ADAIR APARECIDA SANTOS ALEMANY

Influência da dieta hipercolesterolêmica em camundongos *knockout LDLr -/-* expostos a partículas ambientais concentradas sobre o sistema pulmonar.

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profª Drª. Thais Mauad

São Paulo

2013

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

©reprodução autorizada pelo autor

Alemany, Adair Aparecida Santos
Influência da dieta hipercolesterolêmica em camundongos knock-out LDLr-/- expostos a partículas ambientais concentradas sobre o sistema pulmonar / Adair Aparecida Santos Alemany. -- São Paulo, 2013.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Thais Mauad.

Descritores: 1.Material particulado/efeitos adversos 2.Material particulado/toxicidade 3.Material particulado/análise 4.Poluição do ar/análise 5.Camundongos knockout 6.Exposição ambiental/efeitos adversos 7.Dieta hiperlipídica 8.Aterosclerose 9.Pulmão/fisiopatologia

USP/FM/DBD-149/13

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

CHARLES CHAPLIN

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Marcelo, uma pessoa tão especial em minha vida, que sempre esteve ao meu lado, e que sem seu incondicional apoio não teria sido possível a realização deste trabalho.

Aos meus pais, amor e apoio sempre.

Aos meus filhos, Natalie e Juan, luz da minha vida, que sempre entenderam minha ausência.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profª Drª Thais Mauad, por me acolher como sua orientanda, diante tantos obstáculos.

A Drª Mariana Matera Veras, pela paciência, estímulo, dedicação absoluta, ensinamento e apoio incondicional no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Profº Drº Paulo Hilário Nascimento Saldiva pela idealização deste grande projeto.

A Dra. Nair Yamaguchi, minha terapeuta, pelos bons conselhos e por me fazer acreditar cada vez mais no meu potencial.

Ao Dr. Rodolfo Vieira pela ajuda nas análises de ELISA.

Ao Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP) representado pela Dra. Dulcinéia Saes pela colaboração na doação dos animais para o início da realização do trabalho.

A equipe do Laboratório de Biologia Celular (LIM 59) representada pela Profª. Dra. Elia pelo recebimento acolhedor durante um período de desenvolvimento deste trabalho.

Ao grupo de colaboradores da técnica do Laboratório de Imunohistoquímica pelo preparo das lâminas (muitas vezes com solicitações para ontem).

A técnica Ana Lucia, pela disponibilidade em escanear minhas lâminas (sempre com muita urgência).

A Dra. Raquel Annoni por sua disponibilidade e paciência no processo de análise imunohistoquímica.

A Dra. Beatriz Romanholo (Laboratório de Terapêutica Experimental -LIM 20) pelo recebimento acolhedor para realização de parte dos experimentos.

Ao Dr. Sérgio Catanozi, pelo recebimento acolhedor em seu laboratório tornando possível a realização de uma das etapas mais importantes deste trabalho.

Aos colegas do laboratório pelo apoio e companheirismo durante a realização deste trabalho. Em especial Natália e Gabriel pela força incondicional durante e para o desfecho deste trabalho.

As secretárias do Departamento de Fisiopatologia Experimental, Tânia e Liduvina, pelo apoio e ajuda nos processos burocráticos.
As secretárias do laboratório de Poluição Atmosférica, Dalva e Sônia, pelo apoio e ajuda nos processos burocráticos.

A Capes, pelo apoio financeiro.

E finalmente, mas não menos importante, aos camundongos que deram a vida para que este trabalho acontecesse.

Lista de Abreviaturas
Lista de Tabelas
Lista de Figuras
Lista de Quadros
Resumo
Abstract

Sumário

1. INTRODUÇÃO 14
2. REVISÃO DE LITERATURA 15
2.1. Poluição Atmosférica 15
2.2. Material Particulado 18
2.3.Poluição Atmosférica no Estado de São Paulo e Região Metropolitana 19
2.4.Medidas de Controle da Poluição Atmosférica na Cidade de São Paulo 20
2.5.Saúde humana X Material Particulado 20
2.6.Parto Prematuro e Baixo peso ao nascer 21
2.7.Aterosclerose 22
3. MODELO ANIMAL 27
3.1.Camundongos ldlr -/- 27
3.2.Marcadores para ativação endotelial. 27
4.HIPÓTESE 29
5.OBJETIVOS 29
5.1.Objetivo Geral 29
5.2.Objetivo Específico 30
6. MATERIAIS E MÉTODOS 30
6.1.Comissão de ética 30
6.2.Local 30
6.3.Modelo Experimental 31
6.4.Desenho experimental 32
6.5.Concentrador de partículas ambientais (CPA) 33

6.6.Caracterização do Material Particulado 34
6.7.Dieta hipercolesterolêmica 34
6.8.Avaliação dos desfechos gestacionais 35
6.9.Avaliação do desenvolvimento da prole 35
6.10.Consumo e ganho de peso após dieta 36
6.11.Coleta de material para análise 36
6.12. Análise bioquímica do perfil lipídico – Extração de Colesterol Total (CT) e Triglicéries (TG) através do fígado. 36
6.13.Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar (LBA) 37
6.14.Quantificação de mediadores inflamatórios 38
6.15.Avaliação Estereológica do pulmão 38
6.16.Amostragem e inclusão 39
6.17.Volume Pulmonar ("Reference Space") 39
6.18.Avaliação imunohistoquímica 40
6.19. Análise morfológica 41
6.20.Análise estatística 43
7.RESULTADOS 44
7.1.Avaliação dos filtros de policarbonato e quartzo 44
7.2.Avaliação dos desfechos gestacionais 46
7.3.Avaliação do desenvolvimento da prole 47
7.4.Consumo e ganho de peso após dieta 50
7.5.Análise Perfil Lipídico 53
7.6.Volume do Pulmão 55
7.7.Análise de Quantificação de Mediadores Inflamatórios 58
7.8.Análise de Imunomarcadores de ativação endotelial 60
8. DISCUSSÃO 69
9. CONCLUSÃO 74
10. REFERÊNCIAS 75

LISTA DE ABREVIATURAS

µm	Micrômetro
μm^2	Micrômetro quadrado
μm^3	Micrômetro cúbico
AC	Ar Concentrado
AF	Ar Filtrado
Al	Alumínio
ATS	American Thoracic Society
Br	Bromo
BSA	Soro fetal bovino
Ca	Cálcio
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise e Projeto de Pesquisa
Cetesb	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
Cl	Cloro
CO	Monóxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPA	Concentrador de Partículas Ambientais
Cr	Cromo
CT	Colesterol total
Cu	Cobre
DAB	Diaminobenzidine
DATASUS	Banco de Dados do Sistema Único de Saúde
DH	Dieta Hipercolesterolêmica
DN	Dieta Normal
DVC	Doença Vascular Cerebral
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
ERS	European Respiratory Society
FCFUSP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
Fe	Ferro

FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GC/MS	Gas chromatography - mass spectrometry
GD1	1º dia gestacional
GD18	18º dia gestacional
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HDL	Lipoproteina de alta densidade
HEPA	High-Efficiency Particulate Air
HPAs	Hidrocarbonetos Policiclicos Aromáticos
HPLC/Flu	High performance liquid chromatograph/ fluorescence
HRP	Horseradish peroxidase
IAG/SP	Instituto de Astronomia e Geofísica da Universidade de São Paulo
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL1β	Interleucina 1 beta
IL6	Interleucina 6
INOS	Inducible nitric oxide synthase
ISOP	Isoprostane
K	Potássio
LBA	Lavado Broncoalveolar
LDL	Lipoproteina de baixa densidade
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LPAE	Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
MP	Material Particulado
$MP_{0,1}$	Material particulado com diâmetro inferior a 0,1µ
MP_{10}	Material particulado com diâmetro inferior a 10µ
$MP_{2,5}$	Material particulado com diâmetro inferior a 2,5µ
Na	Sódio
Ni	Níquel

NOX2	NADPH Oxidase
O_3	Ozônio
P	Fósforo
Pb	Chumbo
PBS	Phosphate Buffer Saline
PI	Partículas inaláveis
PI	Peso inicial
PI	Peso inicial
PR	Peso remanescente
PRC	Peso de ração consumida
PTS	Partículas totais de suspensão
Rh	Rhódio
S	Enxofre
Se	Selênio
Si	Silício
SO_2	Dióxido de enxofre
SOD3	Superoxide dismutase
SPSS	Statístical Package for the Social Sciences
TG	Triglicéries
Ti	Titânio
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
UNESP	Universidade Estadual Paulista
V	Vanádio
VCAM	Molécula de adesão celular
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLDL	Lipoproteina de densidade muito baixa
Zn	Zinco

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes adicionados para manipulação da ração experimental.....35

Tabela 2. Anticorpos primários e processamento utilizado na análise imunohistoquímica.....41

Tabela 3. Descritivo dos constituintes da composição elementar do $PM_{2.5}$ (ug/m^3).....44

Tabela 4. Aplicação de técnica da análise dos elementos principais, para o composto dos dados de medidas elementares dos filtros do $MP_{2,5}$.....45

Tabela 5. Demonstração da quantidade de HPAs em filtros expostos ao $MP_{2.5}$ durante o período de 2 horas.....46

Tabela 6. Média, Desvio padrão e Erro padrão dos parâmetros avaliados com desfechos gestacionais nos grupos AF e AC.....46

Tabela 7. Média, Desvio padrão e Erro padrão dos parâmetros avaliados com avaliação do desenvolvimento da prole.....48

Tabela 8. Médias de peso de acordo com a idade e sexo dos filhotes nos grupos AF e AC.....49

Tabela 9. Ganho de peso antes e depois do inicio do consumo de dieta.....52

Tabela 10. Estatística Descritiva da Análise do Perfil Lipídico (mg/dL).....53

Tabela 11. Estatística descritiva do volume total do pulmão através do método Cavaliere (mm^3).....55

Tabela 12. Estatística Descritiva da Análise de Quantificação de Mediadores inflamatórios.....58

Tabela 13. Estatística Descritiva da Análise dos Imunomarcadores Endotelina, ENOS e e IL1β.....61

Tabela 14. Estatística Descritiva da Análise dos Imunomarcadores INOS, ISOP e NOX2.....62

Tabela 15. Estatística Descritiva da Análise dos Imunomarcadores SOD3, VEGF, VCAM e ICAM.....63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eventos iniciais para o desenvolvimento da placa aterosclerótica. A LDL sofre oxidação no espaço subendotelial, desde a LDL minimamente modificada (mmLDL) até a LDL oxidada (oxLDL). Os monócitos aderem-se à célula endotelial induzida a expressar moléculas de adesão por meio da ação da mmLDL e citocinas inflamatórias. Os monócitos no espaço subendotelial diferenciam-se para macrófagos. Estes, com a participação da oxLDL, transformam-se em células espumosas. A oxLDL é assim armazenada ou transportada para fora da célula.....22

Figura 2: Progressão da lesão. Interação entre macrófagos/células espumosas, linfócitos Th1 e Th2 estabelece um processo inflamatório crônico. As citocinas secretadas pelos linfócitos e macrófagos exercem ação, tanto pró, como antiaterogênica. As CML migram da porção média da parede arterial, proliferam e secretam matriz extracelular que forma a placa fibrótica.....23

Figura 3: Região apical do ventrículo esquerdo mostrando septo intraventricular com duas comunicações interventriculares (exploradores), espessamento endocárdico difuso e trombose em organização na parede anterior (setas).....23

Figura 4: Corte transversal do coração mostrando infarto do miocárdio ântero-septal, cicratizado, com intenso afilamento da parede ventricular....24

Figura 5 - Desenho Experimental - Modelo knock-out LDLr -/-.....32

Figura 6 - (A) câmara de exposição: Ar concentrado ($MP_{2,5}$) e Ar filtrado; (B) Imagem lateral de Impactadores.....34

Figura 7: Divisão de fases - Análise de Perfil Lipídico - CT e TG.....37

Figura 8 - Representação esquemática dos métodos e amostragem do pulmão para o estudo estereológico. A- inclusão do pulmão em Agar; B- Cortes verticais seriados; C- Sistema teste de pontos para estimativa do volume pelo método de Cavalieri nas fatias de pulmão em Agar; D, Inclusão das fatias de Agar me blocos de parafina; E, segundo estágio de amostragem dos pulmões de camundongos.....39

Figura 9 - **A:** Delimitação do perímetro externo do vaso; **B:** Delimitação do diâmetro maior e menor do vaso.....42

Figura 10 - **C:** Delimitação de todas área externa e interna do vaso **D:** Área positiva do vaso corada com cada anticorpo.....42

Figura 11 - **E**: Delimitação da área total do vaso.....43

Figura 12- Curva de ganho de peso médio durante a gestação.....47

Figura 13- Curva de ganho de peso nos grupos AF e AC.....48

Figura 14. Gráfico demonstrando o peso médio dos filhotes de acordo com a idade.....49

Figura 15. Peso médio mensal dos animais após o início da dieta hipercolestrolêmica.....51

Figura 16. Peso dos animais nos dois meses anteriores ao início da dieta. 51

Figura 17. Consumo de ração durante os 4 meses de tratamento com a dieta hiprcolesterolêmica.....52

Figura 18: Gráfico demonstrando perfil lipídico - Colesterol Total.....54

Figura 19: Gráfico demonstrando perfil lipídico - Triglicérides Total.....54

Figura 20: Gráfico demonstrando o volume total do pulmão.....56

Figura 21: Gráfico demonstrando a média do volume total do pulmão..... 56

Figura 22: Gráfico demonstrando Quantificação de Mediadores inflamatórios 57

Figura 23: Gráfico demonstrando Quantificação de Mediadores inflamatórios 59

Figura 24: Gráfico demonstrando a concentração de quantificação de Mediadores inflamatórios IL-6.....59

Figura 25: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - Endotelina.....64

Figura 26: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - ENOS.....64

Figura 27: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - IL1B.....65

Figura 28: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - INOS.....65

Figura 29: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - ISOP.....66

Figura 30: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - NOX2.....66

Figura 31: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - SOD3.....67

Figura 32: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - VEGF.....67

Figura 33: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - VCAM.....68

Figura 34: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - ICAM.....68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Poluentes indicadores da qualidade do ar, características e fontes.....16

Quadro 2 - Poluentes x níveis de concentração.....17

RESUMO

Alemany APS. Influência da dieta hipercolesterolêmica em camundongos *knock-out LDLr -/-* expostos a partículas ambientais concentradas sobre o sistema pulmonar [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2013.

Introdução: Os dados epidemiológicos e experimentais têm mostrado efeitos adversos da exposição pré e pós natal ao material particulado ($MP_{2,5}$) sobre a saúde fetal e adulto. Entretanto, poucos estudos abordaram a toxicidade fetal da exposição gestacional à poluição do ar ambiental, bem como consequências a longo prazo de adversos da exposição pré-natal sobre o desenvolvimento pós-natal e maturação de vários sistemas de órgãos. Objetivos: O objetivo deste estudo foi determinar se a exposição pré-natal e / ou pós-natal ao material particulado, influência o desenvolvimento pulmonar e resposta vascular pulmonar em um modelo de camundongo suscetível a aterosclerose (LDLr-/- camundongos knockout). Métodos: Camundongos LDLr-/- foram expostos durante a gestação ao ar filtrado (AF) ou ar poluído (AC). Após o período de desmame, os filhotes foram subdivididos e novos quatro grupos foram formados de acordo com a exposição gestacional ou a exposição pós natal contínua no ar poluído. Atingindo a idade de 4 meses, esses grupos foram novamente subdivididos, formando um total de 8 grupos e uma dieta hipercolesterolêmica foi introduzida. Os seguintes parâmetros foram analisados: desfechos gestacionais, dosagem de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG) do fígado, avaliação de citocinas no LBA, e avaliação imunohistoquímica da resposta vascular pulmonar . Resultados: Nos grupos que receberam dieta hipercolesterolêmica (DH) os níveis de colesterol e triglicérides apresentaram-se aumentados (p=0,02); A expressão da IL6 no LBA mostrou-se elevada (p=0,01) somente no grupo não foi exposto a poluição em nunhum período da vida e recebeu dieta postnatalmente. Diferenças significativas também foram observadas na expressão pulmonar vascular dos seguintes imunomarcadores: endotelina (p=0,05); ENOS

(p=0,04); IL1β (p=0,005); INOS (p=0,002); ISOP (p=0,001); NOX2 (0,01) e ICAM (0,04) quando comparados ao grupo controle. O volume pulmonar total também se mostra alterado em decorrência do tratamento. Assim, conclui-se que a resposta do desenvolvimento pulmonar à exposição gestacional à poluição particulada do ar pode ser evidenciada mais tarde durante a vida adulta e agir como um fator modulador de insultos pós-natal devido à exposição a poluição do ar e a uma dieta hipercolesterolemica em individuos predispostos aterosclerose.

Descritores: Material particulado/efeitos adversos; Material particulado/toxicidade; Material particulado/análise; Poluição do ar/análise; Camundongos knockout; Exposição ambiental/efeitos adversos; Dieta hiperlipídica; Aterosclerose; Pulmão/fisiopatologia

ABSTRACT

Alemany APS. Influência da dieta hipercolesterolêmica em camundongos *knock-out LDLr -/-* expostos a partículas ambientais concentradas sobre o sistema pulmonar [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2013.

Epidemiological and experimental data have shown adverse effects of gestational and post natal exposure to ambient particulate matter (PM) on the fetal and adult health. However, few studies addressed the fetal toxicity of gestational exposure to environmental air pollution as well as long-term adverse consequences of prenatal exposure on postnatal development and maturation of several organ systems. The aim of this study was to determine if prenatal and/or postnatal exposure to concentrated ambient particles influences lung development and pulmonary vascular response in an atherosclerosis susceptible mouse model (LDLr-/- knockout mice). LDLr-/- mice were exposed during the pregnancy to either filter (AF) or polluted air (CAP). After weaning period, pups were subdivided and new 4 groups formed according to gestational and continuous or not post natal exposure to air pollution. Reaching the age of 4 months these groups were again subdivided and a hypercholesterolemic (HC) diet introduced and a total of 8 groups were formed. Then the following parameters were analyzed: evaluation of the offspring outcomes, assessment of airway responsiveness, evaluation of cytokines in BALF, dosage of total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) in the liver and pulmonary vascular response by immunohistochemistry. Results: Animals that received HC diet presented higher levels of cholesterol and triglycerides (p=0.02) when compared to those animals that received normal diet. Expression of IL-6 was only increased in the groups of mice exposed not exposed to particulate air pollution and that received the HC diet (p=0.01). Significant differences were also observed in vascular expression of immunomarkers in the lung endothelin (p=0.05); ENOS (p=0.04); IL1β (p=0.005); INOS (p=0.002); ISOP

(p=0.001); NOX2 (0.01) e ICAM (0.04). Total lung volume was also different, there was an increase in those animals receiving a HC diet. In conclusion, the response of the lung development to gestational exposure to particulate air pollution can be evidenced later in life and act as a modulator factor for postnatal insults due to exposures to particulate air pollution and hypercholesterolemic diet in individual predisposed to atherosclerosis.

