias de sinalização intracelular e, conseqüentemente, provocar alterações metabólicas (Hill & Treisman, 1995). Metais, como o As, Cr, Cu, V, Zn, encontrados nas partículas de exaustão do diesel, têm a propriedade de ativar os receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR). Esta ativação é dada no sentido de que os estímulos extracelulares desencadeiem uma resposta intracelular por uma sequência de fosforilações (Marchese *et al.*, 2003).

Em geral, a presença dos compostos orgânicos e inorgânicos presentes no DEP podem interagir de forma sinérgica e/ou aditiva, e provocar distúrbios fisiológicos, celulares, subcelulares e moleculares em diferentes órgãos e tecidos, incluindo, principalmente, o sistema respiratório (Li *et al.*, 2002; Li *et al.*; Pozzi *et al.*, 2003; Ntziachristos *et al.*, 2007, Laks *et al.*, 2008, Delfino *et al.*, 2009, Gurbani *et al.*, 2013).

1.2 Sistema respiratório e mecanismos de defesa

Dadas as devidas informações básicas a respeito da poluição atmosférica, nessa seção, serão apresentadas algumas das características do sistema respiratório, alvo das substâncias inaláveis e foco do presente estudo.

O sistema respiratório humano é composto, basicamente, por estruturas facilitadoras de trocas gasosas entre o ambiente e o sangue. Tais estruturas

são conhecidas como zona condutora e zona respiratória (Savarese & Rosinha, 2006).

A zona condutora inclui as estruturas: nariz, nasofaringe, laringe, traqueia e brônquios que desempenham funções diferenciadas em relação ao ar inspirado. O nariz, por exemplo, atua na filtração por meio de pelos grossos e aquecimento do ar. Em seguida, temos a nasofaringe que, por meio de pequenos cílios, movem partículas para a boca a fim de serem deglutidas ou expelidas. A seguir, temos a laringe revestida de células que produzem muco abundantemente e lubrificam e umidificam a região (Savarese & Rosinha, 2006).

Ainda em sentido à zona respiratória, temos duas das estruturas pelas quais temos focado nosso estudo: a traqueia e os brônquios (Figura 3).

Fonte: Odonto-USP

Figura 3 - Ilustração com características da traqueia e dos brônquios.

A traqueia é o principal segmento condutor das vias aéreas, formada por anéis cartilagosos e células especializadas na produção e remoção de muco, que se subdividem até chegar aos sacos aéreos. A presença de subdivisões ao longo da traqueia diminui a velocidade da passagem do ar para que as trocas

gasosas ocorram com maior eficiência. Além disso, em toda sua extensão, existe um revestimento interno mucoso e cílios que se movem em direção contrária, ou seja, para cima, levando muco para a faringe. À medida que a traqueia se estende até a zona respiratória, esta se divide em dois ramos na forma de brônquios esquerdo e direito (Savarese & Rosinha, 2006).

Os brônquios mantêm as estruturas cartilaginosas das traqueias, e possuem um revestimento interno contendo células mucosas e ciliares, entretanto, à medida que começam a ocorrer subdivisões desta estrutura, as células ciliares vão diminuindo até desaparecerem no bronquíolo terminal. (Savarese & Rosinha, 2006)

Assim, é caracterizada a zona condutora, porém o sistema ainda precisa de mecanismos com ajustes mais finos que estão descritos na zona respiratória. Os componentes desta região são revestidos por alvéolos responsáveis pela troca gasosa, podendo ser considerados como unidades funcionais respiratórias. Além disso, os alvéolos são formados por células alveolares ou pneumócitos tipo I e tipo II. Nesta região, também é comum a presença de macrófagos alveolares que fagocitam partículas estranhas e as levam para a faringe (Savarese & Rosinha, 2006).

São essas as características que fazem das vias aéreas a maior área de superfície do corpo humano em contato direto com o meio externo, e, como consequência, é a que mais sofre com agressões advindas desse contato.

O ar inspirado contém partículas orgânicas e inorgânicas, entretanto, apesar da inalação diária de, aproximadamente, 12.000 litros de ar, podendo chegar até 20.000 litros, dependendo da atividade física, os pulmões são limpos e estéreis devido a mecanismos de defesa ao longo do trato respiratório (Nakagawa *et al.*, 2006).

As defesas do sistema respiratório incluem as adquiridas (específicas) e as inatas (não específicas). Em relação à resposta adquirida, esta é feita pelo sistema de defesa mediado pelas células inflamatórias de memória e anticorpos (Nakagawa *et al.*, 2006), enquanto que o sistema de defesa inato, além de outros componentes, apresenta o sistema de defesa mucociliar que é responsável pelo transporte de partículas e micro-organismos depositados na superfície das vias aéreas (Nakagawa *et al.*; Savaranese & Rosinha, 2006).

O primeiro mecanismo de defesa inato inicia-se nas narinas por meio dos cílios e do turbilhonamento aéreo. Posteriormente, segue a filtração aerodinâmica e o transporte mucociliar. Além destes, existem outros mecanismos (espirro e tosse) que são ativados quando há a redução das funções do sistema mucociliar (Savaranesse & Rosinha, 2006).

O transporte mucociliar tem como função primordial remover qualquer tipo de material retido no muco respiratório para a região de orofaringe em que será deglutido ou expectorado (Savarese & Rosinha, 2006). Este sistema depende de três elementos fundamentais para o seu funcionamento: 1) integridade e função dos cílios; 2) composição e quantidade de muco, e 3) interação muco-cílio (Macchione *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 2005) (Figura 4).

Fonte: ACD/UFRJ

Figura 4 - Epitélio respiratório com presença de células ciliadas e mucosas

O muco é um importante componente da defesa respiratória. Esta substância amorfa, reveste o epitélio respiratório, e é continuamente produzida e transportada pelo batimento ciliar de forma coordenada em direção à orofaringe em que será deglutida ou expectorada. Suas funções são: lubrificar e umidificar a superfície das vias aéreas, isolar e proteger o epitélio de agressores exógenos, promover um ambiente adequado ao batimento ciliar e diminuir a tensão superficial (Nakagawa *et al.*, 2006). Para o desempenho destas funções, podemos dizer que o muco é um composto bifásico, representado por: a) fração sol, formado por água com menor quantidade de íons cloreto e sódio com um pH ligeiramente ácido com distribuição de forma contínua da traqueia aos brônquios; e b) camada gel, é representado pelo

muco propriamente dito. Apresenta características físico-químicas não newtoniana, ou seja, possui qualidades de matéria sólida – componente elástico, e líquido – componente viscoso, que são essenciais para que o muco seja deslocado mediante a força aplicada pelos cílios durante o batimento ciliar (Carvalho-Oliveira *et al.*, 2006).

A parede das vias aéreas compreende diversos tipos celulares que contribuem direta ou indiretamente para o processo de defesa respiratória. Neste grupo, estão inclusas as células serosas, mucosas, ciliadas, de Clara e outras ainda pouco estudadas, como as células Kultschitzky (endócrinas) (Macchione & Saldiva, 2006).

As células secretoras e mucosas são responsáveis pela produção de muco e as células ciliadas pelo transporte. As células secretoras e mucosas estão localizadas nas glândulas submucosas dos brônquios e da traqueia, e no epitélio das vias aéreas. A secreção de um muco de boa qualidade e quantidade ideal é importante para o “clearance” mucociliar, entretanto, quando o epitélio é exposto a agentes químicos, físicos ou biológicos, pode ocorrer alteração nas propriedades físico-químicas do muco (Macchione & Saldiva, 2006; Pires-Neto *et al.*, 2006; Yoshizaki *et al.*, 2010).

1.3 Estruturas celulares alvos do DEP no epitélio respiratório: mitocôndrias, membrana celular e citoesqueleto

1.3.1 Mitocôndrias

Mitocôndrias em vias aéreas são, particularmente, suscetíveis aos danos oxidativos (Bowler *et al.*, 2002). Esta organela está envolvida em diversos processos celulares codificados pelo genoma nuclear e mitocondrial, dentre os quais se destacam a produção de energia e a respiração celular (Lehninger & Smith, 1949; Di Donato, 2000).

Historicamente, o primeiro caso clínico associado com disfunção mitocondrial foi descrito por Luft *et al.* (1962), que descreveram a dessincronia entre atividade mitocondrial com a síntese de ATP. Neste contexto, novos

horizontes surgiram a fim de avaliar a atividade mitocondrial (Mossman, 1983; Hansen *et al.*, 1989).

O teste do MTT, ou teste de atividade mitocondrial, ou teste de viabilidade celular, baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs, ativada em mitocôndrias de células viáveis, converter o sal de tetrazolium (dimetiltiazol difenil tetrazolium, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor azul escura e, assim, a formação de cristais é proporcional ao metabolismo mitocondrial (Mossman, 1983; Hansen *et al.*, 1989).

1.3.2 Membrana celular

A membrana celular é uma estrutura que delimita o espaço intracelular e, por intermédio da permeabilidade seletiva, exerce o controle da entrada e saída de subprodutos do seu metabolismo e das fontes exógenas. Assim, alterações nas características estruturais podem modificar a atividade de proteínas de membranas que atuam como canais de íons, transportadores, receptores, e nos processos de sinalização celular, podendo provocar, ainda, apoptose e, também, alteração no volume celular (Corsetto *et al.*, 2011; Penha-Silva *et al.*, 2007).

O método que analisa a enzima lactato desidrogenase (LDH) é muito utilizado na avaliação da citotoxicidade, pois o LDH é uma enzima citoplasmática liberada para o meio extracelular apenas quando as células sofrem lesão na membrana plasmática. Deste modo, a sua determinação constitui uma boa avaliação da viabilidade celular, fornecendo indicações a respeito da integridade da membrana (Rego *et al.*, 1996).

1.3.3 Citoesqueleto

O citoesqueleto é uma rede de estruturas filamentosas compostas por microfilamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários, que

participam de uma variedade de eventos celulares, incluindo a interação célula-célula ou célula-matriz extracelular, tensão de estiramento, endocitose, remodelamento, mitose e outros ainda não tão bem estabelecidos. Desse modo, as mudanças nessa estrutura celular podem determinar sua sobrevivência e funções (Chen *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2012).

Ainda são poucos os métodos que avaliam diretamente a integridade do citoesqueleto, entretanto, com o aprimoramento das técnicas de análises de imagens e da microscopia confocal, já é possível aferir o alinhamento do citoesqueleto e a reologia celular por meio de citometria óptica magnética de oscilação (OMTC) (Fabry *et al.*, 2003). A principal aplicação desse método é medir a capacidade viscoelástica de células (Park *et al.*, 2006).

1.4 Sinalização celular por proteínas quinases ativadas por mitógenos ou MAPK

A cascata de sinalização do estímulo extracelular para uma resposta intracelular é dada por uma família de proteínas com peso molecular de 38 a 110 KDa conhecidas como proteínas quinase ativadas por mitógeno ou MAPKs (Wu *et al.*, 1999; Pourazar *et al.*, 2008).

A regulação das MAPKs se dá, basicamente, por fosforilação e desfosforilação. A ativação das proteínas quinases ocorre por fosforilação em uma cascata de ativação sequencial, iniciada por MAPKKK, seguida de ativação das MAPKK em resíduos de serina e treonina. As MAPKK, por sua vez, reconhecem e catalisam a fosforilação treonina/tirosina (Thr-Tyr) na alça de ativação das MAPK (Tanoue *et al.*, 2001). A sequência de aminoácidos passíveis de serem fosforilados e, conseqüentemente, ativar as MAPK ERK e JNK são Thr183/Tyr185 para o JNK e Tyr204 para ERK (Samet *et al.*, 1998) (Figura 5).

A MAPK JNK participa, entre outros processos, da interrupção do ciclo celular, reparo ou apoptose (Hill & Treisman, 1995). Estas proteínas podem ser ativadas por vários fatores de estresses, tais como irradiação UV, estresse osmótico, citocinas pró-inflamatórias, dano oxidativo e poluentes (Wu *et al.*, 1999, Tanoue *et al.*, 2001). Tournier *et al.* (2000) mostraram que camundongos

jnk1-/-jnk2-/- que são *knockout* para JNK eram resistentes à apoptose induzida e sugerem que JNK pode induzir a apoptose por meio da modulação de genes Bcl-2 e da proteína de BIM.

Também é descrito o envolvimento do JNK na resposta imune pela regulação da expressão de citocinas (Jaeschke *et al.*, 2005) e produção excessiva de muco associado à proteína MUC5AC nas vias respiratórias expostas à contaminantes atmosféricos (Choi *et al.*, 2010)

ERK é caracterizada como uma importante proteína da família das MAPK porque atua diretamente no crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Duas isoformas de ERK expressa (ERK1 e ERK2), referido como P42/P44 fosforilam substratos em todos os compartimentos celulares, como as proteínas da membrana (CD120a, Syk, e calnexina), substratos nucleares (SRC-1, Pax6, NF-AT, Elk-1, MEF2, c-Fos, c-Myc e STAT3), proteínas do citoesqueleto e outras proteínas quinases (Chen *et al.*, 2001).

