DANIELA PERRONI FRIAS

**Participação do Nrf2 no processo de autofagia de
células de brônquios humanos expostas ao
material particulado de diesel**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Dr^a Mariangela Macchione

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Frias, Daniela Perroni

Participação do Nrf2 no processo de autofagia de
células de brônquios humanos expostas ao material
particulado de diesel / Daniela Perroni Frias. --
São Paulo, 2018.

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

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Mariangela Macchione.

Descritores: 1.Estresse oxidativo 2.Poluição
ambiental 3.Particulado de diesel 4.Brônquios
5.Elementos de resposta antioxidante 6.Fator 2
relacionado a NF-E2 7.Autofagia

USP/FM/DBD-410/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: FRIAS, Daniela Perroni.

Título: Participação do Nrf2 no processo de autofagia de células de brônquios humanos expostas ao material particulado de diesel.

Dissertação de Mestrado apresentada
a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Agradecimentos

À minha família, minha mãe Marlene, meu pai Claudio e meu irmão Felipe, pelo amor incondicional, paciência e apoio durante a minha jornada.

À Dra. Macchione, professora e amiga, pela confiança em mim e no meu trabalho, mesmo quando eu duvidei.

À Dra. Regiane Carvalho-Oliveira pelo auxílio na técnica do EDX e pela ajuda nas análises estatísticas.

À Dra. Monique Matsuda pela colaboração nos experimentos de RT-PCR, discussões de práticas e por ceder o espaço do laboratório.

À Dra. Mara Junqueira pela colaboração nos testes de Western Blotting e por ter me ensinado a técnica em todas as etapas.

À Dra. Walcy pela colaboração na confecção das lâminas de imunofluorescência e na análise das fotos.

Aos colegas do laboratório Kelly, Raquel, Juliana, Juliane e Pedro pelas discussões, dicas e companhia durante os experimentos.

Ao Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental e à Faculdade de Medicina da USP pela oportunidade de trabalhar aqui desde a minha iniciação científica.

À Capes e à FAPESP pelo financiamento do estudo.

RESUMO

Frias DP. *Participação do Nrf2 no processo de autofagia de células de brônquios humanos expostas ao material particulado de diesel* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

As partículas eliminadas na exaustão do diesel (DEP) são importantes fontes diárias de partículas inaladas, responsáveis por gerar espécies reativas de oxigênio no sistema respiratório, fazendo com que as células ativem mecanismos de defesa, como o sistema Keap1-Nrf2 e a autofagia. Para investigar o papel do Nrf2 no processo de autofagia induzida pelas DEPs, BEAS-2B foram expostas às DEP, coletadas diretamente de um motor a diesel. BEAS-2B foram tratadas com sulforafano, bafilomicina e EBSS para testar a relação entre as vias autofágica e antioxidante. A quantidade relativa de mRNA foi verificada por RT-PCR para os seguintes genes: Nrf2, NQO1, HO-1, p62, Atg5 e LC3B. A seguir, BEAS-2B foram transfectadas com RNA silenciador (siRNA) para Nrf2, expostas ou não às DEPs (10 e 50 µg/mL por 1h e 2 h), e mRNA detectado por RT-PCR e Western blot para proteínas. Bafilomicina (inibidor de autofagia) mostrou uma diminuição significativa nos marcadores antioxidantes Nrf2 ($p = 0,024$), HO-1 ($p = 0,002$) e NQO1 ($p = 0,003$), enquanto sulforafano (ativador de Nrf2) aumentou os marcadores autofágicos LC3B ($p = 0,004$) e Atg5 ($p = 0,007$). BEAS-2B expostas às DEP na concentração de 50 µg/mL por 2hs mostraram um aumento significativo nos genes autofágicos LC3B ($p = 0,018$) e p62 ($p = 0,007$) e nos genes da via antioxidante Nrf2 ($p = 0,007$) e NQO1 ($p = 0,025$). Houve uma diminuição significativa no mRNA de LC3B ($p < 0,001$), p62 ($p = 0,001$) e Atg5 ($p = 0,024$) nas células transfectadas com siRNA, expostas ou não à DEP. Western blotting mostrou uma redução das proteínas Nrf2, p62 e LC3II nas BEAS-2B siRNA, indicando que a exposição ao silenciamento de Nrf2 modificou a expressão de marcadores de autofagia ($R < 1$). Os resultados deste estudo mostram que, em células brônquicas expostas às DEP, o sistema Nrf2 e a autofagia trabalham em conjunto para tentar manter a homeostase celular.

Descritores: estresse oxidativo; poluição ambiental; particulado de diesel; brônquios; elementos de resposta antioxidante; fator 2 relacionado a NF-E2; autofagia.

ABSTRACT

Frias DP. *Participation of Nrf2 in the autophagy process of human bronchial cells exposed to diesel particulate matter* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Diesel Exhaust Particles (DEPs) are main sources of daily inhaled particles, responsible for generating reactive oxygen species in the respiratory system, and causing the cells to activate defense mechanisms, such as the Keap1-Nrf2 system and autophagy. In order to investigate the role of Nrf2 in DEP-induced autophagy, BEAS-2B cells collected directly from a diesel engine were exposed to DEP and treated with sulforaphane, bafilomycin and BESS to test the relationship between autophagic and antioxidant pathways. The relative amount of mRNA was verified by RT-PCR for the following genes: Nrf2, NQO1, HO-1, p62, Atg5 and LCB3. Next, BEAS-2B cells were transfected with silencer RNA (siRNA) specific to Nrf2, exposed or not to DEPs (10 and 50µg/mL 1h and 2hs), and mRNA detected by RT-PCR and Western blotting for protein. Bafilomycin (autophagy inhibitor) showed a significant decrease in the antioxidant markers Nrf2 ($p=0.024$), HO-1 ($p=0.002$) and NQO1 ($p=0.003$), whereas sulforaphane (Nrf2 activator) increased the expression levels of autophagic markers LC3B ($p=0.004$) and Atg5 ($p=0.007$). BEAS-2B exposed to DEP at a concentration of 50µg/mL for 2hs showed a significant increase in autophagic genes LC3B ($p=0.018$) and p62 ($p=0.007$), and in the antioxidant pathway markers Nrf2 ($p=0.007$) and NQO1 ($p=0.025$). There was a significant decrease in mRNA of the LC3B ($p<0.001$), p62 ($p=0.001$) and Atg5 ($p=0.024$) in cells transfected with siRNA, exposed or not to DEP. Western blotting showed a reduction of Nrf2, p62 and LC3II proteins in BEAS-2B transfected with siRNA, indicating that Nrf2 silenced exposed to DEP modulated the expression of autophagy markers ($R<1$). The results of this study show that, in bronchial cells exposed to DEP, the Nrf2 system and autophagy work together in order to try to maintain cellular homeostasis.

Descriptors: oxidative stress; environmental pollution. particulate of diesel; bronchi; antioxidant response elements; NF-E2-related factor 2; autophagy.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Poluição atmosférica	17
2.1.1 Material particulado da exaustão de diesel.....	20
2.2 Sistema respiratório.....	23
2.2.1 Mecanismos de defesa do sistema respiratório	27
2.3 Estresse oxidativo e defesas	30
2.3.1 Sistema Keap1-Nrf2.....	31
2.3.2 Autofagia.....	36
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Cultura de células BEAS-2B.....	42
4.2 Coleta do DEP.....	42
4.3 Caracterização do DEP	43
4.3.1 Compostos elementares.....	43
4.3.2 Compostos orgânicos.....	43
4.4 Testes de citotoxicidade.....	44
4.4.1 Ensaio MTT	44
4.4.2 Ensaio Trypan Blue	45
4.4.3 Análise estatística	45
4.5 Exposição de células BEAS-2B ao DEP	46
4.5.1 Grupos de estudo.....	46
4.5.2 Transfecção de BEAS-2B	48
4.6 Expressão gênica.....	49
4.6.1 Método geral para o estudo da expressão gênica	49

4.6.2 Primers.....	50
4.6.3 Análise estatística	51
4.7 Western Blotting.....	51
4.7.1 Extração de proteínas totais	51
4.7.2 Eletroforese em gel	52
4.7.3 Densitometria	52
4.8 Imunofluorescência	53
5 RESULTADOS.....	54
5.1 Compostos elementares- EDX	54
5.2 Compostos orgânicos.....	54
5.3 MTT	56
5.4 Trypan Blue.....	57
5.5 Estudo da interferência da expressão de marcadores autofágicos e do sistema Keap1-Nrf2 nos controles	58
5.6 Estudo da indução das vias autofágica e antioxidante após a exposição ao DEP	61
5.7 Estudo da influência do Nrf2 na autofagia de BEAS-2B tratadas com DEP	62
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICE A	91
APÊNDICE B	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Contribuição Relativa de cada categoria na emissão de poluentes do estado de São Paulo em 2016.	21
Figura 2- Material Particulado de Diesel	22
Figura 3 - Árvore traqueobrônquica.....	25
Figura 4 - Distribuição de MP nas vias aéreas.....	28
Figura 5 - Domínios e sítios de ligação do Nrf2 e seu inibidor Keap1.....	33
Figura 6 - Estrutura do complexo Keap1-Nrf2 em condições basais.....	34
Figura 7 - Ativação do complexo Keap1-Nrf2.....	35
Figura 8 - Processo de maturação do autofagossomo.....	38
Figura 9 - Provável via pela qual p62 ativa Nrf2.....	39
Figura 10 - Resultados de MTT	56
Figura 11 - Resultado Trypan Blue em Porcentagem de Células Mortas.....	57
Figura 12 - Expressão gênica da via autofágica em EBSS, Bafilomicina e Sulforafano.....	58
Figura 13 - Expressão dos marcadores da via Keap1-Nrf2 após exposição a EBSS, Bafilomicina e Sulforafano	60
Figura 14 - Expressão de Nrf2 e NQO1 após exposição ao DEP	61
Figura 15 - Expressão de LC3B e p62 após exposição ao DEP	62
Figura 16 - Expressão de Nrf2 e HO-1 após exposição a DEP e siRNA.....	63
Figura 17 - Expressão de LC3B e p62 após exposição a DEP e siRNA.....	64
Figura 18 - Expressão de Atg5 após exposição a DEP e siRNA.....	65
Figura 19 - Resultado Western Blotting.....	66
Figura 20 - Expressão de proteínas a partir do Western Blotting.....	66
Figura 21 - Imunofluorescência para Controle Negativo e DEP.....	68
Figura 22 - Imunofluorescência para siRNA e siDEP.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Principais Poluentes Atmosféricos e suas Fontes	18/19
Tabela 2– Paineis gerais dos grupos de estudo	47/48
Tabela 3– Sequências de <i>primers</i> para os genes de interesse.....	50
Tabela 4– Compostos elementares do DEP	54
Tabela 5– Resultado fração orgânica do DEP por cromatografia gasosa.....	55
Tabela 6– Análise da fração carbonosa- técnica termo-óptica.....	55
Tabela 7– Valores significativos de p para expressão de Nrf2.....	91
Tabela 8– Valores significativos de p para expressão de HO-1	91
Tabela 9– Valores significativos de p para expressão de LC3B	92
Tabela 10– Valores significativos de p para expressão de p62.....	92
Tabela 11– Valores significativos de p para expressão de Atg5	92
Tabela 12– Valores de R.....	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

$\cdot\text{OH}$: radicais hidroxila

ARE: *Antioxidant Response Element*

Atg: genes relacionados à autofagia

BC: *black carbon*

BEAS-2B células epiteliais de brônquios linhagem 2B

bZIP: Zíper de Leucina básico

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CE: Carbono elementar

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CO: monóxido de carbono

CO₂: dióxido de carbono

CTN: BEAS-2B transfectadas com Controle Negativo

Cul3: *Cullin3*

DEP: Particulado da Exaustão do Diesel

DEP10 1h: BEAS-2B controle negativo expostas ao DEP 10µg/mL por 1 hora

DEP10 2h: BEAS-2B controle negativo expostas ao DEP 10µg/mL por 2 horas

DEP50 1h: BEAS-2B controle negativo expostas ao DEP 50µg/mL por 1 hora

DEP50 2h: BEAS-2B controle negativo expostas ao DEP 50µg/mL por 2 horas

DMSO: dimetil-sulfóxido

DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica

E3: ubiquitina ligase

EBSS: *Earle's Balanced Salt Solution*

EDX: espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva

ERE: estresse do retículo endoplasmático

ERN: espécies reativas de nitrogênio

ERO: espécies reativas de oxigênio

GCLC: subunidade catalítica cisteína-glutamato ligase

GPx: glutational peroxidase

GST: glutational S-transferase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HO-1: heme oxigenase-1

HPA: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Keap1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*

KIR *Kelch*

LC3B: *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*

LR: região ligadora

MP: Material Particulado

MP₁: Material Particulado 1 µm

MP₁₀: Material Particulado 10 µm

MP_{2,5}: Material Particulado 2,5 µm

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NO_x: óxidos de nitrogênio

NQO1: NAD [P] H: quinona oxidoreductase-1

Nrf2: *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor*

O₂^{•-}: ânion superóxido

OC: Carbono orgânico (*Organic carbon*)

OCa: Carbono orgânico fração a

OCb: Carbono orgânico fração b

PBS: tampão fosfato-salino

PC: Carbono pirolisado

PTS: Partículas Totais em Suspensão

PU: particulado urbano

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

SFB: Soro Fetal Bovino

siDEP10 1h: BEAS-2B transfectadas com siRNA expostas ao DEP 10µg/mL por 1 hora

siDEP10 2h BEAS-2B transfectadas com siRNA expostas ao DEP 10µg/mL por 2 horas

siDEP50 1h: BEAS-2B transfectadas com siRNA expostas ao DEP 50µg/mL por 1 hora

siDEP50 2h BEAS-2B siRNA expostas ao DEP 50µg/mL por 2 horas

siRNA: BEAS-2B transfectadas com RNA de interferência (siRNA) para diminuir a expressão de Nrf2

SOD: superóxido dismutase

SOD1: superóxido dismutase 1

SOD2: superóxido dismutase 2

UFP: Partículas Ultrafinas

USP: Universidade de São Paulo

1 INTRODUÇÃO

A exposição à poluição atmosférica atualmente é considerada um dos principais fatores que causam adversidades na saúde de indivíduos, principalmente devido às gotículas e partículas provenientes de substâncias tóxicas, que permanecem em suspensão no ar. As partículas da poluição atmosférica, ou Material Particulado (MP), podem diferir em propriedades, tamanho e composição, dependendo da sua fonte (Macchione, 1998). Fontes naturais e antropogênicas, tais como poeira do solo ressuspensa, sal marinho, cinzas vulcânicas, grãos de pólen, construções civis, atividades industrial e agrícola, tráfego rodoviário, entre outros, contribuem para o total de emissões de MP em massa global (Andreaeu; Leroux; Bouharrou; 2012).

Os oxidantes e pró-oxidantes contidos nos poluentes ambientais podem provocar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) quando em contato com o trato respiratório. A exposição crônica à poluição do ar tem sido associada à inflamação (Lima et al., 2013; Rodríguez-Cotto et al., 2014; de Brito et al., 2018) e disfunção no transporte mucociliar (Macchione et al., 1998; Carvalho- Oliveira et al., 2005; Trindade, 2010) do trato respiratório superior; aumento dos riscos de síndrome do desconforto respiratório e taquipneia transitória em recém nascidos (Seeni et al., 2018); agravamento dos sintomas da asma e de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC); e aumento da incidência de câncer de pulmão e mortalidade por problemas cardiopulmonares (Arbex et al., 2012).

Um dos componentes mais nocivos do MP urbano é o Particulado da Exaustão do Diesel (DEP), proveniente da queima de combustíveis fósseis. O DEP consiste de um núcleo formado por substâncias a base de carbono e grande área de superfície, na qual outros produtos químicos presentes no ambiente são adsorvidos, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), nitro derivados de HPAs, oxigenados derivados de HPA (cetonas, quinonas e dionas), compostos heterocíclicos, aldeídos e hidrocarbonetos alifáticos. HPAs e seus derivados são especialmente importantes porque são

capazes de gerar ERO e ERN, estabelecendo uma condição de estresse oxidativo nos tecidos (Takizawa, 2011).

Para impedir a total destruição das células, os organismos vivos possuem um complexo grupo de substâncias antioxidantes capazes de responder aos danos oxidativos provocados pelas ERO (Macchione, 1998; Salvador; Henriques, 2004). Um componente importante para o controle da homeostase redox intracelular são os promotores conhecidos como ARE (*Antioxidante Response Element*), encontrado nas regiões promotoras de muitos genes que codificam enzimas antioxidantes (Jain; Bloom; Jaiswall, 2005). O fator de transcrição Nrf2 (*Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor*) induz a transcrição dos genes ARE como parte de uma resposta protetora contra danos oxidativos a organelas e macromoléculas (Itoh et al., 1997).

Além da resposta antioxidante, estudos implicam que a formação de grande quantidade de ERO pode promover a ativação de autofagia nos tecidos (Ryter; Choi, 2010; Hale et al., 2013). Autofagia é um processo homeostático, que ocorre na maioria das células de mamíferos e que tem a função de reduzir o volume do citoplasma, nesse caso, digerindo algumas organelas e proteínas obsoletas, por meio de um processo de degradação dependente de lisossomo, para que sejam substituídas por outras organelas e proteínas novas. Sendo assim, a autofagia geralmente funciona como um mecanismo de sobrevivência celular. (Hale et al., 2013; Johansen; Lamark, 2011).

Entretanto, este mecanismo pode sofrer desregulação em casos agudos ou crônicos de toxicidade/doença, sendo a ativação excessiva da autofagia apontada como uma das causas de ativação de morte celular não-apoptótica (Ryter; Choi, 2010). No trato respiratório, o comprometimento da autofagia, somado à indução de estresse do retículo endoplasmático, pode contribuir para o desenvolvimento de fibrose pulmonar *in vivo* (Maciel et al., 2018). Pacientes com fibrose pulmonar idiopática possuem baixa atividade autofágica, mesmo em condições de estresse oxidativo e disfunção da mitocôndria (Patel et al., 2012).

Há evidências de que alguns genes da autofagia, como Atg5, Atg4D e SQSTM1/p62, possuem regiões promotoras ARE, sendo possível que sua regulação ocorra através da atividade do Nrf2 (Pajares et al., 2016). A proteína

SQSTM1 ou p62 (daqui em diante referida como p62) atua no processo autofágico através de sua associação tanto com proteínas ubiquitinadas, quanto com LC3B, a proteína de membrana do autofagossomo. Curiosamente, a fosforilação da proteína p62 aumenta significativamente a afinidade de ligação desta com Keap1, importante inibidor da atividade de Nrf2 (Ichimura et al., 2013). A p62 interage com o mesmo local de ligação de Nrf2- Keap1 e competitivamente inibe a interação Keap1- Nrf2. A acumulação de p62 dentro das células faz com que esta proteína passe a interagir com a Keap1 com maior frequência, resultando na inibição da Keap1 e, conseqüentemente, ativação de Nrf2 (Komatsu et al., 2010; Lau et al., 2010).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Poluição atmosférica

A poluição atmosférica pode ser definida como alta concentração de componentes da atmosfera (material particulado, gases ou material biológico) que danificam o meio ambiente ou causam efeitos adversos à saúde para os seres humanos ou outros organismos vivos. Esses componentes incluem as substâncias naturais e as substâncias não encontradas naturalmente no ar, comumente geradas pelas atividades antropogênicas (Kunzli et al., 2010).