Descriptors: Particulate matter/adverse effects; Particulate matter/toxicity; Particulate matter/analysis; Air pollution/analysis; Mice, knockout; Environmental exposure/adverse effects; Diet, hight-fat; Atherosclerosis; Lung/physiopathology.

1. INTRODUÇÃO

A cidade de São Paulo possui milhões de pessoas expostas diariamente a concentrações elevadas de poluentes atmosféricos. Ações têm sido tomadas como a inspeção veicular (Controlar) e o rodízio municipal de veículos, porém são insuficientes quando o assunto é poluição do ar. Deparamos-nos ainda com um enorme incentivo por parte das indústrias automobilísticas para que cada vez mais as pessoas possam adquirir novos veículos. Este aumento constante na frota implica em ar mais poluído. Tal situação eleva a probabilidade de ocorrência de doenças, comprometendo especialmente o sistema respiratório. Para este último tópico não resta dúvidas sobre os efeitos adversos da poluição. À luz deste cenário, geram-se indagações sobre os demais efeitos prejudiciais, levando em consideração diversos níveis de quantidade e tempo de exposição a poluentes. Nos dias atuais temos nos deparado com inúmeros casos de pessoas hipertensas, diabéticas e com nível elevado de colesterol, e que estes eventos não estão sendo mais de exclusividade alimentar, mas também associados à qualidade de vida. Estas alterações tendem há estar um pouco mais presente em pessoas suscetíveis e também em gestantes. Devido este fato não estar somente associado à vida adulta, o presente estudo, ocorrido entre 2010 e 2012, busca alertar exatamente para os efeitos da exposição intrauterina e pós-natal crônica a poluição ambiental, mas com uma importante variação: somar uma dieta hipercolesterolêmica.

Este cenário, onde o estilo de vida urbano é somado aos efeitos poluentes, se situa em um momento onde cada vez mais a sociedade busca aumentar a longevidade. Hábitos de consumo associados a dietas hipercalóricas e ricas em gorduras se configuram como um dos fatores que potencializam outras doenças. Campanhas para diminuição de poluentes somadas aos apelos por melhoria de qualidade de vida em qualquer ambiente, seja profissional ou pessoal, incentivam ao desafio de compreender como as variáveis “poluição e colesterol” se combinam e

colaboram para entender e vislumbrar os efeitos prejudiciais aos seres humanos na atual e nas próximas gerações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Poluição Atmosférica

A poluição do ar é uma mistura de partículas e gases interagindo entre si e com atmosfera (Brook et al., 2004). Pode ser definida como a contaminação do ambiente interno ou externo, por qualquer agente químico, físico ou biológico que modifica as características naturais da atmosfera (WHO, 2011). Desde o final do século XVIII, as emissões de poluentes na atmosfera estão presentes em nossas vidas, e uma variedade de doenças associadas a eles afetam desde então a saúde humana (Phalen e Phalen, 2011). Os poluentes podem ser classificados como primários (emitidos diretamente pelas fontes de emissão) e secundários (formados na atmosfera através da reação química entre poluentes ou constituintes naturais) (Cetesb, 2010). As conseqüências à exposição aos poluentes vão além dos agravos que ocorrem no sistema respiratório, pois a interação deste com o sistema circulatório pode ser causadora de interferências no funcionamento fisiológico do indivíduo (Kinney, 2008), e sistema reprodutivo (Lichtenfels et al., 2007; Veras, 2008) e endócrino (Wang et al., 2005; Brook, 2008). Dentre os poluentes amplamente estudados e descritos na literatura causadores de efeitos adversos à saúde, destaca-se o material particulado (MP).

Poluente atmosférico é definido como toda e qualquer substância que esteja presente no ar e que seja nocivo a saúde humana, bem como á flora e fauna (Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA).Os problemas relacionados a qualidade do ar em SP ocorrem principalmente devido aos poluentes provenientes de veículos automotores.No caso do ozônio, existe a necessidade do controle dos compostos orgânicos e óxidos de nitrogênio, que são formadores desse poluente por processos fotoquímicos. Alem do ozônio, tais processos ainda geram uma gama de substâncias, denominadas genericamente de oxidantes fotoquímicos, e uma quantidade considerável de aerossóis secundários, que em função de seu pequeno tamanho afetam significativamente a saúde. (CETESB, 2010)

De acordo com relatórios da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) os principais poluentes indicadores da qualidade do ar, estão demonstrados no quadro 1.

Quadro 1 - Poluentes indicadores da qualidade do ar, características e fontes. ***Fonte: CETESB, 2010***.

Poluente	Características	Fontes Principais	Efeitos ao Meio Ambiente
MP_{10}	Partículas sólidas ou liquídas (faixa de tamanho - <10µ)	Processo de combustão	Danos a vegetação
Partículas totais em suspensão (PTS)	Partículas sólidas ou liquídas (faixa de tamanho - <100µ)	Processos industriais, veículos, poeira e queima de biomassa	Danos a vegetação
Dióxido de Enxofre (SO_2)	Gás incolor com forte odor	Processos de queima de óleo combustível	Formação de chuva ácida
Dióxido de Nitrogênio (NO_2)	Gás marrom avermelhado com forte odor	Processos de combustão (veículos e indústrias)	Formação de chuva ácida
Monóxido de Carbono (CO)	Gás incolor, inodoro e insípido	Processos de combustão incompleta de veículos.	
Ozônio (O_2)	Gás incolor, inodoro nas concentrações ambientais	Não é emitido diretamente para a atmosfera. Produzido pela radiação solar	Danos a colheita e vegetação

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da Resolução Nº 03 de 28/06/1990 e tendo como base a Portaria Normativa Nº348 de 14/03/90 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA), estabeleceu padrões primários e secundários de qualidade do ar que ao serem ultrapassados, podem causar danos a saúde da população e ao ambiente. Os principais poluentes, bem como os níveis máximo de contração estão apresentados no quadro 2.

Quadro 2 - Poluentes x níveis de concentração. ***Fonte: CETESB, 2010***.

Poluente	Tempo Amostragem	Padrão Primário (µg/m$^{3)}$	Padrão Secundário (µg/m3)
PTS	24 H	240	150
	Média Anual	80	60
PI	24 H	150	150
	Média Anual	50	50
Fumaça	24 H	150	100
	Média Anual	60	40
SO_2	24 H	365	100
	Média Anual	80	40
NO_2	1 H	320	190
	Média Anual	100	100
		40.000	40.000
CO	1 H	35 ppm	35 ppm
	8 H	10.000	10.000
		9 ppm	9 ppm
O_3	1 H	160	160

2.2. Material Particulado

Poluente atmosférico constituído por uma mistura de partículas que podem ser sólidas, liquidas ou ambas, suspensas no ar, constituídas por compostos orgânicos e inorgânicos (WHO, 2005).

A cidade de São Paulo possui milhões de pessoas expostas diariamente a concentrações elevadas de poluentes atmosféricos. O grupo de pesquisadores do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) tem se dedicado ao estudo deste problema, acumulando certa experiência em demonstrar efeitos adversos à saúde associados aos diversos poluentes do ar (Arbex, et al., 2000; Batalha, et al., 1999, 2002; Böhm, et al., 1989; Braga, et al., 2001; Saldiva, et al.,1994, 1995, 1998, Soares, et al., 2003; Sumita, et al., 2003, Rivero, et al., 2005).

De acordo com o seu tamanho, o MP classifica-se em: partículas grossas (MP_{10}), partículas finas ($MP_{2,5}$) e partículas ultra-finas ($MP_{0,1}$) (Pope, 2000). A fração grossa é composta por partículas com um diâmetro aerodinâmico ≤10 μm, geradas a partir do solo ou outros materiais da crosta terrestre, fricção de pneus dos veículos com o asfalto das ruas. A fração fina é composta por partículas com um diâmetro aerodinâmico ≤2,5 μm geradas pela combustão incompleta de veículos automotores, indústrias ou usinas termoelétricas. As partículas ultrafinas são compostas por partículas com diâmetro aerodinâmico inferior a 0,1μm e são geradas pela combustão incompleta de veículos automotores com um tempo de residência na atmosfera relativamente curto, pois se agregam progressivamente para formar partículas finas. (Cançado et al., 2006; Dominici et al., 2006; Polichetti et al., 2009). Além disso, o MP pode ser caracterizado de acordo com sua forma, composição e origem (Baird, 2002). Possui tamanho heterogênico e pode ser classificado através de seu diâmetro aerodinâmico.

As partículas presentes no ar inalado depositam-se seletivamente no trato respiratório, de acordo com o seu tamanho, de tal forma que as maiores (MP_{10}) ficam retidas nas vias aéreas superiores enquanto que o material particulado fino ($MP_{2,5}$) e ultrafino tem a capacidade de alcançar os

alvéolos pulmonares (Colombini, 2008). A composição do MP (principalmente MP_{10}) pode apresentar variabilidade de substâncias adsorvidas como metais de transição, compostos orgânicos e inorgânicos (Cetesb, 2008b; Courtois et al., 2008) destacando-se o sulfato, nitratos, amônia, cloreto de sódio, pó de carvão mineral e água (WHO, 2005a).

Estudos demonstram uma ampla relação entre formação de MP com queima de combustível e óleo lubrificante de veículos automotores (Cadle et al., 1997). Além disso, o desgaste de freios e pneus são potenciais fontes de MP (Thorpe e Harrison, 2008). Desta forma, a emissão veicular é uma das principais fontes de poluição nas grandes metrópoles.

2.3.Poluição Atmosférica no Estado de São Paulo e Região Metropolitana

O Estado de São Paulo possui uma grande extensão de área (algo aproximado 249.000 km^2) e também com maior ocupação territorial, contingente populacional, desenvolvimento econômico e maior frota automotiva (Cetesb, 2012) do país.

Apresenta áreas com diferentes características, o que necessita de diversas formas de monitoramento e controle da poluição. Redes de monitoramento da qualidade do ar são mantidas pela Cetesb desde a década de 1970. Este monitoramento acontecia por estações manuais, que ainda hoje são utilizadas em alguns municípios. Com a chegada do monitoramento automático em 1981, o número de poluentes medidos foi ampliado, permitindo assim o acompanhamento dos resultados em tempo real. Uma expansão significativa da rede automática aconteceu em 2008 e em 2011 pode contar com 42 estações fixas localizadas em 28 municípios (Cetesb, 2012).

2.4.Medidas de Controle da Poluição Atmosférica na Cidade de São Paulo

O rodízio municipal de veículos na capital paulista, estabelecido pela Lei Municipal 12.490 de 3 de outubro de 1997 e regulamentado pelo Decreto 37.085 (1997), determina que a circulação de veículos automotores de passeio (exceto taxis) seja restrita em horário de pico em ruas e avenidas do centro expandido da cidade. Visando melhorar as condições ambientais através da redução de poluentes na atmosfera, esta determinação acabou refletindo posteriormente em congestionamento das principais vias, porém de acordo com relatórios anuais da Cetesb, estes congestionamentos estão cada vez maiores devido a um descontrole no aumento frota de veículos.

Outra medida adotada para atingir o mesmo objetivo é o Programa de Inspeção e Manutenção de Veículos. Este programa foi estabelecido pelas Leis Municipais nº 11.733 de 27 de março de 1995; nº 12.157 de 9 de agosto de 1996 e nº 14.717 de 17 de abril de 2008 e pela Resolução CONAMA nº 418 (2009) e está previsto no Artigo 104 do Código de Trânsito Brasileiro. De acordo com a Controlar, empresa responsável por estas inspeções, o programa deu iniciou as suas atividades em 2008 somente com veículos a diesel. A partir do ano de 2009, automóveis com ano de fabricação entre 2003 e 2008 e também motos tiveram a necessidade de passar por esta vistoria.

2.5.Saúde humana X Material Particulado

Estudos conduzidos em várias cidades com contrastantes níveis de poluição atmosférica relataram efeitos adversos da concentração de MP relacionados com o aumento de morbidade e mortalidade em diferentes grupos e idade (Saldiva et.al, 1995) e (Gouveia et.al, 2006).

Há também indicações de que estes efeitos são maiores para os subgrupos mais vulneráveis como os idosos e crianças (Ballester, et.al, 1996; Verhoeff, et.al, 1996). Bobak et. al,(1992) e Woodruff (1998), encontraram em seus estudo associações significativas entre os poluentes do ar e a mortalidade

perinatal.

Pereira et.al, (1998) encontraram uma associação entre poluição do ar de São Paulo e mortalidade intra-uterina ou perdas fetais tardias (28 semanas ou mais em gestação) .Este estudo também mostrou que os níveis de carboxihemoglobina no sangue do cordão umbilical estavam correlacionados com os níveis de monóxido de carbono no ambiente.

2.6.Parto Prematuro e Baixo peso ao nascer

A exposição materna à poluição do ar durante a fase gestacional está associada a um aumento de partos prematuros (Veras, 2008 p. 9). Segundo Ritz et.al, 2007.O nascimento prematuro é um indicador de distúrbios pré-natal da placenta e do desenvolvimento fetal.

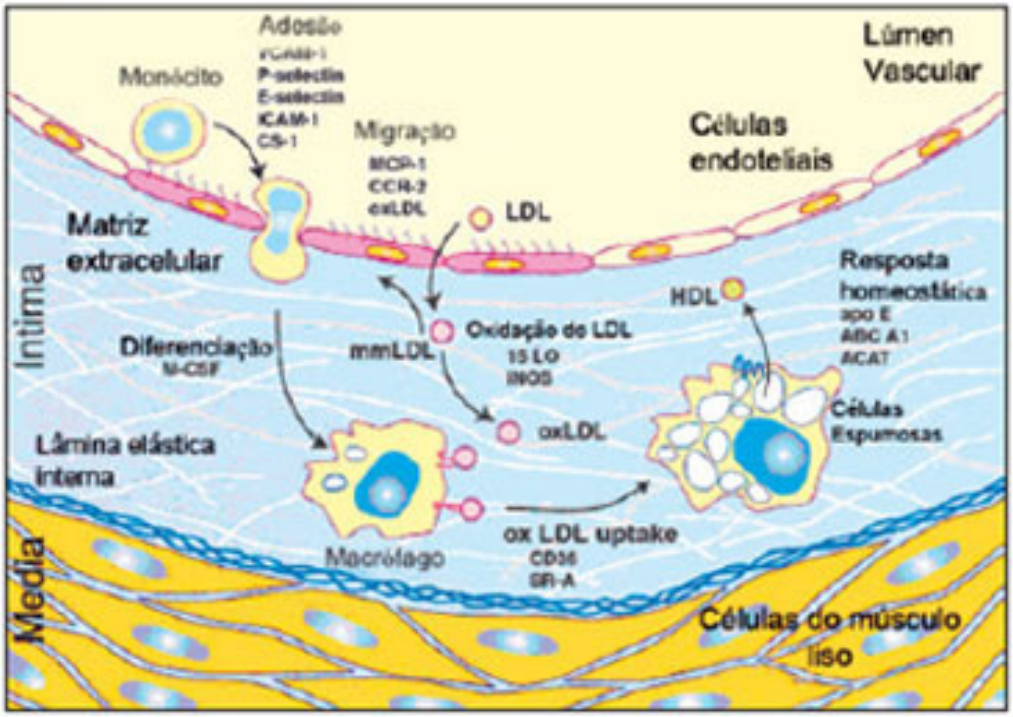
Ainda de acordo com estudos realizados por Veras et.al, (2008), o baixo peso do animal neonato é o efeito mais associado à exposição à poluição do ar, indicando que o crescimento fetal e duração da gestação são afetados.

Barker (1995), Osmond e Barker (2000), mostraram que o peso ao nascer é um importante indicador do subsequente status da saúde e que bebes com baixo peso são mais susceptíveis a desenvolver hipertensão, doenças coronarianas e diabetes não dependentes de insulina na vida adulta.

Segundo Brook et.al, 2010, as partículas da poluição do ar são associadas ainda, com desencadeamento de infartos do miocárdio e aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares. Os níveis de partículas estão associados a ambos os eventos agudos cardíacos, bem como a progressão crônica de doenças ateroscleróticas (Nawrot et.al, 2011; Peters et.al, 2001; Hoffmann et, al, 2007 e Kunzli et.al, 2005).

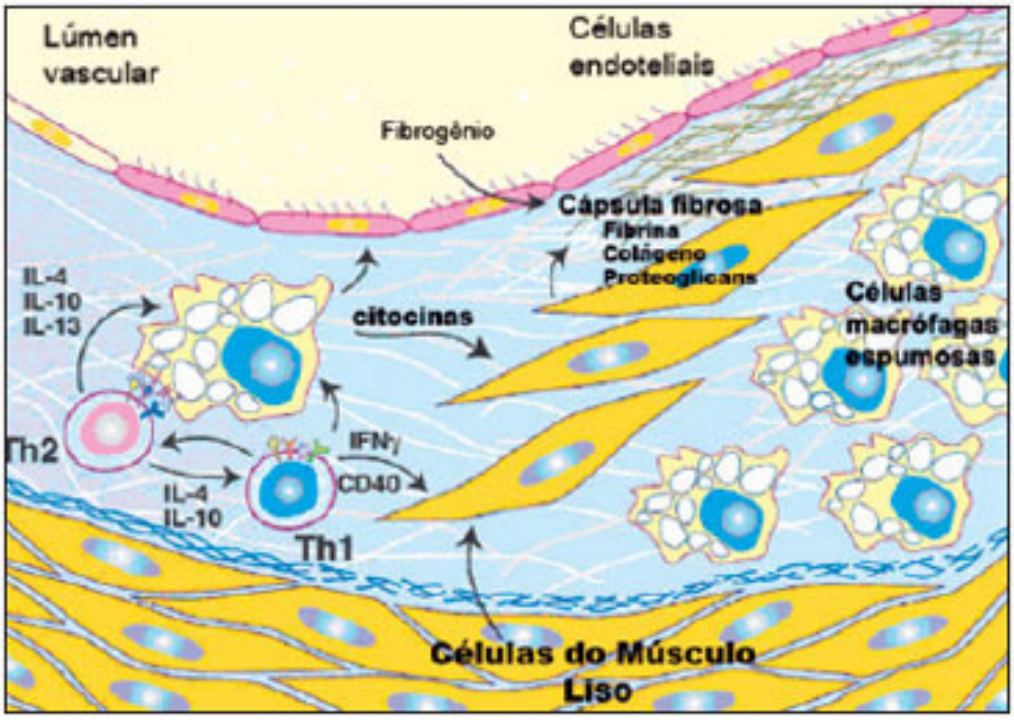
2.7. Aterosclerose

A aterosclerose (do grego, *athero*-**mingau** e *sclerosis*–**endurecimento**) é uma doença degenerativa crônica que ocorre em artérias de médio e grande calibre, principalmente em locais de "stress" hemodinâmico. É a causa primária de doenças cardiovasculares e infarto agudo do miocardio, em grande parte resultantes da ruptura da placa e trombose (Lusis, 2000), que por sua vez representam a principal causa de morte por doença no mundo (Hansson, 2005). Somente no Brasil cerca de 400 mil mortes associadas a doenças cardiovasculares foram registradas pelo DATASUS no período de junho/2009 até julho/2010. Estimativas para os próximos quinze anos continuam apontando essas doenças como principal causa de morte global, devido à sua crescente prevalência em países em desenvolvimento e na Europa oriental, e à grande incidência de obesidade e diabetes nas sociedades ocidentais (Hansson, 2005).