A regulação anormal das vias de sinalização de ERK tem sido observada em varias doenças, incluindo muitos tipos de câncer, doenças pulmonares, tais como asma (Duan *et al.*, 2004) enfisema (Mercer *et al.*, 2004) e DPOC (Renda *et al.*, 2008). Além disso, essa MAPK pode controlar a atividade ou abundância de proteínas da família Bcl-2, citocromo c da mitocôndria, ativação de caspases e morte celular (Balmano & Cook, 2009).

Segundo Hewson *et al.* (2003), ERK é uma via critica para a indução da expressão de MUC5AC e metaplasia de células caliciformes. Li *et al.* (2012) mostraram que um aumento significativo na ativação de ERK induziu a expressão de MUC5AC em células epiteliais brônquicas.

Modelo simplificado das MAPK ERK, JNK e P38

Figura 5 - Modelo simplificado da ativação de MAPK ERK, JNK e P38

1.5 Estresse oxidativo, sistema de defesa antioxidante e apoptose

O estresse oxidativo é caracterizado como um distúrbio no estado de equilíbrio dos sistemas pró-oxidantes/antioxidantes em células ou tecidos. Assim, quando ocorrem eventos intra e ou extracelulares capazes de gerar oxidantes reativos e a não remoção destes compostos pelos antioxidantes, pode conduzir à oxidação de substratos biológicos. Os agentes pró-oxidantes mais importantes são as espécies reativas de oxigênio (ERO), embora existam também espécies reativas de nitrogênio (ERN) e enxofre (ERS), podendo ser considerados tóxicos ao funcionamento de qualquer sistema biológico (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A citotoxicidade é produzida por algum agente que, em virtude de suas propriedades físicas ou químicas, pode induzir ou produzir mudanças em estruturas que exercem o controle homeostático celular, resultando em efeitos deletérios (Ashby, 1995). Dentre os agentes reconhecidos pelo potencial cito e genotóxico, os radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio (ERO), são descritos como resultado da exposição à radiação, a medicamentos e à poluição (Halliwell & Gudridge, 2007).

Estes radicais agem diretamente atacando lipídios e proteínas de membranas, particularmente aquelas do retículo endoplasmático por meio de reações de alquilação com provável inativação enzimática; e, indiretamente, por meio de interações com ácidos graxos insaturados de membrana e consequente peroxidação lipídica (Comporti, 1989).

A geração de radicais livres, em consequência da inalação do material particulado, é bem descrita por Mudway *et al.* (2004) e Pourazar *et al.* (2008). Em termos gerais, isso ocorre devido à biotransformação enzimática intracelular dos hidrocarbonetos e metais.

O processo de detoxificação é composto por duas fases. Nas reações da Fase I, mediada pelo complexo citocromo p450, um grupo polar é introduzido na molécula, aumentando a hidrossolubilidade, tornando-a adequada para as reações de conjugação (Fase II). Nas reações da Fase II, os compostos modificados pelas reações da Fase I reagem com um substrato endógeno, produzindo compostos conjugados hidrossolúveis (Stegman *et al.*, 1992)

A Glutathione-S-Transferase pertence à fase II do metabolismo, tendo importância crucial na conjugação e detoxificação. Atualmente, esta enzima é utilizada como biomarcador em estudos de contaminação ambiental em vertebrados e invertebrados, assim como em distúrbios metabólicos e danos celulares em órgãos específicos (George, 1994).

Em particular, a glutathione peroxidase, Gpx1, é reconhecida por decompor o peróxido de hidrogênio (Ott *et al.*, 2007) e intermediários reativos e/ou radicais livres, gerados pela atividade redutora do citocromo P450. Tais subprodutos podem reagir facilmente com substratos intracelulares e aumentar o processo lipoperoxidativo acelerando a morte celular (Comporti, 1989).

Também fazem parte deste sistema antioxidante as enzimas superóxidos dismutases (SODs), que dismutam o ânion superóxido (O_2^-) à peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (McCord & Fridovich, 1969). Atualmente, são conhecidas três isoformas da enzima. A SOD1 é a enzima dependente de zinco e cobre (Cu/ZnSOD), e está localizada no citoplasma das células. A enzima dependente de manganês (MnSOD ou SOD2) encontra-se dentro das mitocôndrias de células aeróbias e a isoforma SOD3 (EC-SOD) está presente no meio extracelular, detectada em plasma, linfa e líquido (Zelko *et al.*, 2002).

Esse H_2O_2 pode ser, então, decomposto a oxigênio molecular (O_2) e água pela ação da enzima catalase (CAT) (Aebi, 1984); ou, então, decomposto diretamente na água por meio da ação da atividade de enzimas, como a glutathione peroxidase (Otto & Moon, 1996).

Sabendo-se que o epitélio respiratório está diretamente exposto ao material particulado contendo diversos metais, incluindo o ferro, há, neste sentido, a possibilidade de espécies reativas de oxigênio e H_2O_2 . Estes oxidantes poderiam ser transportados para os eritrócitos que, em virtude da íntima relação com outras células, teria um grande papel no aparecimento de doenças (Halliwell & Gutteridge, 2007). Junto com os metais também temos diversos compostos orgânicos adsorvidos na superfície do material particulado que, por meio do complexo citocromo p450, também geram radicais livres na passagem de lipossolúvel para hidrossolúvel e serem excretados (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A morte celular ou processo apoptótico é causado por uma sequência de eventos intracelulares por meio de um conjunto de proteínas cisteína proteases conhecida como caspases. Estas proteínas estão divididas em 2 grupos: as iniciadoras e as efetoras. As iniciadoras, geralmente, realizam autoclivagem e autoativação, seguida da clivagem e ativação das caspases efetoras. E as efetoras, como a caspase-3, é descrita como responsável pela maioria dos efeitos apoptóticos celulares, com a quebra de muitas proteínas importantes, tais como as enzimas nucleares que atuam no reparo celular (Ohashi *et al.*, 2006).

A apoptose ainda pode ser descrita como extrínseca ou intrínseca. A via extrínseca é caracterizada, principalmente, pela ativação de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF) capaz de ativar a via das caspases. A via intrínseca se dá por meio da quebra na homeostase do complexo de Golgi, retículo endoplasmático, lisossomos e mitocôndria, a qual tem sido mais estudada (Ferri & Kroemer, 2001).

1.6 Explante de traqueias e cultura de células de epitélio brônquico como modelo experimental em estudos de toxicidade do DEP

A cultura de tecidos ou órgão (explante) é um método *in vitro* para o estudo de mecanismos celulares, tanto de vegetais como de animais, isenta de variações sistêmicas que podem surgir, *in vivo*, tanto durante a homeostase normal quanto sob condições experimentais (Dai *et al.*, 1998; 2003).

O estabelecimento de um explante de traqueia apresenta muitas das características encontradas *in vivo*, tais como cobertura de muco, transporte mucociliar e manutenção da estrutura celular (Kitson *et al.*, 1999). Além disso, os tecidos traqueais podem dar uma nova dimensão sobre mecanismos de ação de drogas ou poluentes e, assim, fornecer informações para compreender as interações entre epitélio e células estruturais subjacentes da mucosa das vias aéreas (Abeynaike *et al.*, 2010). Este modelo já tem sido utilizado para investigar os efeitos de poeiras minerais, bem como, de partículas da poluição atmosférica, fornecendo informações a respeito da absorção de partículas pelo epitélio (Dai *et al.*, 1998; 2003). Assim, o modelo de explante de traqueia pode ser útil para o estudo de misturas complexas, como o DEP.

As células do epitélio respiratório não são apenas uma simples barreira entre o corpo e o ambiente externo. Estas protegem os organismos contra toxinas inaladas, agentes patogênicos e partículas com respostas variadas que dependem do tipo de estímulo. Tais estímulos, como a geração de espécies reativas de oxigênio ou radicais livres, podem ativar vias de sinalização celular e, conseqüentemente, inflamação (Samet *et al.*, 1998).

Células epiteliais das vias aéreas podem produzir uma gama diversificada de mediadores pró-inflamatórios, fatores de crescimento e citocinas ativamente envolvidas em diferentes estágios de reparação epitelial (Allahverdian *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de técnicas de rotina para isolamento e manutenção de células de via aérea respiratória diferenciadas promove um significativo avanço para pesquisas em fisiologia do epitélio respiratório e para o estudo de doenças da via aérea. A manipulação de cultura de células permite examinar os mecanismos de diferenciação epitelial e a resposta deste epitélio a vários insultos do meio ambiente.

A cultura de célula, em particular, as células de epitélio brônquico (BEAS), possui metodologia bem estabelecida para o cultivo, amplas informações das suas características fisiológicas e bioquímicas, e de fácil reprodução em curto espaço de tempo.

Neste contexto, compreender parte dos mecanismos que envolvem os distúrbios metabólicos e a ativação de sinalização celular pode ajudar a estabelecer alvos terapêuticos em relação a doenças que podem ocorrer da exposição ao DEP, bem como propor medidas para redução da toxicidade dos compostos presentes neste contaminante ambiental.

2 HIPÓTESES

2 HIPÓTESES

- O DEP bruto é capaz de ativar as vias das MAPK ERK e JNK, e, consequentemente, afetar o perfil de mucinas em explantes de traqueias de camundongo BALB/c, provocar alterações epiteliais, como apoptose e/ou vacuolização;
- O DEP submetido a tratamentos para remoção de metais e compostos orgânicos pode afetar o perfil das mucinas em explantes de traqueias de camundongo BALB/c em detrimento da mudança no perfil químico da partícula de DEP;
- O enriquecimento inorgânico das partículas de DEP pode produzir efeitos deletérios nas membranas e no citoesqueleto de células de epitélio brônquico humano (BEAS-2B) via ativação de MAPK JNK;
- A exposição de células de epitélio brônquico humano (BEAS-2B) a baixas concentrações de DEP podem provocar alteração na expressão de genes envolvidos no sistema de defesa antioxidante, ativação de vias de apoptose e alterações na reologia celular.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar em explante de traqueia de camundongo BALB/c.

Estudo I:

- 1- Se a exposição ao DEP em diferentes tempos e concentrações ativam as MAPKs ERK, JNK, e causam apoptose, vacuolização e alteração no perfil das mucinas;

Estudo II:

- 2- Mudanças quali-quantitativas de muco produzido pelas células mucossecretoras, quando expostas ao DEP e DEP tratados com ácido nítrico e solventes para remoção de compostos orgânicos e inorgânicos;

E, em cultura de células de epitélio brônquico humano (BEAS-2B), avaliar:

Estudo III:

- 1- Alterações da reologia celular de BEAS-2B e a relação com as MAPK ERK e JNK em situação de exposição a partículas de DEP com enriquecimento inorgânico;

Estudo IV:

- 2- Efeitos da exposição ao DEP na expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo, apoptose, e relacioná-los com a citotoxicidade e reologia celular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do DEP

O DEP a ser testado no presente estudo foi obtido após um dia de operação normal de um ônibus urbano. As partículas foram coletadas em filtro bimetalico, acoplado ao escapamento de um ônibus da frota urbana da cidade de São Paulo. Este filtro cria um campo capaz de reter as partículas da exaustão do diesel.

O ônibus estava equipado com motor Mercedes-Benz MB 1620, com 210 hp de potência, sem controle de injeção eletrônica de combustível, circulando com diesel comumente utilizado em São Paulo com concentração de 500ppm de enxofre (atualmente, o diesel utilizado na região metropolitana de São Paulo contém 10 ppm de enxofre).

Em seguida, as amostras de DEP foram acondicionadas e levadas ao Laboratório de Poluição Atmosférica da Faculdade de Medicina da USP (LAPAE-FMUSP) e submetidas a diferentes métodos de extração química:

1) Extração com ácido nítrico (DEP/NA) - partículas de MP bruto do diesel foram imersas em 160 ml de água mili-Q contendo HNO₃ 65% para ajustar o pH para 3,0, agitadas em agitador magnético durante 2 horas e, a seguir, colocadas em um misturador ultrassônico por 60 minutos, sendo deixadas em repouso por 24 horas. Após este período, a suspensão foi centrifugada por 20 minutos a 1800 rpm (rotações por minuto), a 5°C e, posteriormente, por 10 minutos a 5000 rpm a 10°C. O supernadante foi, então, coletado e seco a 57°C por 48 horas antes de sua utilização.

2) Tratamento com solventes hexano (DEP/HEX) e metanol (DEP/MET): Partículas de MP bruto do diesel foram imersas em 160ml de soluções contendo hexano e metanol, agitadas em agitador magnético por 2 horas e, a seguir, colocadas em um misturador ultrassônico por 60 minutos e deixadas, posteriormente, em repouso, por 24 horas. Após este período, a suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm, a 10°C. O supernadante foi

descartado e o material precipitado foi estocado em um secador a vácuo por 15 horas.

Dessa forma, os solventes, metanol e hexano removem apenas os componentes orgânicos de alta e média polaridade (metanol), e de baixa polaridade (hexano) respectivamente, restando apenas os componentes metálicos. Já o solvente HNO_3 promove a remoção da maioria dos componentes metálicos.

