Natália de Souza Xavier Costa

**Efeito da exposição ao material particulado atmosférico no
desenvolvimento da lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz
da Silva

São Paulo
2015

Natália de Souza Xavier Costa

**Efeito da exposição ao material particulado atmosférico no
desenvolvimento da lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz
da Silva

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

|\$reprodução autorizada pelo autor

Costa, Natália de Souza Xavier

Efeito da exposição ao material particulado atmosférico no desenvolvimento da lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS / Natália de Souza Xavier Costa. -- São Paulo, 2015.

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

Orientador: Luiz Fernando Ferraz da Silva.

Descritores: 1.Lesão pulmonar aguda 2.Síndrome do desconforto respiratório agudo 3.Poluição do ar 4.Material particulado 5.Inflamação 6.Citocinas

USP/FM/DBD-245/15

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho:

Aos meus pais, Pedro e Sônia, por todas as palavras de carinho, apoio e incentivo durante todo o processo e a minha irmã, Mariana também por sempre me incentivar e por nos dar o maior presente que poderíamos ter este ano, minha sobrinha Antonella.

Ao meu marido, Danilo, por todo amor, compreensão, companheirismo, incentivos, apoio, ajuda e principalmente paciência.

Ao meu orientador Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, a quem admiro muito, pela oportunidade de realizar meu mestrado, por todos os ensinamentos e incentivos, pela confiança depositada em mim, disponibilidade e por toda assistência durante estes anos.

À Dr^a Mariana Matera Veras por todas as oportunidades que me propiciou desde o começo, pela confiança, pelos inúmeros ensinamentos, mas principalmente pela amizade.

Aos amigos Gabriel, Luciano e Adair não só pela ajuda em todas as etapas deste projeto, mas também por todo apoio, incentivos e principalmente pela amizade de vocês. Sem vocês a execução deste trabalho seria mais difícil e com certeza muito mais chata.

Aos amigos Felipe, Jéssica, Ana, Lígia e Jaqueline por sempre estarem na torcida por mim, entenderem por muitas vezes minha ausência e pela amizade de tantos anos.

À Prof^a. Dr^a. Marisa Dolhnikoff pelos ensinamentos e por toda ajuda neste projeto, desde a idealização até a discussão dos resultados.

Ao Profº. Paulo Saldiva por todos os ensinamentos.

A Fátima Stangueti pelo carinho e amizade.

À Drª Susan Ribeiro pela ajuda com o CBA, pelos ensinamentos e amizade e ao Professor Éspér Kallas por ceder todo suporte necessário para estas análises.

Ao Drº Marco Martins pela ajuda com o concentrador de partículas ambientais e análise dos filtros.

À Professora Dulcinéia Saes Parra Abdalla e Marcela Frota pela ajuda com as análises de PCR em tempo real.

À Lia Junqueira Marçal e Prof. Leila Antonangelo pela ajuda com os hemogramas.

À Ângela Batista Gomes dos Santos e Maria Cristina Rodrigues Medeiros pela confecção das lâminas de imunohistoquímica.

Aos técnicos do laboratório de histologia do departamento de patologia, principalmente à Kely Soares, pela ajuda e pelos ensinamentos.

Aos funcionários do museu do departamento de patologia, Ana, Carlos e Reginaldo pelas centenas de lâminas escaneadas.

Agradeço pelo apoio financeiro à FAPESP (2012/23334-9), ao Cnpq (479679/2012-6), ao LIM 05 e INAIRA.

EPÍGRAFE

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive. ”*

Ricardo Reis (Fernando Pessoa)

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Lista de símbolos

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	26
2. REVISÃO DE LITERATURA	30
2.1. POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E EFEITOS SOBRE O SISTEMA RESPIRATÓRIO	30
2.2. SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO (SDRA) E LESÃO PULMONAR AGUDA (LPA).	37
2.3 MODELOS ANIMAIS DE LPA/SDRA	41
2.4 LPA/SDRA E A POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA	46
3. JUSTIFICATIVA.....	47
4. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	48
4.1 OBJETIVOS GERAIS	48
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	49
6. MATERIAIS E MÉTODOS	50
6.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS	50
6.2 EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS E CARACTERIZAÇÃO DOS POLUENTES	52
6.2.1 <i>protocolo de exposição</i>	53
6.2.2. <i>Caracterização da exposição</i>	53
6.3 PROTOCOLO DE NEBULIZAÇÃO.....	54
6.3.1. <i>Dose e tempo de nebulização</i>	54
6.4 COLETA	55
6.4.1 <i>Pulmões</i>	55
6.4.2 <i>Sangue e plasma</i>	56

6.4.3 Demais órgãos.....	57
6.5 PROTOCOLO DO HEMOGRAMA COMPLETO	57
6.6 PROTOCOLOS DE ANÁLISE DO SORO SANGUÍNEO E DO LAVADO BRONCO-ALVEOLAR	57
6.7 AVALIAÇÃO ESTEREOLÓGICA DO PULMÃO	61
6.7.1 amostragem e inclusão.....	62
6.7.2 volume pulmonar (“reference space”).....	63
6.7.3 volume (v) e densidade de volume (vv) dos compartimentos pulmonares.....	63
6.7.4 áreas de superfície total e densidade de superfície dos alvéolos, vias aéreas e vasos sanguíneos.....	65
6.7.5 estimativa da espessura dos septos alveolares (arithmetic mean thickness).....	66
6.8 AVALIAÇÃO IN SITU DA INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELO LPS	67
6.8.1. Hidratação	70
6.8.2. Recuperação antigênica	70
6.8.3. Bloqueio.....	70
6.8.4. Incubação com o anticorpo primário	70
6.9 ANÁLISE DE COLÁGENO E FIBRAS ELÁSTICAS NO PARÊNQUIMA PULMONAR E NAS VIAS AÉREAS	71
6.10 PROTOCOLO DE ANÁLISES MOLECULARES:.....	73
6.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
7. RESULTADOS.....	78
7.1 CARACTERIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO MATERIAL PARTICULADO 2,5 (PM _{2,5}).	78
7.2 RESULTADOS REFERENTES AOS GRUPOS CONTROLE, LPS 24 HORAS, POLUIÇÃO E LPS + POLUIÇÃO (OBJETIVO 1).	80
7.2.1 Eritrograma	80
7.2.2 Leucócitos.....	81
7.2.3 Neutrófilos.....	83
7.2.4 Linfócitos.....	85
7.2.5 Monócitos e macrófagos.....	87
7.2.6 Plaquetas.....	89

7.2.7 IL-1 β	90
7.2.8 IL-6.....	92
7.2.9 IL-8.....	94
7.2.10 IL-10.....	96
7.2.11 TNF- α	98
7.2.12 Morfologia do tecido pulmonar.....	100
7.2.13 Remodelamento tecidual	107
7.3 RESULTADOS REFERENTES AOS GRUPOS CONTROLE, LPS 5 SEMANAS, POLUIÇÃO E POLUIÇÃO + LPS (OBJETIVO 2).....	110
7.3.1 Eritrograma	110
7.3.2 Leucócitos.....	111
7.3.3 Neutrófilos.....	113
7.3.4 Linfócitos.....	115
7.3.5 Monócitos e macrófagos.....	117
7.3.6 Plaquetas.....	119
7.3.7 IL-1 β	120
7.3.8 IL-6.....	122
7.3.9 IL-8.....	124
7.3.10 IL-10.....	126
7.3.11 TNF- α	128
7.3.12 Morfologia do tecido pulmonar.....	130
7.3.13 Remodelamento tecidual	136
8. DISCUSSÃO	140
8.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MATERIAL PARTICULADO 2,5 NA FASE AGUDA DA LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS	140
8.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MATERIAL PARTICULADO 2,5 NA FASE TARDIA DA LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS	146
9. CONCLUSÕES	149
10. ANEXOS	150
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161

Lista de abreviaturas e siglas

AECC – *American-European Consensus Conference*

AMT – *Arithmetic mean thickness*

a(p) – Área do ponto

ATS – *American Thoracic Society*

BC – *Black Carbon*

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CBA – *Cytometric Bead Assay*

CD14 – *Cluster of differentiation 14*

CD3 - *Cluster of differentiation 3*

COX-2 – Ciclo-oxigenase-2

CPA – Concentrador de partículas ambientais

CPAP – Pressão positiva contínua nas vias aéreas

CXCL-1/KC - *(C-X-C motif) ligand 1*

DAB – Diaminobenzidina

DEP – Partículas de exaustão do diesel

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ERS – *European Respiratory Society*

et al. - Entre outros

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FiO₂ – Fração inspirada de oxigênio

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GATA-3 – *GATA binding protein 3*

HC – Hidrocarbonetos

H&E – Hematoxilina e eosina

IgE – Imunoglobulina E

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-6 – Interleucina 6

IL-7 – Interleucina 7

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IL-17A – Interleucina 17A

IL-17F – Interleucina 17F

INAIRA – Instituto Nacional de Análise Integrada do Risco Ambiental

INF- γ – Interferon gama

LBA – Lavado Broncoalveolar

LBP – *Lipopolysaccharide binding protein*

LPA – Lesão Pulmonar Aguda

LPS – Lipopolissacarídeo

MCP-1 – *Monocyte chemoattractant protein-1*

MD-2 – *Myeloid differentiation factor 2*

MMP - Metaloproteinase

MP – Material particulado

MP₁₀ – Material particulado com diâmetro inferior a 10 μ m

MP_{2,5} – Material particulado com diâmetro inferior a 2,5 µm

MPO – Mieloperoxidase

MyD88 – *Myeloid differentiation primary response 88*

NF-κB – Fator de transcrição nuclear kappa b

OMS – Organização mundial da saúde

PaO₂ – Pressão arterial de oxigênio

PBS – *Phosphate buffered saline*

PEEP – Pressão expiratória positiva final

PVC – Policloreto de polivinila

ROI – Região de interesse (*Region of interest*)

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RPL13a – Proteína ribossomal L13a

S18 – Proteína ribossomal S18

SDRA – Síndrome do desconforto respiratório agudo

St – densidade de superfície

Sv – superfície total

T – Espessura

Th1 – *T helper type 1*

Th2 – *T helper type 2*

TLR-2 – *Toll-like receptor 2*

TLR-4 – *Toll-like receptor 4*

TNF-α – Fator de necrose tumoral

Vt – volume total

Vv – densidade de volume

Lista de figuras

Figura 1 – Esquema dos grupos experimentais.	51
Figura 2 - Representação da câmara de Neubauer. Os quadrantes destacados em vermelho representam os locais de contagem dos leucócitos.	58
Figura 3 - Representação da diluição seriada realizada para a curva padrão do CBA.	60
Figura 4 - Representação esquemática dos métodos e amostragem do pulmão para o estudo estereológico. A e B - preparação do ágar a 12%; C - pulmão a ser incluído; D - inclusão do pulmão em ágar; E e F - Cortes verticais seriados; G - Fatias obtidas para a estimativa do volume total pulmonar pelo método de Cavalieri.	62
Figura 5 - Exemplo de região de interesse (ROI) selecionada no software newCAST.	64
Figura 6 - Exemplo da aplicação do sistema teste de pontos e de segmentos de reta para estimativa das densidades de volume e densidades de superfície dos compartimentos pulmonares no software newCAST.	66
Figura 7 - Diagrama exemplificando a estratégia adotada de análise dos dados em relação ao objetivo 1: Avaliar se a lesão induzida por LPS é alterada em um indivíduo previamente exposto à poluição do ar.	76
Figura 8 - Diagrama exemplificando a estratégia adotada de análise dos dados em relação ao objetivo 2: Avaliar qual o impacto da poluição atmosférica de uma região urbana sobre a progressão da LPA induzida por LPS.	76

Figura 9 - Fotomicrografia do esfregaço do lavado bronco-alveolar: A – grupo controle (40x); B – grupo poluição (40x); C – grupo LPS 24 horas (40x) e D – grupo poluição + LPS (40x)..... 82

Figura 10 - Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar (coloração H&E). A e B – grupo controle em 10x e 20x respectivamente; C e D – grupo poluição em 10x e 20x respectivamente; E e F – grupo LPS 24 horas em 10x e 20x respectivamente; G e H – grupo poluição + LPS em 10x e 20x respectivamente 106

Figura 11 – Fotomicrografia do esfregaço do lavado bronco-alveolar: A – grupo controle (40x); B – grupo poluição (40x); C – grupo LPS 5 semanas (40x) e D – grupo LPS + poluição (40x)..... 112

Figura 12 - Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar (coloração H&E). A e B – grupo controle em 10x e 20x respectivamente; C e D – grupo poluição em 10x e 20x respectivamente; E e F – grupo LPS 5 semanas em 10x e 20x respectivamente; G e H – grupo LPS + poluição em 10x e 20x respectivamente 135

Figura 13 - Fotomicrografia representativa do tecido pulmonar corado com a técnica de *Picrosirius Red*. A – Grupo LPS 5 semanas (40x): fibras colágenas apresentam-se na coloração vermelha; B – Grupo LPS 5 semanas polarizada (40x): seta vermelha indica colágeno tipo I, seta verde indica colágeno tipo III. 139

Lista de gráficos

- Gráfico 1** – Representação gráfica da concentração média dos elementos químicos inorgânicos presentes no material particulado ($\mu\text{g}/\text{m}^3$). 79
- Gráfico 2** - Representação gráfica do número de leucócitos presentes no sangue (mil/mm^3) (A) e do número de células totais no lavado bronco-alveolar (B). 81
- Gráfico 3** – Representação gráfica da quantidade de neutrófilos presentes no sangue (mil/mm^3) (A), do número total de neutrófilos no lavado bronco-alveolar (B) e da proporção de neutrófilos por unidade de área de tecido pulmonar (C). 84
- Gráfico 4** – Representação gráfica da quantidade de linfócitos presentes no sangue (mil/mm^3) (A), do número total de linfócitos no lavado bronco-alveolar (B) e da proporção de linfócitos T por unidade de área de tecido pulmonar (C). ... 86
- Gráfico 5** – Representação gráfica da quantidade de monócitos presentes no sangue (mil/mm^3) (A); do número total de macrófagos no lavado bronco-alveolar (B) e da proporção de macrófagos (MAC 2+) por unidade de área de tecido pulmonar (C). 88
- Gráfico 6**– Representação gráfica da média de plaquetas presentes no sangue (mil/mm^3). 89
- Gráfico 7** – Representação gráfica da quantificação de IL-1 β : (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas e (E) expressão gênica relativa. 91

Gráfico 8 – Representação gráfica da quantificação de IL-6: (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas e (E) expressão gênica relativa.	93
Gráfico 9 – Representação gráfica da quantificação de IL-8: (A) no parênquima pulmonar, (B) nas vias aéreas e (C) expressão gênica relativa.	95
Gráfico 10 – Representação gráfica da quantificação de IL-10: (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas e (E) expressão gênica relativa.	97
Gráfico 11 – Representação gráfica da quantificação de TNF- α : (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas (proporção de área positivamente marcada por unidade de perímetro) e (E) expressão gênica relativa.	99
Gráfico 12 – Representação gráfica do volume total pulmonar (mm ³).	100
Gráfico 13 – Representação gráfica da densidade de volume (V _v) do septo alveolar (A), volume total dos septos (mm ³) (B), densidade de volume do espaço aéreo alveolar (C) e volume total do espaço aéreo alveolar (mm ³) (D).	101
Gráfico 14 – Representação gráfica da média da densidade de volume (V _v) de via aérea (A) e volume total de via aérea (mm ³) (B).	102
Gráfico 15 – Representação gráfica da densidade de superfície (S _v) de septos alveolares (mm ⁻¹) (A) e da área de superfície total dos septos alveolares (mm ²) (B).	103

Gráfico 16 – Representação gráfica da espessura média dos septos alveolares (mm)..... 104

Gráfico 17 – Representação gráfica da proporção de fibras elásticas por área de via aérea (%) (A) e da proporção de fibras elásticas por área de tecido do parênquima pulmonar (%) (B). 107

Gráfico 18 – Representação gráfica da proporção de colágeno por área de via aérea (%) (A), da proporção de colágeno por área de tecido do parênquima pulmonar (%) (B), Expressão gênica relativa de colágeno tipo I (C), expressão gênica de colágeno tipo III (D) e expressão gênica relativa de TGF- β (E). 109

Gráfico 19 – Representação gráfica do número de leucócitos presentes no sangue (mil/mm³) (A) e do número de células totais no lavado bronco-alveolar (B). 111

Gráfico 20 – Representação gráfica da quantidade de neutrófilos presentes no sangue (mil/mm³) (A), do número total de neutrófilos no lavado bronco-alveolar (B) e da proporção de neutrófilos por unidade de área de tecido pulmonar (C). 114

Gráfico 21 - Representação gráfica da quantidade de linfócitos presentes no sangue (mil/mm³) (A), do número total de linfócitos no lavado bronco-alveolar (B) e da proporção de linfócitos T por unidade de área de tecido pulmonar (C). . 116

Gráfico 22 – Representação gráfica da quantidade de monócitos presentes no sangue (mil/mm³) (A); do número total de macrófagos no lavado bronco-alveolar

(B) e da proporção de macrófagos (MAC 2+) por unidade de área de tecido pulmonar (C). 118

Gráfico 23 – Representação gráfica da média de plaquetas presentes no sangue (mil/mm³). 119

Gráfico 24 – Representação gráfica da quantificação de IL-1 β : (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas e (E) expressão gênica relativa. 121

Gráfico 25 – Representação gráfica da quantificação de IL-6: (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas e (E) expressão gênica relativa. 123

Gráfico 26 – Representação gráfica da quantificação de IL-8: (A) no parênquima pulmonar, (B) nas vias aéreas e (C) expressão gênica relativa. 125

Gráfico 27 – Representação gráfica da quantificação de IL-10: (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas e (E) expressão gênica relativa. 127

Gráfico 28 – Representação gráfica da quantificação de TNF- α : (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas (proporção de área positivamente marcada por unidade de perímetro) e (E) expressão gênica relativa. 129

Gráfico 29 – Representação gráfica do volume total pulmonar (mm³). 130

Gráfico 30 – Representação gráfica da média da densidade de volume (V_v) do septo alveolar (A), volume total dos septos (mm^3) (B), densidade de volume do espaço aéreo alveolar (C) e volume total do espaço aéreo alveolar (mm^3) (D).
..... 131

Gráfico 31 – Representação gráfica da média da densidade de volume (V_v) de via aérea (A) e volume total de via aérea (mm^3) (B)..... 132

Gráfico 32 – Representação gráfica da densidade de superfície (S_v) de septos alveolares (mm^{-1}) (A) e da área de superfície total dos septos alveolares (mm^2) (B). 133

Gráfico 33 – Representação gráfica da espessura média dos septos alveolares (mm). 134

Gráfico 34 – Representação gráfica da proporção de fibras elásticas por área de via aérea (%) (A) e da proporção de fibras elásticas por área de tecido do parênquima pulmonar (%) (B). 136

Gráfico 35 – Representação gráfica da proporção de colágeno por área de tecido do parênquima pulmonar (%) (A), da proporção de colágeno por área de via aérea (%) (B), expressão gênica relativa de colágeno tipo I (C), expressão gênica de colágeno tipo III (D) e expressão gênica relativa de TGF- β (E). 138

Lista de tabelas

Tabela 1 - Características, principais fontes e efeitos gerais ao meio ambiente dos principais poluentes.....	32
Tabela 2 - Critério recomendado para lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) pela AECC.....	37
Tabela 3 - Critério recomendado para síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) pela definição de Berlin.....	38
Tabela 4 - Modelos animais de LPA/SDRA, suas similaridades, diferenças com LPA/SDRA humana e questões técnicas.....	42
Tabela 5 - Principais características da LPA experimental e grau de relevância de cada parâmetro.....	44
Tabela 6 - Concentração de proteínas (pg/ml) em cada ponto da curva padrão.....	60
Tabela 7 - Limite de detecção das citocinas avaliadas no soro sanguíneo e lavado broncoalveolar.....	61
Tabela 8 - Descrição da imunomarcação, anticorpo utilizado e concentração padronizada.....	69
Tabela 9 - Descrição de cada sequência <i>forward</i> e <i>reverse</i> dos primers.....	74
Tabela 10 - Concentração de PM _{2,5} (µg/m ³) e BC (µg/m ³) nos filtros amostrados durante o período de exposição dos animais.....	78

Tabela 11 – Média, desvios padrão, medianas e intervalos interquartil dos grupos controle, poluição, LPS 24 horas e poluição + LPS. 150

Tabela 12 – Média, desvios padrão, medianas e intervalos interquartil dos grupos controle, poluição, LPS 5 semanas e LPS + poluição. 155

Lista de símbolos

α – Alfa

β – Beta

> – Maior

< – Menor

% – Percentual

°C – Graus Celsius

μg – Micro gramas

μl – Micro litros

Al – Alumínio

Ca - Cálcio

cmHg - Centímetro de mercúrio

CO – Monóxido de carbono

Cu – Cobre

Fe – Ferro

g – Gramas

K – Potássio

m³ – Metros cúbicos

mg – Miligrama

ml – Mililitro

mmHg - Milímetro de mercúrio

Na - Sódio

NaCl – Cloreto de sódio

Ni – Níquel

NO_x – Óxido de nitrogênio

O₃ – Ozônio

P – Fósforo

Pb – Chumbo

pg – picogramas

rpm – rotações por minuto

S – Enxofre

Si – Silício

SO₂ – Dióxido de enxofre

SO_x – Óxido de enxofre

Ti – Titânio

V – Vanádio

Zn – Zinco

Costa NSX. *Efeito da exposição ao material particulado atmosférico no desenvolvimento da lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Estudos epidemiológicos e experimentais mostram que a poluição do ar pode causar diversos efeitos adversos na saúde, dentre eles inflamação sistêmica e pulmonar, doenças cardiovasculares e exacerbação de doenças pré-existentes. A síndrome do desconforto respiratório aguda é caracterizada por intenso infiltrado inflamatório, dano na barreira alvéolo-capilar e hipoxemia, e desde a sua descrição em 1967 ainda apresenta elevados índices de mortalidade. O presente estudo tem como objetivos: 1. Avaliar qual o impacto da poluição atmosférica de uma região urbana sobre a progressão da LPA induzida por LPS; e 2. Avaliar se a lesão induzida por LPS é alterada em um indivíduo previamente exposto à poluição atmosférica. Os principais achados relativos ao objetivo 1 mostram que, de uma forma geral, quando há a interação do material particulado fino (MP_{2,5}) anterior à fase aguda da LPA, esta não se desenvolve de forma tão grave. Quanto aos parâmetros inflamatórios, nota-se que, na maioria dos parâmetros, as células inflamatórias e citocinas pró-inflamatórias aumentam no grupo LPS 24 horas, mas não, ou não tanto quanto, no grupo poluição+LPS. Como base nestes resultados podemos hipotetizar que pode ter ocorrido uma alteração do perfil da resposta inflamatória ou imunotoxicidade. Quando observamos os resultados referente ao objetivo 2, nota-se que, o grupo LPS + poluição permanece em um estado inflamatório persistente com número de leucócitos aumentado no lavado bronco-alveolar e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-8) no tecido pulmonar, enquanto o grupo LPS 5 semanas tem estes parâmetros mais próximos do grupo controle. Na morfologia tecidual, o grupo LPS + poluição a diminuição do espaço aéreo alveolar e o espessamento septal. É bastante plausível que a poluição do ar dificulte recuperação e o reparo adequado da lesão causada pelo LPS, uma vez que a poluição do ar, e especialmente o material particulado fino, exerce um papel pró-inflamatório contínuo sobre a lesão. Podemos concluir que: o uso do LPS por nebulização é um modelo viável para a reprodução dos parâmetros característicos da lesão pulmonar aguda, a exposição ao material particulado pode alterar o perfil de resposta imediata (24 horas) na lesão pulmonar aguda e pode dificultar a recuperação da lesão. Estudos adicionais são necessários para entender o possível papel da modulação da resposta imunológica nos mecanismos envolvidos nestes processos.

Descritores: Lesão pulmonar aguda; síndrome do desconforto respiratório agudo; poluição do ar; material particulado; inflamação; citocinas.

Costa NSX. *Effects of the exposure to atmospheric particulate matter on the development of LPS-induced acute lung injury (ALI)* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Epidemiological and experimental studies show that the air pollution can cause several harmful outcomes to the health, which include systemic and pulmonary inflammation, cardiovascular diseases, and exacerbation of preexisting diseases. The acute respiratory distress syndrome is characterized by intense inflammatory response, alveolo-capillary barrier damage and hypoxemia and since it was described for the first time in 1967 it still has high mortality rates. This study aims to 1. Evaluate the impact of urban air pollution exposure on the acute lung injury progression and 2. Evaluate if the LPS-induced injury is altered in an individual previously exposed to the air pollution. The main findings regarding objective 1 show that when there is an interaction of the particulate matter on the acute phase of LPS-induced injury, the lesion is not as severe as in the group that received only LPS. The inflammatory parameters show that inflammatory cells and pro inflammatory cytokines are increased in the LPS 24 hour, whereas not, or not as much as, in the air pollution + LPS group. Based on these results, we can hypothesize that may have occurred a shift of the inflammatory profile or immunotoxicity. Results of the objective 2 show that the group LPS + air pollution remains in a persistent inflammatory condition with increased leucocytes in BALF and pro inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 e IL-8) also increased in the lung tissue, while the LPS 5 weeks group shows these parameters levels closer to the control group. The tissue morphology displays a diminished alveolar air space and septal thickening. It is very likely that the air pollution interferes on the adequate LPS-induced lesion recovery and repair, once that the air pollution, specially the fine particulate matter, has a continuous pro-inflammatory role over the lesion. We can conclude that: the use of nebulized LPS is a feasible acute lung injury model; the exposure to the particulate matter could alter the profile of the immediate response (24 hours) of the acute lung injury and it can impair the lesion recovery. Additional studies are necessary to understand the possible role of the immunological response modulation mechanisms involved in these processes.

Descriptors: Acute lung injury; respiratory distress syndrome; air pollution; particulate matter; inflammation; cytokines.

1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos têm frequentemente indicado uma associação entre a poluição atmosférica ambiental e aumentos nos índices de mortalidade e morbidade, particularmente em indivíduos com doenças crônicas respiratórias e cardiovasculares pré-existentes como asma, bronquite, doença pulmonar obstrutiva crônica, hipertensão, entre outras (Brook et al, 2003; Dockery, et al, 1993; Pope et al., 2004; Pope et al., 1995; Schwartz, 1994).

Nos grandes centros urbanos os veículos automotores são responsáveis pelas emissões para a atmosfera de toneladas por ano de monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos (HC), óxidos de nitrogênio (NOX), material particulado (MP) e óxidos de enxofre (SOX) e além destes, outros poluentes são formados secundariamente por reações fotoquímicas, como é o caso do ozônio (O₃). Dentre estes poluentes, o MP e o ozônio frequentemente ultrapassam os níveis aceitáveis determinados pela legislação na cidade de São Paulo (CETESB, 2010).

O MP é uma mistura de partículas sólidas e líquidas suspensas no ar. De acordo com seu diâmetro, são divididas em MP₁₀ (<10 µm), em MP_{2,5} (<2,5 µm) e partículas ultrafinas (<100nm) (CETESB, 2010).

O MP é o poluente mais associado a desfechos negativos sobre a saúde de adultos e crianças. E estes efeitos são sentidos principalmente por indivíduos mais vulneráveis, como idosos e pessoas com doenças cardiorrespiratórias pré-existentes (Dockery, 2009).

Evidências sugerem que populações nas cidades mais poluídas, expostas cronicamente a níveis acima do recomendado pela OMS (média anual - 10

ug/m³) de material particulado fino (MP_{2,5}) apresentam redução de sua longevidade, em cerca de 2 anos (Dockery, 2009; World Health Organization, 2005).

A literatura é vasta no que diz respeito aos efeitos do MP sobre a saúde respiratória. Estudos epidemiológicos e experimentais mostram que o material particulado pode causar inflamação pulmonar e sistêmica, diminuir a função pulmonar e agravar os sintomas de doenças pulmonares pré-existentes (Laumbach, 2010; Saldiva et al., 2002; Seaton et al., 1995).

Estudos experimentais também mostram que a exposição ao material particulado promove inflamação pulmonar, altera as defesas respiratórias contra agentes inalados e diminui o “clearance” bacteriano pulmonar (Gowdy et al., 2008). Esses achados representam possíveis mecanismos envolvidos na associação epidemiológica entre a exposição à poluição atmosférica e o aumento do número de internações por doenças respiratórias (Atkinson et al., 2014). Além disso, a exposição ao MP induz à inflamação sistêmica, possivelmente decorrente da translocação de partículas para a circulação sistêmica, sendo este um possível mecanismo responsável pelos efeitos adversos da poluição no sistema cardiovascular (Chen et al., 2006).