A poluição natural consiste em vapores orgânicos naturais; partículas de sal resultantes da maresia; pólen transmitido pelo vento, esporos de fungos, algas, leveduras, ferrugem, bactérias; gases e detritos da vida vegetal e animal viva e em decomposição; partículas ressuspensas pelo vento das praias, do deserto, do solo e das rochas; partículas e gases provenientes de erupção vulcânica e incêndios florestais; e partículas entrando na troposfera através do espaço (Vallero et al., 2008).

Os poluentes atmosféricos gerados pelas atividades antropogênicas são classificados de acordo com a emissão: os poluentes primários, que são lançados diretamente para a atmosfera; e os poluentes secundários, que se formam na atmosfera por reações químicas entre os poluentes primários e substâncias já presentes no ar (CETESB, 2018).

Como exemplos de fontes de poluição antropogênica pode-se citar principalmente construção civil, atividade industrial (resinas, plásticos, tintas, ácidos, detergentes, fertilizantes, metais, polpa e papel, etc.), queima incompleta de combustíveis fósseis (veículos automotivos, tráfego aéreo e rodoviário, termelétricas, entre outros) e queima de biomassa (Vallero et al., 2008).

A CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) organiza os principais poluentes atmosféricos de acordo com as suas propriedades químicas, como mostra a tabela a seguir (Tabela1):

Tabela 1– Principais Poluentes Atmosféricos e suas Fontes

Poluente	Características	Fontes Principais	Efeitos Gerais ao Meio Ambiente
Partículas Inaláveis Finas (PM_{2,5})	Partículas de material sólido ou líquido, suspensas no ar, na forma de poeira, neblina, aerossol, fumaça, fuligem, etc., que podem permanecer no ar e percorrer longas distâncias. Faixa de tamanho $\leq 2,5 \mu\text{m}$.	Processos de combustão (industrial, veículos automotores), aerossol secundário (formado na atmosfera) como sulfato e nitrato, entre outros.	Danos à vegetação, deterioração da visibilidade e contaminação do solo e da água.
Partículas Inaláveis (PM₁₀) e Fumaça	Partículas de material sólido ou líquido que ficam suspensas no ar, na forma de poeira, neblina, aerossol, fumaça, fuligem, etc. Faixa de tamanho $\leq 10 \mu\text{m}$.	Processos de combustão (indústria e veículos automotores), poeira ressuspensa, aerossol secundário (formado na atmosfera).	Danos à vegetação, deterioração da visibilidade e contaminação do solo e da água.
Partículas Totais em Suspensão (PTS)	Partículas de material sólido ou líquido que ficam suspensas no ar, na forma de poeira, neblina, aerossol, fumaça, fuligem, etc. Faixa de tamanho $\leq 50 \mu\text{m}$.	Processos industriais, veículos motorizados (exaustão), poeira de rua ressuspensa, queima de biomassa. Fontes naturais: pólen, aerossol marinho e solo.	Danos à vegetação, deterioração da visibilidade e contaminação do solo e da água.
Dióxido de Enxofre (SO₂)	Gás incolor, com forte odor, semelhante ao gás produzido na queima de palitos de fósforos. Pode ser transformado a SO ₃ , que na presença de vapor de água, passa rapidamente a H ₂ SO ₄ . É um importante precursor dos sulfatos, um dos principais componentes das partículas inaláveis.	Processos que utilizam queima de óleo combustível, refinaria de petróleo, veículos a diesel, produção de polpa e papel, fertilizantes.	Pode levar à formação de chuva ácida, causar corrosão aos materiais e danos à vegetação: folhas e colheitas.

Continua

Continuação

Poluente	Características	Fontes Principais	Efeitos Gerais ao Meio Ambiente
Dióxido de Nitrogênio (NO₂)	Gás marrom avermelhado, com odor forte e muito irritante. Pode levar à formação de ácido nítrico, nitratos (o qual contribui para o aumento das partículas inaláveis na atmosfera) e compostos orgânicos tóxicos.	Processos de combustão envolvendo veículos automotores, processos industriais, usinas térmicas que utilizam óleo ou gás, incinerações.	Pode levar à formação de chuva ácida, danos à vegetação e à colheita.
Monóxido de Carbono (CO)	Gás incolor, inodoro e insípido.	Combustão incompleta em veículos automotores.	Contribui para a formação da névoa fotoquímica.
Ozônio (O₃)	Gás incolor, inodoro nas concentrações ambientais e o principal componente da névoa fotoquímica (<i>smog</i>).	Não é emitido diretamente para a atmosfera. É produzido fotoquimicamente pela radiação solar sobre os óxidos de nitrogênio e compostos orgânicos voláteis.	Danos às colheitas, à vegetação natural, plantações agrícolas; plantas ornamentais.

Adaptado de: CETESB, 2018.

Além destes, também encontram-se metais pesados, como chumbo, cádmio, arsênio e níquel; compostos halogenados (fluoretos e cloretos); compostos orgânicos, como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos; compostos orgânicos voláteis, gases e vapores resultantes da queima incompleta e evaporação de combustíveis, como os compostos aromáticos monocíclicos, em particular os benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos; e outros oxidantes fotoquímicos além do ozônio, como formaldeído, acroleína e peroxiacetilnitrato (CETESB, 2018).

As emissões de motores a diesel, especialmente as partículas da sua exaustão (*Diesel Exhaust Particles* - DEP), desempenham um papel importante

nas discussões sobre o risco para a saúde provocado por poluentes do ar ambiente ou no local de trabalho (Wichmann, 2007).

2.1.1 Material particulado da exaustão de diesel

O óleo diesel é um combustível derivado do petróleo, predominantemente constituído por hidrocarbonetos alifáticos, com cadeias contendo de 9 a 28 átomos de carbono. O diesel ainda contém hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus derivados alquílicos, além de enxofre, cujo teor varia de 0,1 a 0,5%. A composição do diesel tem mudado constantemente desde sua introdução no mercado como combustível, devido a diferentes origens do petróleo utilizado como matéria-prima e diferentes processos de refino (Braun; Appel; Schmal, 2004).

Os motores movidos a óleo diesel são usados em veículos que precisam de elevada potência, como ônibus, grandes caminhões, tratores e máquinas para atividades agrícolas e de mineração. Comparados aos motores à gasolina, os motores a diesel possuem menor produção de CO₂, menor quantidade de NO_x, CO e hidrocarbonetos. Em contrapartida, os motores a diesel emitem elevados níveis de material particulado. Nesses motores, o material particulado forma-se em altas temperaturas, em regiões da câmara de combustão ricas em combustível, a partir de gotículas individuais, envolvendo uma sequência de etapas, que são basicamente pirólise, nucleação, crescimento e coagulação, agregação e oxidação (Braun; Appel; Schmal, 2004).

Segundo a CETESB, a emissão veicular é a principal fonte de poluição atmosférica na região metropolitana, sendo que a estimativa da frota veicular do estado, no ano de 2016, era de 11.522.527, desses 677.209 são movidos a diesel. Apesar da frota de veículos que usam diesel ser apenas 5,87%, esses veículos possuem o maior fator de emissão de MP em relação aos demais (Figura 1):

Figura 1 – Contribuição Relativa de cada categoria na emissão de poluentes do estado de São Paulo em 2016.

Fonte: CETESB, 2016

Em estudo recente, Brito et al. (2018) utilizaram etanol como fator traço para identificar as fontes primárias e secundárias de alguns poluentes coletados na região metropolitana de São Paulo. De acordo com os resultados, os veículos pesados movidos a diesel, apesar de representarem aproximadamente 6% da frota, contribuem com metade das substâncias tóxicas presentes no ar.

Os motores a diesel expulsam cerca de 100 vezes mais partículas do que os motores a gasolina. O DEP é composto por uma mistura bastante heterogênea, mas a maioria possui um núcleo central de carbono elementar e compostos adsorvidos na superfície (Figura 2), que variam entre hidrocarbonetos, pequenas quantidades de sulfato, nitrato, metais, monóxido de carbono, aldeídos e vários hidrocarbonetos de baixo peso molecular, tais como benzeno, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), oxi-HPAs e nitro-HPAs (Wichmann, 2007; Madl et al. 2013). A composição básica média do material particulado é 70% em massa de carbono, 20% de oxigênio, 3% de

enxofre, 1,5% de hidrogênio, menos que 1% de nitrogênio e, aproximadamente, 1% de elementos traços (Braun; Appel; Schmal, 2004).

Figura 2 – Material Particulado de Diesel

Figura 2: Imagem esquemática mostrando os núcleos sólidos de carbono, sobre os quais estão adsorvidas outras substâncias, como hidrocarbonetos e sulfato. Adaptado de: Madl et. al, 2013.

Como descrito na tabela 1, o MP é uma mistura complexa de partículas sólidas, orgânicas e inorgânicas, e líquidas, gotículas provenientes de muitas fontes e materiais diferentes. A fração de partículas grosseiras (Partículas Inaláveis) tem um diâmetro aerodinâmico entre 10 e 2,5 μm (MP_{10}). As partículas finas ($\text{MP}_{2,5}$), compõem as partículas com diâmetro inferior a 2,5 μm . Entretanto, há um terceiro tipo de partícula não citado na tabela 1, com tamanho inferior às Partículas Inaláveis Finas, denominado Partículas Ultrafinas (UFP ou $\text{MP}_{0,1}$), que são partículas com um diâmetro aerodinâmico inferior a 0,1 μm (Cançado et al., 2006).

De acordo com a sua origem, as UFP foram classificadas como 1) naturais, como cinza vulcânica, compostos minerais, aerossol do oceano e resíduos vegetais; 2) nanopartículas adaptadas pela indústria, com funções

personalizadas, como nanotubos de carbono, nanofios, nano-revestimentos, entre outros; e 3) UFP antrópicas, originadas como subproduto de uma ação humana, como fumo do tabaco e as partículas de fuligem do escapamento de automóveis, principalmente aqueles com motores movidos a diesel (Madl et al. 2013).

Durante o processo de exaustão, vários agregados de DEP são formados e se aglomeram formando partículas secundárias, com diâmetros aerodinâmicos entre 100 e 1000 nm. Cerca de 90% do material particulado produzido por uma máquina diesel qualquer apresenta diâmetro médio menor que 300 nm (Braun; Appel; Schmal, 2004).

Independente da origem da partícula, estudos recentes procuram entender os efeitos e riscos potenciais de partículas com tamanho menor que 1 μm , como é o caso do DEP e das UFP. Devido ao seu pequeno tamanho, estas partículas possuem um potencial biológico diferente em comparação às partículas de maiores dimensões, pois seu tamanho diminuto permite que essas partículas passem pelas barreiras celulares (Madl et al. 2013; Wichmann, 2007). Sendo assim, as UFP podem ser diretamente inaladas pelos seres humanos, penetrando profundamente no sistema respiratório, se depositando na árvore traqueobrônquica, ou até mesmo chegando às regiões alveolares (Andreau; Leroux; Bouharrou, 2012).

2.2 Sistema respiratório

O sistema respiratório é responsável por garantir as trocas gasosas entre o meio ambiente e o sangue, ou seja, a captação de O_2 pelo organismo e a eliminação de CO_2 para a atmosfera (Nakagawa, Barnabé, 2006). Além disso, o sistema respiratório também ajuda a regular o pH sanguíneo; possui receptores sensoriais para o sentido do olfato; umedece e aquece o ar inspirado; produz sons; e possui mecanismos que defendem o organismo de agentes externos (Tortora; Derrickson, 2006).

O sistema respiratório pode ser dividido em duas partes, levando-se em consideração sua posição: o sistema respiratório superior, que inclui nariz e faringe; e o sistema respiratório inferior, que inclui laringe, traqueia, brônquios e

pulmões. (Tortora; Derrickson, 2006). Além dessa divisão, o sistema respiratório também pode ser dividido em duas partes de acordo com a sua função: a porção condutora, que consiste em uma série de cavidades e tubos interconectados (nariz, faringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos), responsáveis por conduzir o ar até os pulmões; e a porção respiratória, que consiste nos tecidos intrapulmonares em que ocorrem as trocas de gases – bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sáculos alveolares e alvéolos pulmonares (Nakagawa; Barnabé, 2006; Tortora; Derrickson, 2006).

A traqueia é o principal segmento de ar das vias aéreas. Esse segmento consiste em tubo condutor de ar e se estende da faringe à parte superior da quinta vértebra torácica, para depois se dividir em brônquios principais direito e esquerdo, um para cada pulmão. Dentro dos pulmões, os brônquios se ramificam repetidamente em brônquios progressivamente menores (Nakagawa; Barnabé, 2006; Tortora; Derrickson, 2006, Silverthorn et al., 2010).

Os brônquios principais direito e esquerdo conservam os anéis de cartilagem estruturais e o revestimento de células mucosas e ciliares. Próximo à entrada dos pulmões começam as subdivisões, inicialmente de base estrutural idêntica, mas de calibre menor, denominados brônquios lobares. Os brônquios lobares, por sua vez, se subdividem em tubos menores, os brônquios segmentares. Esses se subdividem em bronquíolos ainda menores que, finalmente, se subdividem em bronquíolos terminais (Figura 3), os quais, ao apresentarem alvéolos, passam a se chamar bronquíolos respiratórios, marcando uma transição entre as vias aéreas e o epitélio de troca do pulmão (Nakagawa; Barnabé, 2006; Tortora; Derrickson, 2006; Silverthorn et al., 2010).

Na traqueia e nos brônquios ocorre a filtração do ar, pois estas vias aéreas são revestidas por epitélio pseudoestratificado colunar ciliado, que secreta muco e uma solução salina diluída. Os cílios são banhados em uma camada salina aquosa e no topo deles há uma camada de muco mais viscoso, que aprisiona a maioria das partículas inaladas maiores que 2 μm (Macchione, 1998; Silverthorn et al., 2010). Os cílios se movem em direção à faringe, levando essas e outras impurezas e o excesso de muco (Junqueira; Carneiro, 2004; Nakagawa; Barnabé, 2006; Tortora; Derrickson, 2006). A camada de

muco é secretada por células caliciformes do epitélio. Como os bronquíolos terminais são estruturas de transição entre a porção condutora e a porção respiratória do sistema respiratório, à medida que as subdivisões avançam as células ciliares vão diminuindo até desaparecerem no bronquíolo terminal, mas as produtoras de muco não desaparecem (Nakagawa; Barnabé, 2006).

Figura 3 – Árvore traqueobrônquica.

Adaptado de: Silverthorn et al., 2010.

As concentrações de poluentes atmosféricos encontradas em grandes cidades acarretam complicações agudas e crônicas no trato respiratório. O sistema respiratório é o primeiro contato do organismo com as substâncias do ar e é seriamente afetado pela poluição. Os cílios do nariz e das superfícies

internas que levam até os pulmões podem coletar as partículas maiores dos poluentes; entretanto, as partículas menores e os gases são capazes de alcançar os pulmões (Macchione, 1998).

Freitas et al. (2013) relacionaram a concentração de MP_{10} em 21 municípios brasileiros (incluindo São Paulo- capital) com as taxas de internações hospitalares por doenças respiratórias totais (DRT); doenças respiratórias em menores de 5 anos (DRC) e doenças cardiovasculares em adultos maiores de 39 anos (DCV). Os autores encontraram relação significativa em 81% das localidades para DRT, 89% para DRC e 50% para DCV.

A deposição de partículas inaladas é determinada por fatores biológicos, tais como a anatomia e fisiologia do aparelho respiratório, bem como por fatores físicos, como a dinâmica de fluidos, propriedades das partículas, sedimentação gravitacional, difusão e interação química das substâncias adsorvidas ao material inalado (Madl et. al, 2013). Consequentemente, diferentes regiões do trato respiratório estão expostas a diferentes tamanhos de partículas.

Mesmo que grande parte das partículas seja filtrada do ar inalado e eliminada através do transporte mucociliar, ainda pode ocorrer a permanência de partículas na região brônquica e alveolar (Steiner et al., 2016). Geralmente, o DEP se deposita nas vias aéreas superiores e na região alveolar através de mecanismos eletrostáticos e de mecanismos brownianos de difusão (Madl et. al, 2013). Uma vez no interior das células, essas partículas podem interagir com estruturas intracelulares que conduzem ao estresse oxidativo (Wichmann, 2007, Madl et al. 2013; Seriani, 2014).

O DEP pode provocar reações alérgicas e inflamação mesmo em pessoas sem distúrbios respiratórios ou doenças respiratórias crônicas (Stenfors et al., 2004). Devido à variação de seu tamanho e à complexidade de sua composição, diferentes frações do DEP podem causar efeitos diversos no trato respiratório. A inalação de fumaça de diesel afeta diretamente o trato respiratório através da indução (pró) sinalização inflamatória e de estresse oxidativo local (Seriani et al., 2015; Steiner et al., 2016).

Recentemente Seriani et al. (2016) demonstraram que a exposição de células de brônquios humanos em cultura (linhagem BEAS-2B) a 15µg/mL de DEP por 1 hora e 2 horas provocou citotoxicidade, ocorrendo diminuição na expressão de genes antioxidantes e anti-apoptóticos, e um aumento em genes pró-apoptóticos e genes envolvidos na metabolização de hidrocarbonetos. Houve uma diminuição significativa dos genes envolvidos nas defesas antioxidantes, tanto mitocondrial (SOD2), quanto citoplasmática (SOD1 e GPx) e aumento da proteína do citocromo P450, que é codificada pelo o gene CYP1A1, descrito como uma fonte de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO).

2.2.1 Mecanismos de defesa do sistema respiratório

As vias aéreas representam a maior área de superfície epitelial interna do corpo humano em contato direto com o ambiente externo. Tais condições exigem que os mecanismos de defesa do sistema respiratório estejam sempre ativos nessa região. Assim, apesar de estarem sempre em contato com partículas exógenas, e muitas vezes nocivas, os pulmões permanecem limpos e estéreis, devido aos mecanismos de defesa do sistema respiratório (Nakagawa; Barnabé, 2006; Lopes; Noronha; Mafort, 2010).

Os mecanismos de defesa do sistema respiratório envolvem uma série de fatores que atuam na remoção e/ou destruição de partículas inaladas e micro-organismos. A barreira física é o primeiro mecanismo de defesa e atua em conjunto com o sistema imunológico, com o objetivo de proteger os pulmões contra as infecções. A própria estrutura das vias aéreas, que se subdividem progressivamente em outras estruturas menores, constitui um sistema inicial de defesa ao reter o material particulado inalado, removendo-o através do transporte mucociliar (Macchione, 1998). No caso do transporte mucociliar, o material nocivo inalado que está aderido ao muco das vias aéreas é impulsionado à região da orofaringe pelo batimento contínuo de cílios de células ciliadas (Macchione, 1998; Lopes; Noronha; Mafort, 2010; Nakagawa; Barnabé, 2006). Além disso, o muco também contém imunoglobulinas, que podem inativar muitos patógenos, e uma vez que o muco alcança a faringe, ele

pode ser expelido pelo mecanismo da tosse (expectorado) ou deglutido e digerido no estômago (Silverthorn et al., 2010).