4.2 Explante de traqueias

Quarenta traqueias de BALB/c foram obtidas a partir do eutanasiamento dos animais. Após a remoção, foram mantidas em placas com meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium Ham's F12* (DMEN - Sigma ®) contendo suplementos e antibióticos por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 como descrito por Lankford *et al.* (2005). Posteriormente, as traqueias foram cortadas em 2 pedaços de, mais ou menos, 2 mm, formado quatro grupos de dez traqueias em cada grupo, em que foram tratados da seguinte forma: 1) DEP 50 µg/mL por 30 e 60 minutos; e 2) DEP 100 µg/mL por 30 e 60 minutos, e um grupo controle apenas com meio de cultura. Todas as concentrações foram preparadas em meio DMEN-F12 suplementado e com adição de antibióticos (Lankford *et al.*, 2005) (Figura 6).

DEP 50 µg/mL 30min	DEP 50 µg/mL 60min
Controle DMEN/F12	
DEP 100 µg/mL 30min	DEP 100 µg/mL 60min

5 grupos = 40 traqueias;
8 traqueias por grupo;
Divididas ao meio para histologia e extração
proteica para Western Blot (MAPK)

Figura 6 - Preparação do explante de camundongos BALB/c (a). Após a retirada das traqueias, foram mantidas em estufa por 24 horas e, posteriormente, expostas às concentrações de DEP em diferentes tempos.

4.2.1 Exposição do explante de traqueia ao DEP bruto e DEP tratado com ácido nítrico (DEP/NA) e solventes (DEP/HEX e DEP/MET)

4.2.1.1 Estudo da qualidade e quantidade de muco por meio de morfometria com coloração de Azul Alciano e ácido periódico, e reagente de Shiff

Para este estudo, os explantes foram expostos aos agentes poluentes nas seguintes condições experimentais:

- DEP, DEP/NA, DEP/HEX e DEP/MET + meio de cultura (50; 100 µg/mL) em tempos de 30 e 60 minutos;

- b) Controle: apenas meio de cultura DMEM+F12 + suplementos + antibióticos em 60 minutos.

4.2.1.2 Extratos proteicos

Após o tratamento, as traqueias foram lavadas com PBS e ressuspensas em tampão de lise (50mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH 8, 1% de Triton X-100), contendo inibidores de proteases aprotinina 2µg/mL, 1mM fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) e 1mM de ortovanadato de sódio seguido de homogeneização em Politron. Após 15 minutos a 4°C, o extrato solúvel foi isolado do material, precipitado após centrifugação a 13000g por 15 minutos a 4°C. Os extratos foram mantidos a -20°C até o momento do uso.

4.2.1.3 Dosagem de proteína

A concentração proteica dos extratos foi determinada com o kit BCA (*BioAgency*) que é baseado no método de Lowry modificado. Em uma placa de 96 poços, foram colocados 5 µL de cada amostra em triplicata e 200µL do reagente. A placa foi homogeneizada vagarosamente e, após 30 minutos, a 37°C, e sua absorbância foi lida a 595 nm e determinada sua concentração proteica por meio de uma curva de padrão de BSA.

4.2.1.4 *Western blot*

As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida segundo o protocolo de Laemmli em condições não redutoras. O gel de corrida foi preparado com Tris 0,375 M pH 8.8, SDS 0,1%, acrilamida 10%, persulfato de amônia (APS) e N,N,N,N tetrametiletilenodiamina (TEMED, Sigma), e o gel de empilhamento com Tris 0,125 M pH 6.8, SDS 0,1%, acrilamida 5%, persulfato de amônio e N,N,N,N tetrametiletilenodiamina. Os extratos proteicos

foram diluídos em tampão de amostra redutor (Tris-HCl 120 mM pH 6.8, SDS 4%, glicerol, azul de bromofenol e 5% de β -mercaptoetanol).

A eletroforese foi feita em tampão Tris 25mM, glicina 0,19M pH 8.3, SDS 0,1% à temperatura ambiente e sob uma voltagem constante de 80V. Os extratos proteicos separados no gel de poliacrilamida-SDS foi eletroforeticamente transferidos para membrana de PVDF (*Hydrophobic Polyvinylidene Difluoride*) em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20% por uma hora a 100 V a 4°C.

Para bloqueio de sítios inespecíficos, a membrana foi incubada em BSA 5% em TBS por uma hora à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a membrana foi incubada por 16 horas a 4°C com o anticorpo específico para ERK1/2, fosfo-ERK1/2 Thr²⁰², Tyr²⁰⁴, fosfo-JNK1/2 Thr¹⁸³, Tyr¹⁸⁵ (Calbiochem) e β -actina, e, novamente, lavada com TBS-T0,5%/Molico 5% três vezes por 10 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase, por uma hora, à temperatura ambiente. Assim, a membrana foi revelada com o Kit de ECL plus (Amershan®) segundo orientações do fabricante. Após a revelação da banda, os filmes foram sujeitos à análise por densitometria.

4.2.1.5 Análise morfométrica

Após a exposição, as traqueias foram mantidas em formol tamponado (4%) e processados de acordo com os procedimentos de rotina histológica. As secções foram coradas com uma combinação de ácido periódico de Schiff e Alcian blue (PAS/AB) em pH de 2,5. Por meio desta técnica, as glicoproteínas neutras e ácidas são coradas em vermelho e azul, respectivamente (Jones e Reid, 1978). As amostras foram examinadas microscopicamente e morfometricamente analisadas.

O conteúdo de muco (ácido ou neutro) do epitélio respiratório da traqueia foi quantificado por morfometria convencional, usando um microscópio acoplado à câmera de vídeo e um sistema de análise de imagem, que digitaliza a imagem microscópica em um vídeo de alta resolução acoplada, e um visor

com uma área conhecida contendo 884 quadrados e 3.536 pontos no monitor. A proporção de volume do muco neutro e ácido contido na traqueia foi determinada por contagem de pontos (Pires-Neto *et al.*, 2006; Weibel, 1990).

Resumidamente, o número de pontos de cada tipo de muco e a área do epitélio não secretada são contados em cada campo. Em seguida, foi calculado o número de pontos correspondente à área total do tecido epitelial em cada campo, usando um microscópio Leica DMR, uma câmara de vídeo TK-C JVC 1380 colorida e um sistema de análise de imagem *software* (Image pro-plus), que digitaliza a imagem microscópica em um vídeo de alta resolução acoplada e um visor com uma área conhecida. A espessura média do epitélio é, então, determinada por meio da medida entre o limite da membrana basal e o limite da membrana apical (ampliação de 1380X).

A quantificação de ácido muco, muco neutro, muco misto (ácido + neutro) e nível de vacuolização foi feita a partir do valor do número total de pontos e da espessura do epitélio, utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número total de pontos (ácido muco)} \times 3,81 \text{ (área de pontos)}}{\text{Espessura do epitélio } (\mu\text{m})} =$$

4.2.1.6 Teste de apoptose nos explantes de traqueia

Foi analisado apoptose nos explantes tratados com DEP e comparados ao grupo controle por meio de imuno-histoquímica de acordo com a técnica do TUNEL (Gavrieli *et al.*, 1992). Foi feita a incubação com o anticorpo primário, em câmara úmida, a 4°C. Após estabilização à temperatura ambiente, foram feitos banhos com solução de PBS, e incubados com anticorpo secundário por 1 hora à temperatura ambiente. Depois, foram repetidos os banhos com PBS, e o corte foi incubado com Complexo Strepto-avidina/Peroxidase por 30 minutos. Após banho em PBS, foi feita a revelação com DAB (diaminobenzidina) e examinadas em microscópio óptico por meio de análise de imagem em que verificamos a morte do epitélio da traqueia pelo método morfométrico descrito acima.

4.3 Cultura de células epiteliais BEAS-2B

O procedimento consiste na adesão das células na base do *transwell* (membrana porosa) por meio de uma fina camada de Matrigel (1,3mg/mL) com meio de cultura LHC-9 contendo 10% de Soro bovino fetal, L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 1 mM, antibiótico (1%) e aminoácidos não essenciais 0,1 mM na parte inferior e superior (Figura 1). Após o período de adesão na parte superior do *transwell* e confluência de 80%, as células recebem meio de cultura apenas no compartimento basolateral e ficam expostas ao ar na região apical, caracterizando a interface ar líquido (Figura 6).

As concentrações e os tratamentos foram: A) meio de cultura 30 e 60 minutos (controle); B) concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ de DEP/HEX em meio de cultura com intervalos de 30 e 60 minutos; e C) Exposição de 1 e 2h em concentrações de 15 $\mu\text{g/mL}$ de DEP. Os experimentos foram feitos em triplicatas com cada *transwell* contendo 4×10^4 de células.

Figura 7 - A) Células de Epitélio Brônquico Humano (BEAS-2B) em aumento de 1000x. B) Cultivo e manejo das células em *transwell* e remoção do meio de cultura na parte superior do *transwell* e c) exposição ao DEP e DEP/HEX.

4.3.1 Extratos proteicos

Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em tampão de lise (50mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH 8, 1% de Triton X-100), contendo inibidores de proteases aprotinina 2µg/mL, 1mM fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) e 1mM de Ortovanadato de sódio seguido de homogeneização em Politron. Após 15 minutos a 4°C, o extrato solúvel foi isolado do material precipitado após centrifugação a 13000 g por 15 minutos a 4°C. Os extratos foram mantidos a -20°C até o momento do uso para o Western Blot.

4.3.2 Teste de citotoxicidade para avaliação da concentração teste

Para a determinação das concentrações, utilizamos alterações crescentes de DEP no teste de MTT. Este ensaio é utilizado para verificar o metabolismo mitocondrial por meio da formação de cristais de formazan produzidos pelas mitocôndrias das células. O ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo composto/extrato em questão sobre o metabolismo celular por meio da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. Dessa maneira, a quantidade de cristais formada é medida por espectrofotometria e diretamente proporcional ao número de células viáveis (Mossman, 1983).

4.3.3 Determinação dos oligonucleotídeos de genes de enzimas relacionadas com estresse oxidativo

Os oligonucleotídeos foram desenhados com base nas sequências dos genes presentes nos bancos de dados do NIH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com o auxílio do programa RealTimePCR: (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/RealTimePCR>).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos e suas respectivas sequências

Oligonucleotídeos	Sequência
Gpx1_F	TTCCCGTGCAACCAGTTTG'
Gpx1_R	TTCACCTCGCACTTCTCGAA
Cyp450_F	GAACACCAAGAATCGATGGACA
Cyp450_R	TCAGCAGGAGAAGGAGAGCATA
SOD1_F	TGTGGCCGATGTGTCTATTG
SOD1_F	GCGTTTCCTGTCTTTGTACTTTC
SOD2_F	CCTGGAACCTCACATCAACG
SOD2_F	GCTATCTGGGCTGTAACATCTC
Caspase-3_F	GTGCTACAATGCCCCTGGAT
Caspase_3_R	GCCTATTCATTTATTATTGCTTTCC
Gus_beta_F	GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT
Gus_beta_R	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA
Bcl-2_F	CATGCTGGGGCGTACAG
Bcl-2_R	GAACCGGCACCTGCACAC

4.3.4 Extração e quantificação de RNA de BEAS-2B expostas ao DEP e DEP/HEX

Após o tratamento, as células foram removidas com o auxílio de tripsina e inativadas com soro bovino fetal. Após, foram ressuspensas com o reagente Trizol (*Invitrogen Life Technologies, Inc.*, Carlsbad, CA, USA) segundo o protocolo recomendado pelo fabricante (Figura 3) e quantificadas por espectrofotometria (λ_{260})

Foi adicionado às amostras de células lisadas 100 µl de Clorofórmio (Merk, GE). A mistura foi, então, agitada em vórtex por alguns segundos, incubada por 3 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugada por 15 minutos a 12.000 x g a 4°C para a separação do RNA que permanece exclusivamente na fase aquosa. A fase aquosa foi, então, removida cuidadosamente e transferida para outro tubo. Para precipitar o RNA contido na fase aquosa, foi adicionado 250 µl de álcool isopropílico, seguido de homogeneização e incubação por 2 horas a 4°C. Após, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi, então,

descartado e o RNA foi ressuspenso em 20µl de água DEPC e mantido a -80°C até a síntese do cDNA (Figura 8).

Figura 8 - Extração do RNA por meio da técnica do Trizol®.

4.3.5 Síntese de cDNA e análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real dos genes envolvidos no estresse oxidativo e apoptose (qPCR)

A síntese de cDNA foi feita a partir do RNA total extraído das amostras via transcrição reversa pelo kit Vilo® SuperScript for RT-PCR (*Invitrogen Life Technologies, Inc.*, Carlsbad, CA, USA). Para a síntese do cDNA, foram utilizados 2 µg de RNA total de cada amostra, como recomendado pelo fabricante. Em seguida, as amostras de cDNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific*).

Para amplificação dos genes do estudo, foi utilizada a técnica de reação da cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. O volume total da reação de 25 µL foi composto de: 12,5 µL de SYBR Green (Qiagen), 9,5 µL de água do kit e 0,5 µL do *primer Forward* e 0,5 µL do *primer reverse* e 2 µL de cDNA na concentração de 50ng/ µL. O protocolo de amplificação dos genes de interesse em cada amostra constituiu-se de 40 ciclos com desnaturação 95°C por 30 segundos, anelamento por 58°C por 30 segundos e extensão a 95°C por 30 segundos.

A análise da expressão gênica foi realizada por meio da quantificação relativa de cada gene de interesse em relação a um gene de expressão constitutiva, no nosso caso, o *housekeeping* GUS-Beta. Essa quantificação é

baseada no modelo de Livak & Schmittgen, (2001) que utiliza a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ em que descreve mudanças de nível de expressão de um gene de interesse.