Embora muito já se tenha mostrado sobre os mecanismos de associação entre diferentes doenças respiratórias e a poluição, há ainda poucos estudos abordando a relação entre a exposição à poluição e a lesão pulmonar aguda, particularmente no que diz respeito à compreensão da interação entre os seus mecanismos fisiopatológicos e a relação entre aumento da incidência de algumas doenças respiratórias e seu agravamento em indivíduos que estão cronicamente expostos à poluição do ar nas grandes cidades.

Alguns autores já exploraram de maneira experimental este tema, utilizando modelos de instilação intratraqueal de LPS (endotoxina de bactérias gram-negativas ou lipopolisacarídeo) e DEP (partículas de exaustão de diesel, em inglês). Embora sejam modelos aceitáveis e reconhecidos, eles não representam a realidade na qual as exposições ocorrem de forma inalatória ou por contato.

O LPS tem sido amplamente usado em modelos experimentais de patologias pulmonares. A administração de LPS por via intratraqueal ou por nebulização causa inflamação pulmonar, produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, influxo de neutrófilos e lesão pulmonar aguda (Deleuze et al., 2003; Takano et al., 2002; Toward, Broadley, 2001).

O LPS é encontrado no lavado broncoalveolar de pacientes com pneumonia por bactérias gram-negativas e em indivíduos com síndrome do desconforto respiratório agudo, que frequentemente é associada a um desfecho fatal (Kollef et al., 1996; Martin et al., 1997).

No estudo realizado por Takano et al. (2002) foi avaliado o efeito da exposição a partículas de exaustão de diesel (DEP) em camundongos com lesão pulmonar induzida por LPS. A instilação intratraqueal de DEP associado ao LPS agravou a inflamação pulmonar quando comparada com a lesão causada somente pela endotoxina.

A instilação intratraqueal de LPS em ratos determina um aumento significativo na translocação de partículas ultrafinas do território pulmonar para a circulação sistêmica, sugerindo que a inflamação pulmonar prévia representa um importante mecanismo envolvido no aumento da translocação extrapulmonar de partículas (Chen et al, 2006; Inoue et al, 2009), sugerindo uma relação direta

entre inflamação pulmonar, translocação extrapulmonar de partículas e, consequentemente, indução de inflamação sistêmica.

Considerando os achados na literatura, não há estudos anteriores que explorem a relação entre a lesão pulmonar aguda e a exposição aos níveis ambientais de poluição atmosférica. Neste estudo consideramos que a utilização do concentrador de partículas ambientais (CPA) é uma maneira controlada de administração do material particulado fino que mimetiza as condições as quais estamos constantemente expostos. Assim, este estudo teve como objetivo analisar os efeitos da poluição do ar da cidade de São Paulo a níveis ambientais sobre o desenvolvimento da lesão pulmonar aguda.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Poluição atmosférica e efeitos sobre o sistema respiratório

A poluição do ar pode ser responsável por mais de 7 milhões de mortes ao ano e é considerado um fator de risco para doenças respiratórias como infecções agudas e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doenças cardíacas, acidente vascular cerebral e câncer (Bridget, Kuehn, 2014).

Os impactos da exposição a altos níveis de poluição atmosférica se tornaram claros por meados do século XX, quando cidades da Europa e Estados Unidos vivenciaram, em 1930 no vale do rio Meuse, em 1948 na cidade de Donora e em 1952 na cidade de Londres (*London Fog*), o aumento da mortalidade e de admissões em hospitais relacionados aos altos índices de poluição atmosférica (Chen et al., 2007; Helfand et al., 2001; Logan, 1952; Nemery et al., 2001).

Subsequente a estes episódios, novas legislações e outras ações regulatórias estimularam a redução da poluição do ar em muitas regiões do mundo, especialmente na América do Norte e Europa (Chen et al., 2007). Apesar de regulamentos mais restritivos, diversas cidades na Ásia (Guo et al., 2014, Li et al., 2014; Lim et al., 2014; Tsai et al., 2014), Europa (Beelen et al., 2014; Knox, 2008; Milojevic et al., 2014 Neuberger et al., 2013), América do norte (Chalbot et al., 2014; Zanobetti et al., 2014) e latina (Loomis et al., 1999; Romieu et al., 2012; Salinas, Vega, 1995) ainda correlacionam o aumento da mortalidade com os níveis de poluição atmosférica, caracterizando a poluição do ar nos centros

urbanos como um fator de risco de grande preocupação para a saúde humana e ambiental.

No Brasil, segundo a Resolução CONAMA Nº3 de 28/06/1990, é considerado como poluente atmosférico “qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade” (CETESB, 2012).

Com relação à sua origem, os poluentes atmosféricos podem ser classificados em primários, que são aqueles emitidos diretamente pelas fontes de emissão, ou em secundários, que são aqueles formados na atmosfera através da reação química entre poluentes e/ou constituintes naturais na atmosfera (CETESB, 2012). Os principais poluentes, suas características, fontes principais e efeitos gerais ao meio ambiente são apresentados na tabela 1.

O sistema respiratório é muito vulnerável aos efeitos da poluição do ar por ter contato direto com seus diferentes componentes, por isso inúmeros trabalhos associam a poluição atmosférica aos efeitos adversos a saúde respiratória humana, como doenças pulmonares crônicas e alérgicas, infecções respiratórias e câncer no trato respiratório (Chen et al., 2008; D'Amato et al., 2010; Gordon et al., 2014).

Tabela 1 - Características, principais fontes e efeitos gerais ao meio ambiente dos principais poluentes.

Poluente	Características	Fontes Principais	Efeitos Gerais ao Meio Ambiente
Partículas inaláveis finas (MP2,5)	Partículas de material sólido ou líquido suspenso no ar, na forma de poeira, neblina, aerossol, fumaça, fuligem, etc, que podem permanecer no ar e percorrer longas distâncias. Faixa de tamanho < 2,5 micra.	Processos de combustão, aerossol secundário (formado na atmosfera) como sulfato e nitrato, entre outros.	Danos à vegetação, deterioração da visibilidade e contaminação do solo e água.
Partículas inaláveis (MP10) e fumaça	Partículas de material sólido ou líquido suspenso no ar, na forma de poeira, neblina, aerossol, fumaça, fuligem, etc. Faixa de tamanho < 10 micra.	Processos de combustão, aerossol secundário (formado na atmosfera).	Danos à vegetação, deterioração da visibilidade e contaminação do solo e água.
Partículas totais em suspensão	Partículas de material sólido ou líquido suspenso no ar, na forma de poeira, neblina, aerossol, fumaça, fuligem, etc. Faixa de tamanho < 50 micra.	Processos industriais, veículos motorizados, poeira de rua ressuspensas, queima de biomassa. Fontes naturais: pólen, aerossol marinho e solo.	Danos à vegetação, deterioração da visibilidade e contaminação do solo e água.
Dióxido de enxofre (SO ₂)	Gás incolor com forte odor. Pode ser transformado a SO ₂ 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.	Formação de chuva ácida, corrosão aos materiais e danos à vegetação e à colheita.
Dióxido de nitrogênio	Gás marrom avermelhado, com forte odor e muito irritante. Pode levar à formação de ácido nítrico, nitratos e compostos orgânicos.	Processos de combustão envolvendo veículos automotores, processos industriais, usinas, térmicas que utilizam óleo ou gás, incinerações.	Formação de chuva ácida, danos à vegetação e à colheita.
Monóxido de carbono	Gás incolor, inodoro e insípido.	Combustão incompleta em veículos automotores	
Ozônio	Gás incolor e inodoro nas concentrações ambientais e principal componente da névoa fotoquímica.	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, vegetação natural, plantações agrícolas e plantas ornamentais.

FONTE: CETESB, 2012.

Estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram os efeitos pró-inflamatórios da poluição do ar envolvendo células epiteliais pulmonares e macrófagos alveolares com a estimulação de citocinas (como a IL-8) e mediadores envolvidos na inflamação, redução da viabilidade celular e aumento da geração de ânion superóxido,

resultando em extensa migração de neutrófilos e recrutamento e ativação de linfócitos T (Brunekreef, Holgate, 2002; Orona et al., 2014).

Segundo o estudo realizado por Souza et al. (1998), pessoas que vivem em áreas com concentrações mais altas de poluição atmosférica apresentaram hiperplasia bronquiolar e espessamento do muco. O dano bronquiolar encontrado pode contribuir para a patogênese de doenças inflamatórias das vias aéreas. Estas pessoas também apresentaram aumento de macrófagos e uma tendência ao aumento de pigmento de carbono nas paredes dos bronquíolos.

Estudos realizados com policiais de trânsito, expostos de forma direta e prolongada à poluição, mostram que estes indivíduos apresentam diminuição da função pulmonar e aumento da morbidade respiratória (Patil et al., 2014). Nos estudos de Brucker et al. (2013) e de Lima et al. (2013) que avaliaram trabalhadores expostos a poluição atmosférica urbana foi observado a acidificação do lavado nasal e do condensado exalado respiratório, aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-8 no lavado nasal e soro sanguíneo, do número total de células no lavado nasal e de biomarcadores de dano oxidativo.

Ratos expostos a concentrações ambientais urbanas de poluição do ar durante o período de 20 horas mostraram aumento da peroxidação lipídica, aumento de leucócitos no lavado broncoalveolar não acompanhado de aumento nos níveis de proteínas totais no lavado (Pereira et al., 2007). Em uma exposição mais longa, os animais mostraram aumento da elastância pulmonar, hiperplasia das células secretoras nas vias aéreas, alterações ultraestruturais dos cílios, muco espessado e aumento de células no lavado broncoalveolar (Saldiva et al, 1992; Pereira et al., 1995).

Estudos mostram que os poluentes atmosféricos podem causar exacerbação e, possivelmente, também o início de doenças alérgicas. A poluição do ar pode causar danos nas mucosas das vias respiratórias e comprometer o “clearance” mucociliar o que pode facilitar o acesso das células do sistema imunológico aos alérgenos, promovendo a sensibilização das vias respiratórias (Carlsten, Melén, 2012; D'Amato et al., 2010). Há evidências de que o particulado de diesel e ozônio aumentam a síntese do anticorpo IgE e inflamam as vias aéreas, o que aumentaria a sensibilização a alergênicos comuns. Ao interagirem entre si e com outros fatores ambientais, partículas e poluentes gasosos podem ter efeitos em longo prazo sobre indivíduos alérgicos. Do mesmo modo, a exposição durante longos períodos a misturas de poluentes pode ter efeitos prejudiciais aos tecidos que podem ser irreversíveis (Brunekreef, Holgate, 2002; D'Amato et al., 2010).

Dentre os poluentes mais estudados e descritos na literatura como causadores de efeitos adversos na saúde humana, destaca-se o material particulado. Os níveis de material particulado fino têm sido associados ao aumento de hospitalizações e mortalidade por causas respiratórias (Atkinson et al., 2014).

O material particulado (MP) é uma mistura de partículas sólidas e líquidas suspensas no ar, constituídas de compostos orgânicos e inorgânicos e são classificadas de acordo com seu diâmetro: MP₁₀ (<10 µm - podem penetrar nas vias respiratórias inferiores), MP_{2,5} (<2,5 µm - podem penetrar nas regiões onde ocorrem trocas gasosas no pulmão) e partículas ultrafinas (<100nm) (CETESB, 2010; Goldberg et al., 2001; Pope, Dockery, 1992; Schwartz, Neas, 2000).

A maior fração do MP fica presa no trato respiratório superior e a fração menor pode chegar aos pulmões onde podem se depositar (Amdur, Corn, 1963; Amdur, Cresia, 1966). Em uma tentativa de remover estas partículas, os macrófagos alveolares fagocitam o MP e penetram no interstício celular, porém parte deste particulado fino pode translocar através da barreira ar-sangue para a circulação sistêmica, alcançando órgãos secundários, sugerindo que quanto menor o diâmetro da partícula, maior a possibilidade de translocação para outros órgãos (Takenaka et al., 1986; Ferin et al., 1992; Oberdorster, Utell, 2002; Chen et al., 2006). Apenas uma pequena fração de MP pode passar rapidamente para a circulação sistêmica e a inflamação pulmonar parece ter um importante papel no aumento da translocação de partículas extrapulmonar (Brown et al., 2002; Burch, 2002; Mills et al., 2006; Chen et al., 2006; Wiebert et al., 2006 a,b; Möller et al., 2008).

A toxicidade das menores frações de MP ocorre devido ao fato que estes podem chegar até os pulmões e translocar para a circulação. Além disso, estas frações contêm altas concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais e metais de transição, e têm uma maior capacidade de geração de radicais livres (Squadrito et al., 2001; Kok et al., 2006).

A composição dos poluentes também é diretamente relacionada com os efeitos negativos à saúde, por exemplo, partículas provenientes do carvão e da combustão da gasolina tem maior potencial de produzir espécies reativas de oxigênio do que as partículas de diesel (Aust et al., 2002) e evidências mais recentes mostram que a presença de metais de transição contribui para efeitos mais evidentes (Snow et al., 2014). Os componentes orgânicos e inorgânicos das partículas podem induzir a expressão de citocinas, quimiocinas e espécies

reativas de oxigênio no epitélio pulmonar e estes efeitos também são esperados em outros órgãos (Sioutas et al, 2005; Ritz, Wilhem, 2008).

Estudos epidemiológicos e experimentais mostram que o material particulado pode causar inflamação pulmonar, diminuição da função pulmonar e agravamento de doenças pré-existentes (Laumbach, 2010; Saldiva et al. 2002; Seaton et al. 1995) e que seus efeitos são sentidos principalmente por indivíduos mais vulneráveis, como crianças, idosos e pessoas com doenças cardiorrespiratórias pré-existentes como a asma, bronquite e DPOC (Dockery, 2009; Rom, Boushey, Caplan, 2013).

Em modelos experimentais, mesmo baixas doses de material particulado são suficientes para causarem alterações no sistema respiratório como inflamação pulmonar, aumento de número de células totais e diminuição da viabilidade celular no lavado broncoalveolar, aumento do estresse oxidativo e aumento do apoptose no tecido pulmonar (Martin et al., 2010; Riva et al., 2011).

A instilação de MP_{2,5} aumenta a produção de citocinas relacionadas a resposta Th1 e Th2, regula positivamente os receptores Toll-like em macrófagos alveolares e respostas mediadas por células T (Saunders et al., 2010; Zhao et al., 2012). O MP₁₀ pode ativar o inflamassomo NLRP3 nas células epiteliais de vias aéreas o que leva a produção de IL-1 β , CCL20 e GM-CSF, ativação de células dendríticas e recrutamento de neutrófilos no pulmão. Este pode ser um mecanismo pelo qual a inalação MP₁₀ pode contribuir com a exacerbação de doenças das vias aéreas (Hirota et al., 2014).

Estudos mostram que o DEP pode causar toxicidade pulmonar resultante do dano nos pneumócitos tipo I e em células endoteliais dos capilares, edema alveolar e intensa resposta inflamatória (Ichinose et al., 1995). Outro estudo

destaca que o DEP intensifica as manifestações de resposta alérgica nas vias aéreas de modelo animal de asma, aumentando a expressão de IL-5 e modulando a expressão de IL-4 e IL-2 (Takano et al., 1997).

2.2. Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e lesão pulmonar aguda (LPA).

A SDRA foi primeiramente relatada por Ashbaugh et al. em 1967, em 12 pacientes que manifestaram início agudo de taquipnéia, hipoxemia, diminuição da complacência pulmonar, infiltrado difuso a radiografia de tórax, cianose refratária à oxigenoterapia e sem apresentar resposta aos métodos usuais e comuns de terapia respiratória (Ashbaugh et al., 1967).

Após este relato diversas definições foram propostas até a publicação da conferência de consenso americano-europeu (AECC) sobre SDRA, que reconhece a variabilidade da severidade da lesão pulmonar e dividiu os pacientes em dois grupos: (1) com lesão pulmonar aguda, que apresentam hipoxemia menos severa e (2) com SRDA que apresentam hipoxemia severa (Bernard et al., 1994). Os critérios recomendados pela AECC estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Critério recomendado para lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) pela AECC.

	Início	Oxigenação	Radiografia de tórax	Pressão capilar pulmonar
LPA	Agudo	$Pa_{O_2}/Fi_{O_2} \leq 300$ mm Hg	Infiltrado bilateral visto na radiografia frontal de tórax.	≤ 18 mm Hg ou sem evidência clínica de hipertensão atrial esquerda
SDRA	Agudo	$Pa_{O_2}/Fi_{O_2} \leq 200$ mm Hg	Infiltrado bilateral visto na radiografia frontal de tórax.	≤ 18 mm Hg ou sem evidência clínica de hipertensão atrial esquerda

FONTE: Adaptada de Bernard et al., 1994.

Em 2012 outra definição de SDRA foi proposta por Ranieri et al. (definição de Berlin) com o objetivo de atualizar a definição utilizando novos dados (epidemiológicos, fisiológicos e estudos clínicos) para lidar com as limitações presentes na definição AECC. Nesta nova definição o termo lesão pulmonar aguda é removido e a SDRA é dividida em 3 subgrupos, classificada de acordo com a severidade (leve, moderada e severa). A pressão capilar pulmonar também deixa de ser critério, pois alta pressão capilar pulmonar e SDRA podem coexistir.

Os critérios denominados pela definição de Berlin são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Critério recomendado para síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) pela definição de Berlin.

SDRA	Oxigenação
Leve	$200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mm Hg}$ com PEEP ou CPAP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$
Moderada	$100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mm Hg}$ com PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$
Severa	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mm Hg}$ com PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$

FONTE: Adaptada de Ranieri et al. 2012.

A SDRA é caracterizada por dano alveolar difuso, edema rico em proteínas que pode levar à hipoxemia grave, diminuição da complacência pulmonar, aumento do peso pulmonar, aumento do espaço morto fisiológico, aumento da formação da membrana hialina e hemorragia (Dushianthan et al., 2011; Ranieri et al., 2012).

A fisiopatologia da LPA afeta múltiplos componentes da membrana alveolocapilar. Alterações do endotélio microvascular e do epitélio alveolar resultam em edema alveolar devido ao aumento da permeabilidade a proteínas da barreira endotelial e epitelial e a diminuição da reabsorção do edema nos espaços alveolares pelo epitélio. Estas alterações podem levar ao acúmulo de células inflamatórias e fluidos no pulmão, resultando na inabilidade do pulmão em manter oxigenação suficiente do sangue. O comprometimento do “*clearance*” alveolar em paciente com LPA está associado com falência respiratória aguda prolongada e maior mortalidade (Ware, Matthay, 2001; Bogatcheva et al., 2009; Clerici, 2011).

A SDRA pode ser dividida em 3 fases, que podem se sobrepor:

A fase exsudativa é caracterizada pelo dano difuso ao epitélio alveolar e endotélio capilar, destruição principalmente de pneumócitos tipo I, influxo de células inflamatórias, formação de membrana hialina, edema rico em proteínas e hemorragia alveolar. Sua severidade e desfecho vão depender, em parte, do balanço entre o dano endotelial e epitelial e dos mecanismos de reparo. Nesta fase a SDRA é difícil de ser distinguida da insuficiência respiratória relacionada ao edema pulmonar hidrostático (Sartori, Matthay, 2002, Crouser, Fahy, 2009; Barbas et al., 2006; Piatt, O'Brien, 2002). Cerca de 40% dos pacientes com SDRA foram capazes de reabsorver o edema dentro de 12 horas após a intubação e estes pacientes mostraram recuperação mais rápida e menor índice de mortalidade. Por outro lado, pacientes sem evidências de reabsorção do edema alveolar nas primeiras 12 horas mostraram insuficiência respiratória prolongada e maior mortalidade (Matthay, Wiener-Kronish, 1990; Ware, Matthay, 1999; Ware, Matthay, 2001).

A fase proliferativa é caracterizada pela hiperplasia e proliferação de pneumócitos tipo II para revestir as áreas onde ocorreu a destruição dos pneumócitos tipo I, diminuição da luz alveolar, proliferação de fibroblastos no interstício e luz alveolar (Crouser, Fahy, 2009; Piatt, O'Brien, 2002).

A fase fibrótica é caracterizada pelo início do processo de reparação ao dano alveolar e deposição de colágeno, podendo haver uma cicatrização ordenada e recuperação funcional do tecido lesionado, ou intensa fibrose pulmonar e grande perda da função. A extensão da fibrose pode ser determinante para o grau de incapacidade pulmonar do paciente (Crouser, Fahy, 2009; Piatt, O'Brien, 2002). O processo de alveolite fibrosante pode começar no início do curso de SDRA e é mais evidente em pacientes que recebem ventilação mecânica (Marshall et al., 2000; Rocco, dos Santos, Pelosi, 2009).

As taxas de mortalidade de SDRA são elevadas desde que a síndrome foi descrita pela primeira vez em 1967. A mortalidade é de aproximadamente 40-50% e cerca de 80% das mortes de pacientes com SDRA acontece dentro de 2 a 3 semanas após o início da síndrome. A causa exata da morte destes pacientes ainda permanece imprecisa, pois apenas uma pequena parte morre de hipoxemia. No entanto, a lesão pulmonar causada pela SDRA parece predispor ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória sistêmica que culmina na disfunção múltipla dos órgãos (Villar et al., 2014).

A LPA e a SDRA são geralmente uma complicação de sepse, pneumonia, aspiração do conteúdo gástrico, pancreatite ou trauma severo (Ware, Matthay, 2000).

A probabilidade de sobrevivência é determinada pela severidade da lesão pulmonar, a extensão da disfunção de outros órgãos, condições médicas preexistentes e qualidade dos cuidados de suporte (Matthay et al., 2011).

2.3 Modelos animais de LPA/SDRA

Estudos em modelos animais são essenciais para o entendimento da fisiopatologia da SDRA/LPA e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Clerici, 2011). Os modelos animais de LPA deveriam reproduzir os mecanismos e consequências da lesão em humanos, incluindo as mudanças fisiológicas e patológicas que ocorrem. Devido às alterações da resposta pulmonar no decorrer do tempo, a evolução e reparo da lesão também deveriam ser reproduzidos no modelo (Matute-Bello et al., 2008).

Vários modelos animais foram propostos a fim de elucidar os mecanismos da LPA/SDRA, a maioria dos modelos é baseada em situações clínicas que estão associadas com a patologia, como sepse, múltiplas transfusões, trauma múltiplo, aspiração do conteúdo gástrico, reperfusão de tecidos isquêmicos e ventilação mecânica (Matute-Bello et al., 2008).

Os principais modelos animais, suas similaridade e diferenças com LPA/SDRA humana estão apresentados na tabela 4.

Apesar dos diversos modelos desenvolvidos ao longo dos anos para melhor entender a fisiopatologia da LPA/SDRA, a literatura revela que não há um consenso sobre a definição precisa de LPA/SDRA nos modelos animais.

Tabela 4 - Modelos animais de LPA/SDRA, suas similaridades, diferenças com LPA/SDRA humana e questões técnicas.

Modelo	Similaridades com SDRA	Diferenças com SDRA	Questões técnicas
Ácido oleico	Fase aguda e de reparo com histopatologia e características fisiológicas similares a SDRA humana.	Apenas uma fração de SDRA humanos é causada por embolia gordurosa e não modela a fisiopatologia da SDRA causada por sepse.	Boa reprodutibilidade. Requer injeção intravenosa de ácido oleico, o que pode dificultar o procedimento em pequenos animais.
LPS	Resposta inflamatória neutrofílica com aumento de citocinas intrapulmonares.	As alterações na permeabilidade alvéolo-capilar são leves.	Muito reprodutível.
Aspiração de ácido	O rompimento da barreira alvéolo/capilar com infiltração de neutrófilos.	Humanos aspiram ao conteúdo gástrico, não ácido puro.	Muito reprodutível. Estreita diferença entre doses prejudiciais e não prejudiciais.
Hiperóxia	Fase aguda da lesão epitelial e infiltração neutrofílica seguido de proliferação de célula tipo II, cicatrização.	Em pulmões humanos normais, oxigênio a 100% não induz lesão pulmonar. Não é claro se a hiperóxia está envolvido na patogênese da SDRA.	Boa reprodutibilidade. Requer equipamento especial para administrar e monitorar as concentrações dos gases desejados.
Bleomicina	Lesão inflamatória aguda seguida de fibrose reversível.	Não há formação de membranas hialinas. Relevância fisiopatológica incerta.	Boa reprodutibilidade.
Lavagem com salina	A depleção de surfactante. Diminuição da complacência pulmonar. Prejuízo da troca gasosa.	Sem um estímulo adicional, há comprometimento mínimo de permeabilidade e pouco recrutamento de polimorfonucleares.	Os animais devem ser anestesiados, entubados, e ventilados durante e após o processo.
Isquemia e reperfusão pulmonar	Aumento da permeabilidade vascular e infiltração de polimorfonucleares.	A lesão é geralmente hemorrágica.	Requer cirurgia complexa nos animais.
Isquemia e reperfusão não pulmonar	O aumento da permeabilidade microvascular e sequestro de polimorfonucleares nos pulmões.	A lesão é leve e o componente inflamatório limitada ao interstício.	Requer cirurgia complexa.
Administração de bactérias via intravenosa.	Edema intersticial, congestão intravascular e sequestro de polimorfonucleares.	Sem formação de membrana hialina. Alveolite neutrofílica mínima.	Variabilidade biológica importante
Bactérias intrapulmonares	Aumento da permeabilidade, edema intersticial e alveolite neutrofílica.	As culturas positivas são raras em SDRA precoce.	Variabilidade biológica importante.
Peritonite	Aumento da permeabilidade, graus variáveis de alveolite neutrofílica.	Formação mínima da membrana hialina.	Variabilidade biológica. Dose letal perto de dose de lesão.
Ligadura e perfuração cecal.	O aumento da permeabilidade, alveolite neutrofílica variável.	Formação mínima da membrana hialina.	A variabilidade biológica. Requer cirurgia.

FONTE: Adaptada de Matute-Bello et al., 2008.

Com o objetivo de esclarecer as principais características de LPA em modelos animais, Matute-Belo et al. (2011) publicaram um artigo ressaltando os parâmetros mais relevantes para avaliar estas características. Além do início agudo (dentro de 24 horas) é recomendado que o modelo apresente pelo menos 3 das 4 principais características (Tabela 5) e para determinar se alguma das características estão presentes, recomenda-se usar pelo menos um dos parâmetros “muito relevante” listado na tabela 5.

Um dos modelos de LPA/SDRA mais utilizado é o da lesão pulmonar induzida por LPS. O LPS ativa a resposta imune via receptor Toll-like 4 (TRL4), induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Faffe et al., 2000). O reconhecimento do LPS é mediado por moléculas como a proteína de ligação de LPS (LBP) que aumenta a sensibilidade dos monócitos para o LPS, o CD14 e MD-2. Após a ligação de LPS ao complexo de TLR4-MD-2, essencial para a via de sinalização do LPS, a dimerização do complexo ocorre, que leva ao recrutamento de moléculas adaptadoras (por exemplo, MyD88), e através de uma cascata de sinalização ativa fator de transcrição nuclear fator-kB (NF-kB), resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (Hu et al., 2013; Nijland et al., 2014).

Tabela 5 - Principais características da LPA experimental e grau de relevância de cada parâmetro.

Principais características da LPA Experimental	Grau de Relevância	
	Muito relevante	Relevante
Evidência histológica de lesão tecidual	a. Acumulação de neutrófilos no alvéolo ou no espaço intersticial; b. Formação de membranas hialinas; c. Presença de detritos proteicos no espaço alveolar (como fibrina); d. Espessamento da parede alveolar; e. Lesão mensurada por uma pontuação histológica padronizada	a. Evidência de hemorragia; b. Áreas de atelectasia; c. Alterações macroscópicas (por exemplo, descoloração dos pulmões).
Alteração da barreira alvéolo-capilar	a. Aumento no conteúdo de água pulmonar extravascular; b. Acumulação de proteína exógena nos espaços aéreos ou compartimento extravascular; c. Aumento da concentração de proteínas totais no LBA; d. Aumento da concentração de proteínas de alto peso molecular no LBA (por exemplo, albumina, IgM); e. Aumento do coeficiente de filtração microvascular;	a. Aumento da relação peso pulmonar úmido / seco; b. Translocação de proteína dos espaços aéreos para o plasma; c. Aumento do fluxo linfático do pulmão
Resposta inflamatória	a. Aumento do número absoluto de neutrófilos no LBA; Aumento da atividade ou concentração da mieloperoxidase pulmonar; b. Aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias no tecido do pulmão ou LBA.	a. Aumento na atividade pró-coagulante; b. Aumento da expressão de moléculas de adesão; c. Conversão do alveolite neutrofílica em alveolite mononuclear com tempo; d. Aumento dos níveis de metaloproteinases.
Evidência de disfunção fisiológica	a. Hipoxemia; b. Aumento da diferença de oxigenação alvéolo-arterial;	a. $PaO_2 / FIO_2 < 200$; b. Aumento da ventilação por minuto; c. Aumento da frequência respiratória.