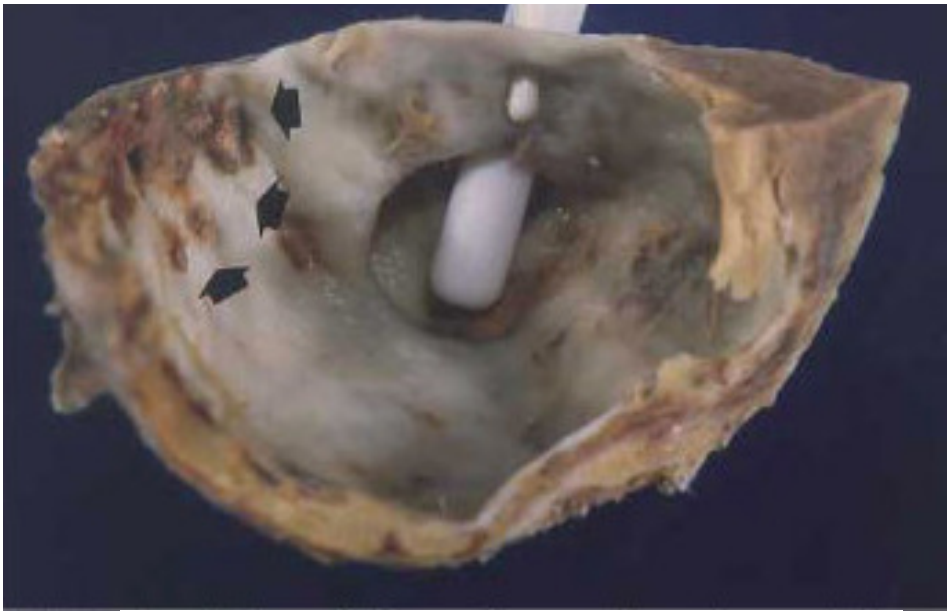
Fonte: Adaptado de Glass e Witzum, 2001

Figura 1: Eventos iniciais para o desenvolvimento da placa aterosclerótica. A LDL sofre oxidação no espaço subendotelial, desde a LDL minimamente modificada (mmLDL) até a LDL oxidada (oxLDL). Os monócitos aderem-se à célula endotelial induzida a expressar moléculas de adesão por meio da ação da mmLDL e citocinas inflamatórias. Os monócitos no espaço subendotelial diferenciam-se para macrófagos. Estes, com a participação da oxLDL, transformam-se em células espumosas. A oxLDL é assim armazenada ou transportada para fora da célula.



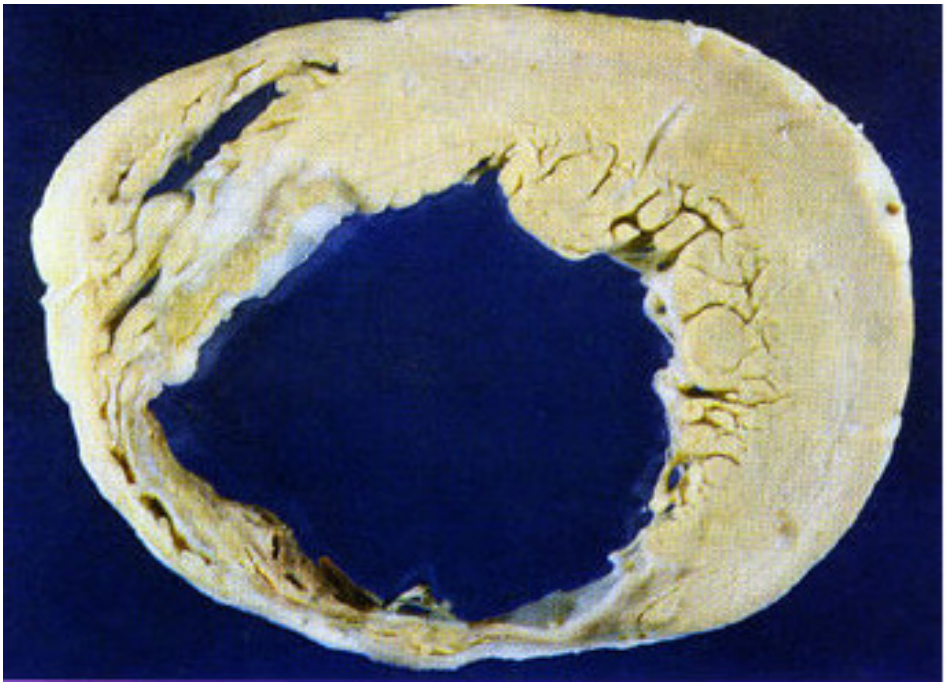
Fonte: Adaptado de Glass e Witzum, 2001.

Figura 2: Progressão da lesão. Interação entre macrófagos/células espumosas, linfócitos Th1 e Th2 estabelece um processo inflamatório crônico. As citocinas secretadas pelos linfócitos e macrófagos exercem ação, tanto pró, como antiaterogênica. As CML migram da porção média da parede arterial, proliferam e secretam matriz extracelular que forma a placa fibrótica.



Fonte: Adaptado de Arq. Bras. Cardiol. vol.69 n.2 São Paulo Aug. 1997

Figura 3: Região apical do ventrículo esquerdo mostrando septo intraventricular com duas comunicações interventriculares (exploradores), espessamento endocárdico difuso e trombose em organização na parede anterior (setas).



Fonte: Adaptado de Arq. Bras. Cardiol. vol.69 n.2 São Paulo Aug. 1997

Figura 4: Corte transversal do coração mostrando infarto do miocárdio ântero-septal, cicratizado, com intenso afilamento da parede ventricular.

A aterosclerose é uma doença multifatorial de grande complexidade e estudos epidemiológicos realizados nos últimos 50 anos revelam inúmeros fatores de risco, que podem ter natureza genética ou ambiental (Lusis, 2000).

Combinações de fatores como altas concentrações sanguíneas de lipoproteína de alta densidade (HDL) (Lusis, 2000), obesidade (Lusis, 2000), fumo, hipertensão, *diabetes mellitus*, sexo, alterações genéticas e presença de agentes infecciosos podem participar do desencadeamento e/ou progressão da doença (Ross, 1999).

O início e a aceleração da aterosclerose tem sido a hipótese para uma via fisiológica onde as partículas exercem efeitos cardiovasculares (Pope, 2006; Dockery, 2006; Mills, 2007; Tornqvist, 2007; Robinson, 2007; Donaldson, 2001; Stone, 2001; Seaton, 2001; MacNee, 2001). A exposição aguda à poluição do ar tem sido relacionada com inflamação sistêmica pulmonar e repetidas respostas inflamatórias pode ser o principal mecanismo para aceleração da aterosclerose (Mills; Tornqvist;

Robinson,et.al, 2007; Ruckerl ; Ibald-Mulli ; Koenig , et al 2006; Dubowsky ; Suh ; Schwartz; Coull ; Gold, 2006; Ross, 1999).

Possíveis caminhos para esses efeitos incluem o aumento da inflamação mediada por citocinas sistêmicas, disfunção endotelial, trombose e arritmias e dimunição da estabilidade de placa (Peters et.al, 1997). Estudos anteriores mostraram que a poluição influência os marcadores de coagulação (tais como o fibrogênio), de atividade inflamatória (como as protéinas C-reativa) e função endotelial (tais como molécula de adesão intracelular ICAM-1 e molécula de adesão celular vascular VCAM-1) (Ruckerl et.al, 2007; Zeka et.al, 2006; Chuang et. .al, 2007; Alexeeff et. al, 2011 e O'Neill et.al, 2007).Elevações nestes marcadores de sangue, por sua vez, têm sido associados com risco de eventos cardiovasculares aumentados (Brook et.al, 2010; Peters et.al, 1997; O'Neill et.al, 2007 e Hwang et.al, 1997).

A poluição do ar pode influenciar a aterogênese através do aumento do estresse oxidativo e da inflamação da parede arterial, além do desequilíbrio autonômico, levando à disfunção endotelial e à diminuição da reatividade vascular (Bauer et al.2010). Vários fatores influenciam diretamente na incidência e progressão da aterosclerose, sendo eles de origem genética ou ambientais (Sung et al., 2012). A poluição atmosférica e hiperlipidemia são dois fatores de risco importantes com papel estabelecido na progressão da aterosclerose.

A exposição ao material particulado ambiental tem sido associada com aumento de admissões hospitalares e mortalidade por doenças cardiovasculares (Dockery, 2001). A exposição ao PM2,5 pode levar ao aumento do risco de Doença Vascular Cerebral (DVC) através do desenvolvimento de aterosclerose (Kaufman et al., 2010).

Künzli N, et al., 2010; em estudo epidemiológico, reportou uma associação entre poluição atmosférica e progressão da aterosclerose. O estudo investigou a associação entre a qualidade do ar exterior e progressão da aterosclerose subclínica. Os testes foram realizados em uma área de Los Angeles, onde os níveis de PM2,5 e a proximidade de trafego mostraram-se

positivamente associados com esta progressão, visto que entre as pessoas que vivem a menos de 100 metros das estradas, esta progressão tende a acelerar. Os resultados sugerem que a poluição atmosférica pode contribuir para a aceleração do desenvolvimento da doença cardiovascular, uma das principais causas de morbidade e mortalidade em muitos países.

Dentre os modelos utilizados na pesquisa experimental de aterosclerose, o cão e os ratos não referências de bons modelos, pois não desenvolvem aterosclerose de forma espontânea, mesmo submetidos a dieta hipercolesterolêmica (Mahley et al.,1974). Dentre os animais de grande porte o porco é um excelente modelo devido a desenvolver lesão aterosclerótica de maneira espontânea, além da anatomia do sistema cardiovascular destes animais serem semelhantes aos seres humanos (Gardner e Johnson 1988).

Segundo Narayanaswamy, et al., 2000., os animais de pequeno porte, principalmente roedores e coelhos, têm sido amplamente utilizados como modelo de pesquisa em aterosclerose. Vilahur et al.,2011, destaca alguns motivos relevantes na seleção desse animais, dentre eles resalta o baixo custo, disponibilidade, manuseio e facilidade de aprovação no comitê de ética em comparação aos animais de grande porte. O modelo experimental com camundongos apresenta uma desvantagem, o fato da necessidade de manipulação genética, uma vez que sua fisiologia lipídica é diferente em relação aos seres humanos. O advento da engenharia genética e a AMPLA disponibilidade de animais *Knockout*, tornaram estes animais vastamente utilizados na área cientifica.

3. MODELO ANIMAL

3.1.Camundongos ldlr -/-

A deficiência dos receptores para a LDL em humanos leva a hipercolesterolemia familiar homozigótica, onde os níveis de LDL no plasma se aproximam de 1000 mg/dL, podendo causar um quadro de infarto agudo do miocárdio durante a segunda década de vida (Fazio e Linton, 2001). Já em camundongos a deficiência para o receptor de LDL, provoca apenas uma modesta hipercolesterolemia, com aumento dos níveis séricos das lipoproteínas aterogênicas LDL e HDL, não ocorrendo o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas quando alimentados com dieta comercial. Entretanto, quando os camundongos LDLr-/- são alimentados com uma dieta aterogênica, com alto conteúdo de gordura saturada e colesterol, ocorre grande susceptibilidade à formação de lesões, as quais apresentam morfologia simples, consistindo predominantemente por macrófagos repletos de lipídeos. Algumas das características das lesões avançadas, como calcificação e núcleo necrótico, são vistas somente se esses camundongos forem alimentados com dieta aterogênica por um longo período (Daugherty, 2002). No estudo realizado por Ribeiro Jr. et.al (2012), foi observado a progressão da placa aterosclerótica através de biomicroscopia ultra-sônica onde notou-se que os animais que consumiram dieta hipercolesterolêmica apresentaram um aumento significativo da área da placa no arco aórtico.

3.2.Marcadores para ativação endotelial.

Entre os fatores envolvidos na ativação endotelial dos vasos pulmonares, destacamos os seguintes comuns aos humanos e camundongos:

Molécula de adesão de célula vascular 1 (VCAM): Molécula de adesão que age em conjunto com as quimiocinas com o intuito de proporcionarem o trajeto de leucócitos dos vasos para o local do tecido lesado.

Molécula de adesão intracelular 1 (ICAM): uma glicoproteína de superfície celular, que é normalmente expressa em células endoteliais e células do sistema imune.

Superóxido dismutase 3 (SOD3): São enzimas antioxidantes que catalisam a dismutação de dois radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Tem a função de proteção do cérebro, os pulmões, e outros tecidos do estresse oxidativo.

NADPH Oxidase (NOX2): é uma enzima que catalisa a produção de superóxido em oxigênio.

Oxido Nítrico Sintase (INOS): Expressa em macrófagos, células de Kpuffer, neutrófilos, fibroblastos, células musculares lisas de vasos e células endoteliais em respostas a estímulos patológicos.
Oxido Nítrico Sintase Endotelial (ENOS): Apresenta um papel crucial no estado de vasodilatação dos vasos sanguíneos e na regulação da pressão arterial.

ENDOTELINA: Este péptido é um vasoconstritor potente e é produzido por células endoteliais vasculares.
Interleucina 1Beta (IL1β): Esta citocina é um importante mediador da resposta inflamatória e está envolvida em uma variedade de atividades celulares como proliferação e diferenciação celular e apoptose.

Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF):. Esta proteína glicosilada é um mitogênio específico que atua sobre as células endoteliais e tem vários efeitos, incluindo mediação da permeabilidade vascular aumentada, induzindo vasculogênese a angiogênese, e o crescimento de células endoteliais, promovendo a migração de células e inibição da apoptose.

Isoprostano (ISOP): Marcador importante para a peroxidação lipídica em membranas.

4.HIPÓTESE

O “status” pró-inflamatório sistêmico induzido por uma dieta hipercolesterolêmica em animais geneticamente predispostos é potencializado pela poluição do ar. Isso afetará os vasos pulmonares, causando ativação endotelial. Estes efeitos serão acentuados em animais expostos na fase pré e pós-natal a poluição do ar. Diversos estudos mostram uma associação entre doenças ateroscleróticas e eventos cardiovasculares, porém pouco se conhece sobre os possíveis efeitos sobre o sistema respiratório da exposição a poluição do ar associada a uma dieta hipercolesterolêmica em indivíduos predispostos a aterosclerose. Para investigar esta hipótese, foram utilizados camundongos com deficiência do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (LDLr-/-). Este modelo animal de hipercolesterolemia caracteriza-se pela formação de placas ateroscleróticas somente quando alimentados com uma dieta rica em gordura e colesterol. Histologicamente, as placas que se desenvolvem nesses animais assemelham-se àquelas observadas em humanos.

5.OBJETIVOS

5.1.Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da exposição intrauterina e pós-natal crônica ao particulado ambiental somada a uma dieta hipercolesterolêmica em camundongos LDLRr -/- sobre a estrutura, função pulmonar e sinais de disfunção endotelial.

5.2.Objetivo Específico

Avaliar desfechos gestacionais (numero de filhotes, ganho de peso materno, razão sexual, peso ao nascer)

Avaliar desenvolvimento da prole até o 30º dia pós-natal (numero de mortes, ganho de peso)

Avaliar as alterações estruturais pulmonares – Exposição à poluição urbana através de técnicas estereológicas;

Analisar os marcadores para ativação no endotélio VCAM, ICAM, NOX2, IL1β, VEGF, E-NOS, INOS, ISOP,SOD3 e ENDOTELINA no tecido pulmonar;

Analisar o perfil lipídico (CT -Colesterol total e TG - Triglicérides).

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.Comissão de ética

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Ánalise e Projetos de Pesquisa (CAPPesq), nº 301/11.

6.2.Local

Os experimentos foram realizados nos seguintes laboratórios:

Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LIM-05), do Departamento de Fisiopatologia Experimental, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob orientação da professora Thais Mauad;

Laboratório de Biologia Celular (LIM-59), do Departamento de Fisiopatologia Experimental, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), em colaboração com a professora Elia Garcia Caldini;

Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), em colaboração com a professora Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção

Laboratório de Terapêutica Experimental (LIM-20), do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), em colaboração com a Dr. Milton de Arruda Martins.

Laboratório de Lípides (LIM-10), do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em colaboração com o Dra. Edna Regina Nakandakare.

6.3.Modelo Experimental

Foram utilizados camundongos C57BL6/J, machos, adultos, com deficiência do receptor LDL (LDLr -/-), cujos progenitores foram adquiridos do *The Jackson Laboratories (Maine, USA)*, e seus descendentes cedidos pelo Departamento de análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – FCFUSP para este estudo. Foram cedidas 12 fêmeas e seis machos adultos para a criação dos animais utilizados neste estudo.

A geração dos animais experimentais foi realizada em duas etapas de acordo com a exposição pré-natal (GD1-GD18) e pós natal (21º- 240º dia de vida); Os animais foram alimentados com ração padrão (NUVILAB) e água fornecida *ad libitum* até atingirem a idade de 3 meses quando a dieta hipercolesterolêmica foi introduzida.

Fora dos períodos de exposição os animais foram mantidos em estantes ventiladas com ar filtrado (filtro HEPA), com temperatura controlada entre 22-25ºC, e ciclo claro/escuro de 12 horas, com o ciclo claro iniciando-se às 7 horas.

6.4.Desenho experimental

O desenho experimental deste estudo foi desenvolvido a partir da combinação dos fatores: exposição pré-natal e pós natal ao Ar filtrado (AF), ou material particulado concentrado (AC), Dieta normal (DN) e Dieta hipercolesterolêmica (DH). A nomenclatura dos grupos é composta por 3 grupos de letras, sendo a primeira referente a exposição pré-natal, a segunda a exposição pós natal e a terceira refere-se a dieta. Uma representação esquemática do protocolo esta apresentada na figura 1.