Para cada tratamento, foi adotado o mesmo valor de *threshold*, tanto para o gene de interesse quanto para o *housekeeping*. Esse valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado e o valor do CT do gene-alvo é subtraído do valor do CT do normalizador e resulta no valor de ΔCt ; o valor de ΔCt do gene-alvo é, então, subtraído do valor do ΔCt de um calibrador (que pode ser o grupo controle) e, assim, é encontrado o valor de $\Delta\Delta Ct$ (Livak & Schmittgen, 2001).

4.3.6 Análise da integridade do citoesqueleto por meio da microscopia confocal e viscoelasticidade celular pelo método de citometria óptica magnética de rotação (OMTC)

As células expostas aos grupos DEP e DEP/HEX foram analisadas após fixação da película dos *transwells* que foram lavadas com meio de cultura e, depois, PBS. Após esse procedimento, foram colocados em formol tamponado 4% por 15 minutos, posteriormente removidos e colocados 24 horas em PBS para coloração com Faloidina e DAPI para visualização do citoesqueleto das células. Seis campos foram escolhidos aleatoriamente e as células foram fotografadas. Toda a célula foi selecionada, e a orientação e coerência direcional das fibras de actina foi medida utilizando a ferramenta Orientation J do *software* Image J. Um coeficiente de coerência mais perto de 1 indica uma forte coerência da F-actina, ao passo que um coeficiente de coerência mais próximo de zero indica baixa orientação das fibras (Rezakhani *et al.*, 2012).

O método do OMTC é capaz de medir em células vivas, a capacidade viscoelástica. Para isso, microesferas ferromagnéticas de 4,5 μm de diâmetro são recobertas com um peptídeo sintético RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) capaz formar adesões focais. Desse modo, impõe-se um campo magnético uniforme na microesfera magnetizada e um pequeno torque é gerado, resultando movimento na microesfera e tensão no esqueleto celular. Esse movimento forçado da microesfera é modulado pelas propriedades

elásticas e viscosas do esqueleto celular. A partir de um modelo matemático, a viscoelasticidade celular, então, é dada pelo valor de G' (Moriya *et al.*, 2008).

As células utilizadas neste experimento foram cultivadas em garrafas plásticas de 25 cm (Corning) contendo meio de cultura. Quando as células atingiram a confluência, foram removidas com tripsina 5% EDTA e colocadas em placas a uma densidade de, aproximadamente, 15.000 células por poço revestidos com gelatina porcina 3%, 24 h antes do plaqueamento. Após a adesão, as células foram expostas ao DEP e DEP/HEX no mesmo compartimento de acordo com as condições descritas anteriormente. Os poços contendo DEP e DEP/HEX foram lavados 3x com meio de cultura para remoção das partículas após o período de exposição.

As microesferas ferromagnéticas (Fe_3O_4 , diâmetro de 4,5 μm) foram adicionadas nos poços por 20 minutos na estufa a 37°C para permitir a ligação das microesferas às integrinas da superfície celular e aderir ao citoesqueleto. Após 20 minutos, o poço é lavado uma vez com meio isento de soro para remover as microesferas não ligadas e, após dez minutos, a amostra está apta a ser lida em microscópio ótico com campo magnético que produz o deslocamento das microesferas.

4.4 Análise estatística

A distribuição dos dados de efeitos biológicos foi verificada em todas as variáveis por meio de análise de Kolmogorov-Smirnov. Variáveis com distribuição normal foram analisadas com o teste de Bonferroni e apresentadas como média e desvio padrão nos gráficos de barra. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal Wallis e representados por meio de *boxplot* com as medianas acompanhadas dos respectivos intervalos interquartil IQ (25-75%). As análises foram feitas com o programa estatístico *Syigma Plot* e SPSS 21.0 com nível de significância ajustado para 5%.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização DEP bruto e submetido ao tratamento com ácido e com solventes para remoção de compostos orgânicos e inorgânico; e determinação dos valores de citotoxicidade para BEAS-2B

Na Tabela 2, estão discriminados os elementos orgânicos e metálicos presentes do DEP bruto e com os respectivos tratamentos para remoção de metais e compostos orgânicos com diferentes polaridades.

Tabela 2 - Níveis de metais (ppm) do DEP bruto e após tratamento com ácido nítrico (DEP/NA), Hexano (DEP/HEX) e Metanol (DEP/MET).

Metais (ppm)	DEP	DEP/NA	DEP/HEX	DEP/MET
Níquel (Ni)	0.181 ± 0.037	0.106 ± 0.026	0.319 ± 0.014	0.140 ± 0.009
Enxofre(S)	0.626 ± 0.416	0	0.985 ± 0.145	0
Ferro (Fe)	74.566 ± 2.266	89.311 ± 1.863	63.996 ± 0.544	82.064 ± 0.785
Vanádio (V)	0.037 ± 0.013	0.026 ± 0.034	0.016 ± 0.021	0.026 ± 0.001
Chumbo (Pb)	0.050 ± 0.047	0.010 ± 0.013	0.037 ± 0.021	0.035 ± 0.016
Cádmio (Cd)	0.029 ± 0.008	0.052 ± 0.003	0.125 ± 0.044	0.128 ± 0.020
Cromo (Cr)	0.161 ± 0.116	0.159 ± 0.008	0.166 ± 0.023	0.156 ± 0.005
Cobre (Cu)	0.017 ± 0.001	0.068 ± 0.013	0.147 ± 0.008	0.075 ± 0.030

Tabela 3 - Níveis de hidrocarbonetos (ng/g) do DEP bruto e após tratamento com ácido nítrico (DEP/NA), Hexano (DEP/HEX) e Metanol (DEP/MET)

HPAs (ng/g)	DEP	DEP/NA	DEP/HEX	DEP/MET
Naftaleno	49.23	ND	ND	ND
Acenafetileno	179.48	35.79	5.08	ND
Fluoreno	683.94	80.37	45.75	ND
Antraceno	94.73	1.43	ND	ND
Pireno	12838.73	4457.30	631.31	5.90
Benzo [a] antraceno	1162.73	346.27	107.23	0.57
Benzo [a] fluoranteno	789.93	749.51	201.21	ND
Benzo [k] fluoranteno	562.28	55.80	10.58	0.03
Benzo [a] pireno	1642.28	68.11	26.42	0.15

Nota-se que os tratamentos com ácido nítrico e solventes alteraram, consideravelmente, a composição das partículas. No tratamento com ácido nítrico (DEP/NA), ocorreu uma redução de 88% do total de hidrocarbonetos, em DEP/HEX, redução de 94% e, no grupo DEP/MET, 99%. Para os metais (DEP/NA), reduziu cerca de 30%, enquanto que, em DEP/HEX e DEP/MET, aproximadamente, 10%. A redução parcial de alguns metais e hidrocarbonetos provocaram maior biodisponibilidade de Fe, Cd e Cu em DEP/NA e DEP/MET. Já em DEP/HEX, Ni, S, Cd, Cr e Cu, aumentaram.

Além da caracterização química, realizamos um estudo da distribuição e do tamanho das partículas nas concentrações testes a fim de observar aglomeração e tamanho das partículas. Este estudo foi conduzido no Instituto de Química da USP (IQ-USP) por meio de microscopia de varredura.

Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de A) meio de cultura DMEM + F12 + suplementos; B) Concentração de 50 µg/mL de DEP – aumento de 10.000x; C) Concentração de 100 µg/mL de DEP – aumento de 10.000x; e D) Concentração de 100 µg/mL de DEP – aumento de 40.000x.

Os resultados da viabilidade celular para os testes com BEAS-2B indicaram que as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ não alteraram a viabilidade celular, justificando o uso destas concentrações para os testes de toxicidade com o explante.

Figura 10 - Apresentação gráfica de células expostas ao DEP nas concentrações de 5 a 250 $\mu\text{g/mL}$ durante 60 minutos. Nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de DEP, as células apresentaram maior atividade metabólica.

5.1.1 Explantes de traqueias expostos ao DEP – Western Blot

Análise de *western blot* mostrou aumento na fosforilação de ERK, após 60 minutos de tratamento com DEP, a uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao controle. Não observamos qualquer efeito sobre a ativação da ERK no tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ quando comparado com o grupo controle (Figuras 10 e 11). Em relação à fosforilação “ativação” de JNK, observamos um aumento no período de 60 minutos de tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ DEP em relação ao grupo controle, e, para o tratamento com 100 $\mu\text{g/mL}$ DEP, foi observada ativação após 30 minutos em relação ao controle, mas que diminuiu após 60 minutos.

Figura 11 - A e B representam as análises do Western Blot de traqueia expostas ao DEP em concentrações de 50 e 100 µg/mL nos tempos de 30 e 60 minutos. No tratamento com 50 µg/mL, há aumento de pERK, apenas em 30 minutos e, para JNK, após 60 minutos. Para DEP a 100 µg/mL, na exposição por 30 minutos, observamos que os níveis de fosforilação de ERK1 e JNK aumentaram, e, após 60 min, observamos que houve um aumento nos níveis de fosforilação para ERK, mas uma diminuição para JNK.

5.1.2 Avaliação do perfil das mucinas em explantes de traqueias expostas ao DEP

O tratamento com 50 µg/mL de DEP em 30 minutos provocou aumento significativo no muco ácido ($p < 0.001$), redução no muco neutro ($p < 0.001$) e, no muco misto ($p < 0.001$), após 30 e 60 minutos e aumento da vacuolização ($p < 0.001$) em 30 minutos (Figura 12).

Figura 12 - Representação gráfica (à esquerda da figura) do perfil de mucinas de explantes de traqueia submetidos à exposição ao DEP. Diferenças estatísticas são observadas no muco ácido, neutro e misto na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e vacuolização em 30 minutos. À direita, figuras com as fotos utilizadas para quantificação do muco. A: Muco ácido; b: muco neutro, c) muco misto e; d) vacuolização.

5.1.3 Avaliação do potencial apoptótico do DEP em explantes de traqueias expostas ao DEP

Os efeitos apoptóticos estão representados na Figura 13. Foi observado que, na maior concentração e em maior tempo de exposição, não causou efeito estatisticamente significativo, entretanto, nos demais tratamentos, foram observados altos índices de apoptose.

Figura 13 - Imagens e representação gráfica da proporção de focos apoptóticos em explantes de traqueia de camundongo BALB/c. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas após a exposição por 30 e (*p = 0,004) 60 minutos (# p = 0.006) e em 100 µg/ml DEP por 30 minutos (†<0,001). A) Controle; B) Exposição a 50 µg/ml por 30 minutos; C) Exposição a 50 µg/ml por 60 minutos; D) Exposição a 100 µg/ml por 30 minutos; Exposição a 100 µg/ml por 60 minutos.

5.1.4 Avaliação do perfil das mucinas em explantes de traqueias expostas ao DEP e DEP tratado com ácido nítrico e solvente

As traqueias expostas a diferentes composição de DEP apresentaram consideráveis alterações no perfil das mucinas ácidas e neutras, bem como na presença de vacúolos (Figura 14).

Figura 14 - Explantes de traqueia de camundongo BALB/c expostas à DEP e DEP/NA, DEP/HEX e DEP/MET. Estão identificados a presença de muco ácido (AB+), muco misto (PAS/AB+), vacuolização e muco neutro (PAS+).

A presença de muco ácido foi mais abundante na concentração de 50µg/mL em 30 minutos e, em 100 µg/mL, apenas em 60 minutos (Figura 15).

Figura 15 - Representação gráfica de muco ácido em traqueias expostas a DEP, DEP/NA, DEP/HEX e DEP/MET. Baixas concentrações de DEP (50

$\mu\text{g/mL}$) aumentou significativamente a quantidade de muco ácido após 30 min de tratamento (* $p=0,037$), enquanto que, no grupo DEP/MET, mostrou um aumento significativo de 50 $\mu\text{g/mL}$ aos 60 min. (* $p=0,02$), quando comparado com o grupo de controle.

Houve uma redução de muco neutro, no grupo DEP, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e, no grupo DEP/MET, em 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 16).

Figura 16 - Representação gráfica de muco neutro em traqueias expostas a DEP, DEP/NA, DEP/HEX e DEP/MET. Traqueias expostas a 50 $\mu\text{g/mL}$ de DEP causou diminuição significativa na produção de muco neutro (* $p=0,015$) após 30 e 60 min (* $p=0,008$) e, na exposição ao DEP/MET, mostraram uma diminuição significativa no muco neutro em 30 (* $p=0,02$) e 60 minutos (* $p=0,03$), e 100 $\mu\text{g/mL}$ aos 30 minutos (* $p=0,01$), quando comparado com o grupo controle.

Em relação à vacuolização, foi observado um significativo aumento em DEP e DEP/HEX (Figura 17).

Figura 17 - Representação gráfica de traqueias expostas a 50 µg /mL de DEP a 30 minutos (*p=0,007) mostraram um aumento significativo na vacuolização. A exposição a 50 µg/mL de DEP/HEX aos 30 minutos (*p=0,046) e 60 minutos (*p=0,017) e 100 µg/mL a 30 (*p=0,010) e 60 minutos (*p=0,03) mostraram um aumento na vacuolização, quando foram comparados com grupo de controle.