FONTE: Matute-Bello et al., 2011.

Devido ao papel fundamental do receptor TLR 4 no modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS, a administração de anticorpo monoclonal anti-TLR4 reduz a produção de fatores inflamatórios (TNF- α e IL-6), atenua o grau de edema pulmonar e exibe efeito protetor contra a LPA induzida por LPS (Zhijie et al., 2014).

A lesão pulmonar aguda causada pela administração de LPS é seguida de uma fase inicial caracterizada pelo aumento de polimorfonucleares, albumina, alta atividade da MPO e citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) no lavado broncoalveolar (LBA) e de uma fase tardia (cerca de 48 horas após a administração) que é caracterizada pela normalização dos níveis de citocinas e aumento de macrófagos e linfócitos no LBA. A hipoxemia substancial, que é um pré-requisito para o diagnóstico da doença em humanos, é um parâmetro que não é consistente nas publicações com modelos de LPA induzida por LPS (Matute-Bello, Frevert, Martin, 2008; Matute-Bello et al., 2011).

No nível tecidual, a administração de LPS revela dano do parênquima pulmonar com acúmulo de células inflamatórias polimorfonucleares no espaço alveolar e intersticial, pouca membrana hialina, dano na membrana alvéolo-capilar, hemorragia alveolar e no espaço intersticial, edema e necrose celular (Voelker et al., 2014; Matute-Bello et al., 2011).

Apesar da grande importância dos modelos animais para o entendimento da fisiopatologia da LPA/SDRA, todos os modelos animais são limitados na sua habilidade de reproduzir todos os complexos aspectos da síndrome e por não replicar vários fatores de confusão, por exemplo, efeitos da idade, doenças crônicas e o impacto de fatores genéticos e ambientais que podem contribuir para o quadro clínico (Ware, 2008).

2.4 LPA/SDRA e a poluição atmosférica

Estudos anteriores exploraram os efeitos da poluição atmosférica na lesão pulmonar aguda em modelos animais.

Trabalhos indicam que a instilação intratraqueal de DEP no modelo de lesão pulmonar aguda induzido por LPS leva ao acentuado recrutamento de neutrófilos, edema intersticial, hemorragia alveolar, aumento do estresse oxidativo, aumento da expressão local de citocinas pró-inflamatórias, do receptor Toll-like 4 e moléculas relacionadas a inflamação neutrofílica (Takano et al., 2002; Yanagisawa et al., 2003; Yanagisawa et al., 2004). O agravamento da lesão é dose dependente em relação ao material particulado (Inoue et al., 2007) e quanto menor a partícula mais evidente é o agravamento da lesão pulmonar (Inoue et al., 2006).

A associação do material particulado com o LPS causa o espessamento das paredes alveolares, fragmentação e ruptura das células epiteliais tipo I, fragmentação de células endoteliais dos capilares e recrutamento de células inflamatórias (Inoue et al., 2009). Os componentes das partículas podem afetar de formas diferentes a lesão pulmonar aguda induzida por LPS. O núcleo de carbono em associação com o LPS pode agravar a lesão possivelmente via aumento da expressão de COX-2, enquanto os químicos orgânicos associados com o LPS diminuem a expressão de COX-2 (Inoue et al., 2004).

A maior parte dos estudos demonstra que a associação do particulado contido na poluição do ar e a lesão pulmonar aguda induzida por LPS ocasiona o agravamento da lesão, porém os modelos de exposição à poluição do ar e ao material particulado não mimetizam a condição real a qual a população de grandes cidades como São Paulo é exposta.

3. JUSTIFICATIVA

Tendo em consideração os achados da literatura e as evidências epidemiológicas, propusemos, neste projeto, um estudo experimental para investigar os efeitos e a relação entre a exposição à poluição do ar e o agravamento de lesão pulmonar aguda pré-existente e se a exposição prévia à poluição do ar é capaz de tornar um indivíduo mais susceptível a desenvolver uma lesão pulmonar aguda induzida por agente infeccioso.

Até onde sabemos não há estudos que mostram a interação da lesão pulmonar com a exposição sub-crônica aos níveis reais de poluição do ar. E grande parte dos estudos experimentais que exploraram a relação entre poluição do ar e doenças respiratórias utilizaram técnicas muito invasivas (intratraqueal ou intranasal) para administração do poluente (PM, DEP) o que não mimetiza as condições ambientais reais na qual estamos expostos.

Assim, este trabalho propõe um estudo sobre a interação e os efeitos da exposição à poluição do ar da cidade de São Paulo em condições reais sobre o desenvolvimento, agravamento e susceptibilidade à LPA.

4. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

4.1 *Objetivos gerais*

- Avaliar qual o impacto da poluição atmosférica de uma região urbana sobre a progressão da LPA induzida por LPS;
- Avaliar se a lesão induzida por LPS é alterada em um indivíduo previamente exposto à poluição atmosférica.

4.2 *Objetivos específicos.*

- Avaliação de alterações estruturais pulmonares envolvidas no binômio LPA – Exposição à poluição urbana através de técnicas estereológicas;
- Avaliação da inflamação *in situ*;
- Avaliação de citocinas pró-inflamatórias (IL 1 beta, IL 6, IL-8, TNF-alfa) no lavado broncoalveolar e soro sanguíneo no contexto da LPA e exposição à poluição urbana.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O modelo experimental de lesão pulmonar induzida por lipopolisacarídeo (LPS) empregado neste estudo foi obtido pela técnica de nebulização. Uma série de testes-piloto foi realizada para a determinação das doses e tempos de nebulização. Assim, resumidamente, os animais experimentais foram expostos ao material particulado concentrado previamente ou posteriormente a indução da lesão pulmonar. Após o período de exposição (protocolo descrito a seguir), foram coletados além dos pulmões fixados e congelados), o sangue e o lavado broncoalveolar para avaliação dos desfechos. Os pulmões foram avaliados por técnicas estereológicas para determinar as diferenças no volume pulmonar total, as densidades de volume de seus compartimentos, incluindo processos inflamatórios, e áreas de superfície de troca entre os grupos, além da avaliação *in situ* da inflamação através de técnicas histopatológicas de rotina e expressão gênica de citocinas envolvidas em processos inflamatórios. Já no LBA e no soro sanguíneo foram avaliadas citocinas envolvidas no processo inflamatório. Os demais órgãos dos animais também foram coletados para análises posteriores que se façam necessárias.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Grupos experimentais

Foram utilizados 96 camundongos machos da linhagem Balb/c (n por grupo= 16 animais), adultos jovens, com 7 a 9 semanas de idade pesando cerca de 25 g. Os animais foram obtidos junto ao Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e mantidos em condições controladas de temperatura (22 a 25°C) e luminosidade (ciclo 12h claro / 12h escuro) e 70% de umidade relativa. A alimentação constou de água e ração “ad libitum”. Os animais foram mantidos e manipulados de acordo com as normas de “Uso de Animais de Laboratório” do centro de bioterismo da FMUSP, sendo que todo esforço foi feito para minimizar o desconforto dos animais durante o estudo.

Os animais foram divididos em seis grupos conforme mostrado esquematicamente na figura 1.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Figura 1– Esquema dos grupos experimentais.

6.2 Exposição dos animais e caracterização dos poluentes

Os experimentos foram desenvolvidos dentro do INAIRA (Instituto Nacional de Análise Integrada do Risco Ambiental) na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) – Processo FAPESP 2008/57717-6 e CNPq 573813/2008-6. O projeto foi aprovado junto a comissão de ética da instituição sob o número 177/10 (Anexo B).

Para a avaliação dos efeitos da exposição ao material particulado sobre a lesão pulmonar induzida por LPS, os animais experimentais foram expostos a uma dada concentração de material particulado concentrado (MP) com o auxílio de um concentrador de partículas ambientais (CPA), localizado na FMUSP. O CPA é um equipamento que foi desenvolvido pela Escola de Saúde Pública de Harvard – EUA e utiliza a tecnologia de impactadores virtuais, com o propósito de concentrar em até 30 vezes as partículas ambientais presentes na atmosfera sem modificá-las química ou fisicamente (<http://www.inaira.org/br/intoxicacao/concentrador.shtml>). Este equipamento permite o controle da concentração à qual os animais foram expostos. O ar, então carregando uma concentração determinada de partículas, alimenta uma câmara onde animais foram expostos. Ao mesmo tempo e sob as mesmas condições de pressão, fluxo, temperatura e umidade relativa, outra câmara disposta paralelamente é alimentada com ar filtrado para exposição do grupo controle. Em ambas as câmaras os animais foram acondicionados em gaiolas apropriadas e livres para respirar naturalmente.

6.2.1 Protocolo de Exposição

Os animais de cada grupo foram expostos por um período de 5 semanas ao material particulado concentrado ou ar filtrado após ou previamente à indução de inflamação pulmonar por nebulização de LPS. A figura 1 apresenta um esquema do protocolo de indução da inflamação pulmonar e exposição ao material particulado concentrado.

A concentração à qual os animais foram expostos foi determinada com base nas exposições ambientais reais ao PM_{2,5} na cidade de São Paulo. A concentração de 600 µg. m⁻³ representa a concentração média diária total a que estamos sujeitos na cidade de São Paulo (Andrade et al., 2012; CETESB, 2008). Neste estudo optamos utilizar uma dose duas vezes maior (1200 µg. m⁻³) pelas seguintes razões:

- Camundongos apresentam maior eficiência na retenção de partículas na via aérea superior, devido a sua complexa anatomia nasal e;
- Camundongos apresentam maior eficiência de “*clearence*” alveolar, provavelmente por que seus ductos alveolares são conectados diretamente aos bronquíolos terminais, os quais tem um ativo aparato de “*clearence*” mucociliar (Phalen, Mendez; 2009).

6.2.2. Caracterização da exposição.

Embora o CPA possua um monitor em tempo real da concentração de partículas, estas foram também confirmadas gravimetricamente. A caracterização da exposição foi realizada a partir de filtros de amostragem equipado sem impactadores tipo Harward (Air Diagnostics, Harrison, ME) que estavam conectados a cada uma das câmaras em dias alternados. Ainda

utilizando os mesmos filtros, uma análise quali-quantitativa elementar (Na, Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, V, Fe, Ni, Cu, Zn e Pb) foi realizada com auxílio de um espectrofotômetro de fluorescência de raio X (Shimadzu EDX 700). A quantificação de endotoxina presente no material particulado também foi realizada conforme recomendado pelo kit comercial ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (Genscript, Piscataway, NJ).

6.3 Protocolo de Nebulização

A nebulização foi feita utilizando-se um nebulizador ultrassônico (Pulmosonic Star - Soniclear®) que transforma aproximadamente 80% da solução a ser inalada em micropartículas menores que 5 micrômetros, e tem a taxa de nebulização entre 0,75 ml/minuto a 1,25 ml/minuto. Durante a nebulização, os animais foram colocados em uma caixa de polisulfona com filtro na parte superior, onde foi acoplada uma das pontas do tubo corrugado em P.V.C. atóxico com cerca de 100 cm de comprimento. A outra extremidade foi acoplada ao nebulizador.

A fim de se evitar a contaminação no grupo controle foram utilizados duas caixas de nebulização e dois nebulizadores idênticos.

6.3.1. Dose e tempo de nebulização

Para a determinação da dose de LPS foi realizado um estudo piloto, testando diversas concentrações de LPS e tempos de nebulização diferentes. Também foi testada a metodologia de instilação intratraqueal em diversas doses, para a comparação com a metodologia de nebulização.

O protocolo de nebulização final constou de uma solução de volume total de 5 ml, a uma concentração de 3 mg/ml de LPS e com tempo suficiente para que toda a solução fosse nebulizada. Este protocolo foi escolhido pelas seguintes razões:

- Nível de inflamação satisfatória para a realização do estudo;
- Melhor distribuição da inflamação no tecido pulmonar quando comparado com o método de instilação intratraqueal, e;
- Método menos invasivo quando comparado ao método de instilação intratraqueal, minimizando, assim, o desconforto e estresse do animal e dispensando cuidados pós-operatórios.

Para os grupos experimentais nos quais a lesão pulmonar não foi induzida foi utilizada solução fisiológica a 0,9% de NaCl, em um volume total de 5 ml para a realização do protocolo de nebulização.

6.4 Coleta

6.4.1 Pulmões

Após 24 horas do término do protocolo de exposição, os animais foram eutanasiados por injeção intraperitoneal de tiopental sódico (200 mg.kg⁻¹ peso corporal), traqueostomizados e canulados. Em 8 animais de cada grupo, nos pulmões foram realizadas três lavagens de 0,5 ml de PBS cada e aproximadamente 1,0 ml de lavado bronco alveolar (LBA) foi recuperado. Após a coleta do LBA, os pulmões foram removidos da cavidade torácica e fixados por imersão em paraformaldeído 4% tamponado (em PBS) durante 24 horas para a avaliação estereológica.

Os outros 8 animais de cada grupo foram utilizados para avaliação *in situ* da inflamação induzida pelo LPS e, portanto, não foi realizado o LBA nestes animais. O pulmão esquerdo foi separado para análise histopatológica e o direito congelado em nitrogênio líquido para análises moleculares que foram realizadas. Assim, os animais foram eutanasiados da mesma forma, e por uma toracotomia mediana os pulmões foram expostos, o lobo direito foi isolado ligando-se o brônquio direito com fio de sutura 6.0. Em seguida a traqueia foi canulada e o pulmão esquerdo insuflado com aproximadamente 0,4 ml de solução salina 0,9%. Após a insuflação, o brônquio esquerdo foi ligado e os pulmões removidos e separados. O pulmão direito foi dividido em três fragmentos, acondicionados em criotubo e mantido freezer -80°C e o pulmão esquerdo mantido em solução fixadora de paraformaldeído 4% tamponado (em PBS) por 24 horas e posteriormente em álcool 70% até a realização das análises.

6.4.2 Sangue e Plasma

Em 8 animais o sangue foi coletado previamente à coleta do LBA e à remoção dos pulmões da cavidade torácica. O acesso foi feito pela veia cava inferior, utilizando seringa de 1 ml heparinizada. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1000G por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado, depois a amostra foi centrifugada novamente a 10000G por 10 minutos a 4°C e o soro foi coletado. As amostras foram armazenadas a -80°C até a análise.

Nos outros 8 animais o sangue foi coletado de forma similar e acondicionado em tubos com EDTA K3 (ácido etilenodiaminotetracético) para a realização de hemograma completo.

6.4.3 Demais órgãos

Os demais órgãos (coração, rins, fígado, baço, timo, cérebro e vias aéreas superiores) foram coletados, pesados, fixados em paraformaldeído 4% e ficarão guardados para possíveis análises futuras que se façam necessárias.

6.5 Protocolo do hemograma completo

As amostras sanguíneas acondicionadas em tubos com EDTA K3 foram utilizadas para a realização do hemograma completo. O hemograma foi realizado por método automatizado com o auxílio do analisador hematológico veterinário (POCH-100iV DIFF - Sysmex) na Divisão de Laboratório Central - HC-FMUSP.

A contagem diferencial de leucócitos foi feita manualmente. Após o preparo dos esfregaços sanguíneos, foram corados com Kit Instante Prov - conjunto de corantes para coloração diferencial rápida em hematologia (NewProv) e deixadas para secar à temperatura ambiente. Então 100 células por lâmina foram contadas e classificadas em neutrófilos (bastonetes e segmentados), basófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos.

6.6 Protocolos de análise do soro sanguíneo e do lavado bronco-alveolar

O LBA foi centrifugado (1000 rpm durante 10 minutos a 4° C) e o sobrenadante coletado e separado. O botão de células foi ressuspensionado em

300 µl de PBS, homogenado e utilizado para avaliação do número de células total e diferencial.

Para a avaliação de número total de células, 20 µl do “pellet” ressuspendido foi colocado em uma câmara de Neubauer. Para estimar o número total de células usou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Contagem total de células} = \text{contagem total} \times 10^5 \times \text{diluição da amostra}$$

Figura 2 - Representação da câmara de Neubauer. Os quadrantes destacados em vermelho representam os locais de contagem dos leucócitos.

Para avaliação diferencial das células foi utilizada uma centrífuga de células (Cytospin 3 - Shandon) para a confecção das lâminas. A centrífuga de células permite o preparo de esfregaços das suspensões celulares para uma análise morfológica e prepara uma monocamada de células numa área definida. O Cytospin é composto por um suporte para lâmina com um funil plástico seguida de um cilindro, onde a amostra ressuspendida é colocada. Entre a lâmina e o suporte é colocado um molde espesso de papel de filtro perfurado exatamente no local de encontro com o cilindro que depositará as células na área pré-determinada (Araújo-Jorge et al., 2000).

Desta forma, lâminas devidamente limpas e identificadas foram acopladas a centrífuga de células, 100 µl das amostras foram pipetadas nos funis e centrifugadas por 6 minutos a uma velocidade de 450 rpm. Depois das lâminas estarem secas, elas foram coradas com o auxílio do Kit Instante Prov - conjunto de corantes para coloração diferencial rápida em hematologia (NewProv). Posteriormente as lâminas foram montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) e deixadas para secar em temperatura ambiente. Após a realização do protocolo descrito acima as lâminas foram digitalizadas com o auxílio do escaner de lâminas digital Pannoramic SCAN (3DHistech Ltd., Budapest, Hungary) e as análises foram feitas com a ajuda do software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Durante a análise, as células foram classificadas em: macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e células epiteliais.

As dosagens das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF no lavado broncoalveolar e soro sanguíneo foram realizadas pelo método de citometria de fluxo em ensaios multiplex (*Cytometric Bead Assay* - CBA - BD Bioscience, CA, USA). O CBA foi utilizado conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. O limite de detecção de cada kit está discriminado na tabela 7.

As curvas padrão foram geradas para cada citocina utilizando a mistura de citocinas padrão fornecida pelo kit. Resumidamente, os padrões liofilizados foram reconstituídos em 4 mL de *Assay Diluent* ("Top Standard"), incubados por 15 minutos em temperatura ambiente e posteriormente foi realizada uma diluição seriada, segundo ilustrado na figura 3. A quantidade de proteína em cada diluição é mostrada na tabela 6.

Figura 3 - Representação da diluição seriada realizada para a curva padrão do CBA.

Tabela 6 - Concentração de proteínas (pg/ml) em cada ponto da curva padrão.

Diluição	Top Standard	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Concentração de proteína (pg/mL)	2500	1200	625	312,5	156	80	40	20	10

À 50 µl de cada ponto da curva padrão assim como à 50 µl de cada amostra de LBA e de soro foram adicionados 50µl de solução contendo as “beads” de captura de cada citocina e os tubos foram incubados por uma hora em temperatura ambiente. Depois do período de incubação, 50µl do reagente de detecção foram adicionados aos tubos e deixados por mais uma hora em temperatura ambiente no escuro.

Após as incubações, foi acrescentado 1 ml de tampão de lavagem e centrifugado por 5 minutos a 200g, o sobrenadante foi desprezado e as amostras foram ressuspensas em 300µl de tampão de lavagem para as

aquisições em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, CA, USA). Foi realizada a aquisição de 1200 eventos e a conversão de dados foi realizada utilizando o software FCAP Array (BD Bioscience, CA, USA). A concentração das citocinas em cada sobrenadante foi determinada por interpolação a partir da curva padrão correspondente. A gama de detecção foi 20-5000 pg/ mL para cada citocina.

O limite de detecção de cada citocina está mostrado na tabela 7.

Tabela 7 - Limite de detecção das citocinas avaliadas no soro sanguíneo e lavado broncoalveolar.

Citocina	Limite de detecção
Mouse IL-1 β Flex Set	1,9 pg/mL
Mouse IL-6 Flex Set	1,4 pg/mL
Mouse IL-10 Flex Set	9,6 pg/mL
Mouse TNF Flex Set	2,8 pg/mL

6.7 Avaliação Estereológica do pulmão

A estereologia vem sendo aplicada para a quantificação de estruturas pulmonares desde 1963 (Weibel, 1963). Recentemente, uma ação conjunta da ATS (American Thoracic Society) e da ERS (European Respiratory Society) padronizou os métodos estereológicos para o pulmão. Neste estudo seguimos as recomendações da ATS-ERS (Hsia et al., 2010).

Os seguintes parâmetros foram avaliados: volume pulmonar total, volume total e densidade de volume dos compartimentos pulmonares: parênquima pulmonar (excluindo-se brônquios, vasos, septos inter-lobulares, linfonodos); vias aéreas; vasos sanguíneos; espaços aéreos alveolares; septos

alveolares (pneumócitos e capilares); edema (quando presente); áreas de superfície total e densidade de superfície dos alvéolos, vias aéreas e vasos sanguíneos.

6.7.1 Amostragem e inclusão

A amostragem do pulmão foi feita de forma sistemática uniforme e randômica. A quantificação dos parâmetros pulmonares a serem avaliados foi conduzida em cortes verticais. Assim para a amostragem, os pulmões inteiros (incluindo as estruturas do hilo) foram incluídos em blocos de ágar (12%). O esquema da amostragem é mostrado na figura 4.

Figura 4 - Representação esquemática dos métodos e amostragem do pulmão para o estudo estereológico. A e B - preparação do ágar a 12%; C - pulmão a ser incluído; D - inclusão do pulmão em ágar; E e F - Cortes verticais seriados; G - Fatias obtidas para a estimativa do volume total pulmonar pelo método de Cavalieri.

6.7.2 Volume Pulmonar ("Reference Space")

O volume pulmonar foi estimado pelo método de Cavalieri. Por este método é possível estimar o volume de um objeto de forma arbitrária, seccionando-o em fatias paralelas equidistantes e multiplicando-se a distância entre os cortes pela somatória das áreas das faces de corte. As áreas das faces de corte ou transectos pode ser obtida facilmente pelo método de contagem de pontos. Para este fim, um sistema teste de pontos (de área associada ao ponto (ap) conhecida) foi sobreposto às fatias de ágar e os pontos incidentes sobre o compartimento de interesse foram contados em todas as fatias. Assim o volume foi obtido aplicando-se a fórmula:

$$V_{\text{pulmão}} = \sum p_t \times a(p) \times T$$

onde p_t são os pontos incidentes sobre o pulmão, $a(p) = 7,54 \text{ mm}^2$ e T é a espessura das fatias produzidas no ágar (neste caso 4mm).

6.7.3 Volume (V) e Densidade de Volume (Vv) dos Compartimentos Pulmonares

O método de contagem de pontos foi utilizado para estimarmos as densidades de volume das estruturas pulmonares de interesse: parênquima pulmonar, vias aéreas, vasos sanguíneos, espaços aéreos alveolares e septos alveolares (pneumócitos e capilares).

Para esta análise os blocos de parafina foram seccionados em cortes de 5 μm de espessura e dois pares de cortes consecutivos de cada bloco, distantes 300 μm foram coletados em lâminas de vidro histológicas. Cortes randomicamente selecionados também foram coletados em lâminas para

estudos histoquímicos adicionais (análise de colágeno e fibras elásticas). Os cortes foram corados pelo método hematoxilina-eosina.

Para a análise estereológica das lâminas foi utilizado o software newCASTTM (Visiopharm) ligado a um microscópio ótico (Eclipse Ni, Nikon).

Antes de o software realizar a amostragem randômica e sistemática do tecido pulmonar foi desenhada a região de interesse (ROI) utilizando a menor objetiva disponível (2X) (figura 5). As regiões selecionadas serviram para guiar o processo de amostragem e apenas campos de visão dentro das ROI são amostrados.

Figura 5 - Exemplo de região de interesse (ROI) selecionada no software newCAST.

Após a seleção das ROIs de 10 a 12 campos por lâmina foram randomicamente selecionados e analisados em um aumento de 40x. Para a análise da densidade de volume e volume total dos compartimentos pulmonares (vias aéreas, vasos sanguíneos, espaços aéreos alveolares;

septos alveolares (pneumócitos e capilares) e edema quando presente) foi gerado um sistema teste de pontos (figura 6) com uma área de 2730,54 μm^2 .

Os pontos incidentes sobre as diferentes estruturas pulmonares foram contados em todos os campos e a densidade de volume foi obtida pela fórmula:

$$V_{v\text{comp}} = \sum pt_{\text{comp}} / \sum pt_{\text{parênquima}}$$

onde $\sum pt_{\text{comp}}$ e $\sum pt_{\text{parênquima}}$ referem-se a soma de todos os pontos contados em todos os campos analisados de cada pulmão.

A densidade de cada compartimento foi então convertida em volume absoluto (total) multiplicando-se a densidade de volume ($V_{v\text{comp}}$) pelo volume total do espaço de referência correspondente.

$$V_{\text{comp}} = V_{v\text{comp}} \times V_{\text{pulmão ou parênquima}}$$

6.7.4 Áreas de superfície total e Densidade de superfície dos alvéolos, vias aéreas e vasos sanguíneos.

Quando avaliamos áreas de superfície é importante randomizarmos a orientação, pois esta medida é influenciada pela orientação da estrutura. Da mesma forma e nos mesmos campos que foram utilizados para as medidas de volume utilizamos um sistema teste de linhas para os pulmões (cortes verticais). Nesta análise as intersecções entre os segmentos de reta (figura 6) e os limites da estrutura analisada foram contadas. E, aplicando-se os dados na fórmula a seguir obtivemos as estimativas de densidade de área das estruturas:

$$S_{v\text{comp}} = 2 \times \sum l_{\text{comp}} / \sum pt_{\text{comp}} \times l(p)$$

onde $l(p)$ é o comprimento do linha, $\sum l$ é o número total de intersecções entre os segmentos de reta e o compartimento de interesse e $\sum pt$ é o número de pontos no compartimento de interesse.

As áreas de superfície absolutas serão obtidas aplicando-se a fórmula:

$$St_{comp} = Sv_{comp} \times Vt_{pulmão}$$

onde Sv_{comp} é densidade de volume do compartimento analisado e $Vt_{pulmão}$ é o volume total dos pulmões.

Figura 6- Exemplo da aplicação do sistema teste de pontos e de segmentos de reta para estimativa das densidades de volume e densidades de superfície dos compartimentos pulmonares no software newCAST.

6.7.5 Estimativa da espessura dos septos alveolares (Arithmetic mean thickness)

A espessura dos septos alveolares foi derivada a partir da média aritmética (AMT_{septo}) aplicando-se a seguinte fórmula:

$$AMT_{septo} = 2 \times Vt_{septo} / St_{septo}$$

onde $V_{tseptos}$ é o volume total dos septos alveolares e $S_{tseptos}$ é a área de superfície total dos septos alveolares.

6.8 Avaliação in situ da inflamação induzida pelo LPS

Nesta análise, foi feita uma avaliação histopatológica de rotina empregando técnicas imunohistoquímicas para a determinação e caracterização da resposta inflamatória. Foram contadas as células inflamatórias imunomarcadas (neutrófilos, linfócitos e macrófagos) e a proporção de área de tecido imunomarcado para as seguintes citocinas:

- a) IL-1 β : Importante mediador da resposta inflamatória e está envolvida em uma variedade de atividades celulares como proliferação e diferenciação celular e apoptose.
- b) IL-6: Tem funções no processo inflamatório e na maturação de células B. Esta proteína é produzida principalmente em locais de inflamação aguda ou crônica.
- c) IL-8: Atua no processo inflamatório como um quimiotático para neutrófilos.
- d) IL-10: Atua como um mediador da resposta inflamatória principalmente como citocina anti-inflamatória inibindo a produção de citocinas por macrófagos.
- e) TNF- α : Tem um papel pró-inflamatório multifuncional. Ela é principalmente secretada por macrófagos e está envolvida em uma variedade de processos biológicos como diferenciação e proliferação celular, apoptose, metabolismo lipídico e coagulação.