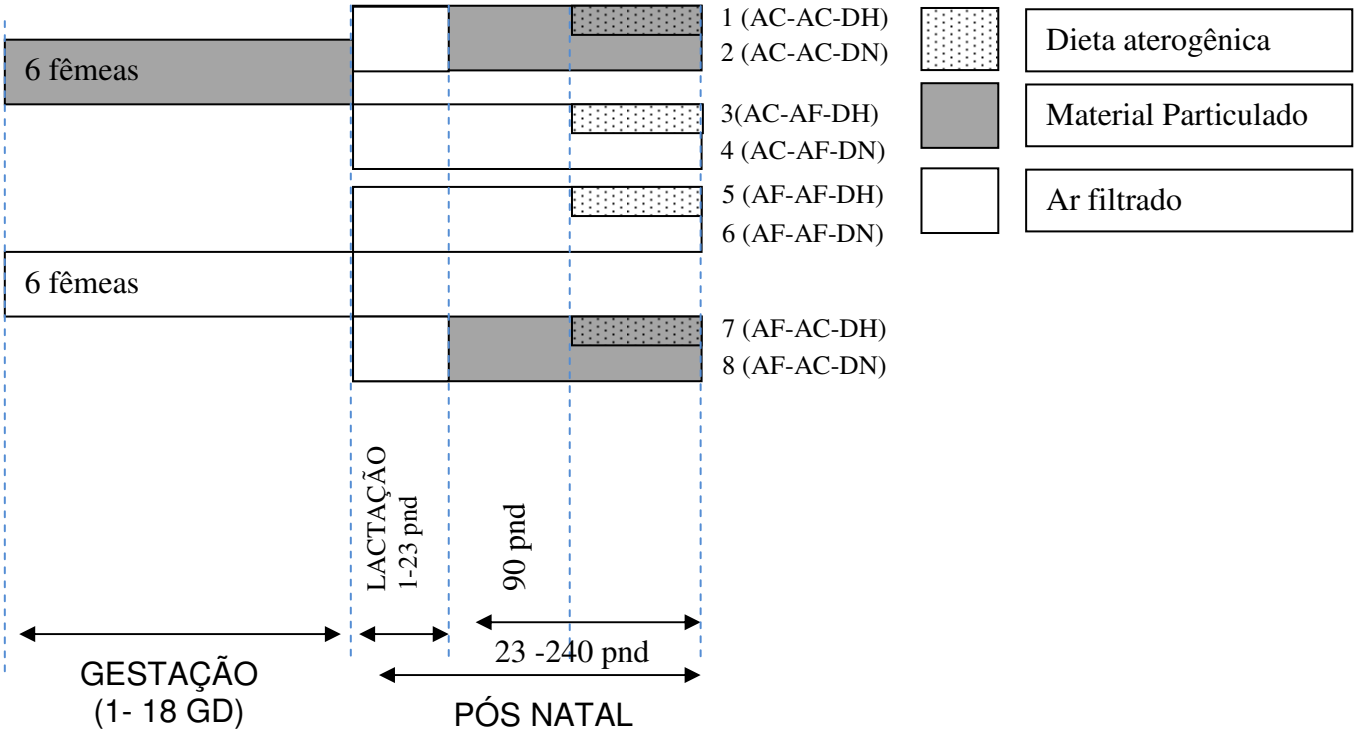


Figura 5 - Desenho Experimental - Modelo knock-out LDLr -/-.

AF-AF-DN - Exposto ao ar filtrado pré-natal + exposto ao ar filtrado pós-natal + dieta comum;

AC-AF-DN - Exposto ao ar concentrado pré-natal + exposto ao ar filtrado pós-natal + dieta comum;

AF-AC-DN - Exposto ao ar filtrado pré-natal + exposto ao ar concentrado pós-natal + dieta comum;

AC-AC-DN - Exposto ao ar concentrado pré-natal + exposto ao ar concentrado pós-natal + dieta comum;

AF-AF-DH – Exposto ao ar filtrado pré-natal + exposto ao ar filtrado pós-natal + dieta hipercolesterolêmica;

AC-AF-DH – Exposto ao ar concentrado pré-natal + exposto ao ar filtrado pós-natal + dieta hipercolesterolêmica;

AF-AC-DH – Exposto ao ar filtrado pós-natal + exposto ao ar concentrado pré-natal + dieta hipercolesterolêmica;

AC-AC-DH – Exposto ao ar concentrado pré-natal + exposto ao ar concentrado pós-natal + dieta hipercolesterolêmica.

Os animais foram divididos em 8 grupos, sendo, 5 animais por grupo. Estes animais foram expostos a uma concentração de 600 $\mu g/m^3$ durante dois períodos distintos, durante a fase de vida intrauterina e no período pós-natal após o desmame 5 dias por semana. Durante o período gestacional as exposições ocorreram diariamente até o termino da gestação, já no período pós-natal as exposições foram realizadas 5 vezes por semana.

6.5.Concentrador de partículas ambientais (CPA)

As exposições ao material Particulado foram realizadas com auxílio de um Concentrador de Partículas Atmosféricas (CPA) que está localizado na parte externa da FMUSP. Este equipamento permite realizar exposições controladas com relação a dose de exposição a poluição particulada do ar. Foi desenvolvido pela Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard, sendo capaz de aumentar até 30 vezes a concentração das partículas ambientais, iguais e inferiores a 2,5µm de diâmetro aerodinâmico, em suspensão presentes na atmosfera alimentando uma câmara de exposição (Sioutas et.al. 1995).

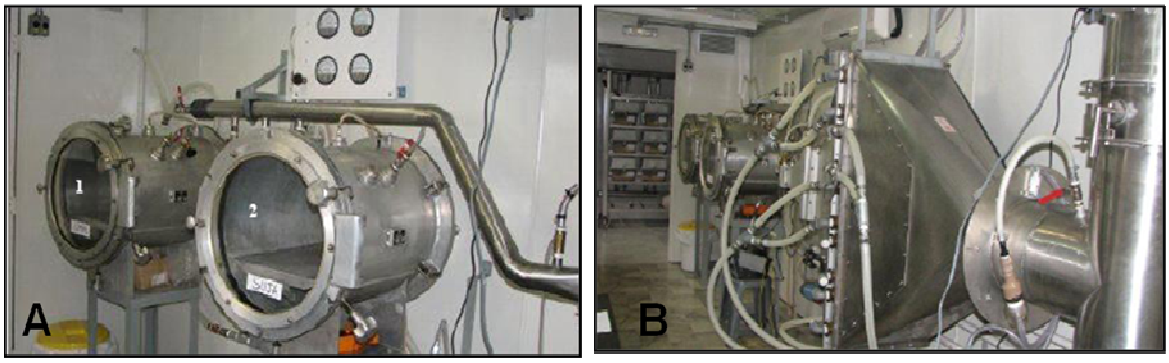


Figura 6 - (A) Câmara de exposição:Ar Concentrado AC($MP_{2,5}$) e Ar Filtrado (AF); (B) Imagem lateral de impactadores.

6.6.Caracterização do Material Particulado

Logo após as exposições e em dias alternados, os filtros para coleta do $MP_{2,5}$ foram ligados apropriadamente ao sistema para caracterização elementar.

A caracterização elementar dos filtros foi realizada em parceria com o Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo (IAG-USP) para analisar a composição química do $MP_{2,5}$ filtrado pelo CPA. As amostras foram enviadas para um sistema de filtragem. O tempo de exposição dos filtros foi de aproximadamente 60 minutos a um fluxo de 5L/h, retirados e posteriormente analisados através de espectrofotometria de fluorescência de raio X (aparelho da empresa Shimadzu EDX 700).

O Laboratório de Cromatografia do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP), é responsável por validar este método e quantificar HPAs por HPLC/Flu o que e é confirmado por GC/MS (Ré-Poppi, 2000).

6.7.Dieta hipercolesterolêmica

A dieta foi introduzida aos filhotes, quando atingiram 120 dias de vida, ou seja, já na fase adulta. A composição da dieta está discriminada na tabela A ração foi adquirida pela empresa Nutri-Experimental. É comercializada em forma de pó e em seguida peletizada. Foi fornecida aos animais *ad libitu*m, e seu consumo monitorado semanalmente.

Tabela 1- Ingredientes adicionados para manipulação da ração experimental.

Ingredientes	%
Caseína	16,5
Amido de milho	53,5
Lipidio	20
Óleo de Coco	**70,1**
Óleo de Soja	**29,9**
Açucar	10
Celulose	5
Mistura de Minerais*	3,5
Mistura de Vitaminas*	1
L-Cistina	0,3
Bitartarato de colina	0,25
Acido cólico	0,5
Colesterol	0,5

* adicionados segundo recomendação da AIN-93 (Reeves et al., 1993).

6.8. Avaliação dos desfechos gestacionais

A avaliação da gestação e seus desfechos foram realizados pelo acompanhamento do ganho de peso materno diário, número de nascidos vivos, razão sexual e número de mortes pós-natais.

6.9. Avaliação do desenvolvimento da prole

O desenvolvimento da prole foi acompanhado até os animais completarem 1 mês de vida pelo monitoramento do ganho de peso medido nos dias 10º, 15º, 20º e 30º de idade. Os pesos foram anotados levando-se em consideração o sexo do animal, já que machos e fêmeas podem responder de forma distinta aos efeitos da exposição intrauterina ao material particulado concentrado e neste estudo serão apenas considerados os machos no que diz respeito a estrutura e função pulmonar

6.10.Consumo e ganho de peso após dieta

Após a introdução da dieta hipercolesterolêmica, no 3º mês de vida, o consumo e a variação de peso dos animais foi realizada semanalmente.
Para estimar o consumo, o peso de ração fornecido inicialmente (PI) foi anotado e uma semana depois o remanescente (PR) foi novamente pesado, obtendo-se assim o peso de ração consumido (PC=PI-PR). O acompanhamento foi realizado nos grupos recebendo dieta hipercolesterolêmica e normal.

6.11.Coleta de material para análise

Após o período de exposição, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico inalatório (ISOFLURANE ®) para coleta de tecidos, segundo métodos recomendados pelo painel de eutanásia da American Veterinary Medical Association (AVMA, 2000)

6.12. Análise bioquímica do perfil lipídico – Extração de Colesterol Total (CT) e Triglicéries (TG) através do fígado.

As análises de colesterol total (CT) e Triglicérides (TG) foram realizadas em tecido hepático por meio do método enzimático por espectrofotometria (500nm) Cobas Mira. Procedimento realizado no laboratório de Lípides (LIM 10) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Foram utilizadas aproximadamente 200mg de amostras do tecido de fígado, transferidas para o tubo Potter onde foram homogenizadas com 4ml de clorofórmio e 2ml de metanol. Os homogenatos foram transferidos para tubos de ensaio previamente lavados com hexana e deixados a 4ºC por 24 horas. No segundo dia as amostras foram filtradas em papel filtro e adicionados 6ml de solução H2SO4 0,05% deixadas em repouso overnight para divisão das fases.

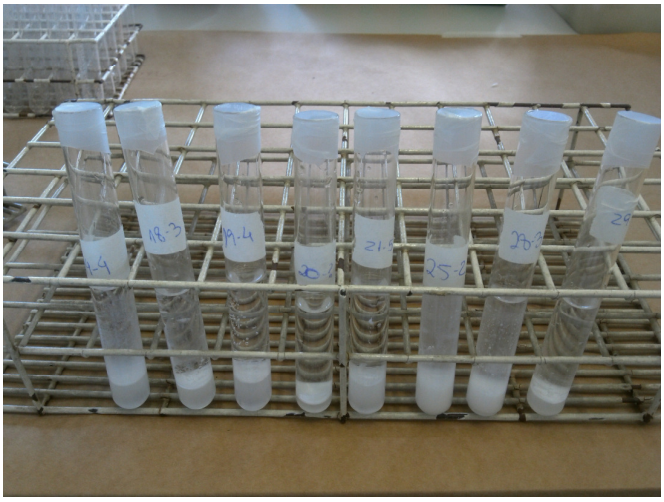


Figura 7: Divisão de fases - Análise de Perfil Lipídico - CT e TG.

No terceiro dia, foram retirados o infranadante das amostras e transferidas para novos tubos de ensaio devidamente limpos com hexana. Foram adicionados 1ml de solução Triton X-100 0,5% em clorofórmio. Após esta etapa foi realizada a secagem do solvente sob fluxo de nitrogênio em um banho seco a 45ºC. Ao final do processo de secagem, foram adicionados as amostras 500µl de água destilada, estas foram aquecidas em banho-maria a 37ºC durante 30 minutos. Os tubos foram devidamente vortexados e retirado uma alíquota de 200µl do padrão das amostras para a dosagem de colesterol total e triglicérides. Os resultados foram expressos em mg/dl.

6.13.Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar (LBA)

Para a realização do lavado broncoalveolar (LBA) fez-se uma traqueostomia e em seguida foi introduzida uma cânula traqueal. Um volume de 0,5ml de Tampão Fosfato Salina (PBS) foi infundida na traquéia por 3 vezes consecutivas, totalizando 1,5ml. O volume recuperado foi centrifugado a 1810 rpm, a 5ºC, por 10 minutos. O sobrenadante foi guardado em micro tubos e congelado em freezer -70ºC para análise de interleucinas.

6.14.Quantificação de mediadores inflamatórios

As citocinas Interleucina 6 (IL6) e Fator de Necrose Tumoral alpha (TNFα) foram quantificadas por ELISA através de Kits Duo Set (R&D System®), disponíveis comercialmente, em alíquotas do sobrenadante do LBA pulmonar, obtidas de acordo o item acima. Os ensaios foram conduzidos seguindo as especificações do fabricante.

Placas de 96 poços NUNC-MAXISORP, foram sensibilizadas à temperatura ambiente durante a noite, com 100µl de anticorpos monoclonais específicos de captura para as citocinas: IL6 e TNFα. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 0,05% e bloqueadas por 2 horas com 200µl de PBS contendo 1% de BSA e 5% de sacarose. Após este período as placas foram lavadas novamente, e 50µl das amostras ou da curva padrão foram adicionadas, seguindo incubação por 2 horas e temperatura ambiente. Após nova lavagem, foram adicionados 100µl do anticorpo de detecção biotinilado específico para cada citocina: IL6 e TNFα, seguindo incubação por 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e incubadas com solução de peroxidase de raiz forte conjugada (HRP) e avidina em PBS contendo 1% de BSA, durante 20 minutos a 37ºC. Após a lavagem das placas, foram adicionados 100µl do reagente para revelar a reação. Após 30 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M e a densidade óptica lida a 450nm. A concentração das citocinas presentes nas amostras foi calculada com base nas curvas padrões.

6.15.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, avaliamos o volume pulmonar total seguindo as recomendações da ATS-ERS (HSIA et al., 2010).

6.16.Amostragem e inclusão

A amostragem do pulmão foi feita de forma sistemática uniforme e randômica. A quantificação dos parâmetros pulmonares avaliados foi conduzida em cortes verticais. Assim para a amostragem, os pulmões inteiros (incluindo as estruturas do hilo) foram incluídos em blocos de Agar (12%). O esquema da amostragem é mostrado na figura 8.

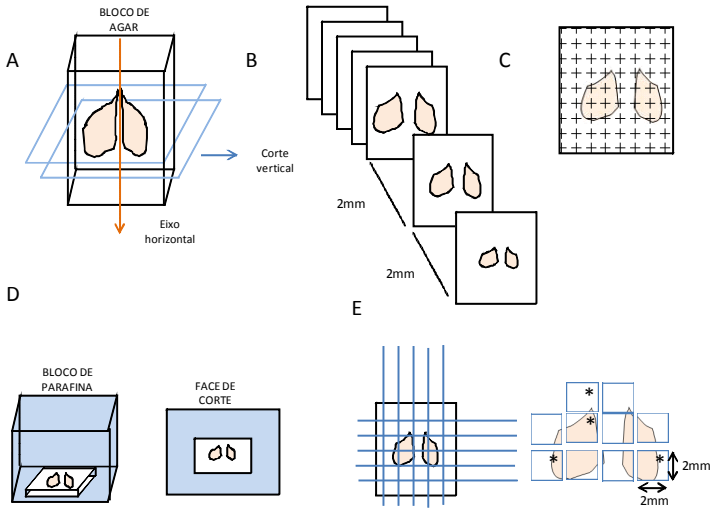


Figura 8 - Representação esquemática dos métodos e amostragem do pulmão para o estudo estereológico. A- inclusão do pulmão em Agar; B-Cortes verticais seriados; C- Sistema teste de pontos para estimativa do volume pelo método de Cavalieri nas fatias de pulmão em Agar; D, Inclusão das fatias de Agar me blocos de parafina; E, segundo estágio de amostragem dos pulmões de camundongos

6.17.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 eqüidistantes 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 a_p conhecida) é sobreposto as fatias de Agar e os pontos incidentes sobre o compartimento de interesse são contados em todas as fatias. Assim o volume será obtido aplicando-se a fórmula:Onde pt

são os pontos incidentes sobre o pulmão, $a_{(p)}$ é a área associada ao ponto do sistema teste de pontos e T é a espessura das fatias produzidas no Agar (neste caso 4mm).

$$[1]\ V_{pulmão} = \sum pt \times a_{(p)} \times T$$

6.18. Avaliação imunohistoquímica

Após a realização do LBA, os pulmões foram coletados e fixados em solução de paraformoldeído 4% tamponado por 24 horas em temperatura ambiente. Após esta etapa, o material foi processado e incluído em parafina. Posteriormente foram feitos cortes de 5µm e coletados em lâminas silanizadas para a avaliação imunohistoquímica. Nesta análise foi feita uma avaliação histopatológica de rotina empregando técnicas imunohistoquímicas para a determinação e caracterização da resposta inflamatória nos vasos do parênquima pulmonar.

Os anticorpos primários, recuperação antigênica, diluição e origem dos anticorpos utilizados para descrever a matriz extracelular são demonstrados na tabela 2. Para a reação de imunohistoquímica, os cortes foram desparafinados, hidratados e submetidos a uma solução de peróxido de hidrogênio (H2O2) a 3% por 20 minutos com o objetivo de inibir a ação de peroxidase endógena. A seguir foi realizada incubação *overnight* com o anticorpo primário. Como anticorpos secundários foram utilizados o ABC kit Vectastain (Vector Elite) por 30 minutos a 37ºC. (Ca, USA). Os cortes foram corados com o cromógeno 3,3 Diaminobenzidine (DAB) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA). Após isto, as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmsadt, Alemanha), lavadas em água corrente, desidratadas e montadas com resina para microscopia Permont (Fisher Scientific , USA). Controles negativos foram realizados com a substituição do anticorpo primário por um anticorpo controle de mesmo isotipo e com a substituição do anticorpo primário por uma solução salina tamponada com fosfato (phosphate buffered saline, PBS).