5.2 Estudos em cultura de células de epitélio brônquico humano: BEAS-2B

5.2.1 Citotoxicidade do DEP e DEP/HEX em BEAS-2B

5.2.1.1 LDH

Nas exposições de 30 e 60 minutos, houve um aumento do LDH no grupo DEP/HEX quando comparado aos grupos controle (p=0,001) e ao DEP (p=0,001). Na exposição de 1 e 2h a 15 µg/mL de DEP ocorreu aumento do LDH (Figuras 18 e 19).

Figura 18 - Medida de Lactato de hidrogenase baseado na reação com NADH. Os grupos DEP e DEP/HEX apresentaram diferenças significativas em relação ao controle ($p=0,001$).

Figura 19 - Medida de Lactato de hidrogenase baseado na reação com NADH. O tratamento com DEP por 1 e 2h na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ apresentou aumento em comparação ao grupo controle ($p<0,05$).

5.2.1.2 MTT

A exposição ao DEP provocou redução significativa do MTT quando comparado ao grupo controle e DEP/HEX ($p=0,001$).

Figura 20 - Análise do MTT de BEAS-2B expostas ao DEP e DEP/HEX. O grupo DEP é diferente do controle ($p=0,001$) e DEP/MET ($p=0,001$).

A exposição por 1 e 2 horas ao DEP provocou acentuada redução nos valores de MTT (Figura 20).

Figura 21 - Análise do MTT de BEAS-2B expostas ao DEP por 1 e 2 horas. Observa-se redução significativa ao longo do tempo em relação ao grupo controle ($p<0,01$).

5.3 Ativação de MAPK em BEAS-2B expostas ao DEP e DEP/HEX

A Figura 21 mostra as bandas com a ativação de ERK e JNK por meio da fosforilação e de seus gráficos correspondentes. Os resultados indicam um aumento de JNK no grupo DEP para 30 minutos e uma redução para 60 minutos. No grupo DEP/HEX, os valores mostraram-se acima do controle em 30 minutos. A ativação de ERK ocorreu apenas no grupo DEP ao longo do tempo e, em DEP/HEX, não foi possível detectar nenhuma ativação.

Figura 22 - Ativação de MAPK ERK e JNK em BEAS-2B, expostas ao DEP e DEP/HEX, e controle. À esquerda, podemos observar as bandas obtidas por Western blot para DEP, DEP/HEX e controle, e à direita, os gráficos correspondentes indicando ativação de DEP para ERK e JNK nos tempos 30 e 60 minutos, e DEP/HEX somente para ERK.

5.4 Integridade do citoesqueleto em microscopia confocal

Este estudo foi realizado com o intuito de verificar as respostas celulares das proteínas do citoesqueleto quando expostas ao DEP e DEP/HEX. O aumento do microscópio confocal foi de 630 vezes. Os resultados mostram que o grupo DEP/HEX apresenta menor coerência de fibras indicando prováveis efeitos sobre o citoesqueleto.

Figura 23 - A fotomicroscopia mostra a visualização da integridade do citoesqueleto por meio da análise da coerência das fibras de actina. O gráfico acima representa o grupo controle, DEP e o DEP/HEX mostrando uma diminuição da coerência das fibras de citoqueratina no grupo exposto ao DEP/HEX ($p < 0,05$).

5.4.1 Análises da viscoelasticidade celular em BEAS-2B expostas ao DEP e DEP/HEX

As células expostas ao DEP/HEX apresentaram maior valor de G' quando comparado ao grupo DEP e ao controle indicando maior resistência celular.

Figura 24 - Análise da viscoelasticidade celular de BEAS-2B controle, e expostas ao DEP e DEP/HEX. Foi observado aumento significativo ($P=0,014$) no grupo DEP/HEX ($P=0,002$) quando comparada ao grupo controle, indicando maior resistência celular. No tratamento com DEP $15\mu\text{g/mL}$ por 1 e 2 horas, ocorreu redução no valor de G comparado ao grupo controle ($p<0,05$).

5.5 Expressão gênica de enzimas antioxidantes, CYP1A' e Apoptose

A seguir, são apresentadas as expressões gênicas referentes aos seguintes antioxidantes: SOD1, SOD2 e GPx.

A exposição ao DEP produziu redução significativa na expressão dos genes que codificam respostas antioxidantes (Figuras 24, 24 e 26).

Figura 25 - Concentração relativa de mRNA de SOD1 (gene que codifica a produção da enzima superóxido dismutase com atividade antioxidante no citosol) de BEAS-2B controle e expostas a 15 µg/mL de DEP por 1 e 2 horas. Foi observada redução significativa na expressão gênica da enzima antioxidante SOD1 após 2 horas de exposição quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$).

Figura 26 - Concentração relativa de mRNA de SOD2 (gene que codifica a produção da enzima superóxido dismutase com atividade antioxidante mitocondrial) de BEAS-2B controle e expostas a 15 µg/mL de DEP por 1 e 2 horas. Foi observada redução significativa na expressão gênica da enzima antioxidante SOD2 após 2 h de exposição quando comparado com o grupo controle ($P < 0,05$).

Figura 27 - Concentração relativa de mRNA de GPx (gene que codifica a produção da enzima glutathiona peroxidase com atividade antioxidante no citosol) de BEAS-2B controle e expostas a 15 µg/mL de DEP por 1 e 2 horas. Foi observado redução significativa na expressão gênica da enzima GPx após 1 e 2 horas de exposição ao DEP quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$).

A expressão do gene da enzima CYP1A1 de BEAS-2B expostas ao DEP apresentou elevada expressão ao longo do tempo quando comparada ao grupo controle (Figura 27).

Figura 28 - Concentração relativa de mRNA de CYP1A1 de BEAS-2B controle e expostas a 15 µg/mL de DEP por 1 e 2 horas. Foi observado aumento significativo nos tempos de 1 e 2 horas do DEP quando comparado ao controle ($P < 0,05$).

Os genes envolvidos no processo de morte celular Caspase-3 e antiapoptótico BCL-2, respectivamente, comportaram-se de forma inversamente proporcional (Figuras 28 e 29).

Figura 29 - Concentração relativa de mRNA de Caspase-3 de BEAS-2B controle e expostas a 15 µg/mL de DEP por 1 e 2 horas. Foi observado aumento significativo nos tempos de 1 e 2 horas no grupo DEP quando comparada ao grupo controle ($P<0,01$).

Figura 30 - Concentração relativa de mRNA de BCL-2 de BEAS-2B controle e expostas a 15 µg/mL de DEP por 1 e 2 horas. Foi observada redução significativa nos tempos de 1 e 2 horas no grupo DEP quando comparadas ao grupo controle ($P<0,05$).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Estudo I – Ativação de MAPK, alteração no perfil das mucinas e apoptose em explantes de traqueias expostas ao DEP

Artigo publicado no periódico: *Environmental Toxicology* - Seriani R, Junqueira MD, de Toledo AC, Martins MA, Seckler M, Alencar AM, Negri EM, Silva LF, Mauad T, Saldiva PH, Macchione M. Diesel exhaust particulates affect cell signaling, mucin profiles, and apoptosis in trachea explants of Balb/C mice. *Environ Toxicol*. 2014 Apr 29. doi: 10.1002/tox.22000. [Epub ahead of print].

O estudo I teve como objetivo observar se a exposição ao DEP ativaria as proteínas da família das MAPK ERK e JNK em explantes de traqueias de camundongo BALB/c, e verificar se estas influenciariam diretamente a apoptose e o perfil das mucinas.

Estudos prévios, como o de Lemos *et al.* (1994) e Pires-Neto *et al.* (2006), observaram que ratos e camundongos, expostos, cronicamente, à poluição atmosférica da cidade de São Paulo apresentam mudança no perfil de suas mucinas de pH neutro para ácido em células mucosas das vias aéreas do trato respiratório. Saldiva *et al.* (1992), Lemos *et al.* (1994) e Yoshizaki *et al.* (2010) também observaram alterações no perfil histológico de células epiteliais, bem como alteração nas propriedades físico-químicas do muco respiratório.

No presente estudo, observamos que a exposição ao DEP promove a ativação de MAPKs e que sugere que estas influenciem na qualidade do muco, e provoquem vacuolização e aumento da apoptose.

A liberação de muco ácido na concentração de 50 µg/mL foi acompanhada do aumento da expressão de pERK em 30 minutos e ativação de pJNK em 60 minutos, sugerindo que a ativação destas MAPK atue na mudança no pH das mucinas. Na concentração de 100 µg/mL, houve a ativação de pERK e pJNK em 30 minutos e, após 60 minutos, ocorreu redução da atividade de ambas MAPKs sem alterar o perfil das mucinas, isto é, não houve aumento de expressão de muco ácido.

Li *et al.* (2012) mostraram que a ativação de ERK aumenta consideravelmente a expressão de MUC5AC em células epiteliais. A acidificação da mucina promove alterações nas propriedades físico-químicas do muco com o aumento da viscosidade interferindo de forma a dificultar o “*clearance*” mucociliar, que é um importante mecanismo de defesas do epitélio respiratório (Lemos *et al.*, 1994; Pires-Neto *et al.*, 2006; Yoshizaki *et al.*, 2010). Assim, podemos atribuir a alteração no perfil das mucinas, primeiramente, à expressão de pERK (30 min) seguida de pJNK. Estes resultados sugerem que pERK tenha atividade antiapoptótica e, assim, apresentou expressão elevada pois o muco ácido é uma resposta de defesa.

A ativação do pJNK, após 60 minutos, na concentração de 50 µg/mL, pode estar ligado ao aumento da produção do muco como um mecanismo de defesa frente à exposição do DEP e, em seguida, agir no rearranjo do citoesqueleto para realizar a extrusão. Choi *et al.* (2010) mostraram que a superprodução de muco esteve associada com um aumento na expressão da proteína MUC5AC epitelial, que é dependente da ativação da via JNK, o que sugere que a via JNK pode ser um alvo potencial para regular excesso de muco.

Segundo Reardon *et al.* (1999) e Shen *et al.* (2003), “pro-survival” ERK e “pro-apoptotic” JNK agem em equilíbrio. Deste modo, foi observado, nas alterações de expressão do ERK e JNK, em 30 e 60 minutos, na concentração de 50 µg/mL de DEP. Além disso, na concentração de 100 µg/mL, a expressão inversamente proporcional refletiu no foco de apoptose.

É possível que os vacúolos observadas no nosso estudo sejam resultado de endocitose do DEP por células de traqueia, como observado por Geiser (2002) e Bao *et al.* (2007) em células CHO-K1. No entanto, não podemos desconsiderar que vacúolos podem representar extrusão muco. *In vivo*, a secreção de mucina é, tipicamente, iniciada por um secretagogo e sua extrusão pode ocorrer depois de alguns minutos (Rose & Voynow, 2006).

Mostramos que a vacuolização aumentou em 30 minutos no tratamento com 50 µg/ml de DEP. Estes resultados podem ser atribuídos pela extrusão de muco e pelo processo de rearranjo do citoesqueleto (Pawlak & Helfman, 2001).

Segundo Tricker *et al.* (2011), a ativação de JNK leva à apoptose em células B. Nosso estudo corrobora com esta informação, visto que os maiores níveis de apoptose estiveram ligados com maior expressão de pJNK.

Em relação à concentração utilizada, consideramos a dose média de 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM10 que são comuns em corredores de tráfego (Yoshizaki *et al.*, 2010). Se assumirmos que os seres humanos respiram 6 L/min, o volume inspirado em uma hora será 360 L, o equivalente a 0,36 m^3 , correspondendo a 70 μg de material particulado inalado.

Considerando-se que a retenção das partículas na traqueia é de, aproximadamente, cerca de 20%, 14 μg são retidos na traqueia por hora. Os sujeitos saudáveis produzem uma média de 50 mL de muco por dia (entre 10-100 mL) (Rubin, 2002), e a quantidade de muco produzido na traqueia será de, aproximadamente, 2,0 mL de muco por uma hora. Assim, a concentração esperada de material particulado no muco que reveste a traqueia em uma hora é de 7 μg por mL de muco.

Em nosso estudo, utilizamos as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 30 e 60 minutos. As doses utilizadas, aqui, correspondem a, aproximadamente, 12-14 horas de exposição à poluição do ar urbano. Outros estudos têm utilizado valores superiores ao nosso, cerca de 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ do utilizado por nosso estudo (Dai & Churg, 2001; Dai, *et al.*, 2002; 2003). A concentração utilizada em nosso estudo corresponde a 15,68 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 31.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

As concentrações utilizadas no nosso estudo são baseadas em doses baixas para mostrar os efeitos tóxicos da exposição de DEP nas vias aéreas e a estas concentrações. No entanto, neste contexto, é possível que, na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de partículas de DEP, seria mais dispersa no meio, e conseguiriam penetrar nas células epiteliais mais facilmente do que em 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em que as partículas de DEP podem agregar. Portanto, a resposta de estresse à lesão sob a forma de muco ácido foi mais pronunciada nas células expostas a concentrações mais baixas de DEP.

6.2 Estudo II - Alteração no perfil das mucinas de explantes de traqueias expostas ao DEP, DEP/NA, DEP/HEX e DEP/MET

Artigo aceito para publicação no periódico - *Journal of Toxicology and Environmental Health*. Seriani R, Junqueira M, Toledo AC, Martins MA, Saldiva PHN, Mauad T, Macchione M. Organic and inorganic fractions of diesel exhaust particles cause changes in the mucin profile of mouse trachea explants. *J Toxicol Environ Health*. 2015.