A análise de cada lâmina marcada com os anticorpos CD3 (linfócitos T) e MPO (neutrófilo) foi realizada no parênquima pulmonar. Foram selecionados 20 campos de cada lâmina (objetiva de 40x) e as células imuno marcadas foram contadas. Também foi feita a medida da área total de cada campo e da área sem tecido pulmonar (branco) com o auxílio do software Image-Pro Plus 4.1 for Windows (Media Cybernetics, Silver Spring, Md). Através destas medidas foi possível estimar a quantidade de tecido pulmonar em cada campo (área total do campo - área sem tecido pulmonar) e a proporção de número de células marcadas por área de tecido (número de células positivamente marcada / quantidade de tecido pulmonar).

A análise de cada lâmina marcada com os anticorpos IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α foi realizada nas vias aéreas e no parênquima pulmonar.

Foram selecionadas cinco vias aéreas cortadas transversalmente por animal para a análise. Em cada via aérea foi medido o perímetro, diâmetro maior, diâmetro menor, área total e área positivamente marcada (um espectro de cor previamente definido para cada anticorpo a partir de lâminas do próprio estudo) com o auxílio do software Image-Pro Plus 4.1 for Windows (Media Cybernetics, Silver Spring, Md). Para a estimativa das áreas totais e positivamente marcadas, as vias aéreas foram subdivididas em área interna, que se localiza no limite do epitélio, e área externa, que se localiza entre a camada muscular externa e o limite da via aérea (inserção dos septos alveolares).

No parênquima pulmonar foram selecionados 6 campos excluindo-se vias aéreas e vasos sanguíneos para a análise. Em cada campo foi medida a área total do campo, área positivamente marcada (um espectro de cor previamente

definido para cada anticorpo a partir de lâminas do próprio estudo) e área sem tecido pulmonar (branco) com o auxílio do software Image-Pro Plus 4.1 for Windows (Media Cybernetics, Silver Spring, Md). Através destas medidas foi possível estimar a quantidade de tecido pulmonar em cada campo (área total do campo - área sem tecido pulmonar) e a proporção de tecido marcado (área positivamente marcada / quantidade de tecido pulmonar em cada campo).

Os anticorpos utilizados e concentrações padronizadas estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Descrição da imunomarcção, anticorpo utilizado e concentração padronizada.

Imunomarcção	Anticorpo	Concentração Padronizada
Neutrófilo	Anti – MPO (Abcam – cod. ab9535)	1:750
Linfócito	Anti - CD3 (Serotec – cod .MCA1477)	1:800
Macrófago	Anti - MAC 2 (Cedarlane – cod. CL8942AP)	1:100.000
IL – 1β	Anti – IL-1 β (Santa Cruz – cod. sc-7884)	1:400
IL - 6	Anti – IL-6 (Santa Cruz – cod. sc-1265)	1:1500
IL- 8	Anti – IL- 8 (Abcam – cod.ab110727)	1:500
TNF - α	Anti – TNF – α (Santa Cruz – cod. sc-1348)	1:3000

A imuno-histoquímica (IHQ) utilizada para a pesquisa do anticorpo em tecido pulmonar foi realizada pelo método peroxidase.

Os cortes histológicos a 5 µm de espessura foram realizados em lâminas silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano - Sigma) e seguiu-se o protocolo abaixo descrito.

6.8.1. Hidratação

As lâminas foram desparafinadas com xilol quente (60°C) 15 min e xilol frio por 15 min. lavadas em álcool absoluto, 95 % e hidratadas em água corrente e deionizada.

6.8.2. Recuperação antigênica

Segue-se a recuperação antigênica obtida através de alta temperatura em Panela Pressão, a 125°C por 1min tampão citrato Ph6,0. Após este período, as lâminas foram e lavadas em PBS.

6.8.3. Bloqueio

Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) 10V 3% 4 vezes de 5 minutos cada, seguiu-se a lavagem com água e PBS.

6.8.4. Incubação com o anticorpo primário

Após os bloqueios, os anticorpos primários foram aplicados sobre os cortes e controles, positivo e negativo de tecido, lâminas incubadas “*overnight*” em geladeira 4 graus em câmara úmida.

As lâminas então foram lavadas em PBS e incubadas pelo ABC Kit Vectastain (Vector Elite—Vector Laboratories, Inc. Ingold Road Burlingame, CA).

Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidine (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina de Harris 30 segundos (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas e montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Após a realização do protocolo descrito acima as lâminas foram escaneadas com o auxílio do escaner de lâminas digital Pannoramic SCAN (3DHistech Ltd., Budapest, Hungary) e foram analisadas com a ajuda do software Image-Pro® Plus versão 4.5 para Windows® (Media Cybernetics – Silver Spring MD, USA).

6.9 Análise de colágeno e fibras elásticas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas

Para a análise de colágeno total, as lâminas foram coradas com a técnica de *Picrossirius Red* de acordo com o protocolo descrito abaixo.

Resumidamente, as lâminas foram desparafinadas e hidratadas em gradiente de álcool (absoluto – 95% - 70%- água). Depois as lâminas foram coradas com *Sirius red* por 15 minutos e lavadas em águas corrente. Então as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Carazzi por 5 minutos e lavadas novamente em água corrente. Finalmente as lâminas foram desidratadas em gradiente de álcool (70% - 95% - absoluto), passadas no xilol e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Nesta coloração as fibras colágenas se coram em vermelho vivo.

As moléculas de colágeno são ricas em aminoácidos básicos e reagem fortemente com corantes ácidos como o *Sirius Red* que reage com colágeno promovendo o aumento de sua birrefringência natural. Quando analisadas sob luz polarizada, as fibras de colágeno assumem cores e intensidades de birrefringência variadas de acordo com os diferentes graus de agregação física dos diferentes tipos de colágeno (Montes et al., 1984; Montes, Junqueira, 1988).

Para a análise qualitativa das fibras colágenas, as lâminas coradas com *sirius red* foram analisadas sob luz polarizada, sendo possível a distinção entre o colágeno tipo I, que se apresenta com cor amarela avermelhada e colágeno tipo III, de coloração esverdeada. O colágeno tipo II não forma fibras e mostra uma fraca birrefringência de cor variável (Junqueira et al., 1978; Montes et al., 1980; Zambrano et al., 1982).

Para a análise de fibras elástica, as lâminas foram coradas com Resorcina Fucsina oxidada de acordo com o protocolo descrito abaixo.

Resumidamente, as lâminas foram desparafinadas e hidratadas em gradiente de álcool (absoluto – 95% - 70% - água). Depois as lâminas foram oxidadas em solução de oxona 10% por 40 minutos, lavadas com água por 5 minutos e passadas rapidamente por álcool 70% e 96%. Então as lâminas foram coradas com resorcina-fucsina por 1 hora em temperatura ambiente e lavadas por mais 5 minutos. As lâminas foram diferenciadas em álcool 70% até ser possível ver apenas as fibras elásticas em roxo escuro. Finalmente as lâminas foram desidratadas em gradiente de álcool (95% - absoluto), passadas no xilol e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Este método de coloração demonstra as fibras elásticas elastínicas e oxitalânicas, conferindo-lhes uma cor púrpura (Fullmer et al., 1974; Weigert, 1898).

A análise de colágeno total e fibras elásticas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas foram realizadas da mesma forma que as análises imunohistoquímicas, descritas no item anterior (vide item Material e Método 7.8).

6.10 Protocolo de análises moleculares:

Para a análise da expressão gênica dos genes IL-1 β , IL – 6, IL-8, IL-10, TNF- α , colágeno tipo I e III e TGF- β os tecidos pulmonares foram coletados, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e acondicionados no freezer - 80°C até a análise. As amostras de pulmão foram imersas em 1 ml de TRIZOL (Invitrogen®) e a extração do RNA total foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Preparações com uma razão de densidade óptica 260/280 nm < 1,7 (critério de pureza da amostra) foram descartadas. As soluções de RNA foram aliquotadas e armazenadas a -80°C até o uso. A integridade do RNA extraído foi analisada em gel de agarose e quantificado no espectrofotômetro.

A síntese do cDNA foi realizada com 1 μ g do RNA total seguindo as recomendações da bula do kit SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit and Master Mix (Invitrogen®) e armazenado a -80°C até o uso.

A análise da expressão gênica foi feita através do PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Os primers *forward* e *reverse* foram escolhidos em éxons distintos para evitar amplificação de DNA genômico. Os primers *forward* e *reverse* específicos para cada gene de interesse dos camundongos (*Mus musculus*) e para genes candidatos a controle interno (genes com expressão similar entre os tratamentos), foram desenhados utilizando-se o software Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) e sua especificidade foi verificada através do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Os genes

candidatos a controle interno foram: β -actina, Ciclofilina, S18 e RPL13a. As expressões de cada um destes genes foram analisadas no software GeNorm para a seleção do melhor controle endógeno e o gene selecionado foi o RPL13a. As sequências de cada primer são apresentadas na tabela 09.

Tabela 9 - Descrição de cada sequência *foward* e *reverse* dos primers.

Gene	Sequência <i>Foward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
β-actina	AGCCATGTACGTAGCCATCC	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA
Ciclofilina	ATGGTCAACCCACCGTGT	TCTGCTGTCTTTGGGACCTTGTC
S18	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGCTAGTAGCG
RPL13a	AACCTTTGGTCCCCACTTCCCT	TCCTCAAGACCAACGGACTCCT
IL-1β	TTCCATTAGACAACCTGCACTAC	GTCGTTGCTTGTTCTCCTT
IL-6	TGTGCAATGGCAATTCTGAT	TCTGCTGTCTTTGGGACCTTGTC
IL-8	TGGGATTCACCTCAAGAACA	TGGGGACACCTTTTAGCATC
IL-10	GTACAGCCGGGAAGACAATAA	GCATTAAGGAGTCGGTTAGCA
TNF-α	GGTGCCTATGTCTCAGCCTC	CACTTGGTGGTTTGCTACGA
TGF-β	ATACGCCTGAGTGGCTGTCT	TCTCTGTGGAGCTGAAGCAA
Colágeno tipo 1 α1	CACCCTCAAGAGCCTGAGTC	GTTCCGGGCTGATGTACCACT
Colágeno tipo 3 α1	TGGTCCTCAGGGTGTAAGG	GTCCAGCATCACCTTTTGGT

A concentração de primers foi otimizada. A reação de PCR Real Time foi realizada utilizando-se 2 μ l de cDNA; 5 μ l de SYBR Green PCR Master Mix

(Applied® Biosystems), 0,4 µl da mistura de primers e 2,6 µL de água miliQ estéril. O ensaio RT-PCR foi realizado em equipamento 7500 Fast Real time PCR System (Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60 °C por 60 segundos. Cada reação de PCR foi realizada em duplicata. Como controle negativo foi realizada amplificação do gene alvo na ausência de cDNA. Os valores obtidos foram expressos em *threshold cycle* (CT), que é determinado pelo número de ciclos em que o sinal de fluorescência cruza a linha de *threshold*. A expressão de cada gene alvo foi determinada utilizando-se a fórmula: $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001). O resultado é representado em número de vezes que o tratamento aumentou ou diminuiu a expressão do gene comparado a amostra controle.

6.11 Estratégia de análise dos dados obtidos.

O presente estudo apresenta dois objetivos distintos. O primeiro objetivo pretende avaliar a resposta aguda à administração ao LPS em animais previamente expostos à poluição atmosférica. Para tanto 4 dos 6 grupos iniciais apresentados foram utilizados (Figura 7).

O segundo objetivo pretende avaliar a resposta tardia à administração ao LPS nos animais expostos à poluição atmosférica posteriormente a indução da LPA. Os grupos Controle e CPA estão presentes na análise de ambos os objetivos por representarem o controle negativo e o controle da exposição à poluição (figura 8).

Figura 7 - Diagrama exemplificando a estratégia adotada de análise dos dados em relação ao objetivo 1: Avaliar se a lesão induzida por LPS é alterada em um indivíduo previamente exposto à poluição do ar.

Figura 8 - Diagrama exemplificando a estratégia adotada de análise dos dados em relação ao objetivo 2: Avaliar qual o impacto da poluição atmosférica de uma região urbana sobre a progressão da LPA induzida por LPS.

6.12 Análise estatística

Toda a análise estatística foi realizada utilizando-se o software estatístico SPSS 17 (SPSSinc® / IBM® Chicago, EUA). Médias, medianas, erros padrões (SE), desvios padrões (SD) ou intervalos interquartis (IQR) foram calculados para cada grupo.

Inicialmente, foi aplicado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para a determinação do perfil de distribuição dos dados (paramétricos ou não paramétricos). Para a comparação das variáveis que envolviam apenas dois grupos de exposição utilizamos o Teste t de Student ou teste de Mann-Whitney de acordo com a distribuição paramétrica ou não paramétrica dos dados respectivamente. As variáveis categóricas foram comparadas usando-se o teste Chi-quadrado.

Comparações entre mais de dois grupos foram analisadas pelo teste de Análise de Variância (One-way ANOVA) seguido pelo teste *post-roc* de Tukey para variáveis paramétricas ou teste de Kuskal-Wallis seguido do teste *post-roc* de Bonferroni para variáveis não paramétricas. Para avaliação dos desfechos nos grupos estudados conforme o objetivo avaliado (vide seção 6.10). Para monitorar a variação entre indivíduos de um mesmo grupo, nós também calculamos o coeficiente de variação observado (CV- desvio padrão/ média) para algumas variáveis.

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil) para os dados paramétricos e não paramétricos respectivamente.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterização da exposição ao material particulado 2,5 (PM_{2,5}).

Durante o período de exposição dos animais foram coletados um total de 22 filtros, sendo que destes, 20 (18 filtros coletados e 2 filtros branco utilizados como controle) foi possível quantificar a concentração o material particulado 2,5 e *black carbon* (BC). Os valores de PM_{2,5} e BC estão apresentados na tabela 9.

Tabela 10 - Concentração de PM_{2,5} (µg/m³) e BC (µg/m³) nos filtros amostrados durante o período de exposição dos animais.

Identificação dos filtros	Concentração de PM _{2,5} (ug/m ³)	Concentração de BC (ug/m ³)
MP120056		Branco
MP120057	13,7	2,582
MP120058	10,7	4,181
MP120059	14,4	5,165
MP120060	22,7	11,719
MP120061	21,5	15,944
MP120062	18,9	8,866
MP120063	20,3	5,615
MP120064	14,7	4,724
MP120065	8,7	5,185
MP120066	8,1	3,118
MP120089		Branco
MP120090	14,1	3,572
MP120091	15,7	3,809
MP120092	27,5	
MP120093	27	6,398
MP120094	52,9	27,021
MP120095	29,8	7,499
MP120097	16,5	
MP120098	7,2	1,248
MP120099	33,5	
Média	19,89	7,290

Quanto a análise elementar dos materiais particulados presentes nos filtros amostrados o elemento químico inorgânico predominante foi o enxofre (S, média = 0,858 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) seguido do ferro (Fe, média = 0,48 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), cromo (Cr, média = 0,246 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), silício (Si, média = 0,172 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), potássio (K, média = 0,146 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), sódio (Na, média = 0,115 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), alumínio (Al, média = 0,054 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), cálcio (Ca, média = 0,044 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), cloro (Cl, média = 0,038 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), fósforo (P, média = 0,026 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), níquel (Ni, média = 0,0165 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), zinco (Zn, média = 0,0161 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), cobre (Cu, média = 0,011 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), manganês (Mn, média = 0,010 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), titânio (Ti, média = 0,0039 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), chumbo (Pb, média = 0,0038 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), bromo (Br, média = 0,003 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) e vanádio (V, média = 0,001 $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Gráfico 1 – Representação gráfica da concentração média dos elementos químicos inorgânicos presentes no material particulado ($\mu\text{g}/\text{m}^3$).

A quantificação de endotoxina foi realizada no material particulado 2,5 extraído de um dos filtros coletados. Esta amostra apresentou uma concentração

de 0,975 de unidades de toxina por miligrama de material particulado 2,5 (EU/mg).

7.2 Resultados referentes aos grupos Controle, LPS 24 horas, Poluição e LPS + Poluição (objetivo 1).

7.2.1 Eritrograma

O número de eritrócitos apresentou-se significativamente menor no grupo poluição + LPS ($8,4767 \pm 0,40213$) em relação ao grupo LPS 24 horas ($9,8038 \pm 0,73391$; $p=0,006$). A quantidade de hemoglobina também foi significativamente menor no grupo poluição + LPS ($14,60 \pm 0,577966$) em relação ao grupo LPS 24 horas ($16,3875 \pm 1,03294$; $p=0,028$). Houve ainda a redução significativa do hematócrito no grupo poluição + LPS ($42,05 \pm 1,2502$; $p=0,012$) e poluição ($43,225 \pm 3,70396$; $p=0,038$) em relação ao grupo LPS 24 horas ($47,5375 \pm 2,85854$).

O VCM (volume corpuscular médio) foi significativamente maior no grupo poluição + LPS ($50,25 (1,88)$) em relação aos grupos controle ($48,15 (0,35)$; $p=0,012$), LPS 24 horas ($48,2 (0,48)$; $p=0,042$) e poluição ($47,3 (1,02)$; $p=0,001$). O HCM (hemoglobina corpuscular média) mostrou um aumento significativo no grupo poluição + LPS ($17,25 \pm 0,65345$) em relação aos grupos controle ($16,575 \pm 0,19821$; $p=0,011$), LPS 24 horas ($16,6625 \pm 0,22638$; $p=0,031$) e poluição ($16,4375 \pm 0,32923$; $p=0,002$).

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a média da amplitude da distribuição de eritrócitos (RDW-CV) não apresentaram alteração

significativa. Os valores de média e desvio padrão são apresentados na tabela 11, anexo A.

7.2.2 Leucócitos

O número de leucócitos (mil/mm^3) presente no sangue teve um aumento significativo no grupo poluição ($4,0 (3,0)$) em relação aos grupos controle ($2,0 (0,0)$; $p=0,017$) e poluição + LPS ($2,0 (1,0)$; $p=0,006$) – Gráfico 2A.

O número de células totais no lavado bronco-alveolar foi significativamente maior nos grupos LPS 24 horas ($3,36 \times 10^5 \pm 2,15 \times 10^4$; $p=0,0001$), poluição ($2,13 \times 10^5 \pm 1,067 \times 10^5$; $p=0,014$) e poluição + LPS ($2,6 \times 10^5 \pm 3,3 \times 10^4$; $p=0,001$) em relação ao grupo controle ($1,496 \times 10^5 \pm 3,58 \times 10^4$). Houve ainda redução do número de células totais nos grupos poluição ($p=0,006$) e poluição + LPS em relação ao grupo LPS 24 horas ($p=0,032$) – Gráfico 2B.

Gráfico 2 - Representação gráfica do número de leucócitos presentes no sangue (mil/mm^3) (A) e do número de células totais no lavado bronco-alveolar (B).

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle;

† $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS 24 horas;

‡ $p < 0,05$ em relação ao grupo poluição.

Quanto ao esfregaço do lavado bronco-alveolar, no grupo controle nota-se a presença de poucas células inflamatórias (figura 9 – A). No grupo poluição há a presença predominante de macrófagos (figura 9 – B), já no grupo LPS 24 horas há uma presença intensa de células inflamatórias, principalmente neutrófilos (figura 9 – C) e no grupo poluição + LPS há a presença principalmente de neutrófilos e macrófagos (figura 9 – D).

Figura 9 - Fotomicrografia do esfregaço do lavado bronco-alveolar: A – grupo controle (40x); B – grupo poluição (40x); C – grupo LPS 24 horas (40x) e D – grupo poluição + LPS (40x).

7.2.3 Neutrófilos

O número de neutrófilos (mil/mm³) presente no sangue apresentou um aumento significativo no grupo LPS 24 horas (1,125 (0,318)) em relação aos grupos controle (0,635 (0,273); p=0,0001); e poluição+LPS (0,460 (0,390); p=0,0001). Houve ainda um aumento no número de neutrófilos no grupo poluição (1,205 (0,375)) em relação ao grupo controle (p=0,009) e poluição + LPS (p=0,005) – Gráfico 3A.

O número total de neutrófilos presentes no lavado bronco-alveolar foi significativamente maior no grupo LPS 24 horas ($3,03 \times 10^5$ (31002,01)) em relação aos grupos controle (1128,44 (6750,15); p=0,0001), poluição (5619,71 (7440,2); p=0,0001) e poluição + LPS ($2,023 \times 10^5$ (63467,53); p=0,0001). Também houve um aumento no grupo LPS + poluição em relação aos grupos controle (p=0,0001) e poluição (p=0,0001) – Gráfico 3B.

O grupo LPS 24 horas ($8,44 \times 10^{-6}$ ($5,42 \times 10^{-6}$)) apresentou maior quantidade de neutrófilos (mieloperoxidase (MPO) positivo) no tecido pulmonar em relação aos grupos controle ($8,44 \times 10^{-6}$ ($9,5 \times 10^{-6}$); p=0,0001), poluição ($4,08 \times 10^{-6}$ ($3,5 \times 10^{-6}$); p=0,0001) e poluição + LPS ($01,87 \times 10^{-5}$ ($1,51 \times 10^{-5}$); p=0,0001) – Gráfico 3C.

Gráfico 3 – Representação gráfica da quantidade de neutrófilos presentes no sangue (mil/mm³) (A), do número total de neutrófilos no lavado bronco-alveolar (B) e da proporção de neutrófilos por unidade de área de tecido pulmonar (C).

- * p<0,05 em relação ao grupo controle;
- † p<0,05 em relação ao grupo LPS 24 horas;
- ω p<0,05 em relação ao grupo poluição+LPS;
- outlier.

7.2.4 Linfócitos

O número de linfócitos (mil/mm^3) presente no sangue foi significativamente maior no grupo poluição (2,0 (2,0)) em relação aos grupos poluição + LPS (1,0 (1,0); $p=0,001$) e controle (1,0 (0,0); $p=0,013$) – Gráfico 4A.

Não houve alteração significativa no número total de linfócitos presente no lavado bronco-alveolar – Gráfico 4B. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 11, anexo A.

A proporção de linfócitos T imunomarcados por unidade de área de tecido pulmonar apresentou-se maior no grupo LPS 24 horas ($6,7 \times 10^{-4}$ ($1,4 \times 10^{-4}$)) em relação aos grupos controle ($3,1 \times 10^{-4}$ ($2,7 \times 10^{-4}$); $p=0,001$), poluição ($2,9 \times 10^{-4}$ ($1,1 \times 10^{-4}$); $p=0,0001$) e poluição + LPS ($4,5 \times 10^{-4}$ ($8,9 \times 10^{-5}$); $p=0,028$) – Gráfico 4C.

Gráfico 4 – Representação gráfica da quantidade de linfócitos presentes no sangue (mil/mm³) (A), do número total de linfócitos no lavado bronco-alveolar (B) e da proporção de linfócitos T por unidade de área de tecido pulmonar (C).

† p<0,05 em relação ao grupo LPS 24 horas;

υ p<0,05 em relação ao grupo poluição;

● outlier.

7.2.5 Monócitos e macrófagos

O número de monócitos (mil/mm³) presentes no sangue não apresentou alteração significativa – Gráfico 5A. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 11, anexo A.

O número total de macrófagos presentes no lavado bronco-alveolar apresentou uma quantidade menor significativa no grupo LPS 24 horas ($2,4 \times 10^4 \pm 9,21 \times 10^3$) em relação aos grupos controle ($1,39 \times 10^5 \pm 3,59 \times 10^4$; $p=0,0001$) e poluição ($1,79 \times 10^5 \pm 9,95 \times 10^4$; $p=0,0001$). Houve ainda diminuição significativa no grupo poluição + LPS ($3,62 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^4$) em relação aos grupos controle ($p=0,004$) e poluição ($p=0,0001$) - Gráfico 5B.

Os grupos LPS 24 horas ($8,07 \times 10^{-5}$ ($2,2 \times 10^{-5}$); $p=0,004$), poluição ($7,71 \times 10^{-5}$ ($1,9 \times 10^{-5}$); $p=0,006$) e poluição+LPS ($7,12 \times 10^{-5}$ ($2,1 \times 10^{-5}$); $p=0,015$) apresentaram aumento na quantidade de macrófagos (MAC2 +) no parênquima pulmonar em relação ao grupo controle ($3,83 \times 10^{-5}$ ($3,6 \times 10^{-5}$)) – Gráfico 5C.

Gráfico 5 – Representação gráfica da quantidade de monócitos presentes no sangue (mil/mm³) (A); do número total de macrófagos no lavado bronco-alveolar (B) e da proporção de macrófagos (MAC 2+) por unidade de área de tecido pulmonar (C).

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle;
 † $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS 24 horas;
 ω $p < 0,05$ em relação ao grupo poluição+LPS;
 ● *outlier*.

7.2.6 Plaquetas

Houve uma redução no número de plaquetas no grupo poluição (803,33 $\pm$ 188,248) em relação ao grupo controle (1185 $\pm$ 186,58; $p=0,003$) e LPS 24 horas (1348,13 $\pm$ 165,755; $p=0,0001$) e uma redução no grupo poluição + LPS (905,86 $\pm$ 169,097) também em relação ao grupo controle ($p=0,026$) e LPS 24 horas ($p=0,0001$) – Gráfico 6.

Gráfico 6– Representação gráfica da média de plaquetas presentes no sangue (mil/mm³).

* $p<0,05$ em relação ao grupo controle;
† $p<0,05$ em relação ao grupo LPS 24 horas.

7.2.7 IL-1 β

A quantidade de IL-1 β no soro sanguíneo não apresentou alteração significativa – Gráfico 7A. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 11, anexo A.

A quantidade de IL-1 β no lavado bronco-alveolar foi significativamente maior nos grupos LPS 24 horas (23,685 (15,09)) em relação ao grupo controle (0 (0); $p=0,0001$) e poluição (0,01 (0,026); $p=0,0001$). Houve também um aumento no grupo poluição + LPS (12,87 (7,54)) em relação ao grupo controle ($p=0,001$) e poluição ($p=0,002$). Ainda houve uma tendência à diminuição no grupo poluição + LPS em relação ao grupo LPS 24 horas ($p=0,063$) – Gráfico 7B.

A quantidade de IL-1 β no parênquima pulmonar apresentou-se maior no grupo LPS 24 horas (0,046 (0,047)) em relação aos grupos controle (0,022 (0,098); $p=0,025$) e poluição (0,0048 (0,0055); $p=0,002$). Ainda houve um aumento no grupo poluição + LPS (0,062 (0,0057)) em relação ao grupo poluição ($p=0,006$) e uma tendência ao aumento em relação ao grupo controle ($p=0,06$) - Gráfico 7C.

O grupo poluição (1,141 (0,637)) mostrou uma quantidade menor de IL-1 β nas vias aéreas em relação aos grupos controle (3,274 (0,33); $p=0,033$), LPS 24 horas (3,707 (2,18); $p=0,005$) e poluição + LPS (4,718 (1,086); $p=0,0001$) – Gráfico 7D.

Os níveis de expressão gênica de IL-1 β no tecido pulmonar mostrou-se maior no grupo LPS 24 horas (16,716 (12,85) em relação aos grupos controle (0,933 (0,3814); $p=0,0001$), poluição (3,535 (3,18); $p=0,0001$) e poluição + LPS (1,109 (0,25); $p=0,0001$) – Gráfico 7E.

Gráfico 7 – Representação gráfica da quantificação de IL-1 β : (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas e (E) expressão gênica relativa.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; † $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS 24 horas; ∪ $p < 0,05$ em relação ao grupo poluição; ● *outlier*.

7.2.8 IL-6

A quantidade de IL-6 no soro sanguíneo foi significativamente maior nos grupos LPS 24 horas (800,81 (613,53)) em relação ao grupo poluição (0,125 (0,21); $p=0,027$) e uma tendência em relação ao grupo controle (0,09 (0,3); $p=0,067$) – Gráfico 8A.

A quantidade de IL-6 no lavado bronco-alveolar foi significativamente maior nos grupos LPS 24 horas (800,81 (613,53)) em relação ao grupo controle (0 (0); $p=0,0001$) e poluição (0,1 (0,34); $p=0,0001$). Houve também um aumento no grupo poluição + LPS (325,27 (231,23)) em relação ao grupo controle ($p=0,008$) e poluição ($p=0,008$). Ainda houve uma diminuição no grupo poluição + LPS em relação ao grupo LPS 24 horas ($p=0,0001$) - Gráfico 8B.