A filtração aerodinâmica envolve a deposição de partículas na camada mucosa das vias aéreas e está relacionada com as dimensões dos materiais particulados inalados (Figura 4). Partículas entre 5 μm e 10 μm de diâmetro podem ficar retidas em algum ponto entre a traqueia e brônquios de grosso calibre. As partículas de 5 μm a 0,5 μm que escaparam da filtração podem ser depositadas nos brônquios de menor calibre e nos bronquíolos por sedimentação gravitacional nas paredes inferiores dessas estruturas, aderindo ao muco respiratório. As partículas menores que 0,5 μm podem chegar aos alvéolos e serem depositadas ali através da difusão Browniana, em que elas se deslocam em movimentos aleatórios, colidindo umas com as outras ou com o assoalho dos alvéolos. (Lopes; Noronha; Mafort, 2010).

Figura 4 – Distribuição de MP nas vias aéreas

Figura 4: Distribuição de MP nas vias aéreas. MP $\geq 10 \mu\text{m}$ de diâmetro entram no nariz e boca. A fração torácica, MP₁₀, passa pela laringe e penetra na região traqueal e brônquica do pulmão, distribuindo-se principalmente nas bifurcações pulmonares. A

fração respirável $MP_{2,5}$ e o UFP penetram nas regiões alveolares não ciliadas e depositam-se profundamente dentro dos pulmões. Adaptado de: Cormier et al., 2006.

Com relação às UFP, em cada região do trato respiratório uma quantidade significativa de um determinado tamanho de UFP pode ser depositada por difusão. Outros mecanismos de deposição de importância para partículas maiores, como o inercial e sedimentação gravitacional não contribuem para o depósito de UFPs. Por exemplo, 90% das partículas de 1nm inaladas são depositadas no compartimento da nasofaringe, apenas aproximadamente 10% na região traqueobrônquica, e essencialmente nenhuma na região alveolar. Por outro lado, as partículas de 5nm mostram deposição igual de cerca de 30% das partículas inaladas em todas as regiões; partículas de 20nm têm a mais elevada eficiência de deposição na região alveolar (cerca de 50%), ao passo que na árvore traqueobrônquica e na nasofaringe este tamanho de partícula deposita com uma eficiência de aproximadamente 15%. Essas diferentes eficiências de deposição podem ter consequências para os potenciais efeitos induzidos por UFP inaladas de tamanhos diferentes, bem como para a disposição em órgãos extrapulmonares (Oberdörster; Oberdörster; Oberdörster, 2005).

UFPs podem liberar oxi-radicaís e interagir com o sistema de defesa antioxidante (Oberdörster; Oberdörster; Oberdörster, 2005). Alguns componentes do DEP são eles próprios ERO ou ERN, como seus componentes orgânicos mais conhecidos, os HPAs e os derivados de quinonas (Shinyashiki et al., 2009; Li et al., 2003). Sagai et al. (1991) demonstraram que o DEP pode produzir ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radicais hidroxila ($\cdot OH$) *in vitro*, sem qualquer sistema biológico. A produção de $\cdot OH$ pode ser devido à reação de degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) catalisada pelo íon ferroso, porque o DEP pode conter pequenas quantidades de íon férrico, que pode ser reduzido a íons ferrosos pelo íon $O_2^{\cdot-}$. Além disso, no mesmo estudo, os autores testaram danos pulmonares associados com a geração de ERO pelo DEP em ratos. Segundo os resultados, a administração intratraqueal de DEP nos animais causou diminuição significativa da atividade de enzimas antioxidantes e mortalidade por edema pulmonar.

2.3 Estresse oxidativo e defesas

O estresse oxidativo enfrentado pelas células é derivado de uma situação em que a concentração de radicais livres e espécies reativas está tão alta, que acaba por exaurir as defesas antioxidantes das células (Macchione, 1998; Bianchi; Antunes, 1999; Salvador; Henriques, 2004; Vasconcelos et al., 2007). Com a depleção das defesas antioxidantes, as células não conseguem evitar os diversos danos causados pelos radicais livres.

Segundo Salvador e Henriques (2004) ERO é um termo coletivo que se refere a radicais livres de oxigênio ($\bullet\text{O}_2^-$; $\bullet\text{OH}^-$) e algumas espécies não radicais derivadas do O_2 (peróxido de hidrogênio H_2O_2), mas que são capazes de gerar radicais livres. Um radical livre é uma espécie química que possui um elétron não pareado, ou seja, um elétron ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. Esta condição torna os radicais livres altamente reativos e capazes de iniciar uma reação em cadeia.

Os oxidantes são produzidos a partir de inúmeras fontes em múltiplos compartimentos dentro da célula, normalmente como resultado da exposição a agentes tóxicos ou patológicos. As mitocôndrias são consideradas um local primário de produção de ERO, a partir da respiração aeróbia em condições fisiológicas e fisiopatológicas (Salvador; Henriques, 2004; Ma, 2013). Os oxidantes ambientais, incluindo a fumaça do cigarro, gases da exaustão do diesel, poluentes industriais, ozônio e radiação ionizante também podem contribuir para a formação de ERO (Malaviya; Laskin; Laskin, 2014).

Espécies reativas podem modificar lipídios, proteínas e DNA, levando a citotoxicidade. Os produtos de peroxidação lipídica podem atuar como indutores de moléculas mitogênicas, ativar receptores de membrana e induzir hiperreatividade das vias aéreas (Malaviya; Laskin; Laskin, 2014).

Assim, para impedir a total destruição das células, os organismos vivos possuem um complexo grupo de substâncias antioxidantes, capazes de prevenir a formação dos radicais, interceptar a ação dos radicais livres e espécies reativas oxidantes ou transformá-los por processos enzimáticos (Macchione, 1998; Bianchi, Antunes, 1999; Salvador, Henriques, 2004).

As defesas enzimáticas são representadas principalmente pelas enzimas superóxido dismutase, que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido; a catalase, que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O ; e a glutathione peroxidase, que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathione como co-fator (Vasconcelos et al., 2007). Entre as defesas não-enzimáticas vale destacar os antioxidantes obtidos da dieta, como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e carotenóides, que são importantes na intercepção dos radicais livres (Bianchi; Antunes, 1999) e a glutathione, um dos recursos mais utilizados pelos seres vivos para evitar danos oxidativos.

O ARE (*Antioxidant Response Element*) é um protetor amplamente reconhecido contra a toxicidade induzida por eletrofilos químicos e oxidativos, pois regula a transcrição de enzimas de conjugação de fase II, como por exemplo, como heme oxigenase-1 (HO-1), NAD [P] H: quinona oxidoreductase-1 (NQO1), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST) (Keum, 2012). Trata-se de uma região promotora regulada pelo fator de transcrição Nrf2 (*Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*, ou NFE2L2) (Itoh et al., 1997).

2.3.1 Sistema Keap1-Nrf2

O mecanismo Keap1-Nrf2 é um dos reguladores de resposta citoprotetora ao estresse exógeno e endógeno causado por ERO. A resposta ocorre através da atuação do Nrf2, que se liga a pequenas proteínas Maf (*musculoaponeurotic fibrosarcoma*) no núcleo e coordena a expressão de genes na região promotora ARE (Kansanen et al., 2013).

O Nrf2 é um fator de transcrição do tipo zíper de leucina básico (bZip), pertencente à família cap 'n' collar (CNC). A região básica, logo acima do zíper de leucina, é responsável pela interação desses fatores de transcrição com o DNA (Niture et al., 2010). O Nrf2 medeia a indução de um conjunto de enzimas que afeta diretamente a homeostase de ERO e ERN, regulando a defesa antioxidante através da indução de proteínas de resposta ao estresse (Ma, 2013).

Utilizando indução gênica por transfecção de plasmídeos, Itoh et al. (1999) caracterizaram a molécula de Nrf2-humano (Figura 5a). Os autores encontraram seis domínios, bem conservados, nomeados Neh1-Neh6. O primeiro domínio, Neh1, contém o domínio Ziper de Leucina básico (bZIP). Os terminais amino e carboxil das proteínas são igualmente bem conservados e são referidos como Neh2 e Neh3, respectivamente. Além disso, existem dois domínios ácidos (Neh4 e Neh5), bem como uma região rica em serina (Neh6). A partir de testes com domínios mutantes, Itoh et al. (1999) encontraram que o Neh2 é o domínio que regula negativamente a ação do Nrf2, através de sua ligação com uma proteína até então desconhecida.

Os autores isolaram e identificaram a proteína desconhecida, nomeando-a como Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), devido a sua semelhança com uma proteína de *Drosophila*, que se liga a filamentos de actina (*Kelch*). Testes realizados pela equipe para verificar a interação de Keap1 com Neh2 indicaram que a porção hidrofílica de Neh2 é crucial para sua interação com o domínio KIR (*Kelch*) do repressor Keap1 (Itoh et al., 1999). Mais tarde, descobriram-se as funções dos outros domínios: os domínios Neh3, 4 e 5 se ligam a co-ativadores transcricionais, enquanto Neh6 é uma região reguladora independente de Keap1. (Baird et al., 2014).

Keap1 contém dois domínios conhecidos de interação com proteína: o domínio BTB, na região N terminal, e as repetições de KIR, na região C terminal (Figura 5b). A região BTB medeia a homodimerização e a ligação de Keap1 a Cul3 (*Cullin3*), uma proteína de suporte entre Nrf2 e uma ubiquitina ligase (E3). Entre BTB e KIR está a região ligadora (LR), rica em resíduos de cisteína. Como o Nrf2, Keap1 é expresso amplamente nos tecidos e reside no citoplasma. Nrf2 é rapidamente degradado por proteassomos, sob uma condição basal com uma meia-vida de aproximadamente 20 minutos, resultando em um baixo nível de proteína Nrf2 em muitos tipos de células (Ma, 2013).

Figura 5 – Domínios e sítios de ligação do Nrf2 e seu inibidor Keap1

Figura 5: A) Domínios do Nrf2: Os domínios Neh3, Neh4 e Neh5 se ligam a co-ativadores da transcrição, quando o Nrf2 está ativo no núcleo. O domínio Neh1 se liga à pequenas proteínas Maf, que são outros fatores de transcrição. O domínio Neh2 medeia ligação de Nrf2 com seu inibidor Keap1, através dos seus sítios de ligação DLG e ETGE. B) Domínios do Keap1: A região de Keap1 que se liga à Neh2 é o domínio *Kelch*. O domínio BTB é o sítio de ligação chave para a degradação de Nrf2, uma vez que liga Keap1 à Cul3, proteína de suporte para uma ubiquitina ligase, responsável pela ubiquitinação de Nrf2. Já a região IVR parece ser importante para a ativação de Nrf2, uma vez que possui os resíduos de cisteína que modificam a ligação de Keap1 com Nrf2 e com o complexo ubiquitina ligase. Adaptado de: Kansanen et al., 2013.

A degradação de Nrf2 é desencadeada por poliubiquitinação através do sistema ubiquitina ligase-Keap1-Cul3. Dessa forma, Keap1 atua como um adaptador (Figura 6), trazendo o Nrf2 para o complexo E3 (Ma, 2013). Após a ubiquitinação, o Nrf2 é degradado via proteossomo 26S (Nguyen; Nioi; Pickett, 2009; Kansanen et al., 2013; Ma, 2013). Uma vez que o Nrf2 é liberado do Keap1 e degradado no proteossomo 26S, o dímero de Keap1, agora livre, pode se ligar com uma nova molécula de Nrf2 recém-sintetizada (Baird et al., 2014).

Figura 6 – Estrutura do complexo Keap1-Nrf2 em condições basais

Figura 6: O inibidor Keap1 funciona como um suporte entre Nrf2 e o complexo ubiquitina ligase. Através do seu domínio *Kelch*, Keap1 se liga à Nrf2, pelos sítios de ligação ETGE e DLG. Com o domínio BTB, Keap1 se liga ao complexo ubiquitina ligase, permitindo a ubiquitinação e consequente degradação de Nrf2. Adaptado de: Kansanen et al., 2013.

Atualmente, a via de sinalização oxidante e regulação antioxidante mais conhecida é a sinalização baseada na redução de resíduos de tióis de cisteína. Os tióis reativos interagem com ERO e ERN e geram uma variedade de produtos de oxidação de cisteína. A modificação de tióis de cisteína de Keap1 e Nrf2 por oxidantes e eletrófilos é um dos principais mecanismos pelo qual os indutores de ARE ativam Nrf2 (Ma, 2013).

A Keap1 humana possui 27 cisteínas, sendo que 3 se destacaram como importantes sensores eletrofílicos: C273, C288 e C151. Das três, a C151 foi a mais reativa em resposta a substâncias indutoras. C151 foi o único resíduo de cisteína capaz de modificar significativamente a expressão gênica de ARE. A interação Keap1-Nrf2 não é interrompida pela modificação das cisteínas. Atualmente, acredita-se que o domínio de baixa afinidade DLG se dissocia de Keap1, mas mantém a interação Keap1-Nrf2 via domínio ETGE. Contudo, essa dissociação seria suficiente para impedir a ubiquitinação de Nrf2. Alternativamente, a modificação dos resíduos de cisteína de Keap1 diminui a afinidade com Cul3, o que também seria responsável por um baixo

nível de ubiquitinação de Nrf2, criando um complexo Keap1 “morto” (Figura 7). Assim, os Nrf2 recém-sintetizados não se ligam ao Keap1 e são exportados para o núcleo, para mediar a indução dos genes citoprotetores (Eggler et al., 2009; Ma, 2013).

Figura 7 – Ativação do complexo Keap1-Nrf2

Figura 7: Em condições normais, Nrf2 é constantemente ubiquitinado através de Keap1 e degradado no proteasoma. Após a exposição a eletrólitos ou estresse oxidativo, Keap1 é inativado. O Nrf2 estabilizado acumula no núcleo e ativa muitos genes citoprotetores. Adaptado de: Mitsuishi; Motohashi; Yamamoto, 2012.

Assim, o Nrf2 controla o nível de oxidante celular e a sinalização de oxidantes regulando a expressão de três grupos de genes dependentes de ARE: enzimas/transportadores responsáveis pelo metabolismo de drogas, enzimas/proteínas antioxidantes e proteínas de sinalização de oxidantes. Via promotor ARE, o sistema Nrf2-Keap1 induz mais de 30 genes de resposta antioxidante (Ma et al., 2013), sendo os produtos mais estudados as proteínas heme-oxigenase 1 (HO-1) e NQO1.

Além das defesas enzimáticas, as células desempenham outras funções homeostáticas para auxiliar na remediação dos danos causados pelas ERO, como a autofagia. A autofagia é um processo catabólico evolutivamente conservado, importante na regulação de proteínas essenciais e na eliminação de organelas e agregados de proteínas danificados. A autofagia é observada no pulmão em resposta ao estresse oxidativo

gerado como consequência da exposição a tóxicos ambientais (Malaviya; Laskin; Laskin, 2014). Há estudos indicando que Nrf2 desempenha um papel na regulação destas funções (Zhu et al., 2013; Kapuy et al., 2018).

2.3.2 Autofagia

Todos os organismos vivos passam por renovação contínua. Nos seres humanos, as células e os componentes intracelulares são constantemente remodelados e reciclados, para substituir componentes antigos por novos, de melhor qualidade (Mizushima; Komatsu, 2011).

A autofagia é um termo genérico para todas as vias pelas quais os materiais citoplasmáticos são administrados ao lisossomo em células animais. Existem aproximadamente três classes de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. Na macroautofagia, uma porção de citoplasma, incluindo organelas, é englobado por uma membrana de isolamento (também chamado fagoforo) para formar um autofagossomo. A membrana externa do autofagossomo funde com o lisossomo, e o material interno é degradado no autolisossomo. Considera-se que a macroautofagia é o principal tipo de autofagia, e foi estudada de forma mais extensa em comparação com a microautofagia e a autofagia mediada por chaperonas. Portanto, é comum se referir à macroautofagia simplesmente como "autofagia" (Mizushima; Komatsu, 2011).

Na década de 1990, estudos genéticos em leveduras identificaram uma série de genes relacionados à autofagia (Atg). As múltiplas proteínas Atg governam a formação de autofagossomos e 35 dessas proteínas foram identificadas em levedura. As proteínas mais importantes na formação do autofagossomo, Atg1–10, 12–14, 16, e 18, são altamente conservadas em outros eucariontes, incluindo mamíferos, e agem de forma semelhante em leveduras e mamíferos (Mizushima; Komatsu, 2011).

Vários complexos multiprotéicos medeiam a autofagia. As primeiras proteínas ativadas são ULK1, Atg101, FIP200 (*focal adhesion kinase interacting protein*) e Atg13. Estas proteínas estão predominantemente localizadas no citosol e sob condições basais existem como um complexo. Sob

condições homeostáticas, o alvo do complexo de rapamicina 1 (mTORC1) interage com o complexo ULK1 (ULK1-Atg101-FIP200-Atg13) para inibir a sua função (Malaviya; Laskin; Laskin, 2014).

Diversos estímulos podem induzir a autofagia, incluindo a depleção nutricional, o estresse do retículo endoplasmático (ER), a hipoxia, a hiperoxia, os danos mitocondriais e o estresse oxidativo. O estresse oxidativo é um importante indutor de autofagia, pois este mecanismo auxilia na remoção de proteínas oxidadas e mitocôndrias danificadas. (Malaviya; Laskin; Laskin, 2014).

Após o estresse celular, mTORC1 dissocia-se do complexo ULK1, permitindo que ele se associe com a membrana do retículo endoplasmático para iniciar a formação do autofagossomo. O complexo ULK1, por sua vez, controla a atividade e localização de outro complexo multiproteico (constituído pelas proteínas autofágicas beclin-1, VPS -34 e Atg14) responsável pelo início do isolamento da membrana e nucleação de fagóforos. A atividade de beclin-1 é negativamente regulada pela proteína antiapoptótica Bcl-2. A indução de autofagia resulta na dissociação de beclin-1 e Bcl-2 e Beclin-1 forma então um complexo com VPS-34. A VPS possui atividade de fosfoinositídeo 3 quinase (PI3), que induz alterações físicas na membrana, facilitando a formação de fagóforos e recrutando as proteínas de ligação necessárias para a maturação do autofagossomo. As etapas seguintes envolvem a conjugação covalente de Atg5 a Atg12, através de Atg7. O conjugado Atg5/Atg12 subsequentemente se complexa com Atg16L1. Este complexo medeia a conversão da proteína LC3-I (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) em LC3-II (Figura 8). A forma LC3-II se associa à membrana do autofagossomo, para mediar a fusão deste com um lisossomo (Malaviya, Laskin, Laskin, 2014).