Tabela 2. Anticorpos primários e processamento utilizado na análise imunohistoquímica.

Anticorpo	Pré-Tratamento	Espécie	Diluição	Clone	Origem
VCAM	PP Citrato	Coelho	1:1200	Policlonal	Santa Cruz - CA USA
ICAM	PP pH9	Rato	1:2000	Monoclonal	Santa Cruz - CA USA
SOD3	Tris Citrato	Cabra	1:1600	Policlonal	Santa Cruz - CA USA
NOX2	Citrato pH9	Coelho	1:2000	Policlonal	Abcam Inc.Cambridge USA
INOS	PP Citrato	Coelho	1:1600	Policlonal	Abcam Inc.Cambridge USA
E-NOS	PP Citrato	Coelho	1:100	Policlonal	NeoMarkers Fremont
ENDOTELINA	PP Citrato	Cabra	1:2000	Policlonal	Santa Cruz - CA USA
IL1β	PP Citrato	Coelho	1:200	Policlonal	Santa Cruz - CA USA
VEGF	PV Citrato	Coelho	1:1000	Policlonal	Santa Cruz - CA USA
ISOP	Trip	Cabra	1:500	Policlonal	Oxford Biomedical Oxford, MI

6.19. Análise morfológica

As medidas das áreas coradas foram realizadas utilizando um analisador de imagens e o software Image-Pro® Plus versão 4.5 para Windows® (Media Cybernetics - Silver Spring MD,USA) instalado em um computador pessoal, a partir da leitura de lâminas escaneadas.

A positividade de cada reação foi determinada pelos intervalos de cor (*threshold*). Para definição do limiar de cor, diferentes cortes corados em cada anticorpo (entre 6 e 8 cortes), bem como controles negativos, foram avaliados para se obter o melhor intervalo de positividade entre estes casos e checados por uma experiente patologista pulmonar. Para cada reação um padrão de cor foi estabelecido. Estes procedimentos geraram um arquivo contendo o espectro de cor selecionado e este era aplicado posteriormente para todos os casos corados com o mesmo anticorpo (Araujo *et al.*, 2008).

O programa permite ainda a seleção de uma região onde a medida deve ser realizada, denominada área de interesse. Assim, as áreas de interesse foram manualmente determinadas em cada vaso (5 vasos por animal). As expressões de VCAM, ICAM, SOD3, NOX2, NOX4,

ENDOTELINA, IL1β, ENOS, I-NOS, VEGF e ISOP foram corrigidas pelo perímetro externo da camada muscular ($\mu m^2/\mu m$).

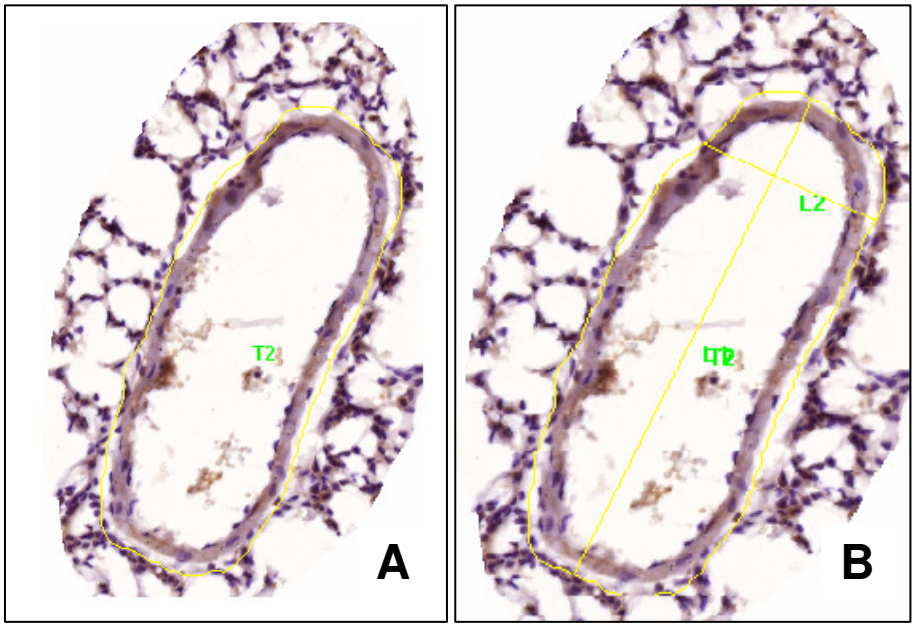


Figura 9 - **A:** Delimitação do perímetro externo do vaso; **B:** Delimitação do diâmetro maior e menor do vaso

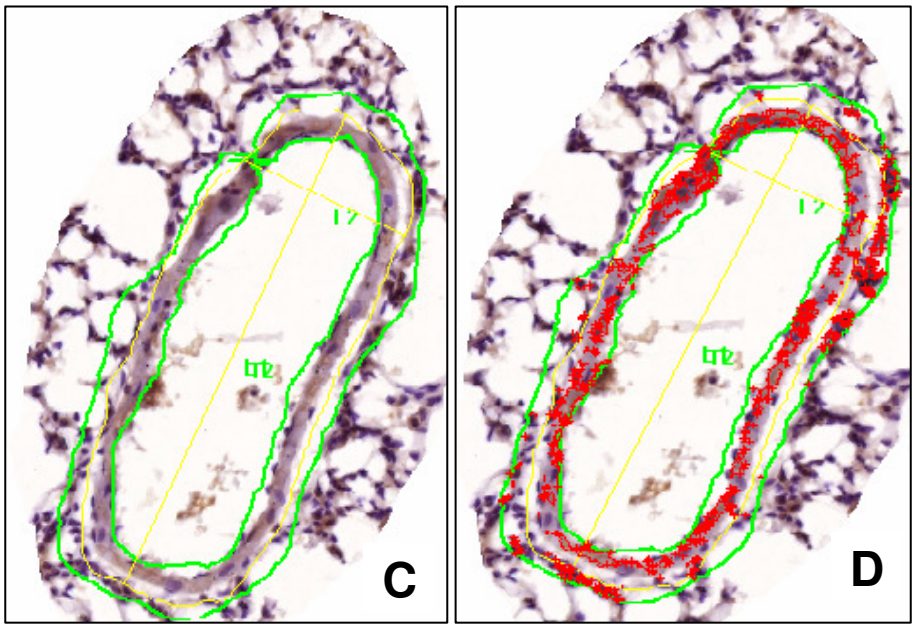


Figura 10 - **C:** Delimitação de toda área externa e interna do vaso **D:** Área positiva do vaso corada com cada anticorpo

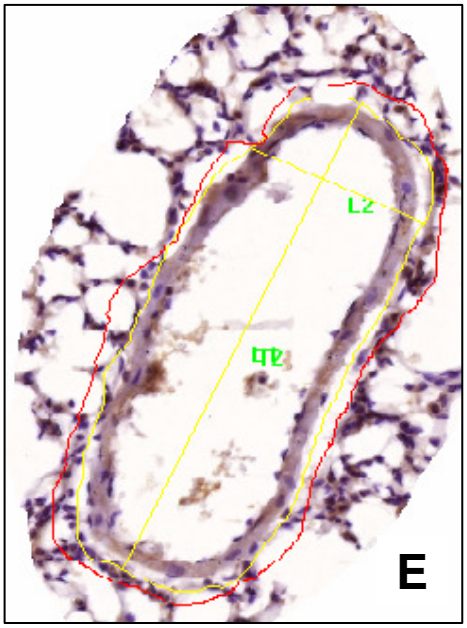


Figura 11 - E**:** Delimitação de todas

6.20. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS 17.0 (SPSS, Chigago, Illinois, USA). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade da amostra. Foram realizados os testes Anova e 3Way Anova O nível de significância foi estabelecido como $p \leq 0,05$ e os resultados expressos como média, desvio e erro padrão.

7.RESULTADOS

7.1.Avaliação dos filtros de policarbonato e quartzo

Semanalmente, nos meses de março a junho de 2011, 2 filtros foram submetidos à exposição para possibilitar a caracterização do $MP_{2,5,}$ e posteriormente foram analisados. Os resultados destas análises estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Descritivo dos constituintes da composição elementar do $PM_{2.5}$ (ug/m^3).

Elemento	Média	DP
$MP_{2.5}$	646,37	534,06
Na	0,53	0,71
Mg	0,36	1,08
Al	5,61	11,74
Si	6,49	14,92
P	0,58	1,52
S	9,37	8,18
Cl	0,77	1,05
K	3,46	6,51
Ca	3,27	7,26
Ti	0,64	1,45
V	0,01	0,02
Cr	0,01	0,04
Mn	0,16	0,26
Fe	5,3	11,62
Ni	0,01	0,02
Cu	0,1	0,16
Zn	0,5	0,72
Se	0	0
Br	0,04	0,05
Rh	0,05	0,09
Pb	0,02	0,04

Através destas análises foram identificados quatro fatores, onde 96% da variação da composição do $MP_{2,5}$ concentrado ficou definida. Estes fatores são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Aplicação de técnica da análise dos elementos principais, para o composto dos dados de medidas elementares dos filtros do $MP_{2,5}$.

Elemento	Fatores			
	1º	2º	3º	4º
Na	-0,016	0,051	0,919	0,1
Mg	0,98	0,026	-0,059	0,1
Al	0,989	0,02	-0,027	-0,006
Si	0,993	0,045	-0,023	-0,006
P	0,124	-0,028	-0,134	0,877
S	-0,038	0,926	0,108	0,075
Cl	0,747	0,542	-0,179	0,054
K	0,968	0,056	-0,047	0,021
Ca	0,99	0,095	-0,039	-0,007
Ti	0,742	0,22	-0,119	-0,076
V	0,588	0,686	-0,008	-0,011
Cr	0,976	0,108	-0,055	0,067
Mn	0,958	0,083	-0,018	0,231
Fe	0,991	0,093	-0,024	-0,012
Ni	0,818	0,459	0,004	0,072
Cu	0,962	0,215	-0,016	0,029
Zn	0,813	0,397	0,143	-0,072
Se	-0,029	0,101	0,249	0,858
Rh	0,699	0,567	-0,203	-0,046
Pb	-0,074	-0,016	0,941	-0,019
Br	0,824	0,321	-0,049	0,119

O primeiro fator normalmente apresenta em sua composição, os elementos Mg, Al, Si, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Ni, Zn e Br. Estes elementos estão principalmente associados com o tráfego urbano, e eventualmente com o elemento Ca (ressuspensão de solo). De acordo com Monaci et al, 2000, os elementos Cu e Ni estão ligados com fontes industriais e fixas. Enxofre (S) predomina o 2º fator que tem sua obtenção por veículos fazem uso de diesel (SCHAUER, et al, 2006). Na e Pb predominam o 3º e P e Se, o 4º fator. A demonstração da quantidade de HPAs apresentada nos filtros, pode ser encontrada na tabela 5.

Tabela 5 - Demonstração da quantidade de HPAs em filtros expostos ao $MP_{2.5}$ durante o período de 2 horas.

HPAs	Filtros	MVC HPAs (ng/m³)
Pireno	6	1,655 (3,6 - 9,0)
Benzo(a) acefenantrileno	6	6,81 (2,44 - 13,97)
Benzo (k) fluoranteno	8	1,42 (0,44 - 3,17)
Benzo (a) pireno	7	0,72 (0,27 - 1,083)

7.2. Avaliação dos desfechos gestacionais

Os resultados dos desfechos gestacionais estão apresentados na tabela 6. E a curva de ganho de peso médio materno nos grupos avaliados está apresentada na figura 12.

Tabela 6. Média, Desvio padrão e Erro padrão dos parâmetros avaliados com desfechos gestacionais nos grupos AF e AC.

	Grupo	N	Media	SD	SE	p
Ganho de peso na gestação (g)	AF	5	16,60	0,58	0,24	0,06
	AC	5	14,57	2,05	0,84	
Numero de filhotes por ninhada	AF	5	7,33	1,75	0,71	ns
	AC	5	7,33	0,82	0,33	
Peso da ninhada (g)	AF	5	17,95	1,80	0,73	ns
	AC	5	17,07	2,43	0,99	
Peso médio dos filhotes	AF	5	2,68	0,45	0,18	ns
	AC	5	2,45	0,22	0,09	
Nº machos	AF	5	3,33	2,07	0,84	ns
	AC	5	3,33	1,37	0,56	
Nº fêmeas	AF	5	2,83	1,47	0,60	ns
	AC	5	3,50	1,05	0,43	
Mortes pós nascimento	AF	5	0,50	1,22	0,50	ns
	AC	5	0,33	0,82	0,33	

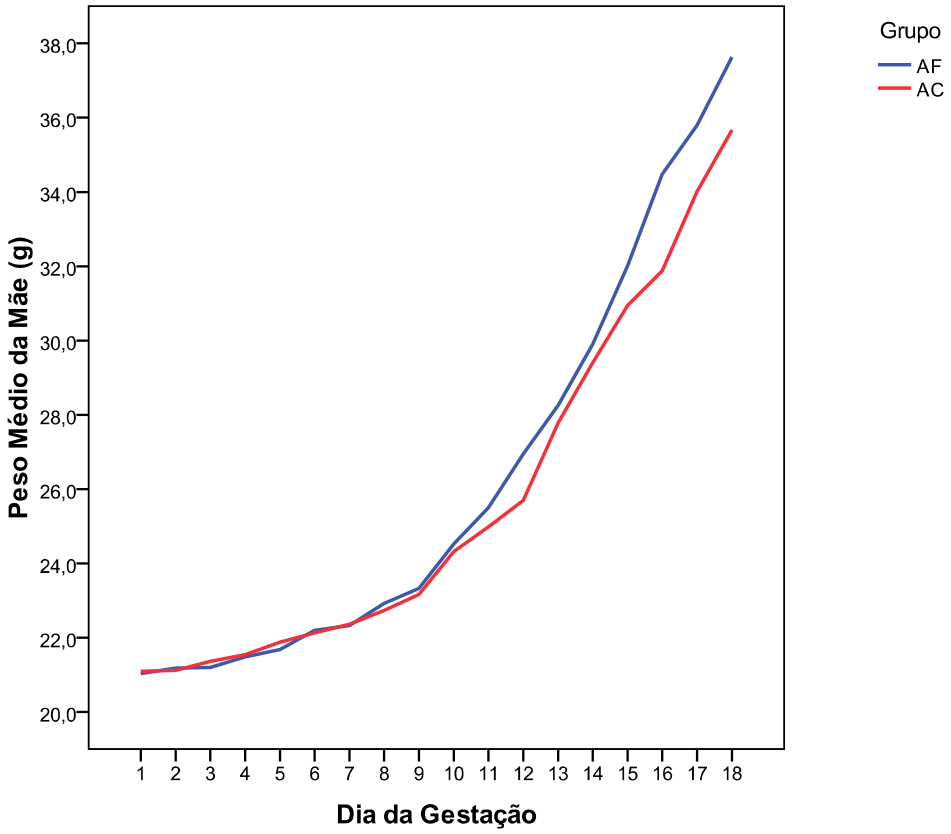


Figura 12- Curva de ganho de peso médio durante a gestação

7.3.Avaliação do desenvolvimento da prole

O acompanhamento do peso médio dos filhotes nos dias 5, 10, 15, 20 e 30 após o nascimento estão apresentados na tabela 7. Observa-se que nos grupos expostos ao material particulado concentrado durante a gestação, os filhotes apresentam peso reduzido no 5º e no 10º dia após o nascimento. No 5° dia os filhotes cujas mães foram expostas ao material particulado concentrado apresentam uma redução média de 10% no peso e de cerca de 8% no 10º dia. Porém esta diferença desaparece ao atingirem a idade de 15 dias após o nascimento. A figura 13 apresenta a curva de ganho de peso nos grupos AF e AC considerando macho e fêmeas juntos. A tabela 8 apresenta as médias de peso de acordo com a idade e sexo dos filhotes

nos grupos AF e AC. e na figura 14 está apresentada a curva discriminada para os sexos.

Tabela 7. Média, Desvio padrão e Erro padrão dos parâmetros avaliados com avaliação do desenvolvimento da prole.

Peso	Grupo	N	Media	DP	EP	p
5º dpn	AF	41	2,63	0,56	0,09	0,03
	AC	41	2,35	0,26	0,04	
10ºdpn	AF	41	4,88	0,95	0,15	0,01
	AC	39	4,45	0,39	0,06	
15ºdpn	AF	41	6,69	0,72	0,12	ns
	AC	39	6,61	0,51	0,08	
20ºdpn	AF	41	7,44	0,79	0,13	ns
	AC	39	7,56	0,85	0,13	
30ºdpn	AF	41	13,81	1,60	0,26	ns
	AC	39	13,53	1,43	0,22	

.