No parênquima pulmonar, o grupo LPS 24 horas ($0,0133 \pm 0,008$) apresentou aumento na quantidade de IL-6 em relação aos grupos controle ($0,0052 \pm 0,005$; $p=0,027$) e poluição ($0,0011 \pm 0,0007$; $p=0,001$). Ainda houve um aumento no grupo poluição + LPS ($0,013 \pm 0,0065$) em relação ao grupo poluição ($p=0,002$) e uma tendência em relação ao grupo controle ($p=0,06$) – Gráfico 8C. Nas vias aéreas o grupo poluição + LPS ($1,97 \pm 0,90$) apresentou aumento nos níveis de IL-6 em relação aos grupos controle ($0,84 \pm 0,74$; $p=0,02$), poluição ($0,11 \pm 0,097$; $p=0,001$) e LPS 24 horas ($0,855 \pm 0,393$; $p=0,031$) – Gráfico 8D.

Os níveis de expressão gênica de IL-6 no tecido pulmonar mostraram-se maior no grupo LPS 24 horas ($54,815 \pm 31,86$) em relação aos grupos controle ($1,29 \pm 0,73$; $p=0,0001$), poluição ($1,701 \pm 1,86$; $p=0,0001$) e poluição + LPS ($0,411 \pm 0,238$; $p=0,0001$) – Gráfico 8E.

Gráfico 8 – Representação gráfica da quantificação de IL-6: (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas e (E) expressão gênica relativa.

† $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS 24 horas; ω $p < 0,05$ em relação ao grupo poluição+LPS; • *outlier*.

7.2.9 IL-8

O grupo poluição + LPS (0,016 (0,0074)) apresentou níveis elevados de IL-8 no parênquima pulmonar em relação aos grupos controle (0,00089 (0,0009) $p=0,001$), LPS 24 horas (0,0019 (0,0103); $p=0,001$) e poluição (0,0032 (0,0025); $p=0,0001$) – Gráfico 9A. Nas vias aéreas o grupo poluição + LPS (1,32 (1,86)) também apresentou maior quantidade de IL-8 em relação aos grupos controle (0,032 (0,161); $p=0,001$), LPS 24 horas (0,208 (0,834); $p=0,023$) e poluição (0,037 (0,026); $p=0,002$) – Gráfico 9B.

Os níveis de expressão gênica de IL-8 no tecido pulmonar mostraram-se maior no grupo LPS 24 horas (39,749 (14,681)) em relação aos grupos controle (1,03 (0,27); $p=0,0001$), poluição (2,84 (2,31); $p=0,0001$) e poluição + LPS (0,875 (0,433); $p=0,0001$) – Gráfico – 9C.

Gráfico 9 – Representação gráfica da quantificação de IL-8: (A) no parênquima pulmonar, (B) nas vias aéreas e (C) expressão gênica relativa.

† $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS 24 horas;
 ω $p < 0,05$ em relação ao grupo poluição+LPS;
 ● *outlier*.

7.2.10 IL-10

A quantidade de IL-10 no soro sanguíneo e lavado bronco-alveolar não apresentaram alteração significativa – Gráfico 10 A e B. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 11, anexo A.

No parênquima pulmonar, o grupo LPS 24 horas (0,035 (0,076)) apresentou aumento da quantidade de IL-10 em relação aos grupos poluição (0,003 (0,007); $p=0,003$) e poluição + LPS (0,006 (0,012); $p=0,008$) e uma tendência em relação ao grupo controle (0,012 (0,014); $p=0,06$) – Gráfico 10C. Nas vias aéreas, o grupo LPS 24 horas ($3,54 \pm 2,08$) apresentou maior nível de IL-10 em relação ao grupo poluição ($0,36 \pm 0,31$; $p=0,003$) - Gráfico 10D.

O nível de expressão gênica de IL-10 no tecido pulmonar mostrou-se maior no grupo poluição (14,74 (11,92)) em relação aos grupos controle (0,98 (1,27); $p=0,0001$) e poluição + LPS (2,4 (3,7); $p=0,003$). Ainda houve um aumento nos níveis de expressão gênica de IL-10 no grupo LPS 24 horas (6,22 (11,43)) em relação ao grupo controle ($p=0,043$) – Gráfico 10E.

Gráfico 10 – Representação gráfica da quantificação de IL-10: (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas e (E) expressão gênica relativa.

† $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS 24 horas; ∪ $p < 0,05$ em relação ao grupo poluição; • *outlier*

7.2.11 TNF- α

A quantidade de TNF encontrada no soro sanguíneo foi significativamente maior no grupo LPS 24 horas (5,065 (3,41)) em relação aos grupos controle (0,69 (1,16); $p=0,001$), poluição (0,855 (1,69); $p=0,001$) e poluição + LPS (2,8 (0,77); $p=0,009$) – Gráfico 11A.

A quantidade de TNF encontrada no lavado bronco-alveolar foi significativamente maior no grupo LPS 24 horas (2822,13 (1310,26)) em relação aos grupos controle (0,15 (0,4); $p=0,0001$), poluição (0,1 (1,0); $p=0,0001$) e poluição + LPS (486,52 (379,76); $p=0,0001$) – Gráfico 11B.

A quantidade de TNF- α no parênquima pulmonar apresentou-se maior no grupo LPS 24 horas ($0,104 \pm 0,011$) em relação ao grupo controle ($0,024 \pm 0,011$, $p=0,015$) – Gráfico 11C. A quantidade de TNF- α nas vias aéreas não apresentou alteração significativa – Gráfico 11D. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 11, anexo A.

O nível de expressão gênica de TNF- α no tecido pulmonar mostrou-se maior no grupo LPS 24 horas (18,66 (19,45)) em relação aos grupos controle (0,921 (0,30); $p=0,0001$), poluição (3,028 (4,32); $p=0,0001$) e poluição + LPS (0,896 (0,456); $p=0,0001$) – Gráfico 11E.

Gráfico 11 – Representação gráfica da quantificação de TNF- α : (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas (proporção de área positivamente marcada por unidade de perímetro) e (E) expressão gênica relativa.

7.2.12 Morfologia do tecido pulmonar

O volume pulmonar total (mm^3) não apresentou alteração significativa – Gráfico 12. Os valores de média e desvio padrão são apresentados na tabela 11, anexo A.

Gráfico 12 – Representação gráfica do volume total pulmonar (mm^3).

A densidade de volume de septos alveolares mostrou-se maior no grupo poluição + LPS ($0,349 \pm 0,0482$) em relação ao grupo controle ($0,2982 \pm 0,0414$; $p=0,049$) – Gráfico 13A. O volume total de septos alveolares (mm^3) apresentou um aumento no grupo LPS 24 horas ($181,6854$ ($35,2339$)) em relação ao grupo controle ($125,3921$ ($31,2416$); $p=0,024$) – Gráfico 13B.

A densidade de volume de espaço aéreo alveolar mostrou-se menor no grupo poluição + LPS ($0,4314 \pm 0,0505$) em relação ao grupo LPS 24 horas ($0,486 \pm 0,0213$; $p=0,049$) – Gráfico 13C. O volume total de espaço aéreo alveolar (mm^3) apresentou uma diminuição no grupo poluição + LPS ($176,3223 \pm 39,1463$) em relação ao grupo LPS 24 horas ($266,0933 \pm 40,5629$; $p=0,02$) – Gráfico 13D.

A densidade de volume e o volume total de vasos sanguíneos (mm^3) não apresentaram alterações significativas. Os valores de média e desvio padrão são apresentados na tabela 11, anexo A.

Gráfico 13 – Representação gráfica da densidade de volume (Vv) do septo alveolar (A), volume total dos septos (mm^3) (B), densidade de volume do espaço aéreo alveolar (C) e volume total do espaço aéreo alveolar (mm^3) (D).

* p<0,05 em relação ao grupo controle;

† p<0,05 em relação ao grupo LPS 24 horas;

● outlier.

A densidade de volume de via aérea apresentou uma diminuição no grupo LPS 24 horas ($0,0546 \pm 0,0259$) em relação ao grupo controle ($0,127 \pm 0,0534$;

$p=0,008$) – Gráfico 14A. O volume total de via aérea (mm^3) não apresentou alteração significativa – Gráfico 14B. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 11, anexo A.

Gráfico 14– Representação gráfica da média da densidade de volume (V_v) de via aérea (A) e volume total de via aérea (mm^3) (B).

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

A densidade de superfície de septos alveolares (mm^{-1}) apresentou uma diminuição nos grupos LPS 24 horas ($203,4828 \pm 29,4713$; $p=0,035$) e poluição + LPS ($197,9822 \pm 21,2658$; $p=0,018$) em relação ao grupo controle ($243,077 \pm 28,8453$) – Gráfico 15A. A área de superfície total de septos alveolares (mm^2) não apresentou alteração significativa – Gráfico 15B. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 11, anexo A.

Gráfico 15 – Representação gráfica da densidade de superfície (Sv) de septos alveolares (mm^{-1}) (A) e da área de superfície total dos septos alveolares (mm^2) (B).

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

A densidade de superfície (mm^{-1}) e a área de superfície (mm^2) total de vasos sanguíneos não apresentou alteração significativa. Os valores de mediana e intervalo interquartil, média e desvio padrão são apresentados na tabela 11, anexo A.

A densidade de superfície (mm^{-1}) e a área de superfície total (mm^2) de via aérea não apresentou alteração significativa. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 11, anexo A.

A espessura média dos septos alveolares (mm) apresentou um aumento significativo nos grupos LPS 24 horas ($0,0037 \pm 0,00091$; $p=0,018$) e poluição + LPS ($0,0037 \pm 0,00093$; $p=0,023$) em relação ao grupo controle ($0,0025 \pm 0,00053$) – Gráfico 16.

Gráfico 16 – Representação gráfica da espessura média dos septos alveolares (mm).

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Na avaliação histopatológica do tecido pulmonar o grupo controle apresenta aspecto normal, sem sinal de processo inflamatório significativo e sem espessamento septal (figura 10 A e B). No grupo poluição, o tecido pulmonar apresenta infiltrado inflamatório ao longo do feixe bronco-vascular, presença de células inflamatórias nos septos alveolares, com predominância de células mononucleares (figura 10 C e D).

No grupo LPS 24 horas, o tecido pulmonar apresenta infiltrado inflamatório adjacente ao feixe vasculo-brônquico e presença de grande número de células inflamatórias nos septos alveolares, com predominância de polimorfonucleares. Há também espessamento septal, alargamento com distribuição irregular dos espaços aéreos alveolares e áreas focais com hemorragia alveolar (figura 10 E e F).

No grupo poluição + LPS, o tecido pulmonar apresenta infiltrado inflamatório perivascular e peribrônquico, presença de poucas células inflamatórias nos septos alveolares e alargamento com distribuição irregular dos espaços aéreos alveolares (figura 10 G e H).

Figura 10 - Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar (coloração H&E). A e B – grupo controle em 10x e 20x respectivamente; C e D – grupo poluição em 10x e 20x respectivamente; E e F – grupo LPS 24 horas em 10x e 20x respectivamente; G e H – grupo poluição + LPS em 10x e 20x respectivamente.

7.2.13 Remodelamento tecidual

A proporção de fibras elásticas por área de via aérea mostrou um aumento no grupo poluição (12,741 (2,31)) em relação aos grupos controle (4,2923 (2,77); $p=0,0001$) e LPS 24 horas (2,1924 (3,1); $p=0,0001$). Houve ainda um aumento no grupo poluição + LPS (9,5136 (2,25)) em relação aos grupos controle ($p=0,001$) e LPS 24 horas ($p=0,0001$) – Gráfico 17 A.

A proporção de fibras elásticas por área de tecido do parênquima pulmonar mostrou-se maior no grupo poluição (7,6484 (3,85)) em relação ao grupo LPS 24 horas (3,7996 (1,57); $p=0,021$). Houve ainda um aumento no grupo poluição + LPS (9,0022 (2,47)) em relação aos grupos controle (5,3677 (2,57); $p=0,010$) e LPS 24 horas ($p=0,001$) – Gráfico 17 B.

Gráfico 17 – Representação gráfica da proporção de fibras elásticas por área de via aérea (%) (A) e da proporção de fibras elásticas por área de tecido do parênquima pulmonar (%) (B).

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle;

† $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS 24 horas;

● *outlier*.

A proporção de colágeno por área de tecido do parênquima pulmonar não apresentou alteração significativa – Gráfico 18A. A proporção de colágeno por área de via aérea também não apresentou alteração significativa – Gráfico 18B. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 11, anexo A.

Os níveis de expressão gênica de colágeno tipo I mostram que há um aumento nos grupos poluição (0,35 (0,22)) e poluição + LPS (0,32 (0,28)) em relação aos grupos controle (1,04 (0,35); $p=0,008$ e $p=0,002$, respectivamente) e LPS 24 horas (1,16 (0,52); $p=0,028$ e $p=0,006$, respectivamente) – Gráfico 18C.

Os níveis de expressão gênica de colágeno tipo III mostram que também há uma redução no grupo poluição + LPS ($0,55 \pm 0,32$) em relação ao grupo LPS 24 horas ($1,3 \pm 0,62$; $p=0,021$). Também houve uma tendência a redução no grupo poluição ($0,68 \pm 0,4$) em relação ao grupo LPS 24 horas ($p=0,06$) – Gráfico 18D.

Os níveis de expressão gênica de TGF- β apresentaram-se menor no grupo LPS 24 horas ($0,446 \pm 0,188$) em relação aos grupos controle ($1,049 \pm 0,271$; $p=0,007$) e poluição ($0,913 \pm 0,49$; $p=0,047$). O grupo poluição + LPS ($0,498 \pm 0,238$) também mostrou menores níveis de TGF- β em relação ao grupo controle ($p=0,015$) – Gráfico 18E.

Gráfico 18 – Representação gráfica da proporção de colágeno por área de via aérea (%) (A), da proporção de colágeno por área de tecido do parênquima pulmonar (%) (B), Expressão gênica relativa de colágeno tipo I (C), expressão gênica de colágeno tipo III (D) e expressão gênica de TGF- β (E).

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; † $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS 24 horas; $\cup$ $p < 0,05$ em relação ao grupo poluição; • outlier.

7.3 Resultados referentes aos grupos Controle, LPS 5 semanas, Poluição e Poluição + LPS (objetivo 2).

7.3.1 Eritrograma

A quantidade de eritrócitos foi significativamente menor no grupo LPS + poluição (8,0 (0,0)) em relação aos grupos controle (9,0 (2,0); $p=0,011$) e LPS 5 semanas (9,0 (1,0); $p=0,001$). Também houve uma tendência ao aumento no grupo LPS 5 semanas em relação ao grupo poluição (8,0 (1,0); $p=0,05$). A quantidade de hemoglobina foi significativamente menor no grupo LPS + poluição (14,0 (0,0)) em relação ao grupo LPS 5 semanas (16,0 (0,0); $p=0,006$).

O hematócrito mostra um aumento significativa no grupo LPS 5 semanas ($47,57 \pm 2,37$) em relação aos grupos poluição ($42,63 \pm 3,852$; $p=0,014$) e LPS + poluição ($41,71 \pm 1,38$; $p=0,004$).

O VCM (volume corpuscular médio) mostra um aumento significativo no grupo LPS + poluição (50,0 (1,0)) em relação aos grupos poluição (47,0 (1,0); $p=0,001$) e LPS 5 semanas (48,0 (1,0); $p=0,020$). O HCM (hemoglobina corpuscular média) mostrou um aumento significativo no grupo LPS + poluição (17,0 (0,0)) em relação aos grupos controle (16,0 (0,0); $p=0,0001$), LPS 5 semanas (16,0 (0,0); $p=0,0001$) e poluição (16,0 (0,0); $p=0,0001$).

A média da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a média da amplitude da distribuição de eritrócitos (RDW-CV) não apresentaram alterações significativas. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 12, anexo A.

7.3.2 Leucócitos

Observamos aumento no número de leucócitos (mil/mm^3) presente no sangue no grupo poluição ($4,3125 \pm 1,58964$) em relação ao grupo controle ($2,6125 \pm 0,35632$; $p=0,018$) e LPS + poluição ($2,7143 \pm 0,91365$; $p=0,035$) e um aumento no grupo LPS 5 semanas ($5,4429 \pm 0,97272$) em relação ao grupo controle ($p=0,0001$) e LPS + poluição ($p=0,0001$) – Gráfico 19A.

O número de células totais no lavado bronco-alveolar foi significativamente maior nos grupos LPS 5 semanas ($3,12 \times 10^5 \pm 1,03 \times 10^4$; $p=0,016$), e LPS +Poluição ($5,37 \times 10^5 \pm 1,44 \times 10^4$; $p=0,0001$) em relação ao grupo controle ($1,49 \times 10^5 \pm 3,58 \times 10^4$). Houve ainda redução do número de células totais no grupo LPS + poluição em relação ao grupo LPS 5 semanas ($p=0,001$) semanas e em relação ao grupo poluição ($2,38 \times 10^5 \pm 9,25 \times 10^4$; $p=0,0001$) – Gráfico 19B.

Gráfico 19 – Representação gráfica do número de leucócitos presentes no sangue (mil/mm^3) (A) e do número de células totais no lavado bronco-alveolar (B).

* $p<0,05$ em relação ao grupo controle; ω $p<0,05$ em relação ao grupo LPS + poluição; • outlier.

Quanto ao esfregaço do lavado bronco-alveolar, no grupo controle nota-se a presença de poucas células inflamatórias (figura 11 – A). No grupo poluição há a presença predominante de macrófagos (figura 11 – B). No grupo LPS 5 semanas nota-se a presença de células mononucleares, com predominância de macrófagos (figura 11 – C) e no grupo LPS + poluição nota-se a presença predominante de células mononucleares, como macrófagos e linfócitos (figura 11 – D).

Figura 11 – Fotomicrografia do esfregaço do lavado bronco-alveolar: A – grupo controle (40x); B – grupo poluição (40x); C – grupo LPS 5 semanas (40x) e D – grupo LPS + poluição (40x).

7.3.3 Neutrófilos

Nota-se um aumento no número de neutrófilos (mil/mm³) presente no sangue no grupo poluição ($1,3613 \pm 0,60941$) em relação ao grupo controle ($0,6825 \pm 0,18714$; $p=0,005$) – Gráfico – 20A. Também houve um aumento no grupo LPS 5 semanas ($1,1843 \pm 0,22142$) em relação ao grupo LPS + poluição ($0,5614 \pm 0,20659$; $p=0,017$).

Houve uma tendência ao aumento do número de neutrófilos no lavado bronco-alveolar nos grupos LPS+poluição e LPS 5 semanas ($p=0,05$) – Gráfico 20B. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 12, anexo A.

No tecido pulmonar, houve uma diminuição no número de neutrófilos (MPO positivo) no grupo poluição ($4,08 \times 10^{-6}$ ($3,5 \times 10^{-6}$)) em relação aos grupos LPS 5 semanas ($1,06 \times 10^{-5}$ ($8,1 \times 10^{-6}$); $p=0,037$) e LPS+poluição ($1,34 \times 10^{-5}$ ($0,9 \times 10^{-5}$); $p=0,043$) – Gráfico 20C.

Gráfico 20 – Representação gráfica da quantidade de neutrófilos presentes no sangue (mil/mm^3) (A), do número total de neutrófilos no lavado bronco-alveolar (B) e da proporção de neutrófilos por unidade de área de tecido pulmonar (C).

- * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle;
- † $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS 5 semanas;
- ∪ $p < 0,05$ em relação ao grupo poluição;
- *outlier*.

7.3.4 Linfócitos

O número de linfócitos (mil/mm^3) presentes no sangue foi significativamente maior no grupo LPS 5 semanas ($4,12 \pm 0,81074$) em relação aos grupos controle ($1,7863 \pm 0,20347$; $p=0,0001$), poluição ($2,79 \pm 1,01771$; $p=0,009$) e LPS + poluição ($1,9943 \pm 0,66755$; $p=0,0001$) – Gráfico 21A.

A quantidade de linfócitos presente no lavado bronco-alveolar apresentou-se significativamente maior no grupo LPS 5 semanas ($19006,34 \pm 14903,14$) em relação aos grupos controle ($4761,35 \pm 2344,99$; $p=0,015$) e poluição ($3135,71 \pm 2203,95$; $p=0,008$) – Gráfico 21B.

A proporção de linfócitos T imunomarcados por unidade de área de tecido pulmonar mostrou-se significativamente maior no grupo LPS 5 ($6,7 \times 10^{-4}$ ($9,3 \times 10^{-5}$)) semanas em relação aos grupos controle ($3,1 \times 10^{-4}$ ($2,7 \times 10^{-4}$); $p=0,0001$), poluição ($2,9 \times 10^{-4}$ ($1,1 \times 10^{-4}$); $p=0,0001$) e LPS + poluição ($5,6 \times 10^{-4}$ ($2,4 \times 10^{-4}$); $p=0,045$) – Gráfico 21C.

Gráfico 21 - Representação gráfica da quantidade de linfócitos presentes no sangue (mil/mm³) (A), do número total de linfócitos no lavado bronco-alveolar (B) e da proporção de linfócitos T por unidade de área de tecido pulmonar (C).

† $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS 5 semanas.

7.3.5 Monócitos e macrófagos

O número de monócitos (mil/mm³) presente no sangue não apresentou alteração significativa – Gráfico 22A. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 12, anexo A.

A quantidade de macrófagos presente no lavado bronco-alveolar é significativamente maior no grupo LPS+poluição ($4,11 \times 10^5 \pm 1,54 \times 10^5$) em relação aos grupos controle ($1,39 \times 10^5 \pm 3,59 \times 10^4$; $p=0,0001$), LPS 5 semanas ($2,61 \times 10^5 \pm 8,99 \times 10^4$; $p=0,04$) e poluição ($1,79 \times 10^5 \pm 9,95 \times 10^4$; $p=0,001$) – Gráfico 22B.

A quantidade de macrófagos no parênquima pulmonar se mostrou maior nos grupos poluição ($7,71 \times 10^{-5}$ ($1,91 \times 10^{-5}$)) e LPS + poluição ($7,61 \times 10^{-5}$ ($3,2 \times 10^{-5}$)) em relação tanto ao grupo controle ($3,83 \times 10^{-5}$ ($3,6 \times 10^{-5}$); $p=0,002$ e $p=0,003$, respectivamente) quanto ao grupo LPS 5 semanas ($5,32 \times 10^{-5}$ ($1,91 \times 10^{-5}$), $p=0,014$ e $p=0,026$, respectivamente) – Gráfico 22C.

Gráfico 22 – Representação gráfica da quantidade de monócitos presentes no sangue (mil/mm^3) (A); do número total de macrófagos no lavado bronco-alveolar (B) e da proporção de macrófagos (MAC 2+) por unidade de área de tecido pulmonar (C).

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle;

† $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS 5 semanas;

ω $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS + poluição.

7.3.6 Plaquetas

Houve uma redução no número de plaquetas no grupo poluição (803,33 $\pm$ 188,248) em relação aos grupos controle (1185 $\pm$ 186,579; $p=0,0001$) e LPS 5 semanas (1282,57 $\pm$ 102,67; $p=0,0001$) e uma redução no grupo LPS + poluição (954,5714 $\pm$ 192) também em relação aos grupos controle ($p=0,036$) e LPS 5 semanas ($p=0,003$) – Gráfico 23.

Gráfico 23 – Representação gráfica da média de plaquetas presentes no sangue (mil/mm³).

* $p<0,05$ em relação ao grupo controle;

† $p<0,05$ em relação ao grupo LPS 5 semanas.

7.3.7 IL-1 β

A quantidade de IL-1 β no soro sanguíneo e lavado bronco alveolar não apresentaram alterações significativas – Gráficos 24 A e B. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 12, anexo A.

A quantidade de IL-1 β presente no parênquima pulmonar apresentou um aumento no grupo LPS + poluição ($0,08 \pm 0,046$) em relação aos grupos controle ($0,022 \pm 0,014$; $p=0,001$), LPS 5 semanas ($0,033 \pm 0,024$; $p=0,013$) e poluição ($0,012 \pm 0,003$; $p=0,0001$) – Gráfico 24C.

O grupo LPS + poluição ($5,8427 (1,48)$) mostrou um aumento na quantidade de IL-1 β nas vias aéreas em relação aos grupos poluição ($1,0499 (0,68)$; $p=0,0001$) e LPS 5 semanas ($2,474 (1,73)$; $p=0,003$). Houve também uma diminuição no grupo poluição em relação ao grupo controle ($3,5719 (2,93)$; $p=0,0001$) – Gráfico 24D.

O nível de expressão gênica de IL-1 β mostrou-se maior no grupo poluição ($3,53 (3,18)$) em relação aos grupos controle ($0,933 (0,38)$; $p=0,001$) e LPS + poluição ($1,32 (1,69)$; $p=0,007$) – Gráfico 24E.

Gráfico 24 – Representação gráfica da quantificação de IL-1 β : (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas e (E) expressão gênica relativa.

$\cup$ p<0,05 em relação ao grupo poluição; ω p<0,05 em relação ao grupo LPS+poluição; • outlier.

7.3.8 IL-6

A quantidade de IL-6 no soro sanguíneo não apresentou alteração significativa – Gráfico 25 A. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 12, anexo A.

A quantidade de IL-6 encontrada no lavado bronco-alveolar foi significativamente maior no grupo poluição (0,0101 (0,34)) em relação aos grupos controle (0,0001 (0); $p=0,027$), LPS 5 semanas (0,0001 (0); $p=0,032$) e LPS + poluição (0 (0); $p=0,026$) – Gráfico 25B.

Já no parênquima pulmonar o grupo LPS + poluição ($0,0314 \pm 0,011$) apresenta aumento nos níveis de IL-6 em relação aos grupos controle ($0,007 \pm 0,005$; $p=0,0001$), LPS 5 semanas ($0,008 \pm 0,006$; $p=0,0001$) e poluição ($0,001 \pm 0,0007$; $p=0,0001$) – Gráfico 25C. Nas vias aéreas não houve alterações significantes entre os grupos – Gráfico 25D. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 11, anexo A.

Os níveis de expressão gênica de IL-6 não apresentaram alteração significativa – Gráfico 25E. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 12, anexo A.

Gráfico 25 – Representação gráfica da quantificação de IL-6: (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas e (E) expressão gênica relativa.

υ $p < 0,05$ em relação ao grupo poluição; ω $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS+poluição; • outlier.

7.3.9 IL-8

O grupo LPS + poluição (0,015 (0,017)) apresentou maiores níveis de IL-8 no parênquima pulmonar em relação aos grupos controle (0,0008 (0,0009); $p=0,001$), LPS 5 semanas (0,0004 (0,0002); $p=0,001$) e poluição (0,0032 (0,0025); $p=0,004$) – Gráfico 26A. Nas vias aéreas o grupo LPS + poluição (0,687 (1,93)) também apresentou maiores níveis de IL-8 no parênquima pulmonar em relação aos grupos controle (0,032 (0,16); $p=0,015$), LPS 5 semanas (0,001 (0,052); $p=0,012$) e poluição (0,037 (0,026); $p=0,018$) – Gráfico 26B.

Os níveis de expressão gênica de IL-8 não apresentaram alteração significativa – Gráfico 26C. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 12, anexo A.

Gráfico 26 – Representação gráfica da quantificação de IL-8: (A) no parênquima pulmonar, (B) nas vias aéreas e (C) expressão gênica relativa.

7.3.10 IL-10

A quantidade de IL-10 no soro sanguíneo e lavado broncoalveolar não apresentaram alterações significativas – Gráficos 27 A e B. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 12, anexo A.

Nas vias aéreas, o grupo LPS + poluição ($4,93 \pm 3,4$) apresentou aumento nos níveis de IL-10 em relação aos grupos LPS 5 semanas ($1,61 \pm 0,73$; $p=0,016$) e poluição ($0,36 \pm 0,31$; $p=0,001$) – Gráfico 27D, enquanto no parênquima pulmonar não há alterações significativas – Gráfico 27C. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 12, anexo A.

O nível de expressão gênica de IL-10 mostrou-se maior no grupo poluição (14,74 (11,92)) em relação aos grupos controle (0,98 (1,27); $p=0,0001$), LPS 5 semanas (1,04 (1,56); $p=0,001$) e LPS + poluição (1,82 (8,47); $p=0,003$) – Gráfico 27E.

Gráfico 27 – Representação gráfica da quantificação de IL-10: (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas e (E) expressão gênica relativa.

υ $p < 0,05$ em relação ao grupo poluição; ω $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS+poluição; • *outlier*.

7.3.11 TNF- α

A quantidade de TNF no soro sanguíneo e lavado bronco-alveolar não apresentaram alterações significativas – Gráficos 28 A e B. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 12, anexo A.

A quantidade de TNF- α no parênquima pulmonar e vias aéreas não apresentaram alterações significativas – Gráficos 28 C e D. Os valores de média e desvio padrão são apresentados na tabela 12, anexo A.