Figura 8 – Processo de maturação do autofagossomo

Figura 8: O estresse oxidativo pode causar danos às proteínas e organelas. Isto resulta na dissociação de beclin-1 e Bcl2 e subsequente formação de um complexo multiproteico, consistindo de beclin-1/VPS34/Atg14. Este complexo facilita o isolamento da membrana e nucleação do fagóforo. O fagóforo de membrana dupla rodeia as proteínas ubiquitinadas e agregadas e organelas danificadas a serem degradadas. O fagóforo é então alongado, um processo mediado pelo complexo Atg16L1/Atg5/Atg12, resultando na formação de um autofagossomo. A conversão de LC3-I em LC3-II é mediada pelo complexo Atg16L1/Atg5/Atg12. LC3-II associa-se com a membrana do autofagossomo e medeia a fusão do autofagossomo com o lisossomo. As proteínas intracelulares e organelas são degradadas por enzimas lisossômicas e LC3B é dilapidada e reciclada por Atg4. Adaptado de: Malaviya, Laskin, Laskin, 2014.

A ligação chave entre a autofagia e Nrf2 é a proteína SQSTM1 (Sequestossomo 1) ou p62, um receptor de carga autofágico. Esta proteína é um substrato específico para autofagia, porque tem um domínio UBA, através do qual pode mediar o sequestro de proteínas ubiquitinadas em autofagossomos. A autofagia disfuncional é geralmente acompanhada de acúmulo de p62. Esta acumulação aumenta a função de p62 em várias vias de sinalização, tais como sinalização de NF-κB, apoptose e ativação de Nrf2 (Mizushima; Komatsu, 2011).

Ichimura et al. (2013) testaram a dinâmica entre p62 e o sistema Keap1-Nrf2 durante autofagia seletiva em fibroblastos embrionários de ratos. Segundo os resultados dos autores, o sistema Keap1-Nrf2 e a autofagia seletiva tem suas vias conectadas pela fosforilação da proteína p62 na serina 351. A fosforilação dessa serina aumenta a afinidade de p62 por Keap1 e a ligação entre as duas moléculas se dá no mesmo sítio em que ocorre a ligação Keap1-Nrf2. Dessa forma, as duas moléculas competem pelo sítio ativo de Keap1, resultando na eventual ativação de Nrf2 e sua consequente migração para o núcleo. Enquanto isso, Keap1 ligada a p62 e a outras moléculas ubiquitinadas são degradadas por autofagia (Figura 9).

Figura 9 – Provável via pela qual p62 ativa Nrf2

Figura 9: A fosforilação da proteína adaptadora de autofagia p62 aumenta acentuadamente a afinidade de ligação de p62 para Keap1, um adaptador do complexo Cul3-ubiquitina E3 ligase responsável pela degradação de Nrf2. Assim, a fosforilação de p62 induz a expressão de alvos citoprotectores Nrf2. Adaptado de: Ichimura et al., 2013.

Jain et al. (2010) utilizaram diversas linhagens celulares humanas para demonstrar que Nrf2 ativa diretamente a expressão de p62 ligando-se ao seu promotor ARE. Além disso, os autores demonstraram que p62 pode se autorregular através de sua ligação com o inibidor de Nrf2, Keap1, promovendo a ativação do Nrf2 e, conseqüentemente, a sua própria.

Além de p62, é possível que alguns genes relacionados à autofagia também sejam regulados por este fator de transcrição, devido a um sítio de ligação ARE nas suas respectivas regiões promotoras do DNA. Pajares et al. (2016), utilizando dados de bioinformática, demonstraram que 16 genes relacionados à autofagia possuíam 25 sítios de ligação ARE em suas regiões promotoras. Usando células da linhagem humana HEK293T, os autores fizeram imunoprecipitação de cromatina (ChIP) e validaram 11 regiões ARE para Nrf2 de 8 genes relacionados à autofagia: p62, CALCOCO2, ULK1, ATG2B, ATG4D, ATG5 e GABARAPL1. Além disso, os autores demonstraram que a exposição à Sulforafano 15 μ M por 12h, um conhecido ativador do sistema Nrf2, aumenta a expressão gênica destes genes em HEK293T, enquanto em fibroblastos de camundongo Nrf2 KnockOut (MEF Nrf2KO) a expressão destes genes estava diminuída. Com relação ao LC3B, a presença ou não do Nrf2 não apresentou diferença na sua expressão nas mesmas condições estudadas. Entretanto, quando induzidas a estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio por 4h, os níveis de LC3B aumentaram em ambas linhagens celulares, mas menos em MEF Nrf2KO, sugerindo que Nrf2 pode regular positivamente a autofagia em casos de estresse oxidativo.

3 OBJETIVOS

Diante do que foi exposto na revisão de literatura, uma das hipóteses deste trabalho é que, assim como a fumaça de cigarro e outros poluentes induziram a ativação de Nrf2, o DEP também tem a capacidade de fazê-lo. Além disso, há uma provável ligação entre o sistema Nrf2-Keap1 e o mecanismo autofágico. Sendo assim, a principal hipótese deste trabalho é: o sistema Nrf2-Keap1 influencia no processo autofágico de células de brônquios humanos, quando estas são expostas ao DEP?

3.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho é verificar o papel do DEP na resposta oxidante mediada pelo mecanismo Nrf2/ARE e a influência desta via na indução de autofagia em células brônquicas humanas.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar se a atividade de Nrf2 interfere na autofagia e/ou vice-versa;
- Verificar se a exposição ao DEP interfere na via autofágica e na via antioxidante;
- Investigar se a quase ausência de Nrf2 interfere na autofagia de BEAS-2B tratadas ou não com DEP;
- De que maneira as vias do Nrf2 e da autofagia estão relacionadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O Projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da FMUSP, processo nº 119/15.

4.1 Cultura de células BEAS-2B

Como preconizado por Seriani et al. (2014), a cultura de células epiteliais de lavado brônquico humano (linhagem imortalizada BEAS-2B) foi preparada em frascos ou placas para cultivo com matrigel (substância que imita a matriz extracelular) e meio LHC-9 suplementado com a seguinte composição/proporção: 10% de soro fetal bovino; 0,1% de L-glutamina 2mM; 1% de antibiótico; 0,1% de piruvato 1mM; e 0,1% de aminoácidos não essenciais 1mM. As garrafas e placas foram mantidas em estufa de CO₂, umidificada, a 37°C.

4.2 Coleta do DEP

O Material Particulado de Diesel utilizado nesse estudo foi coletado a partir de um motor a diesel, com o auxílio de um retentor de partículas acoplado ao escapamento do veículo. O retentor de partículas consiste de um filtro bi-metálico que cria um campo capaz de reter o MP emitido a partir do escapamento. O aparelho foi desenvolvido pelo Prof. Paulo Roberto da Conceição.

O veículo escolhido é um ônibus Volkswagen, ano 2004, motor MWM x-10, 6 cilindros. Trata-se de um ônibus de uma companhia privada, que circula no bairro Campo Belo, região sul da cidade de São Paulo. O ônibus circula cerca de 100 a 150km/dia e o retentor de partículas ficou acoplado no escapamento por 1 semana.

4.3 Caracterização do DEP

4.3.1 Compostos elementares

Como preconizado por Laks et al. (2008), os elementos que compõem o material foram determinados através do método de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDX), em um aparelho da marca SHIMADZU, modelo EDX-700HS (SHIMADZU Corporation, Analytical Instruments Division, Kyoto, Japão). O EDX-700HS, da SHIMADZU, utiliza tubo gerador de raios-X de ródio (Rh-target tube), voltagem de 5 a 50kV, corrente de 1 a 1000 A e um detector dos raios-X de Si (Li).

A análise de Espectrometria de Fluorescência de Raio-X foi realizada no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A técnica é dividida em três fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios X característicos emitidos pela amostra e detecção desses raios. A técnica do EDX é de grande importância na análise multi-elementar de amostras de material particulado coletadas em filtro, pois pode determinar macro elementos, elementos traços, como Cobre-Cu e Chumbo-Pb, ou também elementos não metálicos, como Enxofre-S. Além disso, esta técnica não destrói, nem danifica a amostra analisada, possibilitando que a mesma seja armazenada para futuras análises do material coletado. Foram realizadas 3 varreduras para cada amostra. Para análise quantitativa foi utilizado o software da SHIMADZU para cálculo da concentração.

4.3.2 Compostos orgânicos

Como preconizado por Vasconcellos et al. (2011), as frações dos HPA e seus derivados foram separados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, equipada com detector UV ajustado em 254 nm, utilizando uma coluna empacotada com sílica (Erbasil Carlo Erba, L=250 mm, D=4 mm, d=10µm). Os experimentos foram realizados nas dependências do Instituto de

Química da Universidade de São Paulo, em conjunto com o Grupo De Estudos Em Química Atmosférica.

Para a identificação e quantificação dos HPA, foi utilizada a cromatografia a gás, associada ao detector por espectrometria de massas (CG/EM). As separações foram feitas numa coluna capilar de sílica fundida DB-1. O programa de temperatura do forno utilizado foi entre 80 a 280°C.

4.4 Testes de citotoxicidade

4.4.1 Ensaio MTT

O teste do MTT [brometo de 3- (4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5 difeniltetrazólio], descrito originalmente por Mosmann (1983), é um teste usado para avaliar viabilidade celular. O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo a um composto violeta (formazan). A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória.

Como realizado por Seriani et al. (2014), o ensaio de MTT foi utilizado para determinar a toxicidade do DEP em células BEAS-2B. As células foram semeadas em placas de 96 poços, contendo 3×10^4 células por poço, em 180µL de meio e cultivadas durante 12h para permitir a adesão. As suspensões de DEP foram adicionadas, em concentrações de 10, 50, 100µg/ml. As células ficaram expostas de acordo com os intervalos de tempo de 20 minutos, 40 minutos, 1 hora e 2 horas. Em seguida, 20µL de MTT (2,5mg/mL) e 80µL de meio LHC-9 suplementado foram adicionados em cada poço e as células foram incubadas durante 4 horas numa estufa de CO₂. Após 4h, as os poços foram lavados com 100µL de dimetil-sulfóxido (DMSO) e a placa ficou homogeneizando durante 30 minutos.

Em seguida, as placas foram lidas utilizando um leitor de ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay) a 570 e 630 nm. Os valores de viabilidade celular foram expressos como a percentagem da absorbância observada para as células. Os dados foram coletados em triplicata para cada concentração e tempo.

4.4.2 Ensaio Trypan Blue

A viabilidade celular foi verificada a partir do teste Trypan Blue (corante azul que é impermeável às membranas celulares). O cálculo da viabilidade foi realizado a partir da porcentagem do número de células mortas/mL em relação ao número total de células. Foram semeadas 4×10^4 células em cada poço de uma placa de 12 poços, com 1mL de meio LHC-9. Após 24 horas de cultivo foi dado início à exposição ao DEP.

O material particulado foi pesado e diluído na proporção 1:1 (1mg/ml) em solução fosfato-salina (PBS), com 0,1% de etanol. Desta solução, o material particulado foi diluído em meio de cultura para as concentrações de 10, 50, 100µg/ml. As células foram expostas a estas concentrações por 1 hora e 2 horas. Ao fim do experimento, as células foram lavadas com PBS 1x e exposta a Tripsina (100µL de tripsina/poço) por 1 minuto, para que se soltassem da matrigel. A tripsina foi neutralizada com 100µL de soro fetal bovino e as células foram recolhidas em um tubo estéril. Após centrifugar por 3 minutos a 5000 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100µL de meio LHC-9.

Para a contagem, foram retirados 10µL da solução de células e misturados com 10µL do corante Trypan Blue. Então, 10µL dessa mistura foram colocados em uma placa do aparelho “Countess” (Invitrogen). Os dados foram coletados em triplicata para cada concentração e tempo.

4.4.3 Análise estatística

A distribuição dos dados foi verificada através da análise de Kolmogorov-Smirnov. Variáveis de distribuição normal foram analisadas pelo teste Two Way ANOVA e são apresentadas como média e desvio padrão nos gráficos de barra. Para as variáveis de distribuição não-normal, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. O teste de comparação múltipla “Holm-Sidak” foi utilizado para detectar as diferenças entre os grupos. As análises foram feitas com o programa estatístico, Sigma Plot 11.0, nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$.

4.5 Exposição de células BEAS-2B ao DEP

4.5.1 Grupos de estudo

De acordo Klionsky et al. (2016), que construíram um guia para o estudo da autofagia, a via autofágica é muito dinâmica dentro da célula e possui várias etapas que podem ser reguladas em níveis diferentes. Por isso, as condições de cultivo, como o meio e os suplementos utilizados, podem interferir na autofagia.

O Soro Fetal Bovino (SFB) utilizado para suplementar o meio LHC-9 é rico em aminoácidos e hormônios, que podem regular a autofagia em níveis basais. Sendo assim, é comum nos estudos da via autofágica remover o SFB do meio. Contudo, a viabilidade celular de algumas linhagens diminui ao remover os suplementos do meio de cultura. Por isso, foi decidido que, antes das exposições ao DEP, as BEAS-2B seriam submetidas a testes prévios para conhecer sua dinâmica na via autofágica. Estes testes prévios incluem:

- a) Indução da autofagia através da substituição do meio LHC-9 suplementado com SFB por LHC-9 totalmente não suplementado por 2h antes da exposição à solução salina EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*) por 40 minutos. Essa solução é totalmente pobre em nutrientes, induzindo a célula a uma condição severa de desnutrição.
- b) Inibição da autofagia utilizando Bafilomicina, um fármaco que impede a fusão do autofagossomo ao lisossomo e é amplamente utilizado como controle negativo (Klionsky et al., 2016).
- c) Além de estabelecer os parâmetros para autofagia, também foi utilizado sulforafano, um importante indutor do sistema Nrf2, como controle positivo para a via Nrf2-Keap1 (Lee; Lee, 2011).

Depois desses testes com os controles, a via autofágica e o sistema Keap1-Nrf2 foram analisados após exposição ao DEP nas concentrações de 10µg/mL e 50µg/mL, por 2h.

Por fim, as duas vias foram analisadas novamente depois que as BEAS-2B foram transfectadas com RNA de interferência para Nrf2 ou com RNA de sequência não-significante (controle negativo), e expostas ao DEP nas

concentrações de 10µg/mL e 50µg/mL, por 1h e 2hs. Então, os grupos de estudo foram organizados conforme a Tabela 2:

Tabela 2– Painel geral dos grupos de estudo

PARTE A: Estudo da via autofágica em BEAS-2B	
Grupos	Descrição
Controle	BEAS-2B não tratadas
EBSS40 24h	BEAS-2B tratadas com EBSS (EBSS - Earle's Balanced Salt Solution) por 40 minutos após 24h de privação de Soro Fetal Bovino
EBSS40 2h	BEAS-2B tratadas com EBSS por 40 minutos após 2h de privação de Soro Fetal Bovino
Bafilomicina 10nM	BEAS-2B tratadas com Bafilomicina 10nM por 4 horas
PARTE B: Estudo da indução de DEP	
Grupos	Descrição
Controle	BEAS-2B não tratadas
10µg/mL	BEAS-2B tratadas com DEP 10µg/mL por 2 horas
50µg/mL	BEAS-2B tratadas com DEP 50µg/mL por 2 horas
PARTE C: Estudo da influência do Nrf2 na autofagia de células tratadas com DEP	
Grupos	Descrição
siRNA	BEAS-2B transfectadas com RNA de interferência (siRNA) para diminuir a expressão de Nrf2
siDEP 10 1h	BEAS-2B siRNA expostas ao DEP 10µg/mL por 1 hora
siDEP 50 1h	BEAS-2B siRNA expostas ao DEP 50µg/mL por 1 hora

Continua

Continuação

PARTE C: Estudo da influência do Nrf2 na autofagia de células tratadas com DEP	
Grupos	Descrição
siDEP10 2h	BEAS-2B siRNA expostas ao DEP 10µg/mL por 2 horas
siDEP50 2h	BEAS-2B siRNA expostas ao DEP 50µg/mL por 2 horas
CTN - Controle Negativo	BEAS-2B transfectadas com Controle Negativo
DEP10 1h	BEAS-2B CTN expostas ao DEP 10µg/mL por 1 hora
DEP50 1h	BEAS-2B CTN expostas ao DEP 50µg/mL por 1 hora
DEP10 2h	BEAS-2B CTN expostas ao DEP 10µg/mL por 2 horas
DEP50 2h	BEAS-2B CTN expostas ao DEP 50µg/mL por 2 horas

4.5.2 Transfecção de BEAS-2B

Para melhor investigar o efeito do Nrf2 na via autofágica de BEAS-2B expostas ao DEP, foi utilizado um RNA de interferência para degradar o RNAm de Nrf2, com o objetivo de evitar sua super expressão e verificar como a via autofágica é regulada nessas condições. Para tanto, foram utilizados os reagentes Lipofectamine SiRNAMAX (Invitrogen) e as sequências de siRNA s9394 (Ambion® Silencer® Select siRNA) e s9491 (Ambion® Silencer® Select siRNA) e o controle negativo (Ambion Silencer® Select Negative Control), todos na concentração de 20nM (Lee; Lee, 2011; Su; Yang; Omiecinski, 2014; Son et al., 2015). O controle negativo simula as mesmas condições de transfecção, contudo, o RNA transfectado possui uma sequência não significativa. Para facilitar a transfecção, o siRNA e a lipofectamina foram incubados com o meio Opti-MEM® por 5 minutos e depois foram adicionados ao meio de cultura da célula, conforme instruções do fabricante. A transfecção ocorreu durante 48 horas.

4.6 Expressão gênica

4.6.1 Método geral para o estudo da expressão gênica

Em uma placa de 96 poços foram semeadas 3×10^4 células por poço em triplicatas por grupo. Após a exposição ao DEP, conforme a Tabela 2 partes: A, B e C, as células foram tripsinizadas e centrifugadas. O RNA total foi extraído do pellet de células utilizando 700 μ L do reagente Qiazol® (Qiagen) e coluna de extração (Rneasy mini Kit Qiagen), conforme instruções do fabricante. O RNA foi armazenado a -80°C .

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando 200ng de RNA total incubado na presença de 4 μ L de SUPERScript Vilo Master Mix (Invitrogen®), conforme instruções do fabricante. Os ciclos de incubação foram 10 minutos a 25°C ; 60 minutos a 42°C ; 5 minutos a 85°C ; e resfriado a 4°C no final. O cDNA foi armazenado a -20°C .

A qualidade e concentração do RNA total e do cDNA foi aferida através da leitura no espectrofotômetro Nanodrop (ThermoFischer), que determina a pureza do DNA e RNA através da razão de absorbância 260nm/280nm. A razão entre 1,8 e 2,0 é geralmente aceita como “pura”.

O protocolo de amplificação (temperatura e quantidade de cDNA) foi definido de acordo com as curvas padrões dos genes. O aparelho utilizado foi o Rotor Gene 3000 (Qiagen), nas seguintes condições: 40 de ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 60 segundos. O volume total da reação de RT-PCR foi de 25 μ L, sendo: 12,5 μ L de SYBER Green (Qiagen); 9,5 μ L de água livre de RNase; 0,5 μ L de *primer forward* e 0,5 μ L de *primer reverse*; e 2 μ L de cDNA da amostra na concentração de 200ng/ μ L. Todas as amostras foram feitas em quadruplicatas.