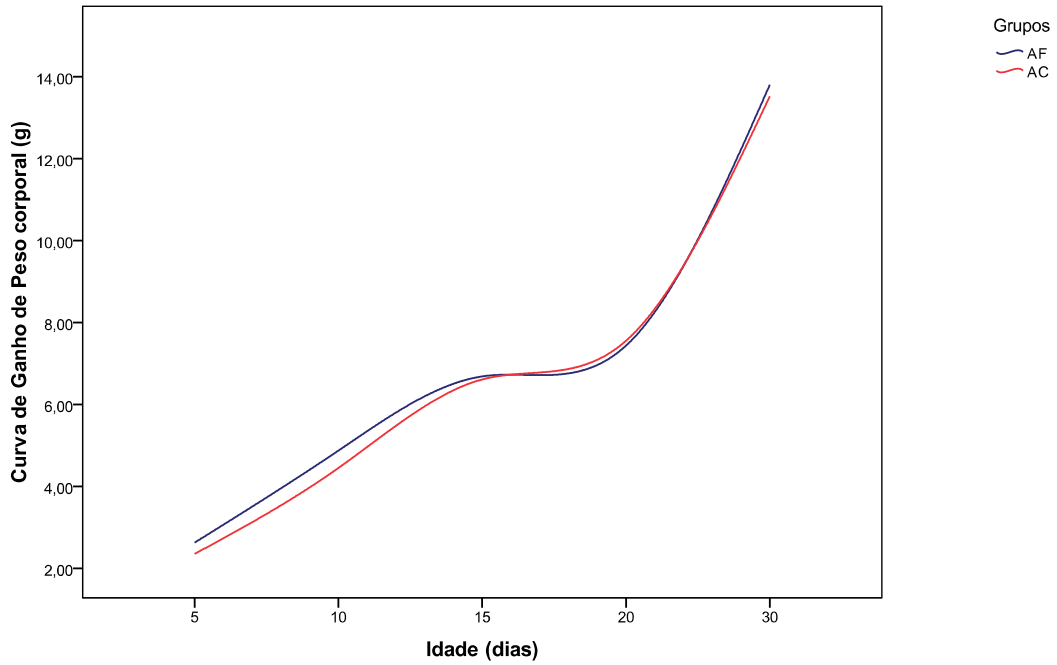


Figura 13- Curva de ganho de peso nos grupos AF e AC

Tabela 8. Médias de peso de acordo com a idade e sexo dos filhotes nos grupos AF e AC

Idade	Sexo	Grupo	Média
10 dias	fêmea	AF	4,83
		AC	4,60
	macho	AF	4,91
		AC	4,48
15 dias	fêmea	AF	6,91
		AC	6,57
	macho	AF	6,90
		AC	6,64
20 dias	fêmea	AF	7,19
		AC	7,42
	macho	AF	7,72
		AC	7,62
30 dias	fêmea	AF	13,19
		AC	12,67
	macho	AF	15,02
		AC	14,55

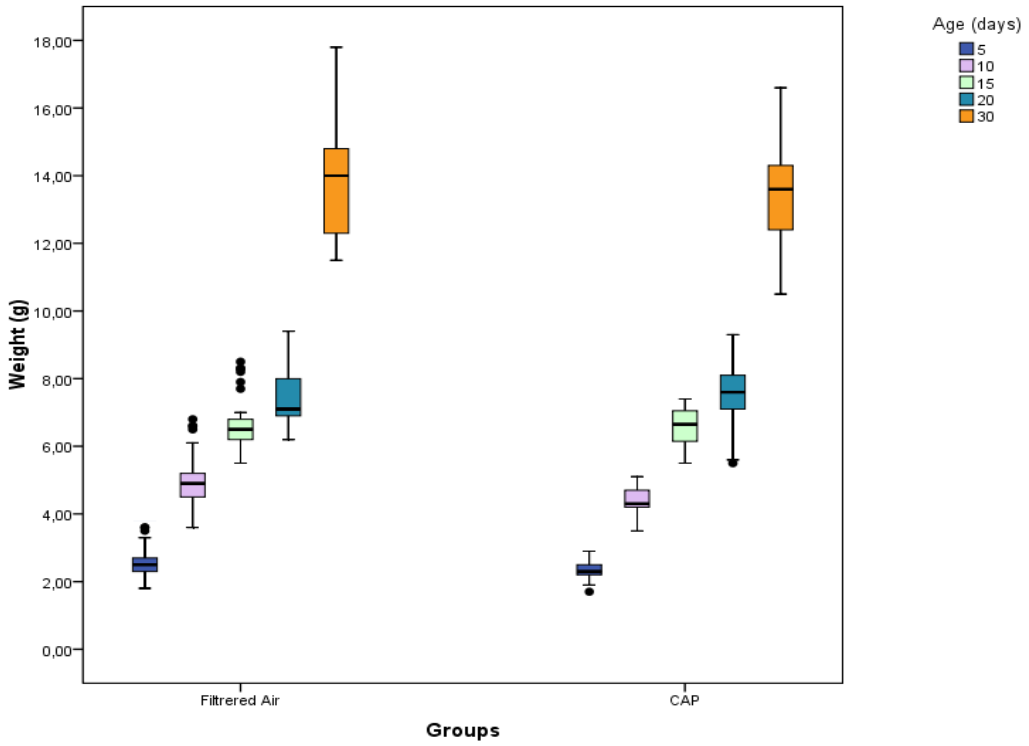


Figura 14. Gráfico demonstrando o peso médio dos filhotes de acordo com a idade

7.4.Consumo e ganho de peso após dieta

Após o 30º dia de vida apenas os machos foram acompanhados para avaliação do ganho de peso e consumo de dieta (a partir de 3 meses de vida).

A figura 15 apresenta um gráfico de barras do peso médio mensal dos animais nos diferentes grupos experimentais após o início da dieta. Nos gráficos apresentados nas figuras 16 e 17 observa-se o peso dos animais nos dois meses anteriores ao início da dieta e nos 4 meses de tratamento com a dieta hipercolesterolêmica, no qual nota-se que a introdução da dieta provoca uma clara redução do peso. Esta redução está associada à dieta e ao tempo de tratamento. Se considerarmos apenas os grupos tratados com dieta hipercolesterolêmica, podemos observar que a exposição pré- natal ao material particulado concentrado, somada a exposição pós-natal ao ar filtrado acentua a perda de peso (r=-0,37). O consumo médio semanal de ração também diminui muito com o início do tratamento com a dieta hipercolesterolêmica (r=-0,66).

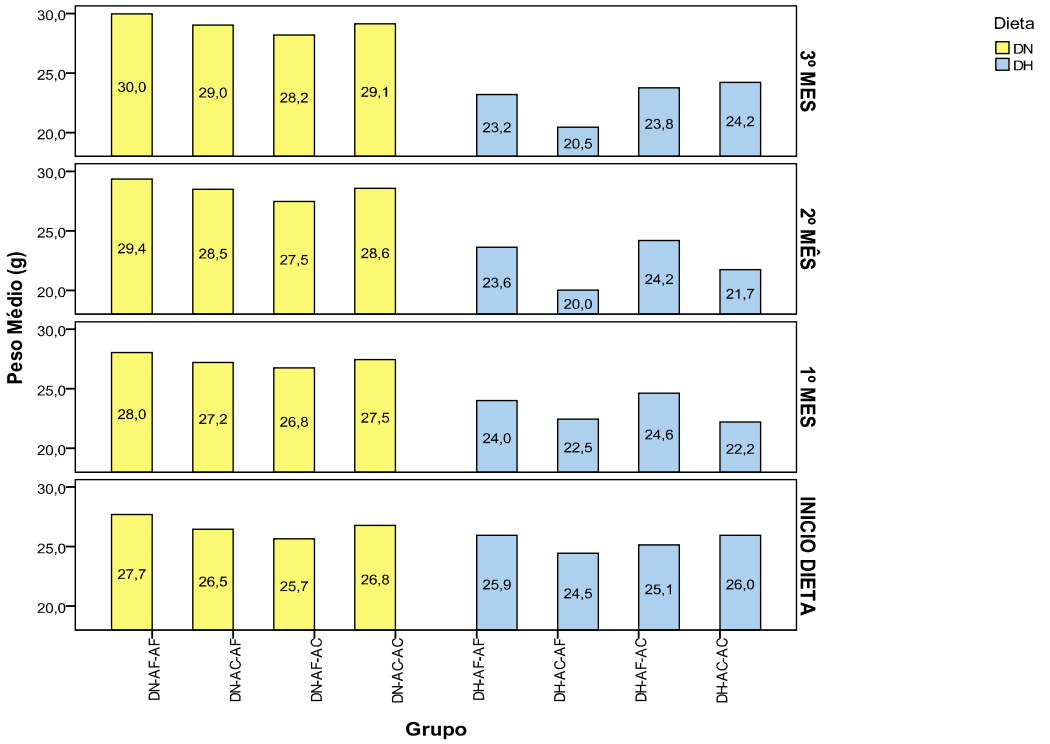


Figura 15. Peso médio mensal dos animais após o início da dieta hipercolestrolêmica

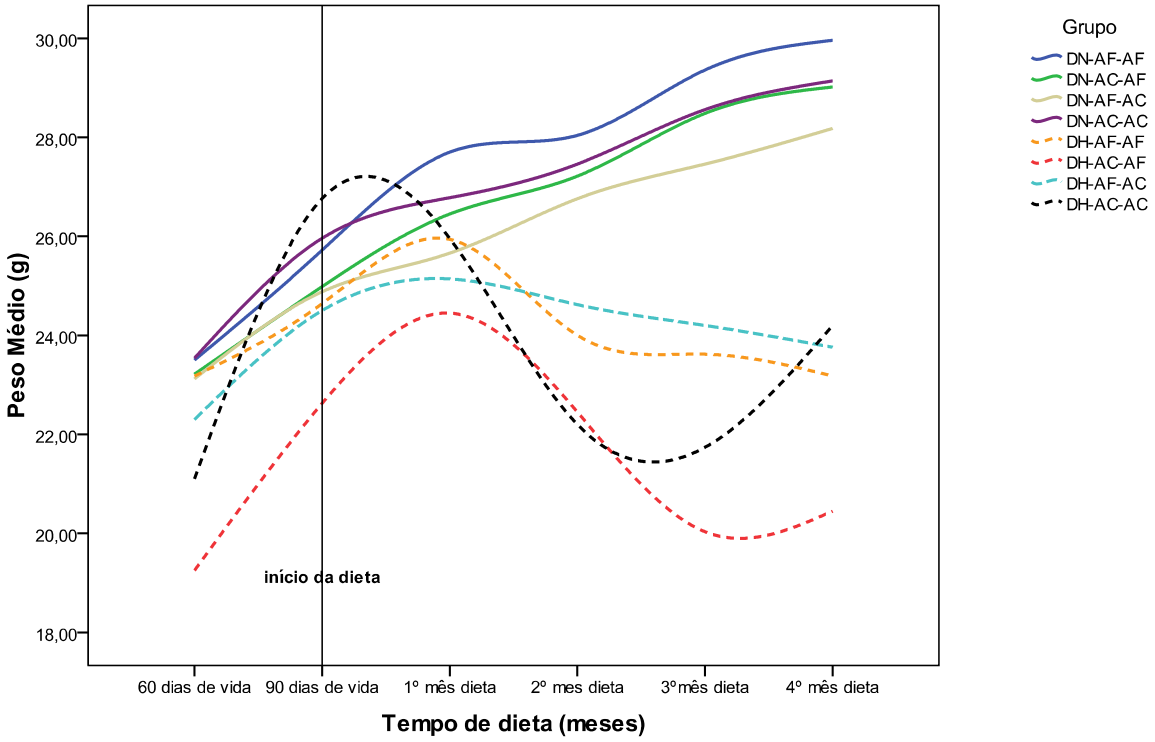


Figura 16. Peso dos animais nos dois meses anteriores ao início da dieta. .

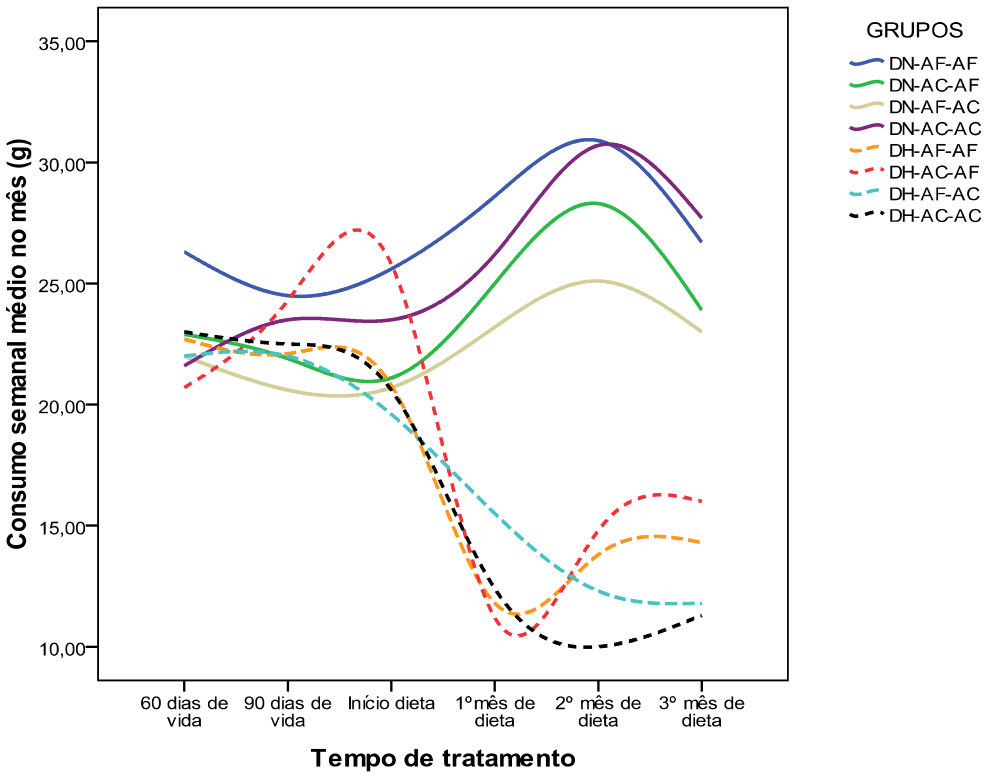


Figura 17. Consumo de ração durante os 4 meses de tratamento com a dieta hiprcolesterolêmica.

Tabela 9. Ganho de peso antes e depois do inicio do consumo de dieta

		30 dias			60 dias			90 dias			120 dias			150 dias			180 dias		
Grupos	N	Média	SD	p	Média	SD	p	Média	SD	p	Média	SD	p	Média	SD	p	Média	SD	p
AFAFDN	5	23,00	1,22		25,40	0,89		27,20	1,30		27,40	1,14		29,20	1,30		29,60	1,82	
ACAFDN	6	22,67	1,03		24,50	0,55		26,00	0,89		26,83	1,47		28,17	1,94		28,50	1,64	
AFACDN	5	22,60	1,34		24,60	1,14		25,20	1,10		26,40	1,14		27,20	1,30		27,80	0,84	
ACACDN	5	23,20	1,30	0,001	25,60	0,89	ns	26,60	1,34	0,003	27,00	1,00	0,001	28,00	1,00	0,001	28,80	1,30	0,001
AFAFDH	5	22,60	0,89		24,20	0,45		25,60	0,55		23,40	1,34		23,20	1,10		22,80	1,48	
ACAFDH	4	18,75	0,96		22,25	1,26		24,00	1,41		21,75	0,50		19,33	1,15		20,25	1,50	
AFACDH	5	21,80	0,84		24,00	1,00		24,80	1,30		24,20	1,30		23,80	1,10		23,40	1,14	
ACACDH	5	20,60	0,89		26,20	4,92		25,60	0,55		21,80	1,30		21,20	1,64		23,75	2,99	

7.5. Análise Perfil Lipídico

Através do método de extração do colesterol total e triglicérides pelo fígado, foi possível analisar o perfil lipídico dos animais estudados. Os resultados estão apresentados na tabela 10 e demonstrados nas figura 18 e 19.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para o parâmetro de colesterol total (p=0,02). O fator determinante para a elevação dos níveis de colesterol total e triglicérides foi a indução da dieta hipercolesterolêmica (p=0,05) e (p=0,01).

Tabela 10: Estatística Descritiva da Análise do Perfil Lipídico (mg/dL)

Perímetro	Grupo	N	Média	DP	EP	P (anova)
Total Cholesterol (mg/dL) [f]	AF-AF-DN	5	0,12	0,02	0,01	0,002
	AC-AF-DN	5	0,13	0,01	0,01	
	AF-AC-DN	5	0,10	0,04	0,02	
	AC-AC-DN	5	0,13	0,01	0,01	
	AF-AF-DH	5	0,25	0,11	0,06	
	AC-AF-DH	5	0,23	0,11	0,08	
	AF-AC-DH	5	0,24	0,01	0,01	
	AC-AC-DH	5	0,21	0,06	0,04	
Total Triglicérides (mg/dL) [f]	AF-AF-ND	5	0,44	0,12	0,05	ns
	AC-AF-DN	5	0,35	0,14	0,06	
	AF-AC-DN	5	0,34	0,08	0,04	
	AC-AC-DN	5	0,34	0,09	0,04	
	AF-AF-DH	5	0,26	0,03	0,02	
	AC-AF-DH	5	0,31	0,21	0,15	
	AC - AC-DH	5	0,26	0,12	0,06	
	AC-AC-DH	5	0,25	0,06	0,04	

f. Dieta – p=0,05 e p=0,01

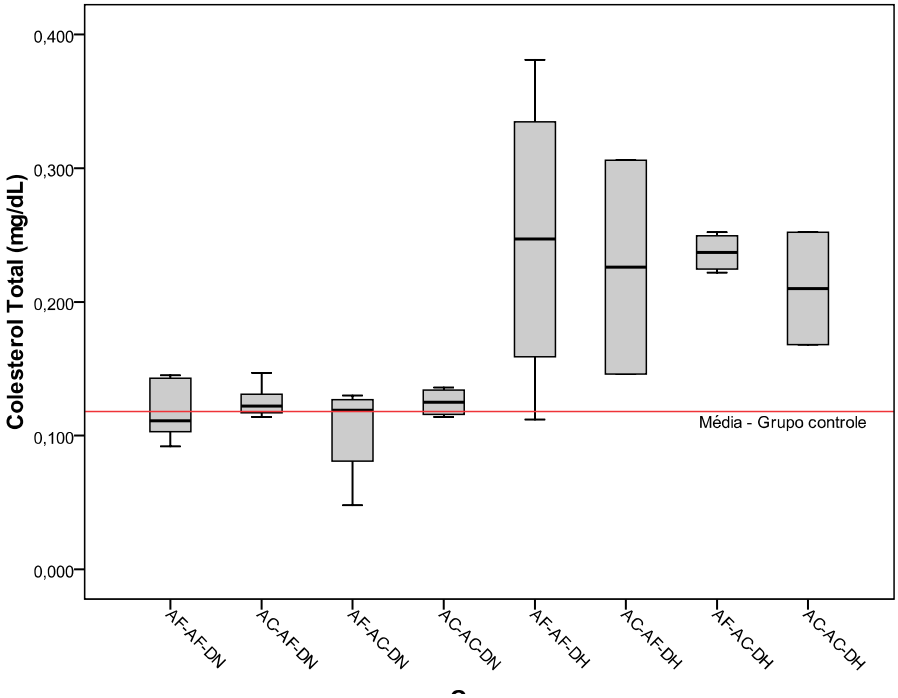


Figura 18: Gráfico demonstrando perfil lipídico - Colesterol Total

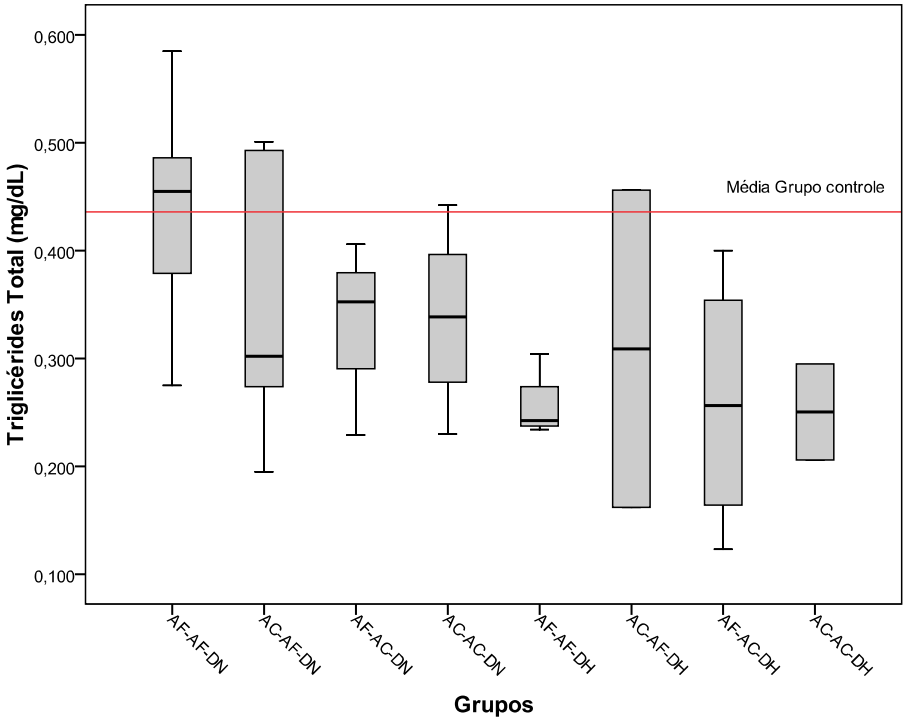


Figura 19: Gráfico demonstrando perfil lipídico - Triglicérides Total

7.6.Volume do Pulmão

Os parâmetros relacionados ao volume do pulmão dos grupos de animais estudados estão apresentados na tabela 11 e demonstrados nas figuras 20,21 e 22.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p= 0,02). Os fatores determinantes para o aumento do volume do pulmão foram a exposição gestacional somada a exposição pós natal (p=0,001) e dieta hipercolesterolêmica (p=0,02).