O nível de expressão gênica de TNF- α mostrou-se maior no grupo poluição (3,02 (4,32)) em relação aos grupos controle (0,92 (0,3); $p=0,019$) e LPS + poluição (0,86 (1,13); $p=0,029$) – Gráfico 28E.

Gráfico 28 – Representação gráfica da quantificação de TNF- α : (A) no soro sanguíneo (pg/ml), (B) no lavado bronco-alveolar (pg/ml), (C) no parênquima pulmonar, (D) nas vias aéreas (proporção de área positivamente marcada por unidade de perímetro) e (E) expressão gênica relativa.

∪ $p < 0,05$ em relação ao grupo poluição; • *outlier*

7.3.12 Morfologia do tecido pulmonar

O volume pulmonar total não apresentou alteração significativa – Gráfico 29. Os valores de média e desvio padrão são apresentados na tabela 12, anexo A.

Gráfico 29 – Representação gráfica do volume total pulmonar (mm³).

A densidade de volume de septos alveolares apresentou um aumento no grupo LPS + poluição ($0,349 \pm 0,04829$) em relação ao grupo controle ($0,2982 \pm 0,04145$; $p=0,049$) – Gráfico 30A. O volume total de septos alveolares (mm³) apresentou um aumento no grupo LPS 5 semanas ($181,6854 (35,2339)$) em relação ao grupo controle ($125,3921 (31,2416)$; $p=0,024$) – Gráfico 30B.

A densidade de volume de espaço aéreo alveolar apresentou uma diminuição no grupo LPS + poluição ($0,4314 \pm 0,05054$) em relação ao grupo LPS 5 semanas ($0,4905 \pm 0,04615$; $p=0,049$) – Gráfico 30C. O volume total de espaço aéreo alveolar (mm³) apresentou uma diminuição no grupo LPS + poluição ($176,3223 \pm 39,1463$) em relação ao grupo LPS 5 semanas ($266,0933 \pm 40,5629$; $p=0,02$) – Gráfico 30D.

Gráfico 30 – Representação gráfica da média da densidade de volume (Vv) do septo alveolar (A), volume total dos septos (mm³) (B), densidade de volume do espaço aéreo alveolar (C) e volume total do espaço aéreo alveolar (mm³) (D).

* p<0,05 em relação ao grupo controle
 † p<0,05 em relação ao grupo LPS 5 semanas;
 ● outlier.

A densidade de volume e volume total (mm³) dos vasos sanguíneos não apresentou alteração significativa. Os valores de mediana e intervalo interquartil, média e desvio padrão são apresentados na tabela 12, anexo A.

A densidade de volume de via aérea apresentou uma diminuição significativa no grupo LPS 5 semanas (0,0464 (0,0409)) em relação ao grupo controle (0,1151 (0,0992); p=0,01) – Gráfico 31A. O volume total de via aérea

(mm³) não apresentou alteração significativa, porém há uma tendência na diminuição do volume nos grupos LPS 5 semanas e LPS + poluição (p=0,05) – Gráfico 31B. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 12, anexo A.

Gráfico 31 – Representação gráfica da média da densidade de volume (Vv) de via aérea (A) e volume total de via aérea (mm³) (B).

* p<0,05 em relação ao grupo controle.

A densidade de superfície de septo alveolar (mm⁻¹) apresentou uma diminuição no grupo LPS + poluição (201,4445 ± 21,0613) em relação ao grupo controle (243,077 ± 28,8453; p=0,009). Houve ainda uma tendência na diminuição da Sv do grupo poluição (213,0182 ± 28,2978) em relação ao grupo controle (p=0,06) – Gráfico 32A. A superfície total de septos alveolar (mm²) não apresentou alteração significativa – Gráficos 32B. Os valores de mediana e intervalo interquartil são apresentados na tabela 12, anexo A.

Gráfico 32 – Representação gráfica da densidade de superfície (Sv) de septos alveolares (mm^{-1}) (A) e da área de superfície total dos septos alveolares (mm^2) (B).

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

A densidade de superfície (mm^{-1}) e área de superfície total (mm^2) de vasos sanguíneos não apresentaram alterações significativas. Os valores de mediana e intervalo interquartil, média e desvio padrão são apresentados na tabela 12, anexo A.

A densidade de superfície (mm^{-1}) e a área de superfície total (mm^2) de via aérea não apresentaram alterações significativas. Os valores de média e desvio padrão são apresentados na tabela 12, anexo A.

A espessura média dos septos alveolares (mm) apresentou um aumento significativo no grupo LPS + poluição ($0,0034 \pm 0,00057$) em relação ao grupo controle ($0,0025 \pm 0,00053$; $p=0,005$). Houve ainda uma tendência no aumento da espessura média dos septos do grupo poluição ($0,0032 \pm 0,00062$) em relação ao grupo controle ($p=0,051$) – Gráfico 33.

Gráfico 33 – Representação gráfica da espessura média dos septos alveolares (mm).

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Na avaliação histopatológica do tecido pulmonar o grupo LPS 5 semanas apresenta infiltrado inflamatório ao longo do feixe vasculho-brônquico, presença de poucas células inflamatórias nos septos alveolares, com predominância de mononucleares, o que pode sugerir a manutenção da resposta inflamatória crônica (figura 12 E e F).

No grupo LPS + poluição, o tecido pulmonar apresenta infiltrado inflamatório ao longo do feixe vasculo-brônquico e presença moderada de células inflamatórias nos septos alveolares, com predominância de células mononucleares. Também apresenta alargamento com distribuição irregular dos espaços aéreos (figura 12 G e H).

Encontra-se a descrição dos achados histopatológicos dos grupos controle (figura 12 A e B) e poluição (figura 12 C e D) na seção Resultado 7.2.11.

Figura 12 - Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar (coloração H&E). A e B – grupo controle em 10x e 20x respectivamente; C e D – grupo poluição em 10x e 20x respectivamente; E e F – grupo LPS 5 semanas em 10x e 20x respectivamente; G e H – grupo LPS + poluição em 10x e 20x respectivamente.

7.3.13 Remodelamento tecidual

A proporção de fibras elásticas por área de tecido do parênquima pulmonar mostrou-se maior no grupo LPS + poluição (10,2001 (5,38)) em relação aos grupos controle (5,3677 (2,57); $p=0,0001$) e LPS 5 semanas (4,6484 (1,53); $p=0,0001$) – Gráfico 34A. A proporção de fibras elásticas por área de via aérea mostrou um aumento no grupo poluição (12,741 (2,31)) em relação aos grupos controle (4,2923 (2,77); $p=0,0001$) e LPS 5 semanas (2,2437 (2,74); $p=0,0001$). Houve ainda um aumento no grupo LPS + poluição (15,7908 (5,44)) em relação aos grupos controle ($p=0,0001$) e LPS 5 semanas ($p=0,0001$) – Gráfico 34B.

Gráfico 34 – Representação gráfica da proporção de fibras elásticas por área de via aérea (%) (A) e da proporção de fibras elásticas por área de tecido do parênquima pulmonar (%) (B).

υ $p < 0,05$ em relação ao grupo poluição;
 ω $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS + poluição;
 ● outlier.

A proporção de colágeno por área de tecido do parênquima pulmonar (%) mostrou-se maior no grupo LPS 5 semanas (1,56 (1,04)) em relação aos grupos controle (0,419 (0,3); $p=0,0001$), poluição (0,4054 (1,3); $p=0,024$) e LPS + poluição (0,3947 (0,64); $p=0,003$) – Gráfico 35A.

A proporção de colágeno por área de via aérea (%) mostrou-se maior no grupo LPS 5 semanas (14,847 (9,2066) em relação aos grupos controle (7,4696 (8,3996)); $p=0,001$), poluição (8,5583 (4,6655); $p=0,014$) e LPS + poluição (6,7949 (3,3933); $p=0,001$) – Gráfico 35B.

A expressão gênica de colágeno tipo I é menor no grupo poluição (0,35 (0,22)) em relação ao grupo controle (1,04 (0,35); $p=0,038$). Houve ainda uma tendência na diminuição na expressão gênica de colágeno tipo I no grupo LPS + poluição (0,39 (0,26)) em relação ao grupo controle ($p=0,05$) – Gráfico 35C. Quanto a expressão gênica de colágeno tipo III não houve alterações significativas – Gráfico 35D.

A expressão genica de TGF- β mostrou-se menor no grupo LPS+poluição (0,524 $\pm$ 0,283) em relação ao grupo controle (1,049 $\pm$ 0,271; $p=0,034$) – Gráfico 35E.

Quanto a análise qualitativa das fibras colágenas, é possível observar que há uma predominância do colágeno tipo I no grupo LPS 5 semanas (figura 13).

Gráfico 35 – Representação gráfica da proporção de colágeno por área de tecido do parênquima pulmonar (%) (A), da proporção de colágeno por área de via aérea (%) (B), expressão gênica relativa de colágeno tipo I (C), expressão gênica de colágeno tipo III (D) e expressão gênica relativa de TGF- β (E).

* p<0,05 em relação ao grupo controle; † p<0,05 em relação ao grupo LPS 5 semanas; • outlier.

Figura 13 - Fotomicrografia representativa do tecido pulmonar corado com a técnica de *Picrossirius Red*. A – Grupo LPS 5 semanas (40x): fibras colágenas apresentam-se na coloração vermelha; B – Grupo LPS 5 semanas polarizada (40x): seta vermelha indica colágeno tipo I, seta verde indica colágeno tipo III.

8. DISCUSSÃO

8.1 Efeitos da exposição ao material particulado 2,5 na fase aguda da lesão pulmonar aguda induzida por LPS

O modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS desenvolvido neste estudo, visou não somente entender a relação da poluição do ar na sua fase exsudativa mas também entender se a poluição pode desempenhar algum papel na recuperação da lesão. As formas de administração, tanto do LPS quanto do material particulado, foram padronizadas para ocorrer da forma menos invasiva possível, minimizando o desconforto e estresse do animal e quaisquer alterações decorrentes de um procedimento cirúrgico.

Entre os nossos principais achados na fase aguda do modelo de LPA induzida por LPS, houve aumento do número de células e citocinas inflamatórias tanto no sangue periférico quanto no lavado bronco-alveolar. Quanto às alterações histológicas do tecido ocorreram um aumento no volume total dos septos alveolares, acompanhado de uma diminuição na densidade da área de superfície e espessamento dos septos alveolares.

O LPS é um dos agentes mais utilizados para induzir a LPA e é principalmente caracterizada por uma resposta inflamatória aguda com infiltração neutrofílica intensa (Matute-Bello et al., 2008). O estudo de Matute-Bello et al. (2011) traz características importantes e relevantes para se considerar em um modelo de LPA (tabela 5) e o modelo apresentado neste estudo (grupo LPS 24 horas) apresenta algumas destas características, como evidência histológica de lesão tecidual (acumulação de neutrófilos no alvéolo e/ou no espaço intersticial e espessamento da parede alveolar), alteração da

barreira alvéolo-capilar e resposta inflamatória (aumento do número absoluto de células no LBA e aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias no LBA e soro sanguíneo).

As características histopatológicas da fase exudativa da LPA são edema intersticial e intra-alveolar, hemorragia, acúmulo de neutrófilos e formação de membrana hialina (Mühlfeld, Ochs, 2013). Apesar de nenhuma medida direta para a quantificação de edema no tecido pulmonar ter sido feita, a alteração de alguns dos parâmetros avaliados pode ser consequência do edema, como o aumento no volume total e espessamento dos septos alveolares. Além do edema, o tecido pulmonar do grupo LPS 24 horas apresenta intenso acúmulo de neutrófilos e hemorragias focais no tecido pulmonar, características também encontradas na síndrome do desconforto respiratório agudo em humanos (Ranieri et al. 2012).

Quando a variável exposição à poluição do ar é combinada à lesão pulmonar, de uma forma geral, os resultados do presente estudo tendem a mostrar que quando há a interação do material particulado fino (MP_{2,5}) anterior à fase aguda da LPA, esta não se desenvolve de forma tão grave. Quando observamos a resposta inflamatória nos grupos referente ao objetivo 1 do trabalho, nota-se que, na maioria dos parâmetros, as células inflamatórias e citocinas pró-inflamatórias aumentam no grupo LPS 24 horas, mas não, ou não tanto quanto, no grupo poluição+LPS.

Com base nestes achados podemos levantar algumas hipóteses para esta situação. Uma delas é a alteração do perfil da resposta inflamatória. Apesar de a grande maioria dos estudos mostrarem que a poluição do ar é responsável pelo desencadeamento de resposta inflamatória Th1 (ex. aumento de IL-6 e IL-

8) (Steenhof et al., 2013; Totlandsdal et al., 2015; Yang et al., 2013), alguns trabalhos mostram que a poluição pode ocasionar a mudança de resposta para um perfil Th2. Esta é uma hipótese plausível uma vez que, com exceção da IL-10, todas as outras citocinas avaliadas neste estudo correspondem a uma resposta Th1. Um estudo recente mostrou que animais expostos ao MP_{2,5} mostraram infiltrado inflamatório nos pulmões e, 24 horas após a exposição ao MP_{2,5}, citocinas relacionadas ao perfil Th2, IL-4, IL-5 e IL-10 aumentaram tanto no lavado bronco-alveolar como no sangue. No mesmo estudo, células TLR 2 e TLR 4 positivas (receptor toll-like 2 e 4) diminuíram no lavado bronco-alveolar após 24 horas da exposição e seguiram assim até o 14º dia após a exposição. Este estudo indica que os receptores TLR 2 e 4 estão envolvidos na resposta imune a exposição ao material particulado fino e que o MP_{2,5} pode também desencadear uma resposta Th2 (Zhao et al., 2012).

No caso da asma, diversos estudos epidemiológicos mostram que a exposição à poluição atmosférica está relacionada a exacerbação da asma e aumento de hospitalizações (Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly of the American Thoracic Society, 1996; Lipsett et al., 1997; Tolbert et al., 2000). Camundongos da linhagem Balb/c expostos ao material particulado apresentam hiperresponsividade das vias aéreas, níveis elevados de IL-17A, IL-17F, IL-13 e IL-5 e redução de IL-10, caracterizado uma resposta Th2. Os camundongos knockout para o gene Rag1 (que apresentam ausência de linfócitos maduros) não desenvolvem hiperresponsividade das vias aéreas, mas a celularidade do lavado bronco alveolar e alteração do muco são apenas parcialmente inibidas, indicando que a resposta linfocitária é um importante mecanismo de ação da poluição do ar (Saunders et al., 2010). Outro estudo

ainda revela que no coração de ratos expostos ao material particulado fino, houve um desequilíbrio da resposta Th1/TH2, com o aumento da produção de citocinas IL-4 e IL13, diminuição de IFN-gama, aumento da síntese de mRNA para STAT1, STAT-6 e GATA-3 (Th2) de diminuição de TBET (Th1) (Zhao et al., 2012).

A literatura sugere que os efeitos da poluição do ar podem ser relacionados à composição química do material particulado, de uma maneira geral os metais pesados, e mais atualmente, metais de transição, que são mais associados à alteração da resposta imunológica e/ou estresse oxidativo, porém, dados sobre exatamente quais componentes são responsáveis pelos desfechos negativos ainda são desconhecidos (Aust et al., 2002; Saldiva et al., 2002; Snow et al., 2014; Zelikoff et al., 2002). Por exemplo, em um estudo conduzido no Rio de Janeiro, o material particulado foi coletado em diferentes pontos da cidade (áreas industriais, urbanas e rurais) e os efeitos destes materiais foram diferentes nas células epiteliais brônquicas humanas. O PM₁₀ coletado no centro urbano desencadeou a produção de IL-6 e IL-8 em menores concentrações do que o MP₁₀ da área industrial e rural e o estudo sugere que este fato pode ser justificado pela concentração dos metais pesados presente material particulado de cada local. Por outro lado, o MP_{2,5} de outra área industrial diminuiu a produção de IL-6 e IL-8 nas células epiteliais brônquicas humanas e este efeito não foi atribuído a alterações na produção da IL-10 e nem apenas a diferença de concentração dos metais pesados (Rodríguez-Cotto et al., 2014).

Em outros estudos utilizando a mesma linhagem de células (BEAS), observou-se que em concentrações mais baixas de MP_{2,5} (20%) as células aumentam a produção de IL-6, mas em doses mais altas (50%) há a inibição de

IL-6. Já quanto à produção de IL-8 e MCP-1, estas foram inibidas em ambas concentrações. O estudo também aponta que os metais associados a estes efeitos são o Níquel e Vanádio (Gioda et al., 2011). As células expostas à fração polar do PM_{2,5} aumentaram a produção de IL-6, IL-1 β e IL-7, por outro lado, esta mesma fração reprimiu a secreção de IL-8, MCP-1 e G-CSF (Fuentes-Mattei et al., 2010).

Quando é separada a fração orgânica do núcleo de carbono residual do DEP é possível ver a diferença dos desfechos produzidos. O núcleo de carbono residual combinado com o LPS causa agravamento da lesão pulmonar com aumento de citocinas pró-inflamatórias, enquanto a fração orgânica combinada ao LPS não. A fração orgânica ainda pode aumentar a reação inflamatória eosinofílica relacionada a alergênicos, proliferação de "*club cells*" no epitélio das vias aéreas e aumenta da expressão de IL-5 (Takano et al., 2007). Em cultura celular de células mononucleares e linfócitos T extraídas do baço de camundongos da linhagem ICR, tanto a fração orgânica do DEP quanto o núcleo de carbono residual desencadeiam a produção de IL-4 e IgE de uma maneira dose-dependente e estes efeitos são maiores na cultura com o núcleo de carbono residual (Inoue et al., 2010). Esta diversidade de componentes químicos, de mecanismos e de desfechos negativos são a razão da poluição do ar produzir efeitos em diversas doenças respiratórias.

A poluição do ar, e principalmente o material particulado, é reconhecidamente um agente pró-inflamatório e pode causar inflamação pulmonar e sistêmica em indivíduos expostos (Laumbach e Kipen, 2012; van Eeden et al., 2005). Um estudo conduzido na China com policiais de trânsito mostrou que a exposição crônica ao material particulado fino é associada com

alterações de marcadores inflamatórios, tanto no verão quanto no inverno (Zhao et al., 2013). Outra hipótese que podemos levantar, é que o desencadeamento da resposta inflamatória resultante da administração do LPS tenha ocorrido de forma mais rápida no grupo que foi previamente exposto ao material particulado fino (grupo poluição + LPS) do que no grupo que recebeu apenas o LPS (grupo LPS 24 horas). As alterações encontradas que poderiam suportar esta hipótese são: 1) alterações na morfologia do tecido pulmonar decorrentes de um processo inflamatório levando a uma diminuição do volume total do espaço aéreo alveolar, aumento da espessura e diminuição da densidade de superfície dos septos alveolares e; 2) baixos níveis de expressão de RNA mensageiro acompanhados de níveis elevados de expressão proteica das citocinas pró-inflamatórias.

A administração intratraqueal de LPS induz uma reação inflamatória caracterizada por exsudato neutrofílico, atingindo seu pico entre 6-12 horas após a administração de LPS, expressão progressiva de IL-1 entre 1-4 horas após o insulto, exsudado de monócitos/macrófagos com um pico após 24 horas, e exsudado linfocitário atingindo seu pico após 48 horas (Ulich et al, 1991). Se considerarmos que o grupo LPS 24 horas teve o pico de atividade do LPS neste intervalo e que mesmo após 24 horas ele ainda mostra não só alta produção proteica, mas também altas taxas de produção de RNA mensageiro das citocinas inflamatórias, no grupo poluição + LPS, o pico de atividade do LPS, pode ter ocorrido antes deste intervalo de tempo justificando os baixos níveis de síntese de RNA mensageiro porém taxas alteradas de produção proteica das citocinas inflamatórias, principalmente de IL-8 e IL-6.

8.2 Efeitos da exposição ao material particulado 2,5 na fase tardia da lesão pulmonar aguda induzida por LPS

Enquanto a maioria dos estudos com modelo de LPA apresenta a melhora dos parâmetros inflamatórios após 48 horas da administração do LPS (Matute-Bello et al., 2008), alguns destes parâmetros parece persistir por mais tempo no modelo utilizado em nosso estudo. O estudo de Yoshida et al. (2014), que avalia por 14 dias a resposta à administração do LPS, mostrou que a contagem de células totais, no lavado broncoalveolar atinge seu pico por volta do 5º dia após a administração e, por volta do 14º dia, os parâmetros voltam ao nível basal, enquanto que nos animais utilizados no presente trabalho, mesmo após 5 semanas da nebulização do LPS (grupo LPS 5 semanas), a contagem de células totais no lavado broncoalveolar, número de leucócitos e linfócitos no sangue ainda se encontram aumentados em relação ao controle. A ausência de neutrófilos no tecido pulmonar e no lavado broncoalveolar e a prevalência de células inflamatórias mononucleadas sugere uma resposta inflamatória com perfil crônico.

É amplamente aceito que a poluição do ar é um agente pró-inflamatório que tem potencial para desencadear respostas em múltiplos órgãos, principalmente no sistema respiratório e cardiovascular (Anderson et al., 2012). Quando a variável exposição do ar é subsequente a lesão pulmonar aguda, de uma forma geral, os resultados deste estudo tendem a mostrar que a exposição ao material particulado fino (MP_{2,5}) impede a recuperação completa do tecido pulmonar após lesão causada pelo LPS no período estudado. Quando observamos os resultados referente ao objetivo 2 do presente estudo, nota-se

que, o grupo LPS + poluição permanece em um estado inflamatório persistente com número de leucócitos aumentado no lavado bronco-alveolar, com predominância de macrófagos e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-8) no tecido pulmonar, enquanto o grupo LPS 5 semanas tem estes parâmetros mais próximos do grupo controle.

Quanto aos achados histológicos, é possível notar que no grupo LPS + poluição, alguns dos danos causados no tecido são persistentes mesmo após 5 semanas na lesão inicial, como a diminuição do espaço aéreo alveolar e o espessamento septal. É bastante plausível que a poluição do ar dificulte recuperação e o reparo adequado da lesão causada pelo LPS, uma vez que a poluição do ar, e especialmente o material particulado fino, exerce um papel pró-inflamatório contínuo sobre a lesão.

A maioria dos estudos experimentais mostram a exacerbação da resposta inflamatória em um curto prazo de tempo (~ 24 horas). Nosso estudo mostra que mesmo após 5 semanas da lesão inicial, os indivíduos expostos ao material particulado ainda apresentam uma lesão significativa no tecido pulmonar.

A quantidade de colágeno depositada no tecido depende da extensão da lesão celular, intensidade de proliferação dos fibroblastos, inflamação e hipoperfusão vascular que ocorrem durante a lesão pulmonar (Souza et al., 2003). Após 5 semanas da indução da lesão houve um acúmulo de colágeno tanto no parênquima pulmonar quanto nas vias aéreas indicando que houve o remodelamento do tecido resultante da lesão induzida pelo LPS (grupo LPS 5 semanas). Em contrapartida, as fibras elásticas parecem sofrer mais o efeito da poluição do ar do que da lesão induzida pelo LPS. O estudo realizado por Akinaga et al. (2009) verificou que a exposição a poluição do ar aumentou a

quantidade de fibras elásticas nas coronárias de camundongos expostos. O material particulado também pode alterar o padrão normal das fibras elásticas encontrada em todo trato respiratório como fragmentação das fibras, consistente com uma desorganização do tecido e consequente alteração funcional (Martin et al., 2007).

Apesar da literatura mostrar que a exposição crônica ao material particulado pode gerar o remodelamento tecidual, como mostrado por Pinkerton et al. (2000) que observou acúmulo de colágeno em vias aéreas, principalmente na primeira geração de bronquíolos, em uma população exposta cronicamente ao material particulado, alguns trabalhos também mostram que a exposição à poluição do ar também pode ativar metaloproteinases (MMP), que agem não só processo inflamatório mas também no remodelamento da matriz extracelular.

A família das MMP é formada por 25 enzimas, entre elas a MMP-1 pode desencadear a hidrolise dos colágenos tipos I, II, III, VII, VIII, X e XI e a MMP-2 pode degradar os colágenos tipos I, II, III, IV, V, VII, X e XI (Siemianowicz, 2012). Na revisão realizada por Dagouassat et al. (2012), os autores relatam uma série de efeitos da exposição à poluição do ar e seus componentes nas MMP. Dentre os efeitos relatados, podemos destacar uma linhagem de células epiteliais brônquicas humanas que as exposições ao DEP aumentam a expressão de MMP-1 e tanto na linhagem de células quanto em animais expostos aumentam a expressão de MMP-2. Estas enzimas são, considerando a sua função, fundamentais no equilíbrio do remodelamento e do acúmulo de colágeno nos tecidos, sustentando os achados observados que sugerem alteração significativa no processo de remodelamento neste estudo.

9. CONCLUSÕES

A partir deste estudo é possível concluir que:

1. O uso do LPS por nebulização, mostrou-se um modelo viável para a reprodução dos parâmetros característicos da lesão pulmonar aguda em camundongos da linhagem Balb/c;
2. A exposição sub crônica a poluição do ar de uma região urbana pode alterar o perfil de resposta imediata (24 horas) a lesão pulmonar aguda, causando um desequilíbrio entre os diferentes tipos de resposta inflamatória;
3. A exposição sub crônica à poluição atmosférica de uma região urbana dificulta a recuperação da lesão pulmonar aguda.

Estudo adicionais são necessários para entender o possível papel da modulação da resposta imunológica nos mecanismos envolvidos nestes processos.

10. ANEXOS

Anexo A

Tabela 11 – Média, desvios padrão, medianas e intervalos interquartil dos grupos controle, poluição, LPS 24 horas e poluição + LPS.

Variável		Grupos			
		Controle	Poluição	LPS 24 horas	Poluição + LPS
Hemograma	Eritrócitos (milhões/mm ³)	9,4213± 0,70697	9,0825± 0,7125	9,8038± 0,73391	8,4767± 0,40213 ↑
	Hemoglobina (g/dL)	15,6± 1,10841	14,95± 1,40814	16,3875± 1,03294	14,6± 0,57966 ↑
	Hematócrito (%)	45,3625± 3,26056	43,225± 3,7039 ↑	47,5375± 2,85854	42,05± 1,2502 ↑
	VCM (fL)	48,15 (0,35) ω	47,3(1,02) ω	48,2 (0,48) ω	50,25 (1,88)
	HCM (pg)	16,575± 0,19821 ω	16,4375± 0,32923 ω	16,6625± 0,22638 ω	17,25± 0,65345
	CHCM (g/dL)	34,3875± 0,36425	34,5625± 0,44701	34,4625± 0,21339	34,7167± 0,57764
	RDW-CV (%)	15,175±0,2434	15,2625±0,6947	15,9375±0,4033	16,2±1,3638
Leucograma	Leucócitos (mil/mm ³)	2,0 (0) ∩	4,0 (3)	3,0 (2)	2,0 (1) ∩
	Neutrófilos (mil/mm ³)	0,635 (0,273) ∩	1,205 (0,375)	1,125 (0,318)	0,460 (0,390) ∩ ↑
	Linfócitos (mil/mm ³)	1,0 (0) ∩	2,0 (2)	1,5 (1)	1,0 (1) ∩
	Monócitos (mil/mm ³)	0 (0)	0 (5)	0 (0)	0 (0)
	Plaquetas (mil/mm ³)	1185± 186,58	803,33± 188,248 * ↑	1348,13± 165,755	905,86± 169,097 * ↑
Lavado Bronco-alveolar (BAL)	Contagem de células totais no LBA/ml	1,496x10 ⁵ ± 3,58x10 ⁴	2,13x10 ⁵ ± 1,067x10 ⁵ * ↑	3,36x10 ⁵ ± 2,15x10 ⁴ *	2,6x10 ⁵ ± 3,3x10 ⁴ * ↑
	Nº de neutrófilos no BAL/ml	1128,44 (6750,15) ↑ω	5619,71 (7440,2) ↑ω	3,03x10 ⁵ (31002,01)	2,023x10 ⁵ (63467,53) ↑
	Nº de linfócitos no BAL/ml	4852,43 (4448,49)	2455,81 (3263,84)	3930,25 (3620,73)	3220,07 (2947,17)
	Nº de macrófagos no BAL/ml	1,39x10 ⁵ ± 3,59x10 ⁴ ↑ω	1,79x10 ⁵ ± 9,95x10 ⁴ ↑ω	2,4x10 ⁴ ± 9,21x10 ³	3,62x10 ⁴ ± 1,4x10 ⁴

Resultados expressos em Média ± Desvio padrão ou Mediana (intervalo interquartil).