A análise foi realizada por meio da quantificação relativa de cada gene de interesse em relação a um “*housekeeping*”, um gene de expressão constitutiva, que neste caso, foi utilizado o RPL13A, de uma família de proteínas ribossomais (Mertens et al., 2017). Essa quantificação é baseada no modelo de Livak e Schmittgen (2001), que utiliza a fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$. Para fazer a análise, foi preparada uma curva padrão para cada gene, utilizando uma

diluição seriada com 5 concentrações de cDNA de células não tratadas. A partir dessa curva, o CT (“*cycle Threshold*”) das amostras teste era calculado. O CT é o ciclo em que a amplificação ultrapassa o “*threshold*” (ponto em que o sinal de amplificação é detectado). O valor do CT do gene alvo é subtraído do valor do CT do “*housekeeping*”, resultando no valor de ΔCT ; o valor do ΔCT é subtraído do ΔCT de um calibrador, amostra de cDNA da célula **não exposta** usada para quantificação relativa, pela qual todas as amostras serão comparadas, para determinar o nível de expressão relativa do gene. A amostra do calibrador constava em todas as corridas de RT-PCR, para todos os genes. O resultado dessa subtração é o $\Delta\Delta CT$, que depois era inserido na fórmula de Livak e Schmittgen (2001).

4.6.2 Primers

Como em Seriani et al. (2016), Os “*primers*” foram concebidos baseados nas sequências genéticas da base de dados NIH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e as sequências determinadas com a ferramenta *primer BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), exceto o “*housekeeping*” RPL13A, cuja sequência foi obtida na literatura (Mertens et al., 2017). As sequências de cada gene alvo e do “*housekeeping*” encontram-se na tabela 3:

Tabela 3 – Sequências de *primers* para os genes de interesse

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
Nrf2	GCTATGGAGACACACTACTTGG	CCAGGACTTACAGGCAATTCT
Keap1	CGTCCTGCACAACTGTATCT	GTGTCTGTATCTGGGTCGTAAC
NQO1	GGAAGAAACGCCTGGAGAATA	CAGGGAAGCCTGGAAAGATAC
HO-1	GGTCCTTACACTCAGCTTTCT	CATAGGCTCCTTCCTCCTTTC
p62	GGAACAGATGGAGTCGGATAAC	CTGGAAGAAGGCAGAGAAACT
LCB3	AGAGCAGCATCCAACCAAAT	TGAGCTGTAAGCGCCTTCTAA
ATG5	GCAACTCTGGATGGGATTGC	AGGTCTTTCAGTCGTTGTCTGAT
RPL13A	AAGGTGGTGGTCGTACGCTGTG	CGGGAAGGGTTGGTGTTTCATCC

4.6.3 Análise estatística

A distribuição dos dados foi verificada através da análise de Kolmogorov-Smirnov. Variáveis de distribuição normal foram analisadas pelo teste One Way ANOVA e para as variáveis de distribuição não-normal, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Os dados estão representados por gráficos de boxplot, com as medianas acompanhadas dos intervalos interquartil (25% e 75%). O teste de comparação múltipla “Pairwise” foi utilizado para detectar as diferenças entre os grupos. As análises foram feitas com programas estatísticos IBM SPSS 23.0. Nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$.

4.7 Western Blotting

4.7.1 Extração de proteínas totais

Em uma placa de 6 poços foram semeadas 2×10^5 células por poço em duplicatas por grupo, conforme a tabela 2, parte C. Para analisar a quantidade das proteínas de interesse Nrf2, LC3 I, LC3II e p62, foram extraídas as proteínas totais dos grupos de estudo. Para tanto, as células foram expostas a Tripsina, centrifugadas e o precipitado foi ressuspensionado na presença do tampão de extração RIPA, suplementado com inibidores de protease e inibidores de fosfatase na concentração de 1:100 (SigmaAldrich®). Após incubação por 15 minutos a 4°C, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para quantificação.

As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford. Este método é baseado na interação entre o corante “Coomassie brilliant blue BG-250” e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente luz em 595 nm (Bradford, 1976). Foi construída uma curva de calibração com BSA e as

amostras foram quantificadas em comparação com a OD obtida pelas concentrações conhecidas de BSA.

4.7.2 Eletroforese em gel

Foram utilizadas 50µg de proteínas totais para eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. O gel de empilhamento foi preparado com Tris 0,125M pH 6.8, SDS 0,1%, acrilamida 5%, persulfato de amônio (APS) e N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (Temed, Sigma). O gel de corrida foi preparado com Tris 0,375M pH 8.8, SDS 0,1%, acrilamida 10%, APS e Temed. Após a transferência para uma membrana de PVDF, esta foi bloqueada em leite em pó desnatado diluído a 5% em PBS Tween 0,1%, por 1h. Após o bloqueio a membrana foi incubada com os anticorpos para β actina (1:3000), Nrf2 (abcam 1:500), LC3B (abcam 1:500) e p62 (abcam 1:500), *overnight*. A membrana foi lavada 3 vezes com PBS Tween e incubada com anticorpo secundário anti-Rabbit HRP (1:1000) por 1h. Depois de lavar novamente por 3 vezes com PBS Tween, a membrana foi revelada por quimioluminescência, utilizando o kit ECL (GE Healthcare Life Sciences) no aparelho ImageQuant™ LAS 4000. A proporção da expressão das proteínas foi realizada pelo método de densitometria.

4.7.3 Densitometria

Para analisar a intensidade das bandas nas fotos adquiridas pela reação de quimioluminescência foi utilizado o software ImageJ. A partir dos valores de área das bandas, as proteínas de interesse foram normalizadas pela expressão de β actina (área proteína de interesse/área β actina). Depois da normalização, foi calculada a relação (R) de cada tratamento pelo valor da célula não tratada (amostra/controle). Assim, considera-se aumento da proteína quando $R > 1$.

4.8 Imunofluorescência

Em uma placa de 24 poços foram semeadas 2×10^5 células por poço em duplicatas por grupo. As exposições foram realizadas conforme tabela 2, parte C. As células foram cultivadas em placas com lamínulas próprias para microscopia nos poços. Após as exposições, as células foram fixadas com Metanol 100%, por 15 minutos a -20°C . Depois, foram lavadas 3 vezes com PBS por 10 minutos a 4°C .

Para permeabilização das células, as amostras foram incubadas por 10 minutos com PBS contendo 0,2% Triton X-100 e lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos. Depois de permeabilizadas, as amostras foram bloqueadas por 1h com BSA 5% em PBS Tween 0,1%, em câmara úmida. Após o bloqueio, as amostras foram incubadas a 4°C , em câmara úmida, “*overnight*”, com os anticorpos primários LC3B (Cell Signalling 1:100) e Nrf2 (Abcam 1:50) para dupla marcação. No dia seguinte, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS por 10 minutos e incubadas com os anticorpos secundários (AlexaFluor 488 e AlexaFluor 546, 1:200) por 1h, em câmara úmida a temperatura ambiente. Depois da incubação, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos e incubadas com DAPI 1:200, filtrado, por 15 minutos, para marcação de núcleo. As amostras foram lavadas 2 vezes com PBS por 5 minutos e as lâminas foram montadas com glicerol e lidas em microscópio de fluorescência. As imagens foram captadas em objetiva de 40X, com o software ImageProPlus.

Depois de adquiridas, as fotos passaram por um tratamento no software ImageJ, onde foram feitos sobreposição (“*merge*”) dos campos correspondentes e os campos escolhidos foram ampliados 2X.

5 RESULTADOS

5.1 Compostos elementares- EDX

O resultado da fluorescência de raios X por dispersão de energia para elementos inorgânicos da amostra de DEP coletada está descrito na Tabela 4:

Tabela 4 – Compostos elementares do DEP

Elemento	Resultado EDX	Elemento	Resultado EDX
Cr	16,14 ± 11,20	Ba	24,78 ± 15,68
Mn	22,62 ± 1,34	Pb	2,29 ± 1,60
Fe(%)	0,29 ± 0,00	Na(%)	0,21 ± 0,03
Co	79,85 ± 5,47	Mg	3,99 ± 6,06
Ni	3,27 ± 1,73	Al	0,67 ± 0,58
Cu	14,09 ± 1,15	Si	338,24 ± 17,07
Zn	285,21 ± 0,51	P	318,49 ± 3,89
As	2,94 ± 1,59	S(%)	0,27 ± 0,00
Br	2,05 ± 1,30	K	73,29 ± 2,51
Rb	1,35 ± 0,59	Ca(%)	0,18 ± 0,00
Zr	1,43 ± 0,38	Sc	150,03 ± 3,97
Cd	1,01 ± 0,01	Cl	5,20 ± 1,36

Tabela 4: A quantidade dos elementos está calculada em ppm (parte por milhão), exceto aqueles indicados por “%”. Os valores apresentados são média ± SEM (*standard error mean*). Fonte: A autora.

5.2 Compostos orgânicos

Padrões para determinação do HPA na amostra de diesel- por GCMS:

- Limite de Detecção: 0,3125ppb;
- Limite de Quantificação: 0,625ppb;
- Coluna: RTX-1MS (30m; 0,25mm diam; 0,25 µm espessura);
- Volume de injeção: 3 µl com injetor automático;
- Modo de aquisição: SIM (Select Ion Monitoring);
- Equipamento: Shimadzu QP-2020 com AOC-5000 (comb-pal);
- Cada amostra foi injetada 5 vezes;
- Método de extração das amostras e teste de recuperação: Soxhlet;
- Tratamento de dados: fator de resposta (área/concentração);

- Padrões de HPA: mix 525b (Supelco) e coroneno (Sigma); benzo(e)pireno (Sigma) e fluoranteno (Sigma).

Tabela 5 – Resultado fração orgânica do DEP por cromatografia gasosa

HPA	Recuperação (%)	Amostra (ng/g)
Fluoreno	74	11
Fenantreno	96	47
Antraceno	53	7
Fluoranteno	81	35
Pireno	74	32
Benzo(a)antraceno	65	8
Criseno	66	15
BbF	73	32
BkF	70	11
BeP	74	25
BaP	69	22
InP	85	6
DBA	93	13
BPer	88	53
Cor	92	170

Tabela 5: As siglas correspondem, respectivamente, aos compostos: Benzo(b)fluoranteno (BbF), Benzo(k)fluoranteno (BkF), Benzo(e)pireno (BeP), Benzo(a)pireno (BaP), Indeno(1,2,3-cd)pireno (Ind), Dibenzo(a,h)antraceno (DBA) e Benzo(ghi)perileno (BPe).

Tabela 6 – Análise da fração carbonosa- técnica termo-óptica

Carbono Elementar (CE)		Carbono Orgânico (OC)		
%	69,3	30,7		
		OCa	OCb	PC
		0,3	3,9	26,6

OCa: corresponde à primeira fração de OC obtida a temperaturas abaixo de 200°C e corresponde à volatilização de compostos orgânicos com massas moleculares mais baixas.

OCb: é a segunda fração de OC, obtida a temperaturas entre 200 e 600°C, consiste na decomposição e oxidação de espécies com massa molar mais alta.

PC: carbono pirolisado.

O CE é formado principalmente em processos de combustão e o OC pode ser emitido diretamente na atmosfera ou ser formado pela condensação de compostos orgânicos voláteis.

5.3 MTT

De acordo com os resultados de MTT (Figura 10), há uma diferença estatisticamente significativa entre a variável TEMPO ($p=0,015$), mas não houve diferença entre os tratamentos:

Figura 10 – Resultados de MTT

Figura 10: Análise da absorbância de formazan produzido pelas células expostas apenas a meio de cultura LHC-9 (controle), 10µg/mL de DEP, dissolvido em LHC-9, 50µg/mL de DEP, dissolvido em LHC-9 e 100µg/mL de DEP, dissolvido em LHC-9. O teste estatístico Two-Way ANOVA não apontou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p=0,568$), mas apontou entre os tempos ($p=0,015$). O método Holm-Sidak apontou diferença entre os tempos de 20 minutos e 2hs ($p=0,009$) e entre os tempos de 1h e 2hs ($p=0,01$), para os grupos expostos ao DEP.

Os grupos que apresentaram diferença entre si foram 20 minutos vs 2 hs e 1h vs 2hs. Como o tempo de meia vida do Nrf2, a proteína de interesse deste estudo, varia entre 15 e 20 minutos dentro da célula (Nguyen, Nioi, Pickett, 2009; Ma, 2013), decidimos seguir os estudos de citotoxicidade apenas com os tempos de 1h e 2hs.

5.4 Trypan Blue

Os valores de cada amostra foram analisados pelo teste Two-Way ANOVA o qual encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre as concentrações utilizadas ($p=0,004$), mas não entre os tempos (Figura 11).

Figura 11 – Resultado Trypan Blue em Porcentagem de Células Mortas

Figura 11: Análise da porcentagem de células mortas nas células expostas apenas a meio de cultura LHC-9 (controle); 10µg/mL de DEP, dissolvido em LHC-9; 50µg/mL de DEP, dissolvido em LHC-9 e 100µg/mL de DEP, dissolvido em LHC-9. O teste estatístico Two Way ANOVA não apontou diferença estatisticamente significativa entre os tempos ($p=0,945$), mas apontou entre as concentrações ($p=0,004$). O método Holm-Sidak apontou diferença entre os grupos: 100µg/mL vs. Controle ($p=0,009$); 100µg/mL vs. 10µg/mL ($p=0,010$); 100µg/mL vs. 50µg/mL ($p=0,025$); 50µg/mL vs. Controle ($p=0,007$); e 50µg/mL vs. 10µg/mL ($p=0,015$).

Apenas as concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL apresentaram diferença estatística em relação ao controle. A menor concentração, 10µg/mL, não apresentou aumento significativo de células mortas em relação ao controle.

Analisando os resultados de MTT e de Trypan Blue, foi decidido que a concentração de 100µg/mL não seria mais utilizada neste trabalho, devido a sua toxicidade. Sendo assim, as demais exposições foram realizadas apenas com 10 e 50µg/mL.

5.5 Estudo da interferência da expressão de marcadores autofágicos e do sistema Keap1-Nrf2 nos controles

Antes de verificar se o DEP é capaz de interferir nas duas vias estudadas neste trabalho, foi verificada a expressão de RNAm dos principais marcadores de cada via, separadamente, nos controles positivos e negativo (Figuras 12 a 13):

Figura 12 –Expressão gênica da via autofágica em EBSS, Bafilomicina e Sulforafano

Figura 12: Quantidade relativa de RNAm após exposição a EBSS por 40 minutos, Bafilomicina1 10nM por 4hs e Sulforafano 10µM por 24hs. A quantificação foi feita por

RT-PCR e calculada pelo método $\Delta\Delta CT$. (A) LC3B: o método Kruskal Wallis apontou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,004$) e o teste “Pairwise” apontou diferença entre os grupos controle e sulforafano ($p=0,031$); bafilomicina e sulforafano ($p<0,001$); e bafilomicina e EBSS ($p=0,035$). (B) p62: o método Kruskal Wallis apontou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,007$) e o teste “Pairwise” apontou diferença entre os grupos controle e EBSS ($p=0,005$); EBSS e sulforafano ($p=0,002$). (C) Atg5: o método Kruskal Wallis apontou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,009$) e o teste “Pairwise” apontou diferença entre os grupos bafilomicina e sulforafano ($p=0,002$); controle e sulforafano ($p=0,007$).

O tratamento com EBSS não provocou aumento significativo na expressão dos marcadores de autofagia e diminuiu os níveis de p62. A Bafilomicina interrompe o processo de autofagia no seu estágio final, impedindo a fusão entre autofagossomo e lisossomo. Contudo, sendo a autofagia um processo dinâmico e com várias etapas, não é possível afirmar se há ou não aumento de autofagia apenas com a concentração relativa de RNAm de LC3B ou p62, pois estas proteínas são alvo do próprio processo autofágico podendo ser degradadas ou recicladas por ele (Komatsu et al. 2011). A concentração de RNAm de Atg5 LC3B e p62 também aumentou com a exposição ao sulforafano, indutor de Nrf2.

Figura 13 – Expressão dos marcadores da via Keap1-Nrf2 após exposição a EBSS, Bafilomicina e Sulforafano

Figura 13: Quantidade relativa de RNAm após exposição a EBSS por 40 minutos, Bafilomicina1 10nM por 4hs e Sulforafano 10 μ M por 24hs. A quantificação foi feita por RT-PCR e calculada pelo método $\Delta\Delta$ CT. (A) HO-1: o método Kruskal Wallis apontou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,002$) e o teste “Pairwise” apontou diferença entre os grupos controle e sulforafano ($p=0,013$); bafilomicina e sulforafano ($p<0,001$); e bafilomicina e EBSS ($p=0,013$). (B) NQO1: o método Kruskal Wallis apontou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,002$) e o teste “Pairwise” apontou diferença entre os grupos controle e sulforafano ($p=0,021$); sulforafano e bafilomicina ($p<0,001$); e bafilomicina e EBSS ($p=0,023$). (C) Nrf2: o método Kruskal Wallis apontou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,024$) e o teste “Pairwise” apontou diferença entre os grupos controle e bafilomicina ($p=0,027$); bafilomicina e EBSS ($p=0,025$); e bafilomicina e sulforafano ($p=0,004$).

Pelo gráfico da figura 13 é possível perceber que a exposição a Sulforafano 10 μ M por 24hs foi capaz de ativar o sistema Keap1-Nrf2, uma vez que as duas proteínas ativadas por essa via, NQO1 e HO-1, tiveram aumento na quantidade de seu RNAm, como esperado. Ainda é possível observar que a privação de nutrientes por EBSS não interfere na expressão do RNAm do sistema Keap-1 Nrf2. Já a Bafilomicina, inibidor da autofagia, promoveu diminuição significativa do RNAm de todos os genes da via antioxidante.

5.6 Estudo da indução das vias autofágica e antioxidante após a exposição ao DEP

Neste ensaio, as células BEAS-2B foram expostas ao DEP nas concentrações de 10 μ g/mL e 50 μ g/mL por 2hs. Foram analisados os marcadores LC3B e p62 da via autofágica, e os marcadores Nrf2 e NQO1 da via antioxidante (Figuras 14 e 15).

Figura 14 – Expressão de Nrf2 e NQO1 após exposição ao DEP

Figura 14: Estudo da expressão gênica dos marcadores de autofagia após exposição ao DEP 10 e 50 μ g/mL. A quantificação foi feita por RT-PCR e calculada pelo método $\Delta\Delta CT$. Os símbolos $\diamond$, # e § acima do boxplot indicam resultado estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$). (A) Nrf2: o teste Kruskal Wallis apontou uma diferença significativa ($p=0,007$) e o teste "Pairwise" entre os grupos "Controle" e "50 μ g" ($p=0,002$). (B) NQO1 o teste Kruskal Wallis apontou uma diferença significativa

($p=0,025$) e o teste “Pairwise” entre os grupos “Controle” e “50 μ g” ($p=0,019$) e “10 μ g” e “50 μ g” ($p=0,019$).