Tabela 11. Estatística descritiva do volume total do pulmão através do método Cavaliere (mm^3)

Parâmetro	Grupos	N	Média	DP	EP	P (anova)
Volume do Pulmão [(a) (f)]	AF-AF-DN	5	311,25	30,92	15,46	0,02
	AC-AF-DN	5	250,00	43,13	17,61	
	AF-AC-DN	5	252,00	38,83	17,36	
	AC-AC-DN	5	318,00	46,72	20,89	
	AF-AF-DH	5	360,00	47,43	23,72	
	AC-AF-DH	5	285,00	112,25	56,12	
	AF-AC-DH	5	295,00	31,42	14,05	
	AC-AC-DH	5	360,00	39,69	22,91	

a. Exp.Gestacional + Exp.Pós-natal – p=0,001

f. Dieta Hipercolesterolêmica – p=0,02

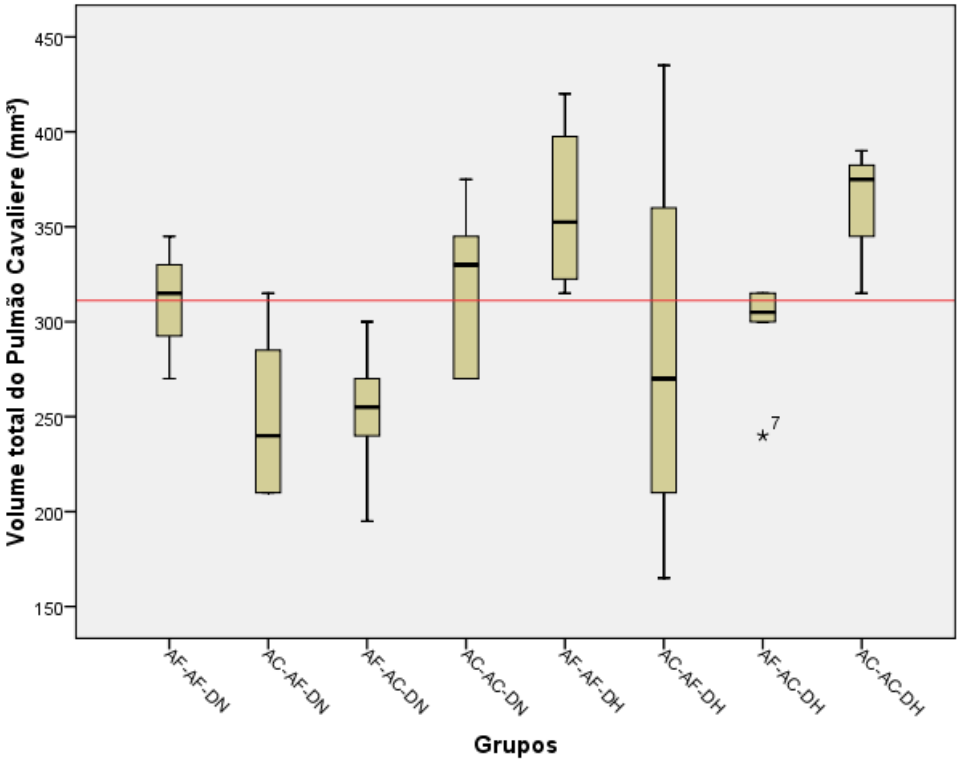


Figura 20: Gráfico demonstrando o volume total do pulmão

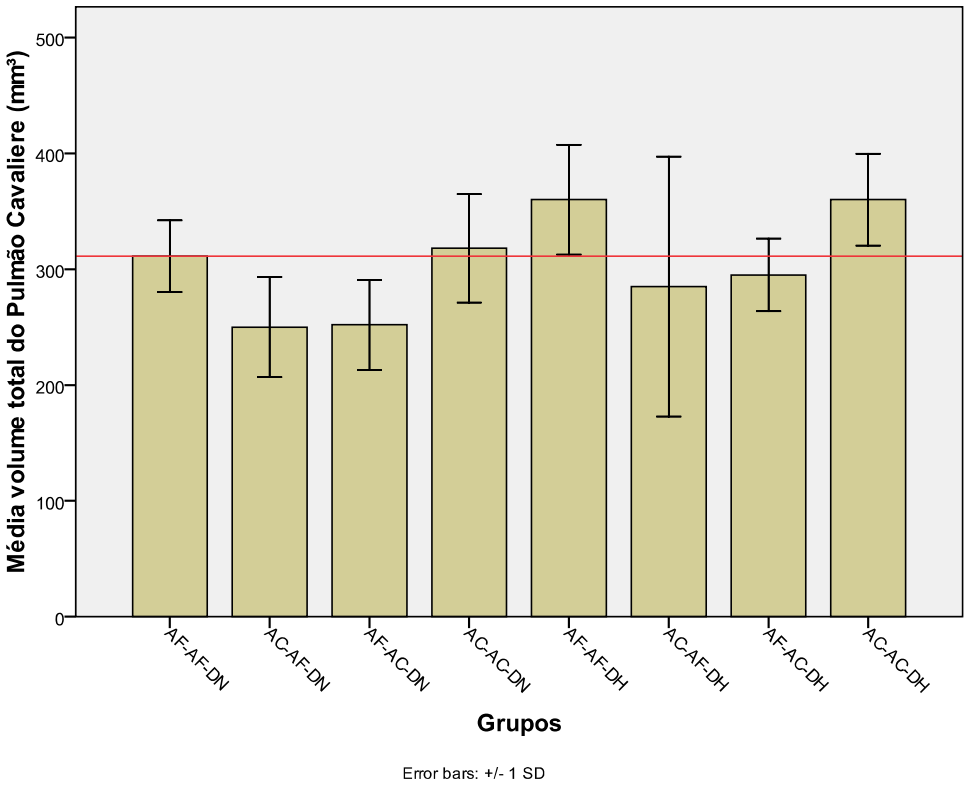


Figura 21: Gráfico demonstrando a média do volume total do pulmão

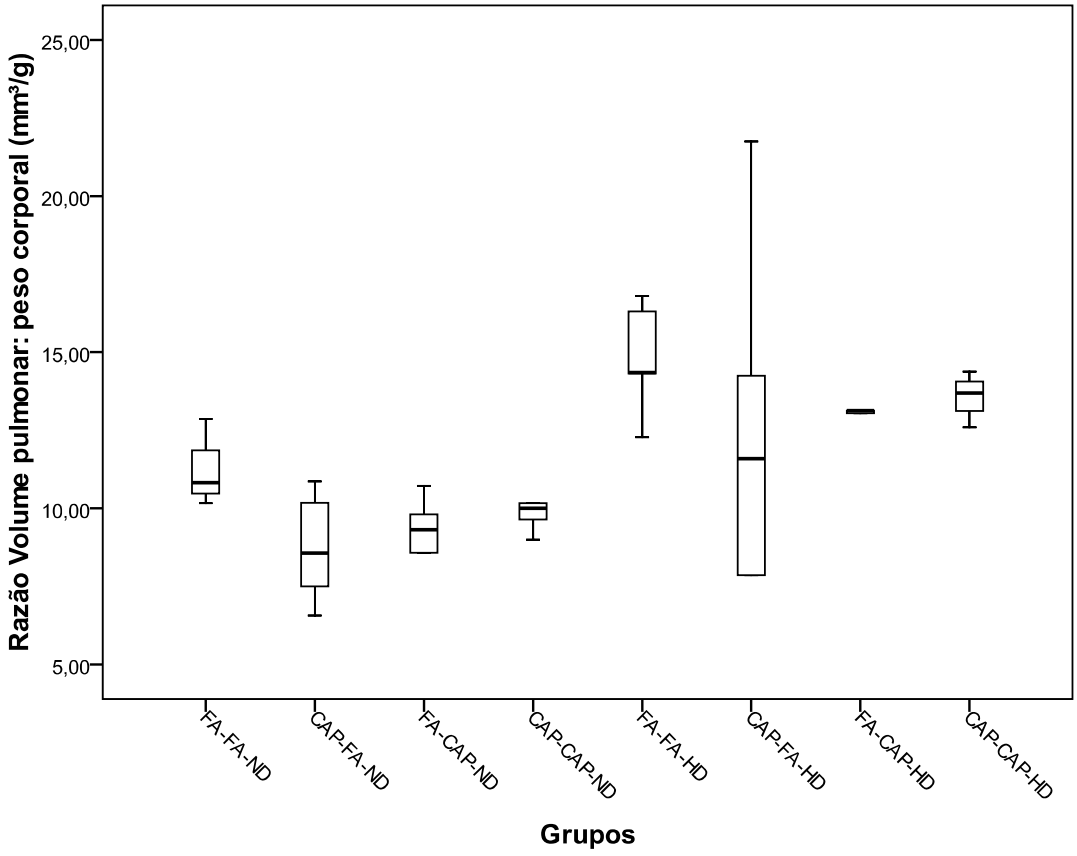


Figura 22: Gráfico demonstrando da razão entre o volume do pulmão e peso corporal dos animais

7.7. Análise de Quantificação de Mediadores Inflamatórios

Através do método de quantificação de mediadores inflamatórios (ELISA) para os parâmetros IL6 e TNFα no lavado broncoalveolar (LBA), foi possível analisar o perfil inflamatório dos animais estudados. Os resultados estão apresentados na tabela 16 e demonstrados nas figuras 38 e 39.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para o parâmetro de IL6 (p=0,03). O fator determinante para o aumento da expressão neste marcador inflamatório foi a indução da dieta hipercolesterolêmica (p=0,05). Para o parâmetro TNFα, não houve diferença estatisticamente significativa.

Tabela 12: Estatística Descritiva da Análise de Quantificação de Mediadores inflamatórios

Parâmetro	Grupo	N	Média	DP	EP	P (anova)
IL-6 [f]	AF-AF-DN	5	286,73	26,47	18,72	
	AC-AF-DN	5	303,14	50,93	22,78	
	AF-AC-DN	5	359,80	61,85	35,71	
	AC-AC-DN	5	334,35	9,06	6,40	0,03
	AF-AF-DH	5	578,18	256,49	128,25	
	AF-AC-DH	5	323,22	58,66	26,23	
	AC-AC-DH	5	209,39	46,24	32,69	
TNFα	AF-AF-DN	5	25,77	1,67	1,18	
	AC-AF-DN	5	25,79	15,61	6,98	
	AF-AC-DN	5	32,90	26,96	15,56	
	AC-AC-DN	5	46,33	5,91	4,18	ns
	AF-AF-DH	5	27,26	12,91	6,46	
	AF-AC-DH	5	44,13	18,66	8,34	
	AC-AC-DH	5	32,60	34,65	24,50	

[f.] Dieta Hipercolesterolêmica – p=0,05

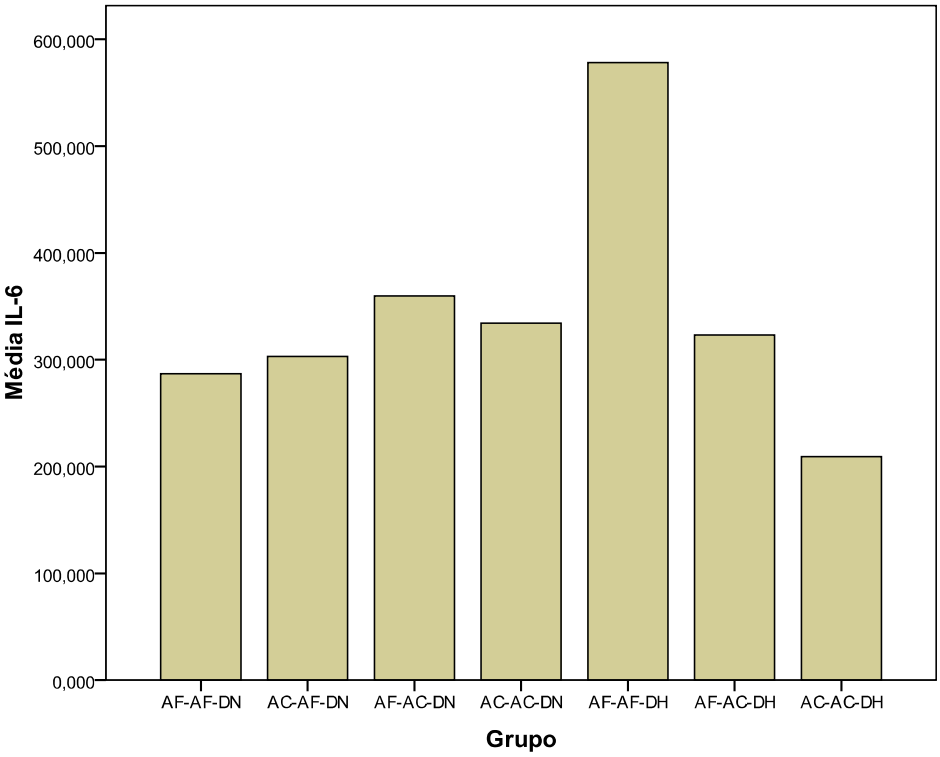


Figura 23: Gráfico demonstrando a média de quantificação de Mediadores inflamatórios IL-6

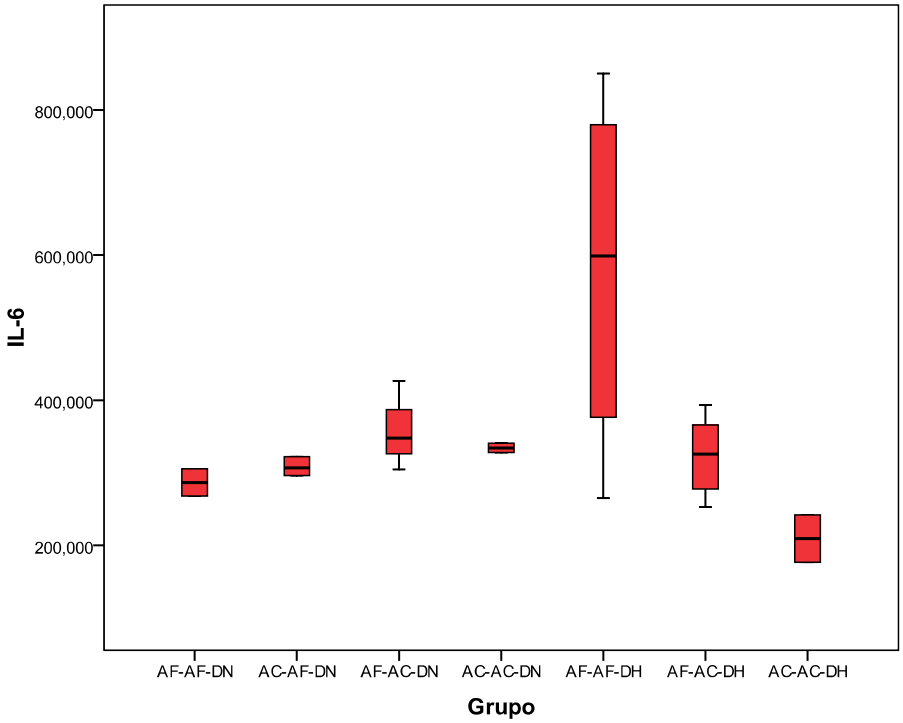


Figura 24: Gráfico demonstrando a concentração de quantificação de Mediadores inflamatórios IL-6

7.8. Análise de Imunomarcadores de ativação endotelial

Com a realização da técnica de avaliação de imunohistoquímica, foi possível analisar as expressões nos vasos do tecido pulmonar. Os resultados estão apresentados nas tabelas 17, 18 e 19 e demonstrados nas figuras de 25 a 34.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para os seguintes imunomarcadores: Endotelina (p=0,05); ENOS (p=0,04); IL1β (p=0,005); INOS (p=0,002); ISOP (p=0,001); NOX2 (0,01) e ICAM (0,04).Os fatores determinantes para a diminuição das expressões nos vasos a partir do grupo controle foram: **Endotelina:** exposição pós natal (p=0,02); exposição gestacional (p=0,001); dieta hipercolesterolêmica (0,01) e exposição gestacional somada a exposição pós natal e dieta hipercolesterolêmica (p=0,03). **ENOS:** exposição gestacional (p=0,01) e exposição gestacional somada a dieta hipercolesterolêmica (p=0,05). **IL1β:** exposição gestacional (p=0,003) e exposição pós natal (p=0,04). **INOS:** exposição gestacional (p=0,00002); exposição pós natal (p=0,005); exposição gestacional somada a exposição pós natal (p=0,01); dieta hipercolesterolêmica (p=0,002); exposição gestacional somada com dieta hipercolesterolêmica (p=0,001) e exposição pós natal somada a dieta hipercolesterolêmica (p=0,002). **ISOP:** exposição gestacional (p=0,001); exposição pós natal (p=0,003); dieta hipercolesterolêmica (p=0,004); exposição gestacional somada a dieta hipercolesterolêmica (p=0,001); exposição pós natal somada a dieta hipercolesterolêmica (p=0,002) e exposição gestacional somada a exposição pós natal e dieta hipercolesterolêmica (p=0,01). **NOX2:** exposição gestacional (p=0,01); exposição gestacional somada a dieta hipercolesterolêmica (p=0,02) e exposição pós natal somada a dieta hipercolesterolêmica (p=0,05). SOD3: exposição pós natal (p=0,02) e exposição gestacional somada a dieta hipercolesterolêmica (p=0,05). **VEGF:** exposição gestacional (p=0,01) e dieta hipercolesterolêmica (p=0,04). **VCAM:** exposição gestacional (p=0,04) e **ICAM:** exposição gestacional (p=0,004) e exposição pós natal (p=0,01).