Legenda: * p<0,05 em relação ao grupo controle;

↑ p<0,05 em relação ao grupo LPS 24 horas;

∩ p<0,05 em relação ao grupo Poluição e

ω p<0,05 em relação ao grupo Poluição + LPS.

Tabela 11 – Média, desvios padrão, medianas e intervalos interquartil dos grupos controle, poluição, LPS 24 horas e poluição + LPS (continuação).

Variável		Grupos			
		Controle	Poluição	LPS 24 horas	Poluição + LPS
Quantificação de citocinas	IL-1 β – LBA (pg)	0,0 (0) $\uparrow$ ω	0,0 (0) $\uparrow$ ω	23,685 (15,09)	12,87 (7,54)
	IL-1 β – Soro (pg)	0,0 (0,03)	0,0 (0)	0,0 (0,05)	0,0 (0)
	IL-6 – LBA (pg)	0,0 (0) $\uparrow$ ω	0,1 (0,34) $\uparrow$ ω	800,81 (613,53)	325,27 (231,23)
	IL-6 – Soro (pg)	0,09 (0,3)	0,125 (0,21) $\uparrow$	9,345 (7,96)	7,73 (13,26)
	IL-10 – LBA (pg)	0,00001 (0,915)	0,00001 (0,255)	1,045 (2,9425)	0,00001 (0,41)
	IL-10 – Soro (pg)	0,415 (1,58)	0,950 (0,75)	1,07 (2,25)	0,00 (0,06)
	TNF – LBA (pg)	0,15 (0,4) $\uparrow$	0,1 (1,0) $\uparrow$	2822,13 (1310,2)	486,52 (379,76) $\uparrow$
	TNF – Soro (pg)	0,69 (1,16) $\uparrow$	0,855 (1,69) $\uparrow$	5,065 (3,41)	2,8 (0,77) $\uparrow$
Estereologia	Volume total do pulmão (mm ³)	439,04 $\pm$ 85,4729	535,08 $\pm$ 151,6618	458,64 $\pm$ 42,5305	493,92 $\pm$ 60,2201
	Vv septos alveolares (%)	0,2982 $\pm$ 0,04145	0,3336 $\pm$ 0,0245	0,3416 $\pm$ 0,02474	0,349 $\pm$ 0,0482 *
	Vv espaço aéreo alveolar (%)	0,486 $\pm$ 0,0213	0,4624 $\pm$ 0,0435	0,4905 $\pm$ 0,0461	0,4314 $\pm$ 0,0505 $\uparrow$
	Vv vasos sanguíneos (%)	0,05152 $\pm$ 0,01673	0,07321 $\pm$ 0,04084	0,07332 $\pm$ 0,01387	0,09851 $\pm$ 0,0655
	Vv vias aéreas (%)	0,127 $\pm$ 0,0534	0,09163 $\pm$ 0,02782	0,0546 $\pm$ 0,0259 *	0,08031 $\pm$ 0,05133
	Vt septos alveolares (mm ³)	125,3921 (31,2416)	163,5359 (61,0647)	181,6854 (35,2339) *	129,9739 (70,9908)
	Vt espaço aéreo alveolar (mm ³)	213,8581 $\pm$ 45,2808	250,1054 $\pm$ 82,5107	266,0933 $\pm$ 40,5629	176,3223 $\pm$ 39,1463 $\uparrow$
	Vt vasos sanguíneos (mm ³)	22,0081 $\pm$ 6,1548	36,4879 $\pm$ 17,1916	39,321 $\pm$ 6,2132	44,2898 $\pm$ 33,8108
	Vt via aérea (mm ³)	40,8279 (55,9565)	47,0946 (47,9202)	25,7889 (28,6135)	20,7135 (30,04)

Resultados expressos em Média $\pm$ Desvio padrão ou Mediana (intervalo interquartil).

Legenda: * p<0,05 em relação ao grupo controle;

$\uparrow$ p<0,05 em relação ao grupo LPS 24 horas;

ω p<0,05 em relação ao grupo Poluição e

ω p<0,05 em relação ao grupo Poluição + LPS.

Tabela 11 – Média, desvios padrão, medianas e intervalos interquartil dos grupos controle, poluição, LPS 24 horas e poluição + LPS (continuação).

Variável		Grupos			
		Controle	Poluição	LPS 24 horas	Poluição + LPS
Estereologia	Sv septos alveolares (mm ⁻¹)	243,077 ± 28,8453	213,0182 ± 28,2978	203,4828 ± 29,4713 *	197,9822 ± 21,2658 *
	Sv vasos sanguíneos (mm ⁻¹)	54,7795 (10,5381)	46,3017 (29,482)	56,7934 (49,5484)	30,433 (23,6408)
	Sv vias aéreas (mm ⁻¹)	14,673 (10,5035)	13,2578 (4,5295)	21,2195 (15,9015)	14,5 (5,7388)
	St septos alveolares (mm ²)	9,45 x 10 ⁴ (56981,29)	1,13 x 10 ⁵ (52036,09)	8,98 x 10 ⁴ (23953,82)	9,28 x 10 ⁴ (23608,75)
	St vasos sanguíneos (mm ²)	2,37 x 10 ⁴ ± 7,11x10 ³	3,02 x 10 ⁴ ± 2,55x10 ⁴	2,62 x 10 ⁴ ± 1,47x10 ⁴	1,92 x 10 ⁴ ± 9,49x10 ³
	St vias aéreas (mm ²)	7201,05 (4185,33)	6028,59 (2824,62)	1,05 x 10 ⁴ (7728,38)	7256,58 (3362,14)
	Espessura média dos septos alveolares (mm)	0,0025 ± 0,00053	0,0032 ± 0,00062	0,0037 ± 0,00091 *	0,0037 ± 0,00093 *
Imunohistoquímica	Proporção de neutrófilos (MPO+) por área de tecido pulmonar(nº de cels/µm ²)	8,44x10 ⁻⁶ (9,5x10 ⁻⁶) ↑	4,08x10 ⁻⁶ (3,5x10 ⁻⁶) ↑	8,44x10 ⁻⁶ (5,42x10 ⁻⁶)	1,87x10 ⁻⁵ (1,51x10 ⁻⁵) ↑
	Proporção de linfócitos T(CD3+) por área de tecido pulmonar(nº de cels/µm ²)	3,1x10 ⁻⁴ (2,7x10 ⁻⁴) ↑	2,9x10 ⁻⁴ (1,1x10 ⁻⁴) ↑	6,7x10 ⁻⁴ (1,4x10 ⁻⁴)	4,5x10 ⁻⁴ (8,9x10 ⁻⁵) ↑
	Proporção de macrófagos (MAC2+) por área de tecido pulmonar(nº de cels/µm ²)	3,83x10 ⁻⁵ (3,6x10 ⁻⁵)	7,71 x10 ⁻⁵ (1,9 x10 ⁻⁵)*	8,07 x10 ⁻⁵ (2,2 x10 ⁻⁵)*	7,12 x10 ⁻⁵ (2,1 x10 ⁻⁵)*
	Proporção de IL-1β por área de parênquima pulmonar(µm ² /µm ²)	0,022 (0,098) ↑ ω	0,0048 (0,0055) ↑ ω	0,046 (0,047)	0,062 (0,0057)
	Proporção de IL-1β por unidade perímetro de via aérea(µm ² /µm ²)	3,274 (0,33) ∩	1,141 (0,637)	3,707 (2,18) ∩	4,718 (1,086) ∩

Resultados expressos em Média ± Desvio padrão ou Mediana (intervalo interquartil).

Legenda: * p<0,05 em relação ao grupo controle;

↑ p<0,05 em relação ao grupo LPS 24 horas;

∩ p<0,05 em relação ao grupo Poluição e

ω p<0,05 em relação ao grupo Poluição + LPS.

Tabela 11 – Média, desvios padrão, medianas e intervalos interquartil dos grupos controle, poluição, LPS 24 horas e poluição + LPS (continuação).

Variável		Grupos			
		Controle	Poluição	LPS 24 horas	Poluição + LPS
Imunohistoquímica	Proporção de IL-6 por área de parênquima pulmonar($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	0,0052 $\pm$ 0,005 $\uparrow$	0,0011 $\pm$ 0,0007 $\uparrow \omega$	0,0133 $\pm$ 0,008	0,013 $\pm$ 0,0065
	Proporção de IL-6 por unidade perímetro de via aérea($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	0,84 $\pm$ 0,74 ω	0,11 $\pm$ 0,097 ω	0,855 $\pm$ 0,393 ω	1,97 $\pm$ 0,90
	Proporção de IL-8 por área de parênquima pulmonar($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	0,00089 (0,0009) ω	0,0032 (0,0025) ω	0,0019 (0,0103) ω	0,016 (0,0074)
	Proporção de IL-8 por unidade perímetro de via aérea($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	0,032 (0,161) ω	0,037 (0,026) ω	0,208 (0,834) ω	1,32 (1,86)
	Proporção de IL-10 por área de parênquima pulmonar($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	0,012 (0,014)	0,003 (0,007) $\uparrow$	0,035 (0,076)	0,006 (0,012) $\uparrow$
	Proporção de IL-10 por unidade perímetro de via aérea($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	2,66 $\pm$ 1,28	0,36 $\pm$ 0,31 $\uparrow$	3,54 $\pm$ 2,08	2,09 $\pm$ 1,68
	Proporção de TNF- α por área de parênquima pulmonar($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	0,024 $\pm$ 0,011 $\uparrow$	0,049 $\pm$ 0,029	0,104 $\pm$ 0,011	0,048 $\pm$ 0,035
	Proporção de TNF- α por unidade perímetro de via aérea($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	1,88(1,8)	1,22(1,42)	0,86(1,62)	2,31(1,23)
Expressão gênica	IL-1 β (relativa ao controle)	0,933 (0,3814) $\uparrow$	3,535 (3,18) $\uparrow$	16,716 (12,85)	1,109 (0,25) $\uparrow$
	IL-6 (relativa ao controle)	1,29 $\pm$ 0,73 $\uparrow$	1,701 $\pm$ 1,86 $\uparrow$	54,815 $\pm$ 31,86	0,411 $\pm$ 0,238 $\uparrow$
	IL-8 (relativa ao controle)	1,03 (0,27) $\uparrow$	2,84 (2,31) $\uparrow$	39,749 (14,681)	0,875 (0,433) $\uparrow$
	IL-10 (relativa ao controle)	0,98 (1,27) $\uparrow \cup$	14,74 (11,92)	6,22 (11,43)	2,4 (3,7) $\cup$
	TNF- α (relativa ao controle)	0,921 (0,30) $\uparrow$	3,028 (4,32) $\uparrow$	18,66 (19,45)	0,896 (0,456) $\uparrow$
	TGF- β (relativa ao controle)	1,049 $\pm$ 0,271 $\uparrow \omega$	0,913 $\pm$ 0,49 $\uparrow$	0,446 $\pm$ 0,188	0,498 $\pm$ 0,238

Resultados expressos em Média $\pm$ Desvio padrão ou Mediana (intervalo interquartil).

Legenda: * p<0,05 em relação ao grupo controle;

$\uparrow$ p<0,05 em relação ao grupo LPS 24 horas;

$\cup$ p<0,05 em relação ao grupo Poluição e

ω p<0,05 em relação ao grupo Poluição + LPS.

Tabela 11 – Média, desvios padrão, medianas e intervalos interquartil dos grupos controle, poluição, LPS 24 horas e poluição + LPS (continuação).

Variável		Grupos			
		Controle	Poluição	LPS 24 horas	Poluição + LPS
Colágeno	Proporção de colágeno por área de parênquima pulmonar (%)	0,419 (0,3)	0,4054 (1,3)	0,4057 (0,68)	0,539 (0,43)
	Proporção de colágeno por área de via aérea (%)	7,4696 (8,3996)	8,5583 (4,6655)	8,9327 (9,032)	5,3232 (4,9187)
	Expressão gênica relativa de colágeno tipo I no tecido pulmonar (relativa ao controle)	1,04 (0,35) † ω	0,35 (0,22)	1,16 (0,52) † ω	0,32 (0,28)
	Expressão gênica relativa de colágeno tipo III no tecido pulmonar (relativa ao controle)	1,093 ± 0,40	0,68 ± 0,4	1,3 ± 0,62 ω	0,55 ± 0,32
Fibras elásticas	Proporção de fibras elásticas por área de parênquima pulmonar (%)	5,3677 (2,57) ω	7,6484 (3,85)	3,7996 (1,57) † ω	9,0022 (2,47)
	Proporção de fibras elásticas por área de via aérea (%)	4,2923 (2,77) † ω	12,741 (2,31)	2,1924 (3,1) † ω	9,5136 (2,25)

Resultados expressos em Média ± Desvio padrão ou Mediana (intervalo interquartil).

Legenda: * p<0,05 em relação ao grupo controle;

† p<0,05 em relação ao grupo LPS 24 horas;

‡ p<0,05 em relação ao grupo Poluição e

ω p<0,05 em relação ao grupo Poluição + LPS.

Tabela 12 – Média, desvios padrão, medianas e intervalos interquartil dos grupos controle, poluição, LPS 5 semanas e LPS + poluição.

Variável		Grupos			
		Controle	Poluição	LPS 5 semanas	LPS + Poluição
Hemograma	Eritrócitos (milhões/mm ³)	9,0 (2) ω	8,0 (1) $\uparrow$	9,0 (1) ω	8,0 (0)
	Hemoglobina (g/dL)	15,0 (2)	14,0 (1)	16,0 (0)	14,0 (0) $\uparrow$
	Hematócrito (%)	44,88±3,137	42,63±3,852 ω	47,57±2,37	41,71±1,38 $\uparrow$
	VCM (fL)	48,0 (0)	47,0 (1) ω	48,0 (1) ω	50,0 (1)
	HCM (pg)	16,0 (0) ω	16,0 (0) ω	16,0 (0) ω	17,0 (0)
	CHCM (g/dL)	34,0 (0)	34,0 (1)	34,0 (0)	34,0 (1)
	RDW-CV (%)	15,0 (1)	15,0 (1)	15,0 (1)	15,0 (1)
Leucograma	Leucócitos (mil/mm ³)	2,6125±0,35632	4,3125±1,5896 * ω	5,4429±0,9727 * ω	2,7143±0,91365
	Neutrófilos (mil/mm ³)	0,6825±0,18714	1,3613±0,60941 *	1,1843±0,22142	0,5614±0,20659 $\uparrow$
	Linfócitos (mil/mm ³)	1,7863±0,20347 $\uparrow$	2,79±1,01771 $\uparrow$	4,12±0,81074	1,9943±0,66755 $\uparrow$
	Monócitos (mil/mm ³)	0,12(0,06)	0,11(0,09)	0,1186(0,09)	0,1(0,09)
	Plaquetas (mil/mm ³)	1185±186,579	803,33±188,248 * $\uparrow$	1282,57±102,67	954,5714±192 * $\uparrow$
Lavado Bronco-alveolar	Contagem de células totais no LBA/ml	1,49x10 ⁵ ±3,58x10 ⁴	2,38x10 ⁵ ±9,25x10 ⁴ ω	3,12x10 ⁵ ±1,02x10 ⁵ * ω	5,37x10 ⁵ ±1,44x10 ⁵ *
	Nº de neutrófilos no BAL/ml	1128,44 (6750,15)	5619,71(7440,2)	7013,87 (5749,92)	9338,02 (12971,62)
	Nº de linfócitos no BAL/ml	4761,35 ± 2,34x10 ³ $\uparrow$	3135,71 ± 2,2x10 ³ $\uparrow$	1,9x10 ⁴ ± 1,49x10 ⁴	7837,56 ± 7,63x10 ³
	Nº de macrófagos no BAL/ml	1,39x10 ⁵ ± 3,59x10 ⁴ ω	1,79x10 ⁵ ± 9,95x10 ⁴ ω	2,61x10 ⁵ ± 8,99x10 ⁴ ω	4,11x10 ⁵ ± 1,54x10 ⁵

Resultados expressos em Média ± Desvio padrão ou Mediana (intervalo interquartil).

Legenda: * p<0,05 em relação ao grupo controle;

$\uparrow$ p<0,05 em relação ao grupo LPS 5 semanas;

ω p<0,05 em relação ao grupo Poluição e

ω p<0,05 em relação ao grupo LPS+Poluição.

Tabela 12 – Média, desvios padrão, medianas e intervalos interquartil dos grupos controle, poluição, LPS 5 semanas e LPS + poluição (continuação).

Variável		Grupos			
		Controle	Poluição	LPS 5 semanas	LPS + Poluição
Quantificação de citocinas no soro e lavado broncoalveolar	IL-1 β – LBA (pg)	0 (0)	0,0001 (0)	0,0001 (0,9)	0 (0)
	IL-1 β – Soro (pg)	0,0001 (0,04)	0 (0)	0 (0)	0,0001 (0)
	IL-6 – LBA (pg)	0,0001 (0) ω	0,0101 (0,34)	0,0001 (0) ω	0,0001 (0) ω
	IL-6 – Soro (pg)	0,0901 (0,3)	0,1251 (0,21)	0,0451 (0,28)	0,0101 (0,06)
	IL-10 – LBA (pg)	0,0001 (0,91)	0,0001 (0,26)	0,0001 (0,03)	0,0001 (0,12)
	IL-10 – Soro (pg)	0,4151 (1,58)	0,0951 (0,75)	0,6201 (1,16)	0,2701 (0,85)
	TNF – LBA (pg)	0,6901 (1,16)	0,8551 (1,69)	0,7451 (1,25)	1,0251 (1,2)
	TNF – Soro (pg)	0,0151 (0,4)	0,1001 (1)	0,0151 (0,4)	0,0001 (0,007)
Estereologia	Volume total (mm ³)	439,04 $\pm$ 85,4729	535,08 $\pm$ 151,6618	540,96 $\pm$ 48,871	412,16 $\pm$ 98,6363
	Vv septos alveolares (%)	0,2982 $\pm$ 0,04145	0,3336 $\pm$ 0,0245	0,3416 $\pm$ 0,0247	0,349 $\pm$ 0,0482 *
	Vv espaços alveolares (%)	0,486 $\pm$ 0,0213	0,4624 $\pm$ 0,0435	0,4905 $\pm$ 0,04615	0,4314 $\pm$ 0,05054 $\uparrow$
	Vv vasos sanguíneos (%)	0,048 (0,0317)	0,063 (0,0755)	0,073 (0,0255)	0,074 (0,1064)
	Vv vias aéreas (%)	0,1151 (0,0992)	0,0951 (0,0464)	0,0464 (0,0409) *	0,0542 (0,099)
	Vt septos alveolares (mm ³)	125,3921 (31,2416)	163,5359 (61,0647)	181,6854 (35,2339) *	129,9739 (70,9908)
	Vt espaços sanguíneos (mm ³)	213,8581 $\pm$ 45,2808	250,1054 $\pm$ 82,5107	266,0933 $\pm$ 940,5629	176,3223 $\pm$ 39,1463 $\uparrow$
	Vt vasos sanguíneos (mm ³)	22 $\pm$ 6,15	36,48 $\pm$ 17,19	39,32 $\pm$ 6,21	44,28 $\pm$ 33,81
	Vt vias aéreas (mm ³)	40,82 (55,95)	47,09 (47,92)	25,78 (28,61)	20,71 (30,04)

Resultados expressos em Média $\pm$ Desvio padrão ou Mediana (intervalo interquartil).

Legenda: * p<0,05 em relação ao grupo controle;

$\uparrow$ p<0,05 em relação ao grupo LPS 5 semanas;

ω p<0,05 em relação ao grupo Poluição e

ω p<0,05 em relação ao grupo LPS+Poluição.

Tabela 12 – Média, desvios padrão, medianas e intervalos interquartil dos grupos controle, poluição, LPS 5 semanas e LPS + poluição (continuação).

Variável		Grupos			
		Controle	Poluição	LPS 5 semanas	LPS + Poluição
Estereologia	Sv septos alveolares (mm ⁻¹)	243,077 ± 28,8453	213,0182 ± 28,2978	223,1625 ± 6,4841	201,4445 ± 21,0613 *
	Sv vasos sanguíneos (mm ⁻¹)	54,77 (10,53)	46,3 (29,48)	24,71 (16,66)	40,48 (32,98)
	Sv vias aéreas (mm ⁻¹)	16,31 ± 5,27	12,3 ± 5,41	16,84 ± 6,4	14,53 ± 8,78
	St septos alveolares (mm ²)	9,45x10 ⁴ (56981,29)	1,13x10 ⁵ (52036,09)	1,19x10 ⁵ (18299,25)	8,36x10 ⁴ (29621,7)
	St vasos sanguíneos (mm ²)	2,37x10 ⁴ ± 7,11x10 ³	3,01x10 ⁴ ± 2,55x10 ⁴	1,44x10 ⁴ ± 8,44x10 ³	1,48x10 ⁴ ± 6x10 ³
	St vias aéreas (mm ²)	7134,45 ± 2,61x10 ³	6310,93 ± 3,03x10 ³	9026,8 ± 3,48x10 ³	6427,16 ± 5,5x10 ³
	Espessura média dos septos alveolares (mm)	0,0025 ± 0,00053	0,0032 ± 0,00062	0,003 ± 0,00023	0,0034 ± 0,00057 *
Imunohistoquímica	Proporção de neutrófilos (MPO+) por área de tecido pulmonar (nº de cels/µm ²)	8,4x10 ⁻⁶ (9,5x10 ⁻⁶)	4,08x10 ⁻⁶ (3,5x10 ⁻⁶)	1,06x10 ⁻⁵ (8,1x10 ⁻⁶)	1,34x10 ⁻⁵ (0,9x10 ⁻⁵)
	Proporção de linfócitos (CD3+) por área de tecido pulmonar (nº de cels/µm ²)	3,1x10 ⁻⁴ (2,7x10 ⁻⁴) ↑	2,9x10 ⁻⁴ (1,1x10 ⁻⁴) ↑	6,7x10 ⁻⁴ (9,3x10 ⁻⁵)	5,6x10 ⁻⁴ (2,4x10 ⁻⁴) ↑
	Proporção de macrófagos (MAC2+) por área de tecido pulmonar (nº de cels/µm ²)	3,83x10 ⁻⁵ (3,6x10 ⁻⁵)	7,71x10 ⁻⁵ (1,91x10 ⁻⁵) * ↑	5,32x10 ⁻⁵ (1,91x10 ⁻⁵)	7,61x10 ⁻⁵ (3,2x10 ⁻⁵) * ↑
	Proporção de IL-1β por área de parênquima pulmonar (µm ² /µm ²)	0,022 ± 0,014 ω	0,012 ± 0,003 ω	0,033 ± 0,024 ω	0,08 ± 0,046
	Proporção de IL-1β por unidade perímetro de via aérea (µm ² /µm ²)	3,5719 (2,93)	1,0499 (0,68) ω*	2,474 (1,73) ω	5,8427 (1,48)

Resultados expressos em Média ± Desvio padrão ou Mediana (intervalo interquartil).

Legenda: * p<0,05 em relação ao grupo controle;

↑ p<0,05 em relação ao grupo LPS 5 semanas;

ω p<0,05 em relação ao grupo Poluição e

ω p<0,05 em relação ao grupo LPS+Poluição.

Tabela 12 – Média, desvios padrão, medianas e intervalos interquartil dos grupos controle, poluição, LPS 5 semanas e LPS + poluição (continuação).

Variável		Grupos			
		Controle	Poluição	LPS 5 semanas	LPS + Poluição
Imunohistoquímica	Proporção de IL-6 por área de parênquima pulmonar($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	0,007 $\pm$ 0,005 ω	0,001 $\pm$ 0,0007 ω	0,008 $\pm$ 0,006 ω	0,0314 $\pm$ 0,011
	Proporção de IL-6 por unidade perímetro de via aérea ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	1,02 (2,43)	0,06(0,21)	1,07(2,6)	3,21(2,12)
	Proporção de IL-8 por área de parênquima pulmonar($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	0,0008 (0,0009) ω	0,0032 (0,0025) ω	0,0004 (0,0002) ω	0,015 (0,017)
	Proporção de IL-8 por unidade perímetro de via aérea ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	0,032 (0,16) ω	0,037 (0,026) ω	0,001 (0,052) ω	0,687 (1,93)
	Proporção de IL-10 por área de parênquima pulmonar($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	0,012 (0,014)	0,003 (0,007)	0,007 (0,003)	0,04(0,035)
	Proporção de IL-10 por unidade perímetro de via aérea ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	2,66 $\pm$ 1,28	0,36 $\pm$ 0,31 ω	1,61 $\pm$ 0,73 ω	4,93 $\pm$ 3,4
	Proporção de TNF- α por área de parênquima pulmonar($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	0,055 $\pm$ 0,038	0,04 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,05	0,05 $\pm$ 0,02
	Proporção de TNF- α por unidade perímetro de via aérea ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	1,89 $\pm$ 1,21	1,13 $\pm$ 0,77	1,69 $\pm$ 0,89	2,75 $\pm$ 1,86
Expressão gênica	IL-1 β (relativa ao controle)	0,933 (0,38) ω	3,53 (3,18)	2,13(2,54)	1,32 (1,69) ω
	IL-6 (relativa ao controle)	1,3(1,17)	1,05(1,95)	1,21(5,67)	0,45(1,11)
	IL-8 (relativa ao controle)	1,03 (0,27)	2,84(2,31)	2,35(2,9)	0,74(5,78)
	IL-10 (relativa ao controle)	(0,98 (1,27) ω	14,74 (11,92)	1,04 (1,56) ω	1,82 (8,47) ω
	TNF- α (relativa ao controle)	0,92(0,3)	3,02(4,32)	2,3 (2,27)	0,86 (1,13)
	TGF- β (relativa ao controle)	1,04 $\pm$ 0,27 ω	0,91 $\pm$ 0,49	0,74 $\pm$ 0,28	0,52 $\pm$ 0,28

Resultados expressos em Média $\pm$ Desvio padrão ou Mediana (intervalo interquartil).

Legenda: * p<0,05 em relação ao grupo controle;

$\uparrow$ p<0,05 em relação ao grupo LPS 5 semanas;

ω p<0,05 em relação ao grupo Poluição e

ω p<0,05 em relação ao grupo LPS+Poluição.

Tabela 12 – Média, desvios padrão, medianas e intervalos interquartil dos grupos controle, poluição, LPS 5 semanas e LPS + poluição (continuação).

Variável		Grupos			
		Controle	Poluição	LPS 5 semanas	LPS + Poluição
Colágeno	Proporção de colágeno por área de parênquima pulmonar (%)	0,419 (0,3) ↑	0,4054 (1,3) ↑	1,56 (1,04)	0,3947 (0,64) ↑
	Proporção de colágeno por área de via aérea (%)	7,4696 (8,3996) ↑	(8,5583 (4,6655) ↑	14,847 (9,2066)	(6,7949 (3,3933) ↑
	Expressão gênica relativa de colágeno tipo I no tecido pulmonar (relativa ao controle)	1,04 (0,35) ∩	0,35 (0,22)	1,06(094)	0,39 (0,26)
	Expressão gênica relativa de colágeno tipo III no tecido pulmonar (relativa ao controle)	1,09 ±0,4	0,68±0,4	0,77±0,35	0,76±0,37
Fibras elásticas	Proporção de fibras elásticas por área de parênquima pulmonar (%)	5,3677 (2,57) ω	4,054 (1,3)	4,6484 (1,53) ω	10,2001 (5,38))
	Proporção de fibras elásticas por área de via aérea (%)	4,2923 (2,77) ∩ ω	12,741 (2,31)	2,2437 (2,74) ∩ ω	15,7908 (5,44)

Resultados expressos em Média ± Desvio padrão ou Mediana (intervalo interquartil).

Legenda: * p<0,05 em relação ao grupo controle;

↑ p<0,05 em relação ao grupo LPS 5 semanas;

∩ p<0,05 em relação ao grupo Poluição e

ω p<0,05 em relação ao grupo LPS+Poluição.

Anexo B: Aprovação do comitê de ética em pesquisa

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18.08.10, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 177/10 intitulado: **"ESTUDO EXPERIMENTAL DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOS PRODUTOS DE EXAUSTÃO DE DIESEL E BIODIESEL E AO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO NO DESENVOLVIMENTO DA LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS."** e seus anexos, **que utilizará 176 camundongos machos Balb/c**, apresentado pelo Departamento de Patologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Luiz Fernando Ferraz da Silva

Pesquisador (a) Executante : Mariana Matera Veras

CEP-FMUSP, 18 de agosto de 2010.