Figura 15 – Expressão de LC3B e p62 após exposição ao DEP

Figura 15: Estudo da expressão gênica dos marcadores de autofagia após exposição ao DEP 10 e 50 μ g/mL. A quantificação foi feita por RT-PCR e calculada pelo método $\Delta\Delta CT$. Os símbolos Δ e $\bullet$ acima do boxplot indicam resultado estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$). (A) LC3B: o teste Kruskal Wallis apontou uma diferença significativa ($p=0,018$) e o teste “Pairwise” entre os grupos “Controle” e “50 μ g” ($p=0,006$). (B) p62 o teste Kruskal Wallis apontou uma diferença significativa ($p=0,007$) e o teste “Pairwise” entre os grupos “Controle” e “50 μ g” ($p=0,002$).

Como esperado, o DEP provocou aumento significativo do RNAm de todos os marcadores na concentração de 50 μ g/mL. Para a concentração de 10 μ g/mL não houve aumento significativo. Estes testes comprovam que a exposição ao DEP é capaz de induzir tanto a via autofágica, quanto a via antioxidante em BEAS-2B.

5.7 Estudo da influência do Nrf2 na autofagia de BEAS-2B tratadas com DEP

A fim de investigar se a presença ou ausência do Nrf2 é capaz de influenciar na expressão de marcadores autofágicos quando as BEAS-2B são expostas ao DEP, o fator de transcrição foi inibido com um RNA de

interferência (siRNA). Cerca de 70% da expressão do RNAm de Nrf2 foi diminuída com o siRNA, assim como a quantidade relativa de RNAm da proteína HO-1, ativada por Nrf2. Os marcadores de autofagia Atg5, LC3B e p62 também tiveram suas expressões alteradas pela ausência do fator de transcrição (Figuras 16 e 17).

Figura 16 – Expressão de Nrf2 e HO-1 após exposição a DEP e siRNA

Figura 16: Expressão de Nrf2 e HO-1 em BEAS-2B expostas ao DEP nas concentrações de 10µg/mL e 50µg/mL, por 1h e 2hs, com transfecção de siRNA-Nrf2. A concentração relativa de RNAm dos marcadores foi analisada por RT-PCR e quantificada pelo método $\Delta\Delta CT$. A) Expressão de Nrf2: o teste Kruskal-Wallis apontou diferença estatística entre os grupos transfectados com siRNA e os grupos não transfectados ($p < 0,001$). O teste de comparação múltipla Pairwise apontou quais grupos apresentaram diferença entre si. Os símbolos “*”, “+”, “▲”, “■” e “○” representam, respectivamente, os grupos de células CTN, DEP10 1h, DEP50 1h, DEP10 2h, DEP50 2h. Acima dos boxplots dos grupos siRNA e siDEP, a lista de símbolos indica os grupos com os quais houve resultado estatisticamente significativo. Os valores de p para os pares estão em Apêndice A. B) Expressão de HO-1: o teste Kruskal-Wallis apontou diferença estatística entre os grupos transfectados com siRNA e os grupos não transfectados ($p < 0,001$). O teste de comparação múltipla Pairwise apontou quais grupos apresentaram diferença entre si. Os valores de p para os pares estão em Apêndice A.

Observando a figura 16 é possível concluir que a transfecção com siRNA diminuiu a expressão do RNAm de Nrf2 e da proteína HO-1. Mesmo com a exposição ao DEP, a concentração de RNAm das células transfectadas não aumentou.

Figura 17 – Expressão de LC3B e p62 após exposição a DEP e siRNA

Figura 17: Expressão de LC3B e p62 em BEAS-2B expostas ao DEP nas concentrações de 10µg/mL e 50µg/mL, por 1h e 2hs, com transfecção de siRNA-Nrf2. A concentração relativa de RNAm dos marcadores foi analisada por RT-PCR e quantificada pelo método $\Delta\Delta CT$. A) Expressão de LC3B: o teste Kruskal-Wallis apontou diferença estatística entre os grupos transfectados com siRNA e os grupos não transfectados ($p < 0,001$). O teste de comparação múltipla Pairwise apontou quais grupos apresentaram diferença entre si. Os símbolos “*”, “+”, “▲”, “■” e “○” representam, respectivamente, os grupos de células CTN, DEP10 1h, DEP50 1h, DEP10 2h, DEP50 2h. Acima dos boxplots dos grupos siRNA e siDEP, a lista de símbolos indica os grupos com os quais houve resultado estatisticamente significativo. Os valores de p para os pares estão em Apêndice A. B) Expressão de p62: o teste Kruskal-Wallis apontou diferença estatística entre os grupos transfectados com siRNA e os grupos não transfectados ($p = 0,001$). O teste de comparação múltipla Pairwise apontou quais grupos apresentaram diferença entre si. Os símbolos “*”, “+”, “▲”, “■” e “○” representam, respectivamente, os grupos de células CTN, DEP10 1h, DEP50 1h, DEP10 2h, DEP50 2h. Acima dos boxplots dos grupos siRNA e siDEP, a lista de símbolos indica os grupos com os quais houve resultado estatisticamente significativo apontado pelo teste Pairwise. Os valores de p para os pares estão em Apêndice A.

Pela observação do gráfico, nota-se que tanto a expressão de LC3B quanto a expressão de p62 diminuíram significativamente no silenciamento de Nrf2. Para a proteína p62, há uma diferença significativa entre a exposição de DEP a 10µg/mL por 1h e as concentrações de DEP expostas a 10 e 50 µg/mL por 2h, reafirmando que DEP é capaz de aumentar a expressão dessa proteína. Sendo assim, a diminuição de p62 e LC3B observada nas células transfectadas pode ser atribuída à diminuição da expressão de Nrf2.

Além dos marcadores LC3B e p62, também foi testado o marcador Atg5 (Figura 18).

Figura 18 – Expressão de Atg5 após exposição a DEP e siRNA

Figura 18: Expressão de Atg5 em BEAS-2B expostas ao DEP nas concentrações de 10µg/mL e 50µg/mL, por 1h e 2hs, com transfecção de siRNA-Nrf2. A concentração relativa de RNAm dos marcadores foi analisada por RT-PCR e quantificada pelo método $\Delta\Delta CT$. O teste Kruskal-Wallis apontou diferença estatística entre os grupos transfectados com siRNA e os grupos não transfectados ($p=0,001$). O teste de comparação múltipla Pairwise apontou quais grupos apresentaram diferença entre si. Os símbolos “*”, “+”, “▲”, “■” e “o” representam, respectivamente, os grupos de células CTN, DEP10 1h, DEP50 1h, DEP10 2h, DEP50 2h. Acima dos boxplots dos grupos siRNA e siDEP, a lista de símbolos indica os grupos com os quais houve resultado estatisticamente significativo. Os valores de p para os pares estão em apêndice A.

A expressão de Atg5 não sofreu uma diminuição no grupo siRNA em relação a CTN. Contudo, a exposição ao DEP em células transfectadas induziu uma diminuição significativa de Atg5 em relação aos grupos não transfectados também expostos ao DEP. A diferença significativa entre os grupos siRNA e siDEP50 2h mostra que a maior concentração de DEP no maior tempo de exposição diminuíram a expressão de Atg5, sugerindo que o Nrf2 participa da regulação da expressão desta proteína. Nota-se ainda que a concentração de 10µg/mL de DEP após 2hs em células não transfectadas apresentou aumento do RNAm de Atg5, reafirmando a indução do DEP na via autofágica.

Os grupos também foram testados por Western Blotting, para análise da expressão de proteínas (Figuras 19 e 20).

Figura 19 – Resultado Western Blotting

Figura 19: Membrana de PVDF revelada por quimioluminescência. Os marcadores de autofagia p62 e LC3 I e II foram analisados junto com a expressão de Nrf2. A) Grupos de células transfectadas com Controle Negativo e expostas ao DEP nas concentrações de 10 e 50 μ g/mL por 1h e 2hs. B) Grupos de células transfectadas com siRNA para Nrf2 e expostas ao DEP nas concentrações de 10 e 50 μ g/mL por 1h e 2hs.

Figura 20 – Expressão de proteínas a partir do Western Blotting

Figura 20: A proporção da expressão de proteínas foi realizada a partir da normalização da expressão das proteínas de interesse por β actina e a razão do valor normalizado pelo valor do controle (CTN). Sendo assim, quando R (razão) > 1

considera-se que a proteína aumentou e $R < 1$, diminuiu. Todos os valores de R estão representados em forma de tabela no Apêndice B.

Observando os resultados da densitometria do Western Blotting é possível perceber que houve diminuição da proteína Nrf2 nas amostras tratadas com DEP, transfectadas e não transfectadas, com exceção do grupo siDEP10 1h, em que o valor de Nrf2 se manteve próximo de CTN ($R=1,03$). Para a expressão de p62 houve diminuição nos grupos não transfectados com siRNA, com exceção das amostras DEP50 2h ($R=0,95$) e DEP50 1h ($R=0,84$), em que os níveis de p62 se mantiveram próximos de CTN.

Em relação a LC3B, a forma LC3II da proteína é a forma funcional, que está localizada na membrana do autofagossomo. De acordo com os resultados, a expressão de LC3II se manteve próxima ao controle em células não transfectadas, exceto no grupo DEP10 1h em que o valor de R aumentou em relação aos demais ($R=1,43$). Já em relação às amostras transfectadas, os níveis de LC3II diminuíram no tratamento com siRNA e apresentaram um aumento discreto nos grupos tratados com DEP em comparação ao não tratado.

Por fim, foi realizada imunofluorescência para verificar a presença dos autofagossomos e de Nrf2 nos grupos estudados (figuras 21 e 22):

Figura 21 – Imunofluorescência para Controle Negativo e DEP

Figura 21: Imagens dos grupos não transfectados com o resultado do método de imunofluorescência para coloração de LC3B (autofagossomos) e Nrf2. As setas em branco na coluna LC3B e Merge indicam alguns pontos verdes mais intensos, correspondentes aos autofagossomos. As setas azuis na coluna Nrf2 indicam algumas marcações positivas, em que a fluorescência vermelha é mais intensa. Na última coluna, Merge é a sobreposição das imagens em verde, vermelho e DAPI. A coloração amarelada no Merge indica sobreposição das cores vermelha e verde e os pontos verdes mais intensos também correspondem a autofagossomos. As imagens foram

adquiridas no microscópio Olympus BX51 usando software ImageProPlus, no aumento de 40X e ampliadas 2X. O Merge foi realizado utilizando software ImageJ.

A coloração amarelada do Merge indica a sobreposição dos marcadores verde e vermelho, isto é, as duas proteínas estão presentes na célula, LC3B em verde e Nrf2 em vermelho.

Na figura 21, as fotos evidenciam os autofagossomos, marcados como pontos verdes brilhantes, tanto na coluna LC3B, quanto na coluna Merge. Os grupos DEP10 2h e DEP50 2h apresentam maior prevalência de pontos verdes em relação aos demais grupos, indicando que a autofagia está mais intensa nessas células. A fluorescência vermelha também está mais intensa no grupo exposto a DEP50 2h, por isso no Merge deste grupo é possível notar que a coloração amarelada deu lugar a um tom alaranjado, uma vez que o tom de vermelho do Nrf2 está mais intenso. Além disso, é possível perceber que alguns núcleos apresentam pontos vermelhos, sinalizando que o Nrf2 está ativo no núcleo nesse grupo.

Figura 22 – Imunofluorescência para siRNA e siDEP

Figura 22: Imagens dos grupos transfectados com siRNA com o resultado do método de imunofluorescência para coloração de LC3B (autofagossomos) e Nrf2. As setas em branco na coluna LC3B e Merge indicam alguns pontos verdes mais intensos, correspondentes aos autofagossomos. As setas azuis na coluna Nrf2 indicam algumas marcações positivas, em que a fluorescência vermelha é mais intensa. Na última coluna, Merge é a sobreposição das imagens em verde, vermelho e DAPI. A coloração amarelada no Merge indica sobreposição das cores vermelha e verde e os pontos verdes mais intensos também correspondem a autofagossomos. As imagens foram

adquiridas no microscópio Olympus BX51 usando software ImageProPlus, no aumento de 40X e ampliadas 2X. O Merge foi realizado utilizando software ImageJ.

Na figura 22, os grupos tratados com siRNA evidenciam a fluorescência vermelha menos intensa, resultado da supressão de Nrf2. Há pontos verdes positivos para LC3B em todos os grupos, contudo com menor intensidade quando comparadas aos grupos não transfectados.

6 DISCUSSÃO

Nesta dissertação, BEAS-2B foram expostas a DEP em diferentes tempos e concentrações para avaliar autofagia e resposta antioxidante. Pelos resultados, pode-se afirmar que DEP diminui a viabilidade celular e provoca a resposta das duas vias bioquímicas, aumentando a expressão dos marcadores de autofagia (LC3B, p62 e Atg5) e das proteínas responsáveis pela defesa antioxidante (Nrf2, NQO1 e HO-1). Além disso, o tratamento com siRNA mostrou que a autofagia é regulada positivamente pelo fator de transcrição Nrf2, indicando que há uma relação entre os dois mecanismos na manutenção da sobrevivência celular quando as BEAS-2B são expostas ao DEP.

As partículas provenientes da poluição atmosférica conhecidamente provocam estresse oxidativo nas vias aéreas e o mecanismo da autofagia durante esse processo vem sendo amplamente estudado. Os resultados deste estudo indicam que a concentração de 50µg/mL de DEP em 2h de exposição é capaz de ativar a via antioxidante, aumentando a expressão de Nrf2 e NQO1 (figura 14), e também a via autofágica, aumentando a expressão de p62 e LC3B (figura 15). Estes resultados corroboram com estudos similares encontrados na literatura, como o de Long et al. (2018), onde os autores demonstraram que a exposição de células de brônquios a MP_{2,5} induz à autofagia por meio da super expressão do RNAm de Atg5 e Beclin-1, aumento da razão entre a quantidade de proteína LC3I e LC3II e aumento de autofagossomos observados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Zhou et al. (2017) também expuseram células humanas endoteliais a MP_{2,5} nas concentrações de 0, 5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL e verificaram por MET que houve aumento de autofagossomos, acúmulo de LC3II por Western Blotting e diminuição da viabilidade celular. Bai et al. (2017) constataram que MP₁ (1µm) na concentração de 100µg/mL induz autofagia e estresse oxidativo intracelular em uma relação dose-resposta em células epiteliais alveolares tipo II. Os autores usaram ainda antioxidantes e quelantes como pré-tratamentos e comprovaram que o estresse oxidativo promovido pelas partículas era gerado pelos metais presentes em sua composição (Fe, Cu e Mn), além de que estes

pré-tratamentos também reduziram a indução de autofagia em relação às células tratadas apenas com MP₁.

Wang, Tsen e Chao (2017) mostraram que as partículas de DEP são internalizadas por células endoteliais humanas, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular e a expressão de SOD1, catalase e HO-1. Os autores expuseram as células a 500µg de DEP e analisaram o aumento da autofagia em relação ao tempo de exposição durante 0, 2, 4, 8, 12, e 24h. A equipe encontrou que as expressões de LC3B, Atg5-Atg12 e p62 aumentam após 4h de exposição, enquanto a formação dos autofagossomos se inicia só após 8h de exposição. Em 24h de exposição, as células apresentaram pico de formação de autofagossomos, sugerindo que há uma dependência entre tempo de exposição/aumento do fluxo autofágico. Lai et al. (2016), expuseram células de adenocarcinoma pulmonar da linhagem A549 a três tipos de partícula: DEP, *black carbon* (BC) e poeira urbana (PU). Os autores encontraram redução da viabilidade celular em A549 expostas a DEP e PU e aumento da oxidação de proteínas em células expostas a DEP, PU e BC. As partículas provocaram aumento da atividade proteossomal, principalmente DEP, e aumento significativo da autofagia, via conversão de LC3I para LC3II. Ao final do estudo, os autores concluíram que entre as três partículas, o DEP possui o maior potencial tóxico para as células.

Os resultados de MTT e Trypan Blue (figuras 10 e 11) deste trabalho evidenciam que o DEP é capaz de causar diminuição significativa da viabilidade celular, comprovando sua toxicidade. Diversos estudos apontam que a citotoxicidade provocada pela exposição ao DEP pode levar a eventos de morte celular, como o estudo de Zhou et al. (2015), em que a exposição de células de brônquios humanos a 100 µg/mL de DEP por 48h aumentou significativamente a porcentagem de células em apoptose inicial. Já os resultados de Matsuo et al. (2003) demonstraram que a exposição de células de brônquios humanos normais às concentrações de 25 e 100µg/mL de DEP, durante 1h, conduz principalmente à necrose, não à apoptose. Li et al. (2003) compararam células BEAS-2B e macrófagos após a exposição ao DEP e demonstraram que as células de brônquios são mais suscetíveis ao efeito do poluente, apresentando aumento significativo de células necróticas em

concentrações menores que 10µg/mL e aumento da taxa de morte celular com tempo maior que 2h de exposição. Em nível transcricional, Seriani et al. (2016) demonstraram que a exposição de BEAS-2B a 15µg/mL de DEP aumentou significativamente a expressão de caspase 3 e diminuiu a expressão de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase 1 e 2 (SOD1, SOD2).

O Nrf2 é um fator de transcrição que regula uma série de proteínas, cujas regiões promotoras possuem um sítio ARE, incluindo alguns genes relacionados à autofagia, como p62 e Atg5 (Pajares et al., 2016). Os resultados encontrados nesta dissertação indicam que a ativação de Nrf2 regula positivamente autofagia induzida por DEP, em nível transcricional, uma vez que os marcadores de autofagia diminuem consideravelmente quando há inibição de Nrf2 por siRNA. A degradação do RNAm de Nrf2 pelo siRNA provocou alteração na expressão dos marcadores autofágicos, diminuindo significativamente a quantidade relativa de RNAm de p62 e LC3B (figura 17), bem como diminuindo expressão relativa de proteína para p62 e LC3II, a forma funcional do LC3B (figuras 19 e 20). Por outro lado, nos testes com os controles, a indução de Nrf2 por sulforafano provocou aumento da expressão de LC3B e p62 (figura 12). Os resultados desses marcadores autofágicos, diminuindo quando Nrf2 está inibido ou aumentando quando Nrf2 está expresso, sugerem que o fator de transcrição controla positivamente a transcrição desses genes. Em relação à expressão de Atg5, a exposição a sulforafano aumentou significativamente a expressão desse gene (figura 12), enquanto que a exposição ao DEP aumentou o RNAm nas células não transfectadas na concentração de 10µg/mL, durante 2h de tratamento (figura 18). Para células transfectadas a expressão de Atg5 diminuiu na exposição a 50µg/mL de DEP por 2hs, mostrando que a ausência do Nrf2 provoca alteração na resposta desse gene quando há tratamento com DEP.

Quando analisadas as proteínas totais (figuras 19 e 20), percebe-se que os níveis de Nrf2 diminuem quando há exposição ao DEP. Analisando esse dado junto com o aumento de RNAm mostrado na figura 14, é possível inferir que as células estão em processo de produção *de novo* dessa proteína, assim como pode estar acontecendo com p62 na concentração de 10µg/mL durante 1h e 2h. Como a autofagia se trata de um processo dinâmico, é possível que a

proteína p62 esteja sendo degradada ou reciclada pelo próprio mecanismo de autofagia (Komatsu et al. 2011). O silenciamento de Nrf2 diminuiu os níveis de LC3II abaixo dos níveis basais, apesar de a exposição ao DEP induzir um leve aumento de LC3II em BEAS-2B siRNA tratadas com DEP em relação a BEAS-2B siRNA sem tratamento (figuras 19 e 20). Ou seja, pode-se inferir que o Nrf2 influencia na transcrição de proteínas relacionadas à autofagia (p62, LC3B e Atg5) e a supressão de Nrf2 induziu a uma diminuição dessas proteínas (p62 e LC3II) nas células.