No estudo II, observamos que o DEP e suas frações orgânicas e inorgânicas diferencialmente induzem alterações no perfil das mucinas em explante de traqueias.

O grupo exposto a vários tempos de exposição e à concentração DEP mostrou um aumento na produção de muco ácido e uma diminuição no muco neutro com aumento de vaculiozação. Baixas concentrações de DEP foram mais tóxicas, possivelmente por não produzir aglomerados.

O tratamento com DEP/MET foi mais agressivo para o epitélio, o que pode ser atribuído à redução em compostos orgânicos e à alta disponibilidade de Fe, Cd e Cu. As traqueias expostas a DEP/MET, na concentração de 50 µg/mL por 30 e 60 minutos, induziu um decréscimo significativo na produção de muco neutro e um aumento na produção de muco ácido, possivelmente atribuída à redução dos compostos orgânicos e enriquecimento inorgânico (Tabela 1).

As traqueias expostas a DEP/HEX apresentou aumento de vacuolização, mostrando que pode ser um processo de proteção do epitélio com aumento da extrusão de muco frente ao aumento da biodisponibilidade de Ni, S, Cd, Cr e Cu. Já em DEP/NA, não ocorreu alteração significativamente estatística no perfil das mucinas e na vacuolização. Isto pode ser explicado pela remoção de enxofre (Tabela 2) e de seus derivados tóxicos, como o sulfito (Li *et al.*, 2007).

Metais de transição e a fração orgânica podem influenciar na toxicidade do DEP e, conseqüentemente, a magnitude dos efeitos adversos apoia o conceito de que a composição e as propriedades físico-químicas podem regular a toxicidade do DEP no epitélio respiratório (Saldiva *et al.*, 2002; Laks *et al.*, 2008, Happonen *et al.*, 2010).

A acidificação muco, que é provocada por mudanças nas propriedades físico-químicas das mucinas, podem aumentar a viscosidade do muco e, conseqüentemente, provocar mudanças nos mecanismos de defesa do epitélio respiratório (Li *et al.*, 2007). Rose e Voynow (2006) mostraram que a secreção de mucina *in vivo* é, normalmente, iniciado por um secretagogo e de ação rápida (segundos a minutos), o que foi semelhante aos resultados do presente estudo, sugerindo que o DEP pode agir como tal.

Em conclusão, nosso estudo mostrou que o DEP modificou o perfil de muco do epitélio e DEP/HEX provocou aumento da extrusão do muco, provavelmente devido à ação do enriquecimento inorgânico, sendo que as células do explante de traqueia podem ter sofrido alterações estruturais e na função das células epiteliais.

6.3 Estudo III – Enriquecimento inorgânico das partículas do DEP por meio do tratamento com hexano e seus efeitos na viscoelasticidade celular, citotoxicidade e ativação de MAPK em BEAS-2B

Artigo em revisão no periódico: *Experimental and Toxicologic Pathology* – Seriani R, Junqueira MS, Carvalho-Sousa CE, Toledo AC, Martinez D, Alencar AM, Garippo AL, Brito JM, Martins MA, Saldiva PHN, Negri EM, Mauad T, Macchione M. Enriched inorganic compounds in diesel exhaust particles induce mitogen-activated protein kinase activation, cytoskeleton instability, and cytotoxicity in human bronchial epithelial cells.

No estudo III, demonstramos que o DEP e DEP/HEX induz, diferentemente, citotoxicidade, ativação de MAPK e perturbações no citoesqueleto de BEAS-2B. Ambos apresentam efeitos negativos sobre a viabilidade celular (MTT ou LDH), mas o DEP/HEX altera a integridade citoesqueleto e a viscoelasticidade celular.

Como observado anteriormente, os compostos orgânicos diminuem após o tratamento com hexano (Tabela 2). A concentração de alguns elementos (S, Ni, Cd, Cr e Cu) aumentou devido à parte da fração orgânica que estava complexada aos inorgânicos (Laks *et al.*, 2008).

Os metais de transição, tais como Cu e Ni (cobre e níquel), podem produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou catalisar a formação de H_2O_2 . Estes compostos desencadeiam uma resposta celular mediada pela ativação de vias de sinalização intracelular, que culminam em proliferação, na transformação de células, ou na morte celular (Fantl *et al.*, 1993; Hill & Treisman, 1995; Ghio *et al.*, 2002).

Células BEAS-2B expostas ao DEP bruto não apresentaram diferenças na coerência fibra, entretanto, houve uma diminuição no ensaio de MTT ao longo do tempo, sem alteração no LDH. Nossos dados sugerem que a exposição ao DEP diminui a atividade mitocondrial, sem alterações significativas no citoesqueleto ou na viscoelasticidade celular, permitindo o transporte de MAPK no interior da célula (Wortzel & Seger, 2011).

Segundo Barros *et al.* (2005) e Tricker *et al.* (2011), a ativação pERK atua como antiapoptótica contra os efeitos pró-apoptóticos de pJNK. No grupo DEP, foi observada a redução do MTT e, também, ativação de pJNK, o que sugere uma relação de apoptose. De acordo com Tournier *et al.* (2000) e Weston e Davis (2007), a ativação de JNK é uma importante via de apoptose, incluindo a ativação de vias de necrose e autofagia.

DEP/HEX removeu grande parte dos compostos orgânicos de polaridade média e baixa. Não ocorreu a expressão de pERK, mas houve um pico na expressão de pJNK. Além disso, LDH e a viscoelasticidade aumentaram, enquanto a coerência da fibra foi menor em relação ao grupo controle. Segundo Goberdhan & Wilson (1998), a ativação JNK também tem função de provocar rearranjos do citoesqueleto, bem como respostas imunes, parada do crescimento celular e regulação da apoptose.

Foi observada a redução em coerência fibra e o aumento da viscoelasticidade sugerindo que esteja associado à desorganização do citoesqueleto. Neste contexto, a redução da coerência da fibra (falta de alinhamento) sugere que pJNK não translocou para o núcleo, em que poderia ativar vários fatores de transcrição, tais como apoptose. Além disso, as remoções de compostos orgânicos aumentaram a biodisponibilidade de alguns metais e fez com que a membrana tenha sofrido danos (observados pelo aumento do LDH).

Em resumo, pode concluir-se que a DEP/HEX induz alterações subcelulares, tais como alterações na viscoelasticidade, e orientação do citoesqueleto por meio da ativação de pJNK.

6.4 Estudo IV - Expressão gênica de enzimas antioxidantes, citotoxicidade e viscoelasticidade celular em células expostas ao DEP

Artigo em fase de redação a ser submetido ao periódico: *Particle and Fibre Toxicology*.

No estudo IV, ficou evidente que os prováveis efeitos do DEP, nas estruturas celulares, podem ser decorrentes de estresse oxidativo devido ao metabolismo de hidrocarbonetos e ciclo redox dos metais encontrados em altas concentrações no DEP utilizado no presente estudo (Tabelas 1 e 2).

Estudos realizados por Gurgueira *et al.* (2002); Park *et al.*, (2006) e Ghio & Cohen (2005), demonstraram que partículas ultrafinas contendo metais, como Mn, Fe, Cu, provocam estresse oxidativo e que o Fe nas partículas parece exercer maior importância na formação de ROS do que os demais metais. Além disso, Pulido & Parrish (2003), apontam para os metais como responsáveis por disfunção mitocondrial ativação de MAPK, p53, caspases e regulação negativa de proteínas antiapoptóticas, como a Bcl-2.

Em nosso estudo, observamos uma significativa depleção dos genes envolvidos nas defesas antioxidantes mitocondriais (SOD2) e citoplasmáticas (SOD1 e GPx), e aumento na expressão de CYP1A1. O aumento da atividade da enzima citocromo p450 ou dos genes CYP1A1 é descrita como importante fonte de geração de ROS durante metabolismo de hidrocarbonetos, ou seja, na transformação de substâncias lipossolúveis para hidrossolúveis, e, assim, serem excretados. Adicionalmente, a atividade de CYP1A1 é extremamente importante na tentativa de remover benzo[a]pireno, pois esse hidrocarboneto apresenta atividade carcinogênica de 10 até 100 vezes maior do que os demais HPAs, além de provocar inflamação e formação de aductos de DNA (Li *et al.*, 2002, Halliwell & Gutteridge, 2007).

Foi observada a relação inversamente proporcional à expressão gênica de caspase-3 e de Bcl-2. Estes genes são pró-apoptótico e antiapoptótico, respectivamente, e tem como alvo alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação de citocromo *c* que resulta em morte celular (Chen *et al.*, 2001). Desse modo, sugere-se a redução da viabilidade celular (*MTT* assay) provocada por esse desequilíbrio entre Bcl-2 e Caspase-3.

Ainda em relação à baixa atividade mitocondrial, é possível atribuir a um processo de morte celular, entretanto, há de se considerar que não apenas a baixa expressão de Bcl-2 pode ser a causa, mas também uma consequência de estresse oxidativo. Observa-se que os níveis de GPx e SOD1 são baixos, o que indica baixa atividade antioxidante no citosol. Nesse sentido, a provável geração de ROS decorrente do metabolismo de HPAs e ciclo redox dos metais, assim como baixa atividade da SOD2 (mitocondrial), tenha aumentado a permeabilidade das mitocôndrias. Esta hipótese ainda não tinha sido discutida em relação ao mecanismo de toxicidade das partículas de DEP, entretanto, Li *et al.* (2003) descreveu a possibilidade de que ROS gerado fora da mitocôndria poderia danificar esta organela, permitindo acesso das partículas ultrafinas à mitocôndria por causa de suas pequenas dimensões e estas poderiam danificar a membrana interna.

Assim como nas mitocôndrias, foi observado aumento nos níveis de lesão das membranas citoplasmática que pode ser atribuído, novamente, à formação de ROS. Estes radicais agem diretamente atacando lipídios e proteínas de membranas, provocando peroxidação lipídica (Comporti, 1989). Com a membrana citoplasmática alterada, a permeabilidade seletiva fica comprometida e o fluxo de íons é alterado, assim como podem modificar a arquitetura e sinalização celular, levando a uma redução na proliferação celular e apoptose (Corsetto *et al.*, 2011).

Somado a estas informações: 1) à expressão gênica elevada da caspase-3, 2) a alterações na membrana e 3) à redução da atividade mitocondrial, é importante sugerir que elas podem levar a uma provável desregulação nos níveis internos de cálcio. Estudos realizados por Duchon, (2000); Zaidi *et al.* e (2004); Brini *et al.* (2000) descrevem que a membrana plasmática tem um importante função no controle de cálcio intracelular. E, assim, quando a

concentração de cálcio no citosol é elevada, este íon pode agir como um modulador de transcrição para genes envolvidos na apoptose, e, ainda, acumular na mitocôndria, provocando uma disfunção na cadeia respiratória e, consequentemente, na síntese de ATP, e a liberação de citocromo c, que pode ativar a via da apoptose. Brown *et al.* (2000) descrevem que as células da via respiratória, quando expostas à partículas ultrafinas, incluindo o DEP, aumentam a concentração interna de cálcio.

No presente estudo, ainda foi observada uma significativa redução da viscoelasticidade celular, evidenciando consideráveis lesões no citoesqueleto. Alterações na viscoelasticidade celular têm sido relatadas por Park *et al.*, (2010) e Wu *et al.*, (2012) em células expostas à poluentes atmosféricos, entretanto, os mecanismos ainda são pouco conhecidos. Estudos realizados por Earnshaw *et al.* (1999) descrevem que alterações funcionais no citoesqueleto refletem diretamente um processo apoptótico, visto que a caspase-3 cliva proteínas funcionais do citoesqueleto e promovem alterações estruturais, além disso, também é provável atribuir as alterações observadas ao ROS que atuam na degradação de proteínas constitutivas do citoesqueleto (Dalle-Done *et al.*, 2001). Deste modo, no presente estudo, a baixa expressão de genes antioxidantes que removeriam os ROS gerados a partir dos metais e hidrocarbonetos também teria grande influência na perda de função do citoesqueleto e não apenas a atividade da caspase 3.

Em relação à alteração na viscoelasticidade celular caracterizando a célula como flácida em decorrência de alterações no citoesqueleto, pode descrever como comprometedora, considerando que o citoesqueleto equilibra as forças de tensão célula-célula, adesão celular e resistência ao estiramento (Trepac *et al.*, 2004).

Em conclusão às alterações observadas, podemos sugerir que há fortes evidências de que as alterações estruturais no citoesqueleto, membranas e mitocôndrias podem ser decorrentes do estresse oxidativo em resultado da elevada expressão de CYP1A1, e redução de SOD1, SOD2 e GPx. Além disso, sugere-se que baixa atividade mitocondrial estejam ligadas, principalmente, à elevada expressão de caspase-3 e redução da SOD2, visto que esta enzima atua, principalmente, nas mitocôndrias.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no explante de traqueia de camundongo e na cultura de células de epitélio brônquico, podemos concluir que em explantes de traqueia:

- Na concentração de 50 µg/ml de DEP, sugere que as partículas fiquem mais dispersas no meio, e podem penetrar nas células mais facilmente e, por consequência, sua resposta frente a esse estresse é a ativação de MAPKs que alteram o perfil das mucinas, com produção de muco ácido e aumento da vacuolização;
- Os explantes submetidos à exposição do DEP com composição química variada modifica o perfil de muco do epitélio e provoca aumento da extrusão do muco, provavelmente devido à ação do enriquecimento inorgânico, e alterando estruturas e função das células epiteliais.