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

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akinaga LM, Lichtenfels AJ, Carvalho-Oliveira R, Caldini EG, Dolhnikoff M, Silva LF, Bueno HM, Pereira LA, Saldiva PH, Garcia ML. Effects of chronic exposure to air pollution from Sao Paulo city on coronary of Swiss mice, from birth to adulthood. *Toxicol Pathol.* 2009; 37(3):306-14.

Amdur MO, Corn M. The irritant potency of zinc ammonium sulfate of different particle sizes. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1963; 24:326-33.

Amdur MO, Creasia DA. The irritant potency of m-terphenyl of different particle sizes. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1966; 27(4):349-52.

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

Andrade MF, Miranda RM, Fornar A, Kerr A, Oyama B, André PA, Saldiva PHN. Vehicle emissions and PM_{2.5} mass concentrations in six Brazilian cities. *Air Quality, Atmosphere and Health*, 2012; 5(1):79-88.

Araújo-Jorge TC, Cotta-de-Almeida V, Olivieri BP, Henriques-Pons A. Preparo de Células para Avaliação de Parâmetros Inflamatórios e Imunológicos. In: Araújo-Jorge TC, Castro SL. Doença de chagas: manual para experimentação animal. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2000. p. 253. Disponível em: <http://static.scielo.org/scielobooks/cdbjg/pdf/araujo-9788575413937.pdf>.

Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *The Lancet.* 1967; 2: 319-23.

Atkinson RW, Kang S, Anderson HR, Mills IC, Walton HA. Epidemiological time series studies of PM_{2.5} and daily mortality and hospital admissions: a systematic review and meta-analysis. *Thorax.* 2014; 69(7): 660–5.

Aust AE, Ball JC, Hu AA, Lighty JS, Smith KR, Straccia AM, Veranth JM, Young WC. Particle characteristics responsible for effects on human lung epithelial cells. *Res Rep Health Eff Inst.* 2002; 110:1-76.

Barbas CSV, Meyer EC, Höeiz C, Carvalho CRR. Síndrome do desconforto respiratório agudo: Fisiopatologia e diretrizes de tratamento. In: Knobel E. *Conduitas no paciente grave*. 3ed. São Paulo: Atheneu; 2006. p. 527-33.

Beelen R, Raaschou-Nielsen O, Stafoggia M, Andersen ZJ, Weinmayr G, Hoffmann B, et al. Effects of long-term exposure to air pollution on natural-cause mortality: an analysis of 22 European cohorts within the multicentre ESCAPE project. *Lancet.* 2014; 383(9919):785-95.

Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al. The American- European Consensus Conference on ARDS: Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 149: 818-24.

Bogatcheva NV, Zemskova MA, Kovalenkov Y, Poirier C, Verin AD. Molecular mechanisms mediating protective effect of cAMP on lipopolysaccharide (LPS)-induced human lung microvascular endothelial cells (HLMVEC) hyperpermeability. *J Cell Physiol.* 2009; 221(3): 750–9.

Bridget M, Kuehn, MSJ. WHO: More than 7 million air pollution deaths each year. *JAMA.* 2014; 311(15):1486.

Brook RD, Brook JR, Rajagopalan S. Air pollution: the "Heart" of the problem. *Current Hypertension Reports.* 2003; 5: 32-9.

Brown JS, Zeman KL, Bennett WD. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166(9):1240-7.

Brucker N, Moro AM, Charão MF, Durgante J, Freitas F, Baierle M, Nascimento S, Gauer B, Bulcão RP, Bubols GB, Ferrari PD, Thiesen FV, Gioda A, Duarte MM, de Castro I, Saldiva PH, Garcia SC. Biomarkers of occupational exposure to air pollution, inflammation and oxidative damage in taxi drivers. *Sci Total Environ*. 2013; 463-464: 884-93.

Brunekreef B, Holgate T. Air pollution and health. *Lancet*. 2002; 360 (9341): 1233-42.

Burch WM. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*. 2002; 106 (20):e141-2.

Carlsten C, Melén E. Air pollution, genetics, and allergy: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012; 12 (5): 455-60.

CETESB. Material particulado inalável fino (MP2,5) e grosso (MP2,5-10) na atmosfera da região metropolitana de São Paulo (2000-2006). [2008]. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/publicacoes.asp>.

CETESB. Qualidade do ar no estado de São Paulo 2010. [2010]. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/qualidade-doar/31-publicacoes-e-relatorios>.

Chalbot MC, Jones TA, Kavouras IG. Trends of non-accidental, cardiovascular, stroke and lung cancer mortality in Arkansas are associated with ambient PM2.5 reductions. *Int J Environ Res Public Health*. 2014; 11(7):7442-55.

Chen H, Goldberg MS, Villeneuve PJ. A systematic review of the relation between long-term exposure to ambient air pollution and chronic diseases. *Rev Environ Health*. 2008; 23(4):243-97.

Chen J, Tan M, Nemmar A, Song W, Dong M, Zhang G, Li Y. Quantification of extrapulmonary translocation of intratracheal-instilled particles in vivo in rats: effect of lipopolysaccharide. *Toxicology*. 2006; 222: 195-201.

Chen TM, Shofer S, Gokhale J, Kuschner WG. Outdoor air pollution: overview and historical perspective. *Am J Med Sci*. 2007; 333 (4): 230–4.

Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly of the American Thoracic Society. Health effects of outdoor air pollution. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 153: 3-50.

Crouser ED, Fahy RJ. Lesão pulmonar aguda, edema pulmonar e insuficiência múltipla de órgãos. In: Wilkins RL, Stoller JK, Kacmarek RM. Fundamentos da terapia respiratória de Egan. 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. p. 571-81.

D'Amato G, Cecchi L, D'Amato M, Liccardi G. Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: an update. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010; 20 (2): 95-102.

Dagouassat M, Lanone S, Boczkowski J. Interaction of matrix metalloproteinases with pulmonary pollutants. *Eur Respir J*. 2012; 39: 1021–32.

de Lima TM, Kazama CM, Koczulla AR, Hiemstra PS, Macchione M, Fernandes AL, Santos Ude P, Bueno-Garcia ML, Zanetta DM, de 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; 68 (12): 1488-94.

Deleuze V, Lefort J, Bureau MF, Scherman D, Vargaftig BB. LPS-induced bronchial hyperreactivity: interference by mIL-10 differs according to site of delivery. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004; 286: 98-105.

Dockery DW, Pope CA, Xu X; Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Benjamin G, Ferris BG, Speizer FE. An Association between Air Pollution and Mortality in Six U.S. Cities. *The New England Journal of Medicine*. 1993; 329: 1753-9.

Dockery DW. Health Effects of Particulate Air Pollution. *Annals of Epidemiology*. 2009; 19: 257-63.

Dushianthan A, Grocott MPW, Postle AD, Cusack R. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Postgrad Med J*. 2011; 87: 612-22.

Faffe DS, Seidl VR, Chagas PSC, Gonçalves de Moraes VL, Capelozzi VL, Rocco PRM, Zin WA. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. *Eur Respir J*. 2000; 15: 85-91.

Ferin J, Oberdörster G, Penney DP. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992; 6(5):535-42.

Fuentes-Mattei E, Rivera E, Gioda A, Sanchez-Rivera D, Roman-Velazquez FR, Jimenez-Veleza BD. Use of Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B) to Study Immunological Markers Resulting From Exposure to PM2.5 Organic Extract from Puerto Rico. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010; 243(3): 381–9.

Fullmer HM, Sheetz JH, Narkates AJ. Oxytalan connective tissue fibers: a review. *J.Oral Pathol*. 1974; 3: 291-316.

Gioda A, Fuentes-Mattei E, Jimenez-Velez B. Evaluation of cytokine expression in BEAS cells exposed to fine particulate matter (PM2.5) from specialized indoor environments. *Int J Environ Health Res*. 2011; 21(2): 106-19.

Goldberg MS, Burnett RT, Bailar JC 3rd, Tamblyn R, Ernst P, et al. Identification of persons with cardiorespiratory conditions who are at risk of dying from the acute effects of ambient air particles. *Environmental Health Perspectives*. 2001; 109 (Suppl. 4): 487- 94.

Gordon SB, Bruce NG, Grigg J, Hibberd PL, Kurmi OP, Lam KB, Mortimer K, Asante KP, Balakrishnan K, Balmes J, Bar-Zeev N, Bates MN, Breysse PN, Buist S, Chen Z, Havens D, Jack D, Jindal S, Kan H, Mehta S, Moschovis P, Naeher

L, Patel A, Perez-Padilla R, Pope D, Rylance J, Semple S, Martin WJ 2nd. Respiratory risks from household air pollution in low and middle income countries. *Lancet Respir Med*. 2014; 2 (10): 823-60.

Gowdy K, Krantz QT, Daniels M, Linak WP, Jaspers I, Gilmour MI. Modulation of pulmonary inflammatory responses and antimicrobial defenses in mice exposed to diesel exhaust. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008; 229: 310-9.

Guo Y, Li S, Tawatsupa B, Punnasiri K, Jaakkola JJ, Williams G. The association between air pollution and mortality in Thailand. *Sci Rep*. 2014; 4:1-8.

Helfand WH, Lazarus J, Theerman P. Donora, Pennsylvania: an environmental disaster of the 20th century. *Am J Public Health*. 2001; 91:553.

Hirota JA, Gold MJ, Hiebert PR, Parkinson LG, Wee T, Smith D, Hansbro PM, Carlsten C, VanEeden S, Sin DD, McNagny KM, Knight DA. The NLRP3 Inflammasome/IL-1RI Axis Mediates Innate Immune but Not Adaptive Immune Responses Following PM10 Exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014. [Epub ahead of print].

Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010; 181 (4): 394-418.

Hu R, Xu H, Jiang H, Zhang Y, Sun Y. The role of TLR4 in the pathogenesis of indirect acute lung injury. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2013; 18:1244-55.

Ichinose T, Furuyama A, Sagai M. Biological effects of diesel exhaust particles (DEP). II. Acute toxicity of DEP introduced into lung by intratracheal instillation. *Toxicology*. 1995; 99: 153-67.

Inoue K, Koike E, Endoh A, Sumi D, Kumagai Y, Hayakawa K, Kiyono M, Tanaka M, Takano H. Diesel exhaust particles induce a Th2 phenotype in mouse naïve mononuclear cells *in vitro*. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2010; 1: 761-67.

Inoue H, Shimada A, Kaewamatawong T, Naota M, Morita T, Ohta Y, Inoue K, Takano H. Ultrastructural changes of the air-blood barrier in mice after intratracheal instillation of lipopolysaccharide and ultrafine carbon black particles. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2009; 61 (1):51-8.

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Hirano S, Kobayashi T, Fujitani Y, Shimada A, Yoshikawa T. Effects of inhaled nanoparticles on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *Toxicology*. 2007; 238 (2-3): 99-110.

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Hirano S, Sakurai M, Shimada A, Yoshikawa T. Effects of airway exposure to nanoparticles on lung inflammation induced by bacterial endotoxin in mice. *Environ Health Perspect*. 2006; 114(9):1325-30.

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yamaki K, Uchiyama K, Yoshikawa T. Components of diesel exhaust particles differentially affect lung expression of cyclooxygenase-2 related to bacterial endotoxin. *J Appl Toxicol*. 2004;24 (6): 415-8.

Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani RR. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*. 1978; 41: 267-74.

Knox EG. Atmospheric pollutants and mortalities in English local authority areas. *J Epidemiol Community Health*. 2008; 62:442–7.

Kok TM, Driessens HA, Hogervorst JG, Briedé JJ. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies. *Mutat Res*. 2006; 613(2-3):103-22.

Kollef MH, Eisenberg PR, Ohlendorf MF, Wick MR. The accuracy of elevated concentrations of endotoxin in bronchoalveolar lavage fluid for the rapid diagnosis of gram-negative pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1996; 154: 1020-8.

Laumbach RJ. Outdoor Air Pollutants and Patient Health. *American Family Physician*. 2010; 81 (2): 175-80.

Laumbach RJ, Kipen HM. Respiratory health effects of air pollution: update on biomass smoke and traffic pollution. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129(1): 3-11.

Li P, Xin J, Wang Y, Li G, Pan X, Wang S, Cheng M, Wen T, Wang G, Liu Z. Association between particulate matter and its chemical constituents of urban air pollution and daily mortality or morbidity in Beijing City. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2014; [Epub ahead of print].

Lim YR, Bae HJ, Lim YH, Yu S, Kim GB, Cho YS. Spatial analysis of PM10 and cardiovascular mortality in the Seoul metropolitan area. *Environ Health Toxicol*. 2014; 29: 1-7.

Lipsett M, Hurley S, Ostro B. Air pollution and emergency room visits for asthma in Santa Clara County, California. *Environ Health Perspect*. 1997;105:216–22.

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; 25 (4): 402-8.

Logan WP. Mortality in the London fog incident. *Lancet*. 1953; (1):336–8.

Loomis D, Castillejos M, Gold DR, McDonnell W, Borja-Aburto VH. Air pollution and infant mortality in Mexico City. *Epidemiology*. 1999; 10(2):118-23.

Marshall RP, Bellingan G, Webb S, Puddicombe A, Goldsack N, McAnulty RJ, Laurent GJ. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162 (5): 1783-8.

Martin S, Dawidowski L, Mandalunis P, Cereceda-Balic F, Tasat DR. Characterization and biological effect of Buenos Aires urban air particles on mice lungs. *Environ Res*. 2007; 105(3):340-9.

Martin S, Fernandez-Alanis E, Delfosse V, Evelson P, Yakisich JS, Saldiva PH, Tasat DR. Low doses of urban air particles from Buenos Aires promote oxidative stress and apoptosis in mice lungs. *Inhal Toxicol*. 2010; 22(13):1064-71.

Martin TR, Rubenfeld GD, Ruzinski JT, Goodman RB, Steinberg KP, Leturcq DJ, Moriarty AM, Raghu G, Baughman RP, Hudson LD. Relationship between soluble CD 14, lipopolysaccharide binding protein, and the alveolar inflammatory response in patients with acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1997; 155: 937-44.

Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*. 2012; 122(8):2731–40.

Matthay MA, Wiener-Kronish JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142: 1250–7.

Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, Kuebler WM; Acute Lung Injury in Animals Study Group. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011; 44(5): 725-38.

Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 295(3): L379-99.

Mills NL, Amin N, Robinson SD, Anand A, Davies J, Patel D, de la Fuente JM, Cassee FR, Boon NA, Macnee W, Millar AM, Donaldson K, Newby DE. Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans? *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173(4):426-31.

Milojevic A, Wilkinson P, Armstrong B, Bhaskaran K, Smeeth L, Hajat S. Short-term effects of air pollution on a range of cardiovascular events in England and Wales: case-crossover analysis of the MINAP database, hospital admissions and mortality. *Heart*. 2014; 100(14):1093-8.

Möller W, Felten K, Sommerer K, Scheuch G, Meyer G, Meyer P, Häussinger K, Kreyling WG. Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177(4):426-32.

Montes GS, Bezerra MSF, Junqueira LCU. Collagen distribution in tissues. IN: Ruggeri A, Motta PM. Ultrastructure of the connective tissue matrix. The Hage, Martinus NIJHOFF. 1984, p.65-88.

Montes GS, Junqueira LCU. Histochemical localization of collagen and of proteoglycans in tissue. In: Nimmi ME. Collagen. Boca-Raton: CRC Press. 1988, p.41-72.

Montes GS, Kristan RM, Shigihara KM, Tokoro R, Mourão PAS, Junqueira LCU. Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. *Histochemistri*. 1980, 65: 131-41.

Mühlfeld C, Ochs M. Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 2: stereological parameters and study designs in various disease of the respiratory tract. *Am J Physiol Lung Mol Physiol*. 2013; 305: 205-21.

Nemery B, Hoet PH, Nemmar A. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. *Lancet*. 2001; 357:704–8.

Neuberger M, Moshhammer H, Rabaczko D. Acute and subacute effects of urban air pollution on cardiopulmonary emergencies and mortality: time series studies in Austrian cities. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10(10):4728-51.

Nijland R, Hofland T, van Strijp JA. Recognition of LPS by TLR4: potential for anti-inflammatory therapies. *Mar Drugs*. 2014; 12 (7): 4260-73.

Oberdorster G, Utell MJ. Ultrafine particles in the urban air: to the respiratory tract – and beyond? *Environ Health Perspect*. 2002; 110:440–1.

Orona NS, Astort F, Maglione GA, Saldiva PH, Yakisich JS, Tasat DR. Direct and indirect air particle cytotoxicity in human alveolar epithelial cells. *Toxicol In Vitro*. 2014; 28(5):796-802.

Patil RR, Chetlapally SK, Bagavandas M. Global review of studies on traffic police with special focus on environmental health effects. *Int J Occup Med Environ Health*. 2014; 27 (4): 523-35.

Pereira CEL, Heck TG, Saldiva PHN, Rhoden CR. Ambient particulate air pollution from vehicles promotes lipid peroxidation and inflammatory responses in rat lung. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007; 40: 1353-9.

Pereira P, Saldiva PH, Sakae RS, Bohm GM, Martins MA. Urban levels of air pollution increase lung responsiveness in rats. *Environ Res*. 1995; 69 (2): 96-101.

Phalen RF, Mendez LB. Dosimetry considerations for animal aerosol inhalation studies. *Biomarkers*. 2009; 14 (Suppl 1): 63-6.

Piatt CU, O'Brien G. Lesão e inflamação do parênquima. In: Crinee GJ, D'Alonzo GE. Fisiopatologia Pulmonar. São Paulo: Atheneu; 2002. p.135-47.

Pinkerton KE, Green FH, Saiki C, Vallyathan V, Plopper CG, Gopal V, Hung D, Bahne EB, Lin SS, Ménache MG, Schenker MB. Distribution of particulate matter and tissue remodeling in the human lung. *Environ Health Perspect.* 2000; 108(11): 1063–69.

Pope CA 3rd, Bates DV, Raizenne ME. Health Effects of Particulate Air Pollution: Time for Reassessment? *Environmental Health Perspectives.* 1995; 103 (5): 472 – 80.

Pope CA 3rd, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation.* 2004; 109: 71-7.

Pope CA 3rd, Dockery DW. Acute health effects of PM10 pollution and symptomatic and asymptomatic children. *The American review of Respiratory disease.* 1992; 145: 1123-8.

Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, et al. Acute respiratory distress Syndrome: the Berlin definition. *JAMA.* 2012; 307(23): 2526-33.

Ritz B, Wilhelm M. Ambient Air Pollution and Adverse Birth Outcomes: Methodologic Issues in an Emerging Field. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008; 102(2): 182–90.

Riva DR, Magalhães CB, Lopes AA, Lanças T, Mauad T, Malm O, Valença SS, Saldiva PH, Faffe DS, Zin WA. Low dose of fine particulate matter (PM2.5) can induce acute oxidative stress, inflammation and pulmonary impairment in healthy mice. *Inhal Toxicol.* 2011; 23(5): 257-67.

Rocco PRM, Dos Santos C, Pelosi P. Lung parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome. *Minerva Anesthesiol.* 2009; 75 (12): 730-40.

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; 194: 112-20.

Rom WN, Boushey H, Caplan A. Experimental Human Exposure to Air Pollutants Is Essential to Understand Adverse Health Effects. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 2013; 49 (5): 691-6.

Romieu I, Gouveia N, Cifuentes LA, de Leon AP, Junger W, Vera J, Strappa V, Hurtado-Díaz M, Miranda-Soberanis V, Rojas-Bracho L, Carbajal-Arroyo L, Tzintzun-Cervantes G; HEI Health Review Committee. Multicity study of air pollution and mortality in Latin America (the ESCALA study). *Res Rep Health Eff Inst.* 2012; 171:5-86.

Saldiva PH, King M, Delmonte VL, Macchione M, Parada MA, Daliberto ML, Sakae RS, Criado PM, Silveira PL, Zin WA, et al. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ Res.* 1992; 57(1):19-33.

Saldiva PHN, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Diaz E, Koutrakis P, Suh H, Tsuda A, Godleski JJ. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2002; 165: 1610-17.

Salinas M, Vega J. The effect of outdoor air pollution on mortality risk: an ecological study from Santiago, Chile. *World Health Stat Q.* 1995; 48(2):118-25.

Sartori C, Matthay M.A. Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights. *Eur Respir J.* 2002; 20: 1299–313.

Saunders V, Breyse P, Clark J, Sproles A, Davila M, Wills-Karp M. Particulate matter-induced airway hyperresponsiveness is lymphocyte dependent. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 640–6.

Schwartz J, Neas LM. Fine particles are more strongly associated than coarse particles are with the acute respiratory health effects in schoolchildren. *Epidemiology*. 2000; 11: 6-10.

Schwartz J. What are people dying of on high air pollution days? *Environmental Research*. 1994; 64 (1): 26-35.

Seaton A, Macnee W, Donald K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet*. 1995; 345: 176–8.

Siemianowicz K. The Role of Metalloproteinases in the Development of Aneurysm. In: Murai Y. Aneurysm. Crocia: InTech, 2012. p.65-74.

Sioutas C, Delfino R, Singh M. Exposure assessment for atmospheric ultrafine particles (UFPs) and implications for epidemiologic research. *Environ Health Perspect*. 2005; 113:947–55.

Snow SJ, Vizcaya-Ruiz A, Osornio-Vargas A, Thomas RF, Schladweiler MC, McGee J, Kodavanti UP. The effect of composition, size, and solubility on acute pulmonary injury in rats following exposure to Mexico City ambient particulate matter samples. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2014; 77:1164–82.

Souza AB, Santos FB, Negri EM, Zin WA, Rocco PRM. Lung tissue remodeling in the acute respiratory distress syndrome. *J Pneumologia*. 2003; 29 (4): 235-45.

Souza MB, Saldiva PH, Pope CA 3rd, Capelozzi VL. Respiratory changes due to long-term exposure to urban levels of air pollution: a histopathologic study in humans. *Chest*. 1998; 113(5):1312-8.

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

Steenhof M, Mudway IS, Gosens I, Hoek G, Godri KJ, Kelly FJ, Harrison RM, Pieters RH, Cassee FR, Lebret E, Brunekreef BA, Strak M, Janssen NA. Acute nasal pro-inflammatory response to air pollution depends on characteristics other than particle mass concentration or oxidative potential: the RAPTES project. *Occup Environ Med*. 2013; 70(5): 341-8.

Takano H, Yoshikawa T, Ichinose T, Miyabara Y, Imaoka K, Sagai M. Diesel Exhaust Particles Enhance Antigen-induced Airway Inflammation and Local Cytokine Expression in Mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 156: 36–42.

Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yoshikawa T, Morita M. Diesel exhaust particles enhance lung injury related to bacterial endotoxin through expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and intercellular adhesion molecule-1. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002; 165: 1329-35.

Takano H, Yanagisawa R, Inoue K. Components of diesel exhaust particles diversely enhance a variety of respiratory diseases related to infection or allergy: extracted organic chemicals and the residual particles after extraction differently affect respiratory diseases. *J Clin Biochem Nutr*. 2007; 40(2): 101-7.

Takenaka S, Dornhofer-Takenaka H, Muhle H. Alveolar distribution of fly ash and of titanium dioxide after long-term inhalation by Wistar rats. *J Aerosol Sci*. 1986; 17:361-64.

Tolbert PE, Mulholland JA, MacIntosh DL, Xu F, Daniels D, Devine OJ, Carlin BP, Klein M, Dorley J, Butler AJ, Nordenberg DF, Frumkin H, Ryan PB, White MC. Air quality and pediatric emergency room visits for asthma in Atlanta, Georgia, USA. *Am J Epidemiol.* 2000;151(8):798–810.

Totlandsdal AI, Låg M, Lilleaas E, Cassee F, Schwarze P. Differential proinflammatory responses induced by diesel exhaust particles with contrasting PAH and metal content. *Environ Toxicol.* 2015; 30(2): 188-96.

Toward TJ, Broadley KJ. Chronic lipopolysaccharide exposure on airway function, cell infiltration, and nitric oxide generation in conscious guinea pigs: effect of rolipram and dexamethasone. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2001; 298: 298-306.

Tsai SS, Chang CC, Liou SH, Yang CY. The effects of fine particulate air pollution on daily mortality: a case-crossover study in a subtropical city, Taipei, Taiwan. *Int J Environ Res Public Health.* 2014; 11(5):5081-93.

Ulich TR, Watson LR, Yin SM, Guo KZ, Wang P, Thang H, del Castillo J. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am J Pathol.* 1991; 138(6):1485-96.

van Eeden SF, Yeung A, Quinlan K, Hogg JC. Systemic response to ambient particulate matter: relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005; 2(1):61-7.

Villar J, Sulemanji D, Kacmarek RM. The acute respiratory distress syndrome: incidence and mortality, has it changed? *Current Opinion in Critical Care.* 2014; 20 (1): 3-9.

Voelker MT, Fichtner F, Kasper M, Kamprad M, Sack U, Kaisers UX, Laudi S. Characterization of a double-hit murine model of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014; 12: [Epub ahead of print].

Ware LB, Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163: 1376–83.

Ware LB, Matthay MA. Maximal alveolar epithelial fluid clearance in clinical acute lung injury: an excellent predictor of survival and the duration of mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 159: A694.

Wiebert P, Sanchez-Crespo A, Falk R, Philipson K, Lundin A, Larsson S, Möller W, Kreyling WG, Svartengren M. No significant translocation of inhaled 35-nm carbon particles to the circulation in humans. *Inhal Toxicol*. 2006a; 18(10):741-7.

Wiebert P, Sanchez-Crespo A, Seitz J, Falk R, Philipson K, Kreyling WG, Möller W, Sommerer K, Larsson S, Svartengren M. Negligible clearance of ultrafine particles retained in healthy and affected human lungs. *Eur Respir J*. 2006b; 28(2):286-90.

Weigert C. Über eine methode zur farbung elastischer fasern. *Zentralbl. Allg. Pathol. Anat*. 1898; 9:289–92.

World Health Organization. WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen, dioxide and sulfur dioxide [2005]. Disponível em: http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair_aqg/en/.

Yanagisawa R, Takano H, Inoue K, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yamaki K, Kumagai Y, Uchiyama K, Yoshikawa T, Morita M. Enhancement of acute lung injury related to bacterial endotoxin by components of diesel exhaust particles. *Thorax*. 2003; 58: 605-12.

Yang JY, Kim JY, Jang JY, Lee GW, Kim SH, Shin DC, Lim YW. Exposure and toxicity assessment of ultrafine particles from nearby traffic in urban air in Seoul, Korea. *Environ Health Toxicol*. 2013; 28: e2013007.

Yoshida T, Nagaia K, Inomata T, Ito Y, Betsuyaku T, Nishimura M. Relationship between neutrophil influx and oxidative stress in alveolar space in lipopolysaccharide-induced lung injury. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2014; 191: 75– 83.

Yanagisawa R, Takano H, Inoue K, Ichinose T, Yoshida S, Sadakane K, Takeda K, Yoshino S, Yamaki K, Kumagai Y, Yoshikawa T. Complementary DNA microarray analysis in acute lung injury induced by lipopolysaccharide and diesel exhaust particles. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004; 229(10):1081-7.

Zambrano NZ, Montes GS, Schigihara KM, Sanchez EM, Junqueira LCU. Collagen arrangement in cartilages. *Acta Anat*. 1982, 113: 26-38.

Zanobetti A, Dominici F, Wang Y, Schwartz JD. A national case-crossover analysis of the short-term effect of PM_{2.5} on hospitalizations and mortality in subjects with diabetes and neurological disorders. *Environ Health*. 2014; 13(1):38-49.

Zelikoff JT, Schermerhorn KR, Fang K, Cohen MD, Schlesinger RB. A role for associated transition metals in the immunotoxicity of inhaled ambient particulate matter. *Environ Health Perspect*. 2002; 110(5): 871–5.

Zhao C, Liao J, Chu W, Wang S, Yang T, Tao Y, Wang G. Involvement of TLR2 and TLR4 and Th1/Th2 shift in inflammatory responses induced by fine ambient particulate matter in mice. *Inhal Toxicol*. 2012; 24: 918–27.

Zhao J, Gao Z, Tian Z, Xie Y, Xin F, Jiang R, Kan H, Song W. The biological effects of individual-level PM (2.5) exposure on systemic immunity and

inflammatory response in traffic policemen. *Occup Environ Med.* 2013; 70(6):426-31.

Zhao J, Xie Y, Qian C, Li L, Jiang R, Kan H, Chen R, Song W. Imbalance of Th1 and Th2 cells in cardiac injury induced by ambient fine particles. *Toxicol Lett.* 2012; 208(3): 225-31.