Nos resultados de imunofluorescência, o tratamento com siRNA não eliminou a formação de autofagossomos, mas reduziu a frequência de pontos verdes, como pode ser visto ao comparar os grupos da figura 22 com os da figura 21. Os grupos não transfectados tratados com DEP por 2h apresentaram maior intensidade da cor vermelha e de pontos verdes, além de alguns núcleos marcados de vermelho-Nrf2, comprovando que DEP pode induzir autofagia e a via antioxidante ao mesmo tempo. No tratamento com DEP50, tanto 1h quanto 2h, é possível notar pelo Merge que a sobreposição das cores tem uma tendência ao vermelho, corroborando com os dados da figura 14, que indicam maior atividade de Nrf2 nessa concentração de DEP. Os grupos tratados com siRNA (figura 22) possuem uma coloração amarelada no Merge (resultado da sobreposição de LC3B – verde – com Nrf2 – vermelho) menos intensa que células não transfectadas. A autofagia que ainda é observada nas imagens por microscopia (figura 22) pode ser entendida como resquícios de proteínas que já estavam produzidas/ativas na célula antes da transfecção com siRNA, pois os baixos níveis de RNAm para LC3B, Atg5 e p62 não permitiram produção *de novo* dessas proteínas.

A relação entre as vias autofágica e antioxidante (mediada por Keap1-Nrf2) tem sido abordada em diversos estudos, com substâncias diferentes. Wang et al. (2018) transformaram BEAS-2B em células malignas por exposição ao cádmio para estudar a ativação de Nrf2 e o fluxo autofágico após tratamento com cádmio e sulforafano. Nas células transformadas havia deficiência na autofagia, acúmulo de p62 e super expressão de Nrf2. Contudo, o tratamento com sulforafano foi capaz de restaurar o fluxo autofágico e a expressão de Nrf2 a nível basal, nas células transformadas. Em BEAS-2B normais, sulforafano

promoveu ativação de Nrf2, aumento da autofagia e diminuição de ERO, evidenciando que sulforafano (e consequentemente, a ativação de Nrf2) possui um papel duplo na regulação da autofagia. Nos resultados da figura 12 nota-se que o tratamento de BEAS-2B com sulforafano foi capaz de aumentar a expressão de p62, LC3B e Atg5, sugerindo que a ativação de Nrf2 também pode influenciar nos níveis dos marcadores autofágicos em BEAS-2B normais, como é o caso deste estudo.

Son et al. (2017) também utilizaram BEAS-2B transformadas por níquel para estudar a relação entre Nrf2 e autofagia. De acordo com os resultados, o níquel aumentou os níveis de LC3-II em células transformadas mais que em BEAS-2B normais. Os autores encontraram um sítio de ligação ARE na região promotora da proteína Stat3, de uma importante família de indutores de citocinas e fator de crescimento em tumores. Em células transformadas, o nível basal de Stat3 estava aumentado em comparação às células normais. Em BEAS-2B normais, a super expressão de Stat3 via transfecção de um plasmídeo aumentou os níveis de LC3-II e autofagossomos, enquanto a inibição de Stat3 através de siRNA aboliu o aumento de LC3II, mesmo após exposição ao níquel. Em outro teste, os autores usaram siRNA para Nrf2 em células transformadas, resultando no esgotamento dos níveis de Stat3, indicando que Nrf2 tem uma participação importante na sensibilidade da autofagia e resistência à apoptose em células transformadas.

Shah et al. (2017) comprovaram que o arsênio induz a expressão de p62 *in vivo* e *in vitro*, usando pele de camundongos e células de queratinócitos humanos. Os autores concluíram que o Nrf2 é o fator de transcrição responsável pelo aumento da expressão de p62, uma vez que sua expressão foi suprimida com siRNA para Nrf2, mesmo quando havia exposição a arsênio. Reafirmando a relação positiva entre p62 e Nrf2, os autores trataram as células com siRNA para p62 e verificaram diminuição da expressão de proteínas como HO-1, NQO1 e GCLC (subunidade catalítica cisteína-glutamato ligase), cuja região promotora é ativada por Nrf2, indicando que Nrf2 depende de p62 para ser ativado e vice-versa.

Entretanto, em alguns casos, Nrf2 tem sido associado como um inibidor da autofagia. Lau et al. (2013), utilizaram diferentes linhagens celulares

humanas (BEAS-2B, 16HBE14o⁺ – brônquios, HEK293 – rim, NIH 3T3 – fibroblastos) e de camundongos (iBMK– rim) para testar a relação entre autofagia e o sistema Keap1-Nrf2 após exposição a arsênio. Os autores concluíram que o arsênio ativa Nrf2 ao provocar interrupção do fluxo autofágico, acumulando p62 e LC3B, resultando na ligação entre Keap1 e p62. Quando as células eram tratadas com sulforafano, os autofagossomos diminuía, sugerindo que nesse caso a ativação de Nrf2 era capaz de regular negativamente a autofagia.

Zhou et al. (2013) demonstraram que a exposição de BEAS-2B a extrato de fumaça de cigarro (EFC) aumenta a expressão de LC3I e LC3II, p62 e NQO1. Contudo, o aumento da expressão de Nrf2 via inibição de Keap1 provocou diminuição da expressão de LC3B, inibindo a autofagia, enquanto o uso de siRNA para Nrf2 restaurou os níveis de LC3I e II nas células expostas a EFC, assim como super expressão de p62 reduziu a autofagia, enquanto sua supressão aumentou os níveis de LC3B, sugerindo que nesse caso a ativação de Nrf2 regula negativamente a autofagia.

As divergências encontradas nessas pesquisas indicam que a influência do Nrf2 na via autofágica ainda não está completamente compreendida. Defesa antioxidante e autofagia estão ambas envolvidas na manutenção da homeostase e sobrevivência celular, mas podem interagir de maneiras diferentes dependendo do tratamento e nível de estresse ao qual a célula está sendo submetida. Kapuy et al. (2018) utilizaram um modelo matemático para simular a influência do Nrf2 na autofagia quando há diferentes níveis de estresse, levando em consideração a cinética das reações químicas e dados conseguidos na literatura. Nos resultados obtidos por essa ferramenta os autores concluíram que o Nrf2 é a molécula responsável pelo ajuste refinado da regulação da autofagia/sobrevivência celular ou indução de morte celular, dependendo do nível de estresse. De acordo com os autores, o Nrf2 pode regular a autofagia em situações de estresse oxidativo de forma semelhante a que ULK-1 (iniciador da autofagia) faz na escassez de nutrientes. Neste caso, Nrf2 atua interagindo com AMPK (Adenosina monofostato quinase) um dos principais indutores de autofagia, e mTOR (alvo da rampamicina em mamíferos), um dos principais inibidores de autofagia.

No caso deste trabalho, a exposição ao DEP a 50µg/mL causou diminuição de 25% da viabilidade celular (figura 11) e diminuição da atividade mitocondrial em 2hs de exposição (figura 10), o que indica que o nível de estresse ao qual a cultura de BEAS-2B está sendo submetida fica entre sobrevivência e início de morte celular, o que explica os altos índices de RNAm para HO-1, Nrf2, LC3B e p62 (figuras 14 e 15) e a regulação positiva que Nrf2 promove na autofagia, como sugerem os dados dos tratamentos com siRNA e siRNA+ DEP.

De acordo com a simulação de Kapuy et al. (2018) AMPK pode ativar o Nrf2 em níveis excessivos de estresse oxidativo, gerando resposta autofágica ainda mais intensa, pois Nrf2 também pode ativar a expressão de AMPK. Estes dados estão de acordo com os resultados de Joo et al. (2016) em que AMPK promoveu acúmulo de Nrf2 no núcleo de células da linhagem Hep-2 (humana epitelial tipo 2), enquanto a inibição de AMPK diminuiu o significativamente acúmulo nuclear de Nrf2. Segundo os resultados do estudo, AMPK promove o deslocamento do Nrf2 para o núcleo através da fosforilação do resíduo 558-serina em humanos e 550-serina em camundongos, localizados na região da molécula conhecida como NES (*Nuclear Export Signal*). Além disso, AMPK inibe GSK3β, uma quinase que catalisa exportação Nrf2 para o citoplasma, favorecendo a permanência do fator de transcrição no núcleo.

Apesar dos relatos recorrentes na literatura sobre a ativação do Nrf2 via interação de p62 e Keap1 (Komatsu et al., 2010; Ichimura et al., 2013; Taguchi et al., 2012), este não é o único mecanismo pelo qual o sistema Nrf2-Keap1 está conectado com a autofagia. A ativação tanto de Nrf2 quanto de autofagia por fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) pode ser uma nova relação que explica a regulação de ambas vias bioquímicas.

Os resultados de Deng et al. (2013) mostraram que o MP_{2,5} é capaz de provocar estresse oxidativo nas células e ativar a via Nrf2 pela indução da via PI3/Akt em células A549. Os autores comprovaram que o MP aumenta a expressão de NQO1, HO-1 e GCLC. Além disso, o tratamento com um inibidor da via do PI3K diminuiu a atividade nuclear de Nrf2, sugerindo que a via PI3K está envolvida na ativação de Nrf2. An et al. (2018) expuseram células A549 a BC para verificar a indução de autofagia, estresse oxidativo e apoptose. O

resultado do estudo apontou que a exposição aumentou os níveis de LC3 I e II, Atgs 3, 5, 7 e 12 e Beclin-1; dobrou os níveis de HO-1, proteína ativada por Nrf2; e aumentou a taxa de apoptose e a expressão de Bax, além de diminuir a expressão de Bcl-2. Ainda nesse estudo, os autores apontaram que pré-tratar as células com antioxidante reduziu a expressão de LC3B e a taxa de apoptose, indicando que o estresse oxidativo possui papel duplo na exposição a BC ao induzir as duas vias, antioxidante e autofágica. O pré-tratamento com bafilomicina reduziu a expressão de proteínas relacionadas à apoptose e aumentou a expressão de LC3B, sugerindo que a autofagia pode inibir a apoptose na exposição a BC. Por fim, os autores mostraram que BC induz a autofagia via fosforilação de mTOR por PI3K/Akt, enquanto o tratamento com inibidor de PI3K/Akt reduziu a taxa de apoptose e autofagia em A549 tratadas com BC, sugerindo que PI3K/Akt pode estar relacionado com as duas vias.

Sendo assim, a regulação positiva ou negativa da autofagia e da via antioxidante pode ser atribuída à natureza do estímulo, no caso deste trabalho, ao DEP. Na composição do DEP há oxidantes e pró-oxidantes, principalmente metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), que podem levar a formação de radicais livres e ao estresse oxidativo no sistema respiratório, levando à inflamação e alteração no parênquima dos pulmões (Laks et al., 2008). Seriani et al. (2015) expuseram células de traqueias de camundongo a diferentes frações do DEP. A fração de DEP tratado com o solvente metanol, rico em Fe, Cd e Cu, diminuiu a produção de muco neutro e aumentou a produção de muco ácido. Já a amostra tratada com hexano, rica em Ni, S, Cd, Cr e Cu, provocou vacuolização do epitélio, que pode indicar início de apoptose celular.

Entretanto, no Brasil não há regulamentação para controlar a especificamente a emissão de metais e HPA's no ar. Recentemente, Brito et al. (2018) destacaram que a maioria das substâncias tóxicas no ar são provenientes do material particulado da exaustão do diesel, o que reflete a necessidade de uma padronização para os valores de HPA encontrados no ar. Atualmente, o órgão responsável pela verificação é a CETESB, e há um padrão de valores orientadores para a quantidade máxima recomendada de HPA na

água e no solo, mas até o momento deste estudo, não há nenhuma regulação para estes compostos no ar.

A autofagia provocada pelo estresse oxidativo é conhecidamente um dos fatores responsáveis pelo agravamento de doenças respiratórias. Martin et al. (2012) realizou um estudo de coorte com 312 crianças asmáticas da região de Cincinnati, Ohio, EUA, e identificaram duas variações de gene Atg5 associados com asma e cujos fatores de transcrição também estão associados a asma (Stat1 e C-Fos). Mediante a coleta de células epiteliais nasais dos pacientes, os autores verificaram que a expressão de RNAm de Atg5 estava aumentada durante um ataque agudo de asma. Tang et al. (2017) verificaram aumento de autofagia em células epiteliais alveolares de ratos modelo DPOC, devido estresse do retículo endoplasmático (ERE). Em comparação ao grupo controle, ratos DPOC apresentavam níveis elevados de LC3-II, Beclin-1, Atg5, Atg7, Caspase12, e Caspase-3, enquanto níveis de p62 estavam reduzidos. Havia diminuição de apoptose em ratos tratados com inibidores de autofagia, indicando que a indução exagerada de autofagia promovida por ERE era uma das causas de apoptose em ratos DPOC. Um dos inibidores usados pelos autores, 3-MA (3 metiladenina) pertence a um grupo de inibidores PI3K, um componente essencial para a indução de autofagia.

Patel et al. (2012) apontaram que a autofagia está reduzida nos tecidos do pulmão de pacientes com fibrose pulmonar idiopática (FPI), sugerindo que a expressão elevada de TGF- β 1 é responsável por esse desequilíbrio. O tratamento de modelo animal com indutor de autofagia, rampamicina, diminuiu o número de fibrose nos pulmões, indicando que a autofagia possui um papel protetor na prevenção de FPI. Na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), existe a possibilidade de que a autofagia exerça um efeito proinflamatório (Levine et al., 2011). O aumento da autofagia em células epiteliais tem um efeito deletério pela promoção de morte celular, desenvolvimento de enfisema e prejuízo da autofagia em macrófagos alveolares, que inviabiliza o transporte eficiente de patógenos para o lisossomo, resultando em alta propensão de infecções agudas bacterianas (Margaritopoulos et al., 2013).

Sendo assim, o conhecimento sobre o processo autofágico em células das vias aéreas expostas à poluição atmosférica se faz necessário para o

entendimento de como as doenças respiratórias se estabelecem e a partir disso traçar estratégias de tratamento e promover políticas públicas que visem melhorar a qualidade do ar.

7 CONCLUSÃO

- Verificamos que existe a participação de Nrf2 na autofagia
- Verificamos que a exposição ao DEP interfere nas vias autofágicas e antioxidantes através do Nrf2;
- Verificamos que a quase ausência de Nrf2 interfere na autofagia de BEAS-2B
- Verificamos que as vias de Nrf2 estão relacionadas a autofagia através do quase silenciamento de Nrf2 que diminuiu a expressão de LC3II, Atg5 e p62.

Este trabalho mostrou que a defesa antioxidante promovida por Nrf2 e o mecanismo da autofagia atuam em conjunto em células BEAS-2B ao particulado da exaustão de diesel. Contudo, na literatura há dados conflitantes sobre como esses mecanismos se relacionam, o que leva à hipótese de que a substância que está sendo utilizada e o nível de estresse na linhagem celular induzida é determinante para a relação entre essas vias. Para testar esta hipótese são necessários mais experimentos para determinar se alguma fração ou algum componente específico do DEP é responsável pelo estresse oxidativo e pela relação positiva entre Nrf2 e autofagia apresentada nestes resultados.

Referências

- An J, Zhou Q, Wu M, Wang L, Zhong Y, Feng J, Shang Y, Chen Y. Interactions between oxidative stress, autophagy and apoptosis in A549 cells treated with aged black carbon. *Toxicol In Vitro*. 2018 Set 18;54:67-74.
- Andreau K, Leroux M, Bouharrou A. Health and Cellular Impacts of Air Pollutants: From Cytoprotection to Cytotoxicity. *Biochem Res Int*. 2012 Abr; 2012:1-18.
- Arbex MA, Santos UP, Martins LC, Saldiva PHN, Pereira LAA, Braga ALF. A poluição do ar e o sistema respiratório. *J Bras Pneumol*. 2012;38(5):643-655.
- Bai R, Guan L, Zhang W, Xu J, Rui W, Zhang F, Ding W. Comparative study of the effects of PM1-induced oxidative stress on autophagy and surfactant protein B and C expressions in lung alveolar type II epithelial MLE-12 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Dez;1860(12):2782-92.
- Baird L, Swift S, Llères D, Dinkova-Kostova AT. Monitoring Keap1-Nrf2 interactions in single live cells. *Biotechnol Adv*. 2014 Nov;32(6):1133-44.
- Bianchi MLP, Atunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr*. 1999 12(2):123-130.
- Braun S, Apel LG, Schmal M. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas à diesel: a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. *Quim. Nova*. 2004 Jun;27(3):472-482.
- Brito J, Carbone S, A Monteiro Dos Santos D, Dominutti P, de Oliveira Alves N, V Rizzo L, Artaxo P. Disentangling vehicular emission impact on urban air pollution using ethanol as a tracer. *Sci Rep*. 2018 Jul 16;8(1):10679.
- Cançado JED, Braga A, Pereira LAA, Arbex, MA, Saldiva PHN, Santos UP. Repercussões clínicas da exposição à poluição atmosférica. *J Bras Pneumol*. 2006 maio;32 Suppl 2: 6-11
- Carvalho-Oliveira R, Saiki M, Pires-Neto RC, Lorenzi-Filho G, Macchione M, Saldiva PH. Anti-oxidants reduce the acute adverse effects of residual oil fly ash on the frog palate mucociliary epithelium. *Environ Res*. 2005 Jul;98(3):349-54.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Dados Emissões Veiculares de 2016. Disponível em: <http://veicular.cetesb.sp.gov.br/relatorios-e-publicacoes/>.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Qualidade do Ar: Poluentes. Disponível em: <http://ar.cetesb.sp.gov.br/poluentes/>.

Cormier SA, Lomnicki S, Backes W, Dellinger B. Origin and health impacts of emissions of toxic by-products and fine particles from combustion and thermal treatment of hazardous wastes and materials. *Environ Health Perspect.* 2006 Jun;114(6):810-7.

de Brito JM, Mauad T, Cavaleiro GF, Yoshizaki K, de André PA, Lichtenfels AJFC, Guimarães ET, Rivero DHRF, Antonangelo L, Oliveira LB, Pedrosa LRM, Macchione M, Saldiva PHN. Acute exposure to diesel and sewage biodiesel exhaust causes pulmonary and systemic inflammation in mice. *Sci Total Environ.* 2018 Jul 1;628-629:1223-1233.

Deng X, Rui W, Zhang F, Ding W. PM_{2.5} induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell Biol Toxicol.* 2013 Jun;29(3):143-57.

Eggle AL, Small E, Hannink M, Mesecar AD. Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1. *Biochem J.* 2009 Jul;422(1):171-80.