Em cultura de células BEAS-2B:

- DEP/HEX induz alterações subcelulares, tais como alterações na viscoelasticidade, e orientação do citoesqueleto por meio da ativação de pJNK mediada pelo enriquecimento inorgânico.
- DEP induz à apoptose celular devido a alterações funcionais no citoesqueleto, membrana citoplasmática e mitocôndrias. Tais alterações podem ser atribuídas ao estresse oxidativo devido à redução da expressão de genes antioxidantes (GPx, SOD1 e SOD2) e pró-apoptóticos (Caspase-3).

Em síntese, podemos concluir que nosso estudo contribuiu para o conhecimento em relação aos mecanismos de toxicidade do DEP em traqueias descrevendo o envolvimento de proteínas da família das MAPK: ERK e JNK nas alterações epiteliais e no perfil das mucinas. Além disso, nas células de

epitélio brônquico, podemos esclarecer como interagem alguns dos genes envolvidos no estresse oxidativo e apoptose com a funcionalidade do citoesqueleto, mitocôndrias e membrana citoplasmática.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

- Abeynaike L, Meeusen ENT, Bischof RJ. An ovine tracheal explant culture model for allergic airway Inflammation. *J Inflamm.* 2010;7:46.
- Ackland ML, Zou L, Freestone D, Wasssenburg VS, Michalczyk AA. Diesel exhaust particulate matter induces multinucleate cells and zinc transporter-dependent apoptosis in human airway cells. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(8):617-22.
- Aebi H. *Catalase. Methods of enzymatic analysis.* London: Academic Press. 1984;105:121-6.
- Allahverdian S, Harada N, Singhera GK, Knight DA, Dorscheid DR. Secretion of IL-13 by airway epithelial cells enhances epithelial repair via HB-EGF. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;38:153–160.
- Altuğ H, Gaga EO, Döğeroğlu T, Özden O, Ornektekin S, Brunekreef B, Meliefste K, Hoek G, Van Doorn W. Effects of air pollution on lung function and symptoms of asthma, rhinitis and eczema in primary school children. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2013;20(9):6455-67.
- ANFAVEA - Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. (2012). *Diesel e emissões: a nova legislação 2012.* São Paulo: Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores.
- Ashby J. *Druckrey's definition of 'genotoxic'. Mutation research fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis.* Series: Current issues in mutagenesis and carcinogenesis. 1995;57.
- Balmano K, Cook SJ. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ.* 2009;16:368–77
- Bao L, Chen S, Wu L, Hei TK, Wu Y, Yu Z, Xu A. Mutagenicity of diesel exhaust particles mediated by cell-particle interaction in mammalian cells. *Toxicology.* 2007 5;229(1-2):91-100.
- Barros JC, Marshall CJ. Activation of either ERK1/2 or ERK5 MAP kinase pathways can lead to disruption of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 2005;118:1663-71.
- Bell ML, Davis DL, Gouveia N, Borja-Aburto VH, Cifuentes LA. The avoidable health effects of air pollution in three Latin American cities: Santiago, Sao Paulo, and Mexico City. *Environ Res.* 2006;100(3):431-40.

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):1116-23.

Block ML, Calderón-Garcidueñas L. Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. *Trends Neurosci*. 32(9):506-16.2009.

Bourotte C, Forti MC, Taniguchi S, Bicego MC, Lotufo PA. A wintertime study of PAHs in fine and coarse aerosols in São Paulo city, Brazil. *Atmos Environ*. 2005;39:3799-3811.

Bowler RP, Nicks M, Warnick K, Crapo JD. Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282(4):719-26.

Brini M. Effects of PMCA and SERCA pump overexpression on the kinetics of cell Ca²⁺ signaling. *EMBO J*. 2000;19:4926-35.

Brown DM, Stone V, Findlay P, MacNee W, Donaldson K. Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occupat Environ Med*. 2000;57(10):685-91.

Carvalho-Oliveira R, Saiki M, Pires-Neto RC, Lorenzi-Filho G, Macchione M, Saldiva PH. 10. Anti-oxidants reduce the acute adverse effects of residual oil fly ash on the frog palate mucociliary epithelium. *Environ Res*. 2005;98(3):349-54.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; Secretaria do Meio Ambiente; Governo do Estado de São Paulo. (2011 - 2013). Plano de Controle de Poluição Veicular do Estado de São Paulo; São Paulo.

Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric control of cell life and death. *Science*. 1997;276(5317):1425-8.

Chen F, Vallyathan V, Castranova V, Shi X. Cell apoptosis induced by carcinogenic metals. *Mol Cell Biochem*. 2001;222(2001):183-8.

Choi W, Syrkina O, Kwon KY, Quinn DA, Hales CA. JNK activation is responsible for mucus overproduction in smoke inhalation injury. *Resp Res*. 2010;11:172.

Comporti M. Three models of free radical-induced cell injury. *Chem Biol Interact*. 1989;72:1-56.

Corsetto PA, Montorfano G, Zava S, Jovenitti IE, Cremona A, Berra B, Rizzo AM. Effects of N-3 Pufas on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. *Lipids Health Dis*. 2011;73(10):1-16.

Dai J, Churg A. Relationship of fiber surface iron and active oxygen species to expression of procollagen, PDGF-A, and TGF-beta(1) in tracheal explants exposed to amosite asbestos. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;24:427-35.

Dai J, Gilks B, Price K, Churg A. Mineral dusts directly induce epithelial and interstitial fibrogenic mediators and matrix components in the airway wall. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:1907-13.

Dai J, Xie C, Vincent R, Churg A. Air pollution particles produce airway wall remodeling in rat tracheal explants. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29:352-8.

Dalle-Donne I, Rossi R, Milzani A, Di Simplicio P, Colombo R. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(12):1624-32.

De Martinis BS, Okamoto RA, Kado NY, Gundel LA, Carvalho LRF. Polycyclic aromatic hydrocarbons in a bioassay-fractionated extract of PM10 collected in São Paulo, Brazil. *Atmospher Environ*. 2002;36:307-14.

Delfino RJ, Staimer N, Tjoa T, Gillen DL, Polidori A, Arhami M, Kleinman MT, Vaziri ND, Longhurst J, Sioutas C. Air pollution exposures and circulating biomarkers of effect in a susceptible population: clues to potential causal component mixtures and mechanisms. *Environ Health Perspect*. 2009;117(8):1232-8.

DETRAN/SP – Frota Veicular do Estado de São Paulo. Outubro 2014. [Acesso em 05 jan. 2015]. Disponível em: <http://www.denatran.gov.br/frota2014.htm>.

Di Donato S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis*. 2000;23:247-63.

Diaz-Sanchez D, Penichet-Garcia M, Saxon A. Diesel exhaust particles directly induce activated mast cells to degranulate and increase histamine levels and symptom severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(6):1140-6.

Driscoll CG, Lawrence A, Bulger T, Butter C, Cronan C, Eager K, Falcon Lambert G, Likens JL, Stoddard and K. Weathers: Acidic deposition in the north eastern U.S. sources and inputs ecosystem and management strategies. *Bioscience*. 2001;51:180-98.

Duan W, Chan JH, Wong CH, Leung BP, Wong WS. Antiinflammatory effects of mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 in an asthma mouse model. *J Immunol*. 2004;172:7053-9.

Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol*. 2000;529:57-68.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:383-424.

Fabry B, Maksym GN, Butler JP, Glogauer M, Navajas D, Fredberg JJ. Scaling the microrheology of living cells. *Phys Rev Lett*. 2001;87:148-102.

Fabry B, Maksym GN, Butler JP, Glogauer M, Navajas D, Fredberg JJ. Scaling the microrheology of living cells. *Phys Rev Lett*. 2001;87:148102

Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*. 1993;62:453-81.

Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*. 2001;3:255-63.

Fischer H, Widdicombe JH. Mechanisms of acid and base secretion by the airway epithelium. *J Membr Biol*. 2006;21(3):139-50.

Fourquet S, Huang ME, D'autreaux B, Toledano MB. The dual functions of thiol-based peroxidases in H₂O₂ scavenging and signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2008;9:1565-76.

Franchini M, Mannucci PM. Impact on human health of climate changes. *Eur J Int Med*. 2015 Jan;26(1):1-5.

Gan WQ, FitzGerald JM, Carlsten C, Sadatsafavi M, Brauer M. Associations of ambient air pollution with chronic obstructive pulmonary disease hospitalization and mortality. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(7):721-7.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119:493-501.

Geiser M. Morphological aspects of particle uptake by lung phagocytes. *Microsc Res Tech*. 2002;57(6):512-22.

George SG. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic conjugating enzymes in fish. In: Mallins DC, Ostrander GK. *Aquatic Toxicology, molecular, biochemical and cellular perspectives*. London. 1994;37-85.

Ghio AJ, Cohen MD. Disruption of iron homeostasis as a mechanism of biologic effect by ambient air pollution particles. *Inhal Toxicol*. 2005;17(13):709-16.

Goberdhan DC, Wilson C. JNK, cytoskeletal regulator and stress response kinase? A Drosophila perspective. *Bioessays*. 1998;20:1009-19.

Gurbani D, Bharti SK, Kumar A, Pandey AK, Ana GR, Verma A, Khan AH, Patel DK, Mudiam MK, Jain SK, Roy R, Dhawan A. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their quinones modulate the metabolic profile and induce DNA damage in human alveolar and bronchiolar cells. *Int J Hyg Environ Health*. 2013;216(5):553-65.

Gurgueira S, Sigaud S, Macchione M, Lawrence J, González-Flecha B. H₂O₂-mediated proinflammatory and toxic responses to ambient air particles in primary alveolar type II cells. In: Corin G, Bodine. (Org.). *Air pollution research advances*. 1ed.: Nova Science Publishers. 2007;1-17.

Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem*. 1996;271(8):4138-42.

Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine*. Nova York: Oxford University Press. 2007;1:851.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*. 1989;119:203-10.

Happo MS, Hirvonen MR, Hälinen AI, Jalava PIAS, Pennanen M, Sillanpää R. Seasonal variation in chemical composition of size-segregated urban air particles and the inflammatory activity in the mouse lung. *Inhal Toxicol*. 2010;22(1):17-32.

Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1995;30:445-600.

Hewson CA, Edbrooke MR, Johnston SL. PMA induces the MUC5AC respiratory mucin in human bronchial epithelial cells, via PKC, EGF/TGF- α , Ras/Raf, MEK, ERK and Sp1-dependent mechanisms. *J Mol Biol*. 2004;344:683-95.

Hill CS, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*. 1995;80(2):199-211.

IARC – International Agency for research to cancer – Monographs of The Evaluations of Carcinogenic Risks to Human. 2012. WHO – World Health Organization.

Jaeschke A, Rincon M, Doran B, Reilly J, Neuberg D, Greiner DL, Shultz LD, Rossini AA, Flavell RA, Davis RJ. Disruption of the Jnk2 (Mapk9) gene reduces destructive insulinitis and diabetes in a mouse model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:6931-5.

Jang JS, Cho HY, Lee YJ, Ha WS, Kim HW. The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates. *Oncol Res*. 2004;14(10):491-9.

Jasinski R, Pereira LAA, Braga ALF. Poluição atmosférica e interações hospitalares por doenças respiratórias em crianças e adolescentes em Cubatão, São Paulo, Brasil, entre 1997 e 2004. *Cad Saude Publ*. 2011;27:2242-52.

Kitson C, Angel B, Judd D, Rothery S, Severs NJ, Dewar A, Alton EW. The extra-and intracellular barriers to lipid and adenovirus-mediated pulmonary gene transfer in native sheep airway epithelium. *Gene Ther*. 1999;6(4):534-46.

Koffer A, Tatham PER, Gomperts BD. Changes in the state of actin during the exocytotic reaction of permeabilized rat mast cells. *J. Cell Biol.* 1990;111:919-27.

Laks DM, Oliveira R, André P, Macchione M, Lemos M, Faffe DS, Saldiva PHN, Zin WA. Composition of diesel particles influences acute pulmonary toxicity: an experimental study in mice. *Inhal Toxicol.* 2008;11:1037-42.

Lang T, Wacker I, Wunderlich I, Rohrbach A, Giese G, Soldati T, Almers W. Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys J.* 2000;78:2863-77.

Lankford SM, Macchione M, Crews AL, Mckane SA, Akley NJ, Martin LD. Modeling the airway epithelium in allergic asthma: interleukin-13-induced effects in differentiated murine tracheal epithelial cells. *In Vitro Cell Devel Biol Anim.* 2005;41(7):217-24.

Lehninger AL, Smith SW. Efficiency of phosphorylation coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen. *J Biol Chem.* 2003;181(1):415-29.

Lehninger AL, Smith SW. Efficiency of phosphorylation coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen. *J Biol Chem.* 1949;181:415-29.

Lemos M, Lichtenfelds AJ, Amaro Júnior E, Macchione M, Martins MA, King M, Böhm GM, Saldiva PH. Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban levels of air pollution. *Environ Res.* 1994;66:87-95.

Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol.* 2003;109:250–265.

Li N, Wang M, Oberley TD, Sempf JM, Nel AE. Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *J Immunol.* 2002;169:4531-41.

Li R, Meng Z, Xie J. Effects of sulfur dioxide on the expressions of MUC5AC and ICAM-1 in airway of asthmatic rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2007;48(3):284-91.

Li R, Ning Z, Cui J, Khalsa B, Ai L, Takabe W, Beebe T, Majumdar R, Sioutas C, Hsiai T. Ultrafine particles from diesel engines induce vascular oxidative stress via JNK activation. *Free Radic Biol Med.* 2009;15;46(6):775-82.

Li N, Li Q, Zhou XD, Juliy VP, Perelman M. Chronic mechanical stress induces mucin5AC expression in human bronchial epithelial cells through ERK dependent pathways. *Mol Biol Rep.* 2012;39:1019-28.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest.* 1962;41:1776-1804.

Macchione M, Oliveira AP, Gallafrio CT, Muchao FP, Obara MT, Guimaraes ET, Artaxo P, King M, Lorenzi-Filho G, Junqueira VC, Saldiva PH. Acute effects of inhalable particles on the frog palate mucociliary epithelium. *Environ Health Perspect.* 1999;107(10):829-33.

Macchione M, Saldiva PHN. Células do epitélio respiratório. In: Naomi Kondo Nakagawa; Viviani Barnabé. (Org.). *Fisioterapia do sistema respiratório*. 1a. ed. São Paulo: Sarvier; 2006. v. 1, p. 247-56.

Marchese C, Visco V, Aimati L, Cardinali G, Kovacs D, Buttari B, Bellocchi M, Torrisi MR, Picardo M. Nickel-induced keratinocyte proliferation and up-modulation of the keratinocyte growth factor receptor expression. *Exp Dermatol.* 2003;12(4):497-505.

Mccord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244:6049-55.

Mercer BA, Kolesnikova N, Sonett J, D'Armiento J. Extracellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase is up-regulated in pulmonary emphysema and mediates matrix metalloproteinase-1 induction by cigarette smoke. *J Biol Chem.* 2004;279:17690-6.

Miraglia SGEK, Saldiva PHN, Böhm GM. An evaluation of air pollution health impacts and costs in São Paulo, Brazil. *Environ Manage.* 2005; 35:667-76.

Moriya HT, Colen DJ, Maksym GN, Alencar AM. Citometria óptico-magnética de rotação: exemplo de um método para medir as propriedades reológicas da célula. *Fig If USP Br.* 2008;1234-7.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.

Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.

Mudway IS, Stenfors N, Duggan ST, Roxborough H, Zielinski H, Marklund SL, Blomberg A, Frew AJ, Sandstrom T, Kelly FJ. An in vitro and in vivo investigation of the effects of diesel exhaust on human airway lining fluid antioxidants. *Arch Biochem Biophys.* 2004;423(1):200-12.

Nakagawa NK, Franchini ML, Driusso P, Oliveira LR, Saldiva PH Lorenzi G. Mucociliary clearance is impaired in acutely ill patients. *Chest.* 2005;128(5):2772-7.

Nakagawa NK, Saldiva PHN, Lorenzi-Filho G. Mecanismos de defesa pulmonar. In: Nakagawa NK, Barnabe V. (Org.). *Fisioterapia do sistema respiratório*. 1 ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2006, v. 1, p. 207-228.

Neas LM, Dockery DW, Burge H, Koutrakis P, Speizer FE. Fungus spores, air pollutants, and other determinants of peak expiratory flow rate in children. *Am J Epidemiol*. 1996;143(8):797-807.

Ntziachristos L, Froines JR, Cho AK, Sioutas C. Relationship between redox activity and chemical speciation of size-fractionated particulate matter. *Part Fibre Toxicol*. 2007;7:4-5.

Ohashi E, Miyajima N, Nakagawa T, Takahashi T, Kagechika H, Mochizuki M, Nishimura R, Sasaki, N. Retinoids induce growth inhibition and apoptosis in mast cell tumor cell lines. *J Vet Med Sci*. 2006;68(8):797-802.

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007;12:913-22.

Otto DME, Moon TW. Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1996;31:141-7.

Park S, Nam H, Chung N, Park JD, Lim Y. The role of iron in reactive oxygen species generation from diesel exhaust particles. *Toxicol In Vitro*. 2006;20:851-7.

Parsonage D, Youngblood DS, Sarma GN, Wood ZA, Karplus PA, Poole LB. Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry*. 2005;44:10583-92.

Pawlak G, Helfman DM. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11:41-7.

Penha-Silva N, Firmino CB, De Freitas Reis FG, Huss JCC, De Souza TMT, De Freitas MV, Netto RCM. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev*. 2007;128:444-9.

Perera FP. Environmental and cancer: who are susceptible? *Science*. 1997;278:1068-73.

Pires-Neto RC, Lichtenfels AJ, Soaes SR, Macchione M, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Effects of Sao Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environ Res*. 2006;101(3):356-61.

Pope CA, Dockery DW. 'Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect'. *J Air Waste Manag Ass*. 2006;56:709-42.

Pourazar J, Blomberg A, Kelly FJ, Davies DE, Wilson SJ, Holgate ST, Sandström T. Diesel exhaust increases EGFR and phosphorylated C-terminal Tyr 1173 in the bronchial epithelium. *Part Fibre Toxicol*. 2008;5:8.

Pozzi R, De Berardis B, Paoletti L, Guastadisegni C. Inflammatory mediators induced by coarse (PM_{2.5-10}) and fine (PM_{2.5}) urban air particles in RAW264.7 cells. *Toxicology*. 2003;183:243-54.

Pritchard RJ, Ghio AJ, Lehman JR, Winsett DW, Tepper JS, Park P, Gilmour MI, Dreher KL, Costa D. Oxidant generation and lung injury after particulate air pollutant exposure increase with the concentrations of associated metals. *Inhal Toxicol*. 1996;8:457-77.

Pulido MD, Parrish AR. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res*. 2003;533:227-41.

Pullikuth AK, Catling AD. Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective. *Cell Signal*. 2007;19:1621-32.

Reardon DB, Contessa JN, Mikkelsen RB, Valerie K, Amir C, Dent P, Schmidt-Ulrich RK. Dominant negative EGFR-CD533 and inhibition of MAPK modify JNK1 activation and enhance radiation toxicity of human mammary carcinoma cells. *Oncogene*. 1999;18:4756-66.

Rego AC, Santos MS, Oliveira CR. Influence of the antioxidants vitamin E and idebenone on retinal cell injury mediated by chemical ischemia, hypoglycemia, or oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1999 Jun;26(11-12):1405-17.

Renda T, Baraldo S, Pelaia G, Bazzan E, Turato G, Papi A, Maestrelli P, Maselli R, Vatrella A, Fabbri LM, Zuin R, Marsico SA, Saetta M. Increased activation of p38 MAPK in COPD. *Eur Respir J*. 2008;31:62-9.

Rezakhaniha RA, Agianniotis JTC, Schrauwen A, Griffa D, Sage CVC, Bouten FN, van de Vosse MU, Stergiopoulos N. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomech. Model. Mechanobiol*. 2012;11:461-73.

Romão R, Pereira LAA, Saldiva PHN, Pinheiro PM, Braga ALF, Martins LC. The relationship between low birth weight and exposure to inhalable particulate matter. *Cad Saude Publ*. 2013;29(6):1101-8.

Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev*. 2006;86:245-78.

Rubin BK Physiology of airway mucus clearance. *Resp Care*. 2002;47: 7, 761-8.

Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Diaz E, Koutrakis P, Suh H, Tsuda A, Godleski JJ. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1610-7.

Saldiva PHN. Efeitos da poluição atmosférica na morbidade e mortalidade em São Paulo. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(9):1195-9.

Samet JM, Graves LM, Quay J, Dailey LA, Devlin RB, Ghio AJ, Wu W, Bromberg PA, Reed W. Activation of MAPKs in human bronchial epithelium cells exposed to metals. *Am J Physiol*. 1998;275:L551-8.

Savarese A, Rosinha MU. Anatomia do sistema respiratório. In: Nakagawa NK, Bernabé V, editores. *Fisioterapia do sistema respiratório*. São Paulo: Savier; 2006. Cap. 1, p. 3-9.

Sayed D, Afaq F, Kweon M-H, Hadi N, Bhatia N, Spiegelman V, Mukhtar H. Green tea polyphenol EGCG suppresses cigarette smoke condensate-induced NF- κ B activation in normal human bronchial epithelial cells. *Oncogene*. 2007;26:673-82.

Schikowski T, Mills IC, Anderson HR, Cohen A, Hansell A, Kauffmann F, Krämer U, Marcon A, Perez L, Sunyer J, Probst-Hensch N, Künzli N. Ambient air pollution- a cause for COPD? *Eur Respir J*. 2014 Jan;43(1):250-63.

Sérgio Chiarelli P, Amador Pereira LA, Saldiva PHN, Ferreira Filho C, Bueno Garcia ML, Ferreira Braga AL, Conceição Martins L. The association between air pollution and blood pressure in traffic controllers in Santo André, São Paulo, Brazil. *Environ Res*. 2011;111(5):650-5.

Shen YH, Godlewski J, Zhu J, Sathyanarayana P, Leaner V, Birrer MJ, Rana A, Tzivion G. Cross-talk between JNK/SAPK and ERK/MAPK pathways: Sustained activation of JNK blocks ERK activation by mitogenic factors. *J Biol Chem*. 2003;278:26715-21.

Singh A; Agrawal M. Acid rain and its ecological consequences. *J Environ Biol*. 2007;29(1):15.

Squadrito GL, Cueto R, Dellinger B, Pryor WA: Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(9):1132-8.

Stegeman JJ, Brouwer M, Di Giulio RT, Förlin L, Fowler BA, Sanders BM, Van Veld PA. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Hugget RJ, Kimerle RA, Mehrle Jr PM, Bergman HL. (eds.) *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Boca Raton, Lewis Publishers. 1992;235-335.

Takenaka S, Karg E, Kreyling WG, Lentner B, Schulz H, Ziesenis A, Schramel P, Heyder J. Fate and toxic effects of inhaled ultrafine cadmium oxide particles in the rat lung. *Inhal Toxicol*. 2004;16:83-92.

Tanoue T, Yamamoto T, Maeda R, Nishida E. A novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 α and β -MAPKs. *J Biol Chem*. 2001;276:26629-39.

Tournier C, Hess P, Yang DDJ, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*. 2000;288:870-4.

Trepas X, Grabulosa M, Puig F, Maksym GN, Navajas D, Farré R. Viscoelasticity of human alveolar epithelial cells subjected to stretch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 287(5):L1025-34.

Tricker E, Arvand A, Kwan R, Chen GY, Gallagher E, Cheng G. Apoptosis induced by cytoskeletal disruption requires distinct domains of MEKK1. *PLoS One*. 2011;6(2):e17310.

Vasconcellos PC, Zacarias D, Pires MAF, Pool CS, Carvalho LRF. Measurements of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particles from the metropolitan area of São Paulo City, Brazil. *Atmosph Environ*. 2003;37:3009-18.

Vitale ML, Seward EP, Trifaro JM. Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron*. 1995;14:353-63.

Weibel ER. Morphometry: stereological theory and practical methods. In: Gil, editor. *Models of lung disease*, 1st ed. Dekker: New York; 1990. p. 199-252.

Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(2):142-9.

Wheeler T, von Braun J. Climate change impacts on global food security. *Science*. 2013;341(6145):508-13.

Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*. 2003;28:32-40.

Wortzel I, Seger R. The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles. *Genes Cancer*. 2011;3:195-209.

Wu W, Graves LM, Jaspers I, Devlin RB, Reed W, Samet JM. Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals. *Am J Physiol*. 1999;277(5):L924-31.

Wu Y, Yu T, Gilbertson TA, Zhou A, Xu H, Nguyen KT. Biophysical assessment of single cell cytotoxicity: diesel exhaust particle-treated human aortic endothelial cells. *PLoS One*. 2012;7(5):e6885.

Wu Y, Yu T, Gilbertson TA, Zhou A, Xu H, Nguyen KT. Biophysical assessment of single cell cytotoxicity: diesel exhaust particle-treated human aortic endothelial cells. *PLoS One*. 2012;7(5):e36885.

Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, Nel A: Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect.* 2004;112(14):1347-58.

Yorifuji T, Kashima S. Air pollution: another cause of lung cancer. *Lancet Oncol.* 2013;14:788-99.

Yoshizaki K, Brito JM, Toledo AC, Nakagawa NK, Piccin VS, Junqueira MS, Negri EM, Carvalho AL, Oliveira AP, Lima WT, Saldiva PH, Mauad T, Macchione M. Subchronic effects of nasally instilled diesel exhaust particulates on the nasal and airway epithelia in mice. *Inhal Toxicol.* 2010;22:610-7.

Zaidi NF. Intracellular calcium modulates the nuclear translocation of calsenilin. *J Neuroch.* 2004;89:593-601.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol Med.* 2002;33(3):337-49.

Zhang B, Wang Y, Su Y. Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy. *Cancer Lett.* 2009 28;286(2):154-60.