Tabela 13 - Estatística Descritiva da Análise de Imunomarcadores Endotelina, ENOS e IL1β

Imunomarcadores	Grupos	N	Média	DP	EP	P (anova)
Vt endotelina [b,d,e,f,g]	AF-AF-DN	5	11,91	5,26	3,03	
	AC-AF-DN	5	1,41	1,02	0,51	
	AF-AC-DN	5	5,13	2,60	1,30	
	AC-AC-DN	5	8,01	4,32	1,93	0,05
	AF-AF-DH	5	5,16	4,03	2,01	
	AC-AF-DH	5	4,11	1,46	0,73	
	AF-AC-DH	5	7,28	5,40	2,42	
	AC-AC-DH	5	5,17	2,37	1,37	
Vt Enos [e,g]	AF-AF-DN	5	8,44	5,27	2,63	
	AC-AF-DN	5	1,78	1,52	0,76	
	AF-AC-DN	5	3,82	1,03	0,59	
	AC-AC-DN	5	9,05	3,70	1,85	0,04
	AF-AF-DH	5	6,15	2,89	1,29	
	AC-AF-DH	5	3,47	1,87	1,08	
	AF-AC-DH	5	6,49	2,99	1,49	
	AC-AC-DH	5	4,74	1,85	1,07	
Vt IL 1 B [d,e]	AF-AF-DN	5	3,94	1,82	0,91	
	AC-AF-DN	5	0,44	0,20	0,09	
	AF-AC-DN	5	1,53	0,44	0,22	
	AC-AC-DN	5	3,41	1,69	0,76	0,005
	AF-AF-DH	5	5,23	3,09	1,55	
	AC-AF-DH	5	2,23	0,64	0,45	
	AF-AC-DH	5	3,37	1,32	0,66	
	AC-AC-DH	5	1,56	0,86	0,50	

[b]. Exp.Gest. + Exp.Pós + Dieta - p=0,03
[d]. Exp.Pós - p=0,02 e p=0,04
[e]. Exp.Gest - p=0,001 e p=0,01 e p=0,003
[f]. Dieta - p=0,02
[g]. Exp.Gest + dieta - p=0,01 e p=0,05

Tabela 14 - Estatística Descritiva da Análise de Imunomarcadores INOS, ISOP e NOX2

Imunomarcadores	Grupos	N	Média	DP	EP	P (anova)
Vt INOS [a,c,d,e,f,g]	AF-AF-DN	5	10,32	3,98	1,99	
	AC-AF-DN	5	1,54	1,22	0,55	
	AF-AC-DN	5	4,42	2,18	1,26	
	AC-AC-DN	5	5,86	2,68	1,20	0,002
	AF-AF-DH	5	4,55	1,79	0,80	
	AC-AF-DH	5	3,77	2,49	1,25	
	AF-AC-DH	5	4,73	2,79	1,25	
	AC-AC-DH	5	7,56	2,08	1,47	
Vt ISOp [b,c,d,e,f,g]	AF-AF-DN	5	15,19	6,36	3,67	
	AC-AF-DN	5	1,47	0,80	0,33	
	AF-AC-DN	5	6,43	0,67	0,34	
	AC-AC-DN	5	11,56	4,76	2,38	0,001
	AF-AF-DH	5	6,84	1,91	0,96	
	AC-AF-DH	5	5,56	2,80	1,40	
	AF-AC-DH	5	6,67	5,04	2,25	
	AC-AC-DH	5	7,09	0,70	0,49	
Vt Nox2 [c,e,g]	AF-AF-DN	5	5,33	3,28	1,64	
	AC-AF-DN	5	0,84	0,83	0,41	
	AF-AC-DN	5	1,65	0,35	0,20	
	AC-AC-DN	5	6,80	4,52	2,02	0,01
	AF-AF-DH	5	3,97	1,95	0,87	
	AC-AF-DH	5	1,12	0,63	0,31	
	AF-AC-DH	5	1,95	1,21	0,54	
	AC-AC-DH	5	3,64	2,06	1,19	

[a]. Exp.Gest + Exp.Pós - p=0,01
[c]. Exp.Pós + Dieta - p=0,002 e 0,05
[d]. Exp.Pós - p=0,005 e p= 0,003
[e]. Exp.Gest. - p=0,00002 e p= 0,0001 e p= 0,01
[f]. Dieta - p= 0,002 e p=0,004
[g]. Exp.Gest. + Dieta - p=0,001 e p=0,001 e p=0,02

Tabela 15 - Estatística Descritiva da Análise de Imunomarcadores SOD3, VEGF, VCAM e ICAM

Imunomarcadores	Grupos	N	Média	DP	EP	P (anova)
Vt SOD 3	AF-AF-DN	5	8,04	5,77	3,33	
	AC-AF-DN	5	0,86	0,96	0,48	
	AF-AC-DN	5	2,28	1,17	0,58	
	AC-AC-DN	5	3,06	1,26	0,73	ns
	AF-AF-DH	5	5,70	3,34	1,49	
	AC-AF-DH	5	2,85	0,96	0,56	
	AF-AC-DH	5	5,12	4,59	2,05	
	AC-AC-DH	5	2,78	0,73	0,52	
Vt VEGF	AF-AF-DN	5	4,92	2,16	1,08	
	AC-AF-DN	5	0,39	0,29	0,14	
	AF-AC-DN	5	1,95	2,74	1,37	
	AC-AC-DN	5	3,08	2,53	1,13	ns
	AF-AF-DH	5	1,65	0,97	0,49	
	AC-AF-DH	5	3,56	1,24	0,88	
	AF-AC-DH	5	2,24	3,12	1,80	
	AC-AC-DH	5	3,50	1,36	0,79	
Vt VCAM	AF-AF-DN	5	7,24	5,12	2,56	
	AC-AF-DN	5	1,07	0,75	0,31	
	AF-AC-DN	5	2,90	1,63	0,73	
	AC-AC-DN	5	7,85	4,05	1,81	ns
	AF-AF-DH	5	6,18	5,00	2,24	
	AC-AF-DH	5	6,25	5,79	2,90	
	AF-AC-DH	5	6,74	5,85	2,62	
	AC-AC-DH	5	6,46	7,34	4,24	
Vt ICAM	AF-AF-DN	5	18,02	11,15	5,58	
	AC-AF-DN	5	1,92	2,21	0,99	
	AF-AC-DN	5	3,57	2,15	1,08	
	AC-AC-DN	5	13,70	8,94	5,16	0,04
	AF-AF-DH	5	9,30	7,85	3,51	
	AC-AF-DH	5	2,22	0,84	0,42	
	AF-AC-DH	5	12,29	10,35	4,63	
	AC-AC-DH	5	7,82	9,50	5,49	

[d].Exp.Pós - p=0,02 e p=0,01
[e]. Exp.Gest. - p=0,01 e p=0,04 e [p]=0,004
[f]. Dieta - p=0,04

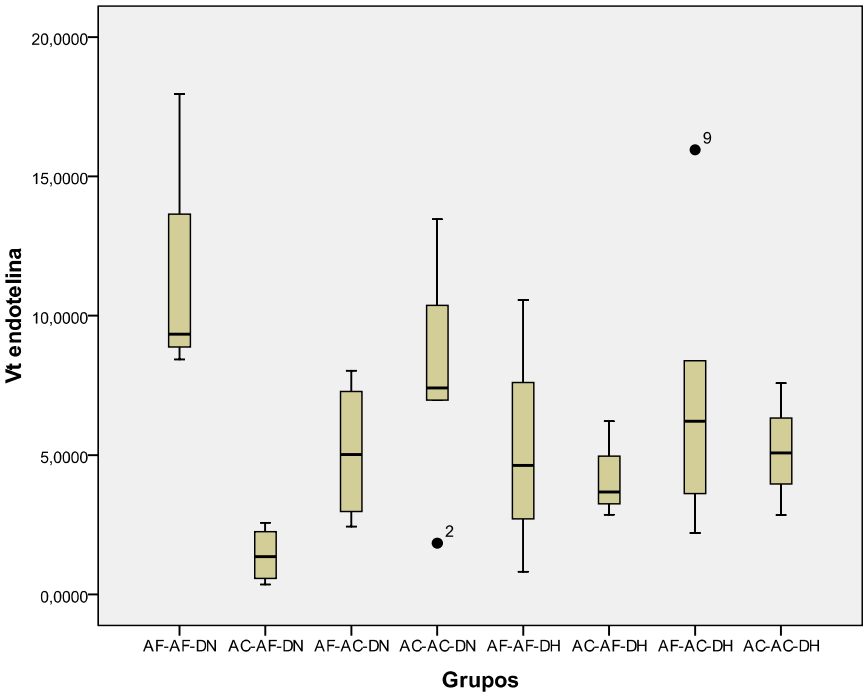


Figura 25: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - Endotelina

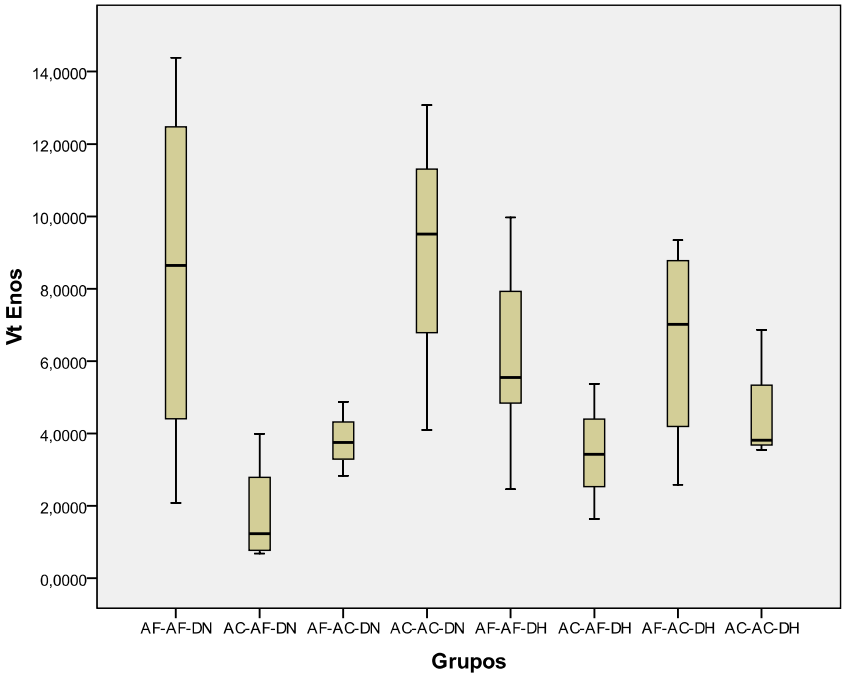


Figura 26: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - E-Nos

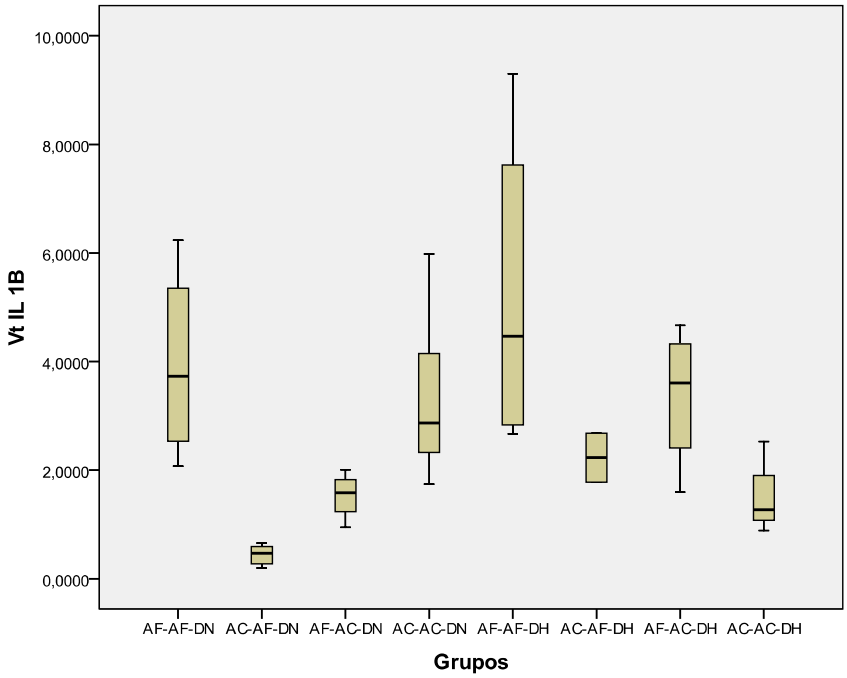


Figura 27: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - IL1B

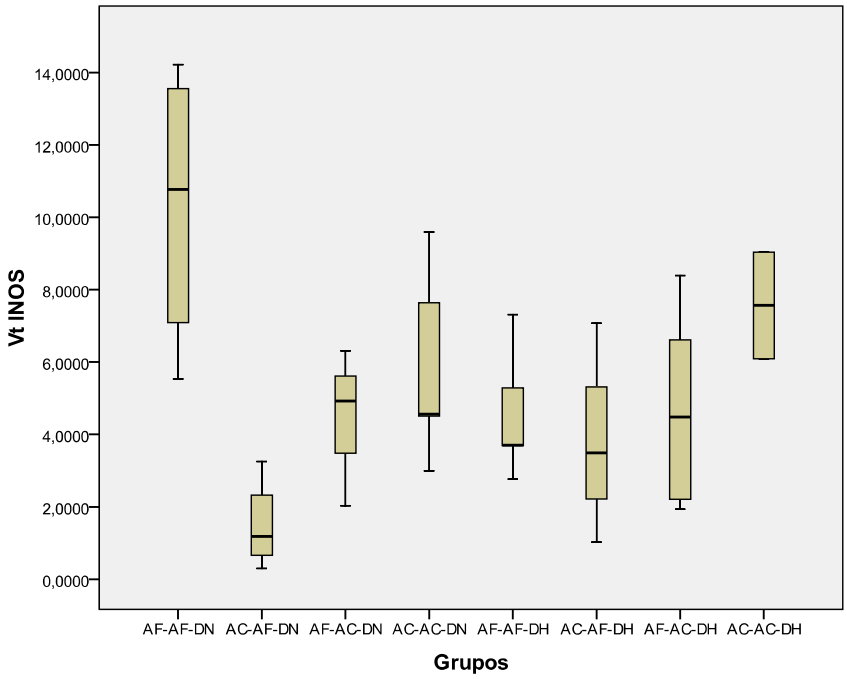


Figura 28: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - INOS

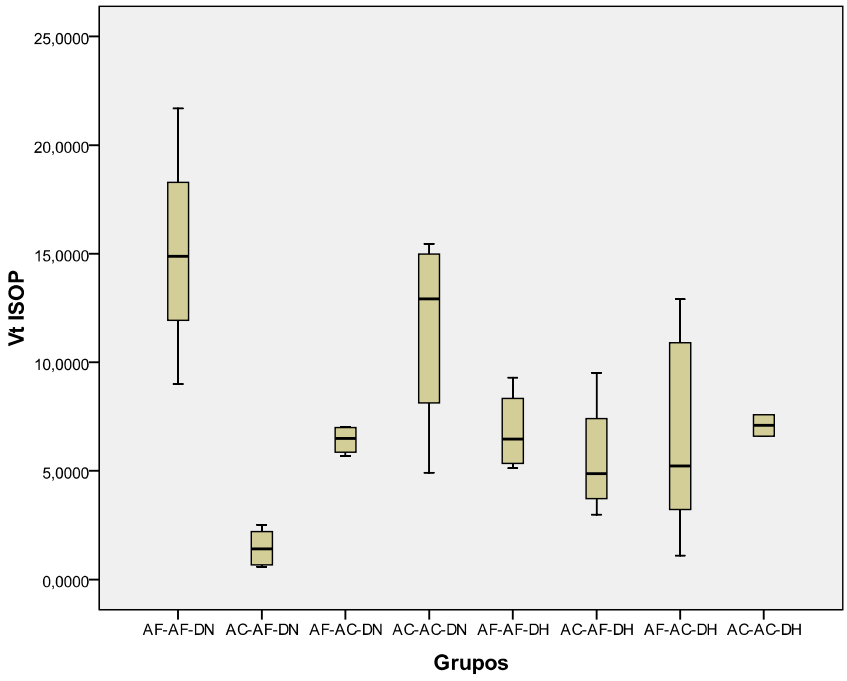


Figura 29: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - ISOP

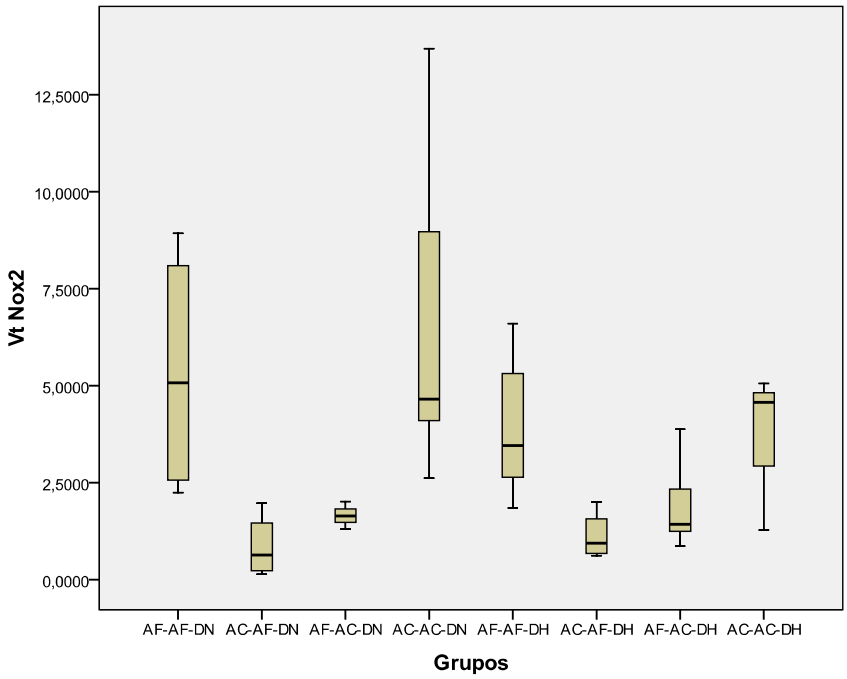


Figura 30: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - NOX2