Freitas CU, Junger W, Leon AP, Grimaldi R, Silva MAFR, Gouveia N. Poluição do ar em cidades brasileiras: selecionando indicadores de impacto na saúde para fins de vigilância. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 2013 Jul/Set;22(3):445-454.

Hale AN, Ledbetter DJ, Gawriluk TR, Rucker EB. Autophagy: regulation and role in development. *Autophagy.* 2013 Jul;9(7):951-72.

Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, Saito T, Yang Y, Kouno T, Fukutomi T, Hoshii T, Hirao A, Takagi K, Mizushima T, Motohashi H, Lee MS, Yoshimori T, Tanaka K, Yamamoto M, Komatsu M. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell.* 2013 Sep 12;51(5):618-31.

Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jul 18;236(2):313-22.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 1999 Jan;13(1):76-86.

Jain AK, Bloom DA, Jaiswal AK. Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J Biol Chem.* 2017 Feb 3;292(5):2052

Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy.* 2011 Mar;7(3):279-96.

Joo MS, Kim WD, Lee KY, Kim JH, Koo JH, Kim SG. AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550. *Mol Cell Biol*. 2016 Jun 29;36(14):1931-42.

Junqueira LC; Carneiro J. *Histologia Básica: texto e atlas*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol*. 2013 Jan;18(1):45-9.

Kapuy O, Papp D, Vellai T, Bánhegyi G, Korcsmáros T. Systems-Level Feedbacks of NRF2 Controlling Autophagy upon Oxidative Stress Response. *Antioxidants (Basel)*. 2018 Mar;7(3):39.

Keum YS. Regulation of Nrf2-Mediated Phase II Detoxification and Anti-oxidant Genes. *Biomol Ther (Seoul)*. 2012 Mar;20(2):144-51.

Klionsky DJ et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222.

Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol*. 2010 Mar;12(3):213-23.

Künzli N, Perez L, Rapp R. Air quality and health. Lausanne: European Respiratory Society; 2010. Disponível em <https://www.ersnet.org/pdf/publications/air-quality-ENG.pdf>.

Lai CH, Lee CN, Bai KJ, Yang YL, Chuang KJ, Wu SM, Chuang HC2. Protein oxidation and degradation caused by particulate matter. *Sci Rep*. 2016 Set;6:33727.

Laks D, Oliveira RC, de Andre PA, Macchione M, Lemos M, Faffe D, Saldiva PH, Zin WA. Composition of diesel particles influences acute pulmonary toxicity: An experimental study in mice. *Inhal Toxicol*. 2008 20:1037–42.

Lau A, Wang XJ, Zhao F, Villeneuve NF, Wu T, Jiang T, Sun Z, White E, Zhang DD. A Noncanonical Mechanism of Nrf2 Activation by Autophagy Deficiency: Direct Interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol*. 2010 Jul; 30(13): 3275–3285.

Lau A, Zheng Y, Tao S, Wang H, Whitman SA, White E, Zhang DD. Arsenic inhibits autophagic flux, activating the Nrf2-Keap1 pathway in a p62-dependent manner. *Mol Cell Biol*. 2013 Jun;33(12):2436-46.

Lee YJ, Lee SH. Sulforaphane induces antioxidative and antiproliferative responses by generating reactive oxygen species in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *J Korean Med Sci*. 2011 Nov;26(11):1474-82.

Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011 Jan 20;469(7330):323-35.

Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect*. 2003 Apr;111(4):455-60.

Lima TM, Kazama CM, Koczulla AR, Hiemstra PS, Macchione M, Fernandes AL, Santos Ude P, Bueno-Garcia ML, Zanetta DM, André CD, Saldiva PH, Nakagawa NK. pH in exhaled breath condensate and nasal lavage as a biomarker of air pollution-related inflammation in street traffic-controllers and office-workers. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013 Dec; 68(12):1488-94.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001 Dez;25(4):402-8.

Long F, Jiang H, Yi H, Su L, Sun J. Particulate matter 2.5 induced bronchial epithelial cell injury via activation of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase-mediated autophagy. *J Cell Biochem*. 2018 Set.

Lopes JA, Noronha JA, Mafort TT. Mecanismos de defesa do aparelho respiratório. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2010 Jul/Dez;9(2):10-15.

Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013 53:401-26.

Macchione M. Efeitos de oxidantes, H₂O₂ e material particulado urbano (PM₁₀) sobre o epitélio mucociliado [dissertação]. São Paulo: Instituto de Química da Universidade de São Paulo; 1998.

Maciel M, Hernández-Barrientos D, Herrera I, Selman M, Pardo A, Cabrera S. Impaired autophagic activity and ATG4B deficiency are associated with increased endoplasmic reticulum stress-induced lung injury. *Aging (Albany NY)*. 2018 Aug 27;10(8):2098-2112.

Madl P. Exposure to Nano-Sized Particles and the Emergence of Contemporary Diseases with a Focus on Epigenetics. In: Khare M, editor. *Air Pollution: Monitoring, Modelling and Health*. InTech; 2013. 305-36. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/air-pollution-monitoring-modellingand-health/airborne-particles-and-the-emergence-of-contemporary-diseases>.

Malaviya R, Laskin JD, Laskin DL. Oxidative stress-induced autophagy: role in pulmonary toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014 Mar 1;275(2):145-51.

Margaritopoulos GA, Tsitoura E, Tzanakis N, Spandidos DA, Siafakas NM, Sourvinos G, Antoniou KM. Self-eating: friend or foe? The emerging role of autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *Biomed. Res. Int.* 2013;1–8.

Martin LJ, Gupta , Jyothula SS, Butsch Kovacic M, Biagini Myers JM, Patterson TL, Ericksen MB, He H, Gibson AM, Baye TM, Amirsetty S, Tsoras AM, Sha Y, Eissa NT, Hershey GK. Functional variant in the autophagy-related 5 gene promotor is associated with childhood asthma. *PLoS One.* 2012;7(4):e33454.

Matsuo M, Shimada T, Uenishi R, Sasaki N, Sagai M. Diesel exhaust particle-induced cell death of cultured normal human bronchial epithelial cells. *Biol Pharm Bull.* 2003 Apr;26(4):438-47.

Mertens TCJ, van der Does AM, Kistemaker LE, Ninaber DK, Taube C, Hiemstra PS. Cigarette smoke differentially affects IL-13-induced gene expression in human airway epithelial cells. *Physiol Rep.* 2017 Jul;5(13):13347.

Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol.* 2012 Dec 26;2:200.

Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011 Nov 11;147(4):728-41.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Nakagawa, N. K.; Barnababe, V. *Fisioterapia do Sistema Respiratório*. 1. ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2006.

Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2009 Maio;284(20):13291-5.

Niture SK, Kaspar JW, Shen J, Jaiswal AK. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Apr;244(1):37-42.

Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005 Jul;113(7):823-39.

Pajares M, Jiménez-Moreno NGarcía-Yagüe ÁJ, Escoll M, de Ceballos ML, Van Leuven F, Rábano A, Yamamoto M, Rojo AI, Cuadrado A. Transcription factor NFE2L2/NRF2 is a regulator of macroautophagy genes. *Autophagy.* 2016 Out 2;12(10):1902-1916.

Patel AS, Lin L, Geyer A, Haspel JA, An CH, Cao J, Rosas IO, Morse D. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 2012; 7:e41394.

Rodríguez-Cotto RI, Ortiz-Martínez MG, Rivera-Ramírez E, Mateus VL, Amaral BS, Jiménez-Vélez BD, Gioda A. Particle pollution in Rio de Janeiro, Brazil: increase and decrease of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 in human lung cells. *Environ Pollut*. 2014 Nov;194:112-20.

Ryter SW, Choi AM. Autophagy in the lung. *Proc Am Thorac Soc*. 2010 Feb;7(1):13-21.

Sagai M, Saito H, Ichinose T, Kodama M, Mori Y. Biological effects of diesel exhaust particles. I. In vitro production of superoxide and in vivo toxicity in mouse. *Free Radic Biol Med*. 1993 Jan;14(1):37-47.

Salvador M, Henriques JAP. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. 1 ed. Canoas: Ulbra; 2004.

Seeni I, Ha S, Nobles C, Liu D, Sherman S, Mendola P Air pollution exposure during pregnancy: maternal asthma and neonatal respiratory outcomes. *Epidemiol*. 2018 Set;28(9):612-618.

Seriani R, de Souza CE, Krempel PG, Frias DP, Matsuda M, Correia AT, Ferreira MZ, Alencar AM, Negri EM, Saldiva PH, Mauad T, Macchione M. Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to diesel exhaust particles exhibit alterations in cell rheology and cytotoxicity associated with decrease in antioxidant defenses and imbalance in pro- and anti-apoptotic gene expression. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016 May;23(10):9862-70.

Seriani R, Junqueira MS, Carvalho-Sousa CE, Arruda AC, Martinez D, Alencar AM, Garippo AL, Brito JM, Martins MA, Saldiva PH, 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. *Exp Toxicol Pathol*. 2015 Abr;67(4):323-9.

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 da Universidade de São Paulo; 2014.

Shah P, Trinh E, Qiang L, Xie L, Hu WY, Prins GS, Pi J, He YY. Arsenic Induces p62 Expression to Form a Positive Feedback Loop with Nrf2 in Human Epidermal Keratinocytes: Implications for Preventing Arsenic-Induced Skin Cancer. *Molecules*. 2017 Jan 24;22(2):194.

Shinyashiki M1, Eiguren-Fernandez A, Schmitz DA, Di Stefano E, Li N, Linak WP, Cho SH, Froines JR, Cho AK. Electrophilic and redox properties of diesel exhaust particles. *Environ Res*. 2009 Abr;109(3):239-44.

Silverthorn DU, Johnson BR, Ober WC, Garrison, CW, Silverthorn AC. *Fisiologia Humana: uma abordagem integrada*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

Son YO, Pratheeshkumar P, Divya SP, Zhang Z, Shi X. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 enhances carcinogenesis by suppressing apoptosis and promoting autophagy in nickel-transformed cells. *J Biol Chem*. 2017 Maio 19;292(20):8315-8330

Steiner S, Bisig C, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. Diesel exhaust: current knowledge of adverse effects and underlying cellular mechanisms. *Arch Toxicol*. 2016 Jul;90(7):1541-53.

Stenfors N, Nordenhäll C, Salvi SS, Mudway I, Söderberg M, Blomberg A, Helleday R, Levin JO, Holgate ST, Kelly FJ, Frew AJ, Sandström T. Different airway inflammatory responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. *Eur Respir J*. 2004 Jan;23(1):82-6.

Su S, Yang X, Omiecinski CJ. Intronic DNA elements regulate Nrf2 chemical responsiveness of the human microsomal epoxide hydrolase gene (EPHX1) through a far upstream alternative promoter. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1839(6):493-505.

Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M, Ishii T, Unno M, Akaike T, Motohashi H, Yamamoto M. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Ago 21;109(34):13561-6.

Takizawa H. Impact of air pollution on allergic diseases. *Korean J Intern Med*. 2011 Set;26(3):262-73.

Tang Y, Cai QH1, Wang YJ, Fan SH, Zhang ZF, Xiao MQ, Zhu JY, Wu DM, Lu J, Zheng YL. Protective effect of autophagy on endoplasmic reticulum stress induced apoptosis of alveolar epithelial cells in rat models of COPD. *Biosci Rep*. 2017 Nov 15;37(6).

Tortora GJ, Derrickson B. *Corpo Humano: fundamentos de anatomia e fisiologia*. 10.ed. Cidade: Guanabara Koogan, 2005.

Trindade SHK. Efeito das diferentes frações do material particulado proveniente da emissão de motores movidos a óleo diesel sobre o epitélio do palato da rã [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Vallero, D. *Fundamentals of air pollution*. 4 ed. Oxford: Elsevier; 2008.

Vasconcellos PC, Souza DZ, Magalhães D, Da Rocha GO. Seasonal Variation of n-Alkanes and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Concentrations in PM10 Samples Collected at Urban Sites of São Paulo State, Brazil. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2011 Nov 222;(1-4):325-336.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova* 2007 Set/Out;30(5): 1323- 1338.

Wang JS, Tseng CY, Chao MW. Diesel Exhaust Particles Contribute to Endothelial Apoptosis via Autophagy Pathway. *Toxicol Sci*. 2017 Mar;156(1):72-83.

Wang Y, Mandal AK, Son YO, Pratheeshkumar P, Wise JTF, Wang L, Zhang Z, Shi X, Chen Z. Roles of ROS, Nrf2, and autophagy in cadmium-carcinogenesis and its prevention by sulforaphane. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018 Jun;353:23-30. [of print]

Wichmann HE. Diesel Exhaust Particles. *Inhalation Toxicology*. 2007;19(1 Suppl):241-244.

Zhou F, Li S, Jia W, Lv G, Song C, Kang C, Zhang Q. Effects of diesel exhaust particles on microRNA-21 in human bronchial epithelial cells and potential carcinogenic mechanisms. *Mol Med Rep*. 2015 Aug;12(2):2329-35.

Zhou Z, Shao T, Qin M, Miao X, Chang Y, Sheng W, Wu F, Yu Y. J The effects of autophagy on vascular endothelial cells induced by airborne PM2.5. *Environ Sci (China)*. 2018 Apr;66:182-187.

Zhu L, Barrett EC, Xu Y, Liu Z, Manoharan A, Chen Y. Regulation of Cigarette Smoke (CS)-Induced Autophagy by Nrf2. *PLoS One*. 2013 Apr 9;8(4):e55695.

APÊNDICE A – Valores de p

As tabelas de 7 a 11 representam os valores de p significativos apontados pelo teste de comparação múltipla “Pairwise”.

Tabela 7 – Valores significativos de p para expressão de Nrf2

Expressão de Nrf2	
Grupos pareados	Valor de p
siRNA vs CTN	0,027
siRNA vs DEP50 1h	0,011
siRNA vs DEP10 2h	0,001
siRNA vs DEP50 2h	0,001
siDEP10 1h vs CTN	0,007
siDEP10 1h vs DEP10 1h	0,018
siDEP10 1h vs DEP50 1h	0,002
siDEP10 1h vs DEP10 2h	<0,001
siDEP10 1h vs DEP50 2h	<0,001
siDEP50 1h vs CTN	0,018
siDEP50 1h vs DEP10 1h	0,043
siDEP50 1h vs DEP50 1h	0,007
siDEP50 1h vs DEP10 2h	<0,001
siDEP50 1h vs DEP50 2h	0,001
siDEP10 2h vs DEP10 2h	0,022
siDEP10 2h vs DEP50 2h	0,023
siDEP50 2h vs DEP10 2h	0,01
siDEP50 2h vs DEP50 2h	0,011

Tabela 8 – Valores significativos de p para expressão de HO-1

Expressão de HO-1	
Grupos pareados	Valor de p
siRNA vs DEP10 2h	0,026
siRNA vs DEP50 2h	0,007
siDEP10 1h vs CTN	0,008
siDEP10 1h vs DEP10 1h	0,001
siDEP10 1h vs DEP50 1h	0,005
siDEP10 1h vs DEP10 2h	<0,001
siDEP10 1h vs DEP50 2h	<0,001
siDEP50 1h vs CTN	0,031
siDEP50 1h vs DEP10 1h	0,006
siDEP50 1h vs DEP50 1h	0,021
siDEP50 1h vs DEP10 2h	0,002
siDEP50 1h vs DEP50 2h	<0,001
siDEP10 2h vs DEP50 2h	0,016
siDEP50 2h vs DEP10 1h	0,013
siDEP50 2h vs DEP50 1h	0,038
siDEP50 2h vs DEP10 2h	0,05
siDEP50 2h vs DEP50 2h	0,001

Tabela 9 – Valores significativos de p para expressão de LC3B

Expressão de LC3B	
Grupos pareados	Valor de p
siRNA vs DEP50 1h	0,005
siRNA vs DEP10 2h	0,034
siDEP10 1h vs CTN	0,013
siDEP10 1h vs DEP10 1h	0,031
siDEP10 1h vs DEP50 1h	<0,001
siDEP10 1h vs DEP10 2h	0,004
siDEP10 1h vs DEP50 2h	0,008
siDEP50 1h vs CTN	0,024
siDEP50 1h vs DEP50 1h	0,001
siDEP50 1h vs DEP10 2h	0,008
siDEP50 1h vs DEP50 2h	0,016
siDEP10 2h vs CTN	0,015
siDEP10 2h vs DEP10 1h	0,036
siDEP10 2h vs DEP50 1h	<0,001
siDEP10 2h vs DEP10 2h	0,005
siDEP10 2h vs DEP50 2h	0,009
siDEP50 2h vs DEP50 1h	0,003
siDEP50 2h vs DEP10 2h	0,023
siDEP50 2h vs DEP50 2h	0,04

Tabela 10 – Valores significativos de p para expressão de p62

Expressão de p62	
Grupos pareados	Valor de p
siRNA vs DEP50 1h	0,01
siRNA vs DEP10 2h	0,001
siRNA vs DEP50 2h	0,001
siDEP10 1h vs DEP50 1h	0,006
siDEP10 1h vs DEP10 2h	0,001
siDEP10 1h vs DEP50 2h	0,001
siDEP50 1h vs DEP50 1h	0,025
siDEP50 1h vs DEP10 2h	0,004
siDEP50 1h vs DEP50 2h	0,004
siDEP10 2h vs DEP10 2h	0,016
siDEP10 2h vs DEP50 2h	0,017
siDEP50 2h vs DEP10 2h	0,013
siDEP50 2h vs DEP50 2h	0,014
DEP10 1h vs DEP10 2h	0,029
DEP10 1h vs DEP50 2h	0,032

Tabela 11 – Valores significativos de p para expressão de Atg5

Expressão de Atg5	
Grupos pareados	Valor de p
siDEP10 1h vs CTN	0,007
siDEP10 1h vs DEP50 1h	0,046
siDEP10 1h vs DEP10 2h	<0,001
siDEP10 1h vs DEP50 2h	0,019
siDEP50 1h vs DEP10 2h	0,009
siDEP10 2h vs CTN	0,037
siDEP10 2h vs DEP10 2h	0,004
siDEP50 2h vs CTN	0,002
siDEP50 2h vs DEP50 1h	0,014
siDEP50 2h vs DEP10 2h	<0,001
siDEP50 2h vs DEP50 2h	0,005
DEP10 1h vs DEP10 2h	0,007
siDEP50 2h vs siRNA	0,024

APÊNDICE B – Valores de R

A tabela 12 a seguir representa as razões amostra/controle da área das bandas das proteínas Nrf2, p62, LC3I e LC3II normalizadas por β - actina.

Tabela 12: Valores de R

	Nrf2	p62	LC3I	LC3II
CTN	1,00	1,00	1,00	1,00
DEP10 1h	0,55	0,34	0,92	1,43
DEP50 1h	0,34	0,84	0,77	1,07
DEP10 2h	0,41	0,63	0,94	1,03
DEP50 2h	0,45	0,96	0,83	0,93
siRNA	0,56	0,67	0,17	0,21
siDEP10 1h	1,03	0,59	0,09	0,62
siDEP50 1h	0,54	0,43	0,54	0,40
siDEP10 2h	0,35	0,43	0,40	0,46
siDEP50 2h	0,18	0,09	0,49	0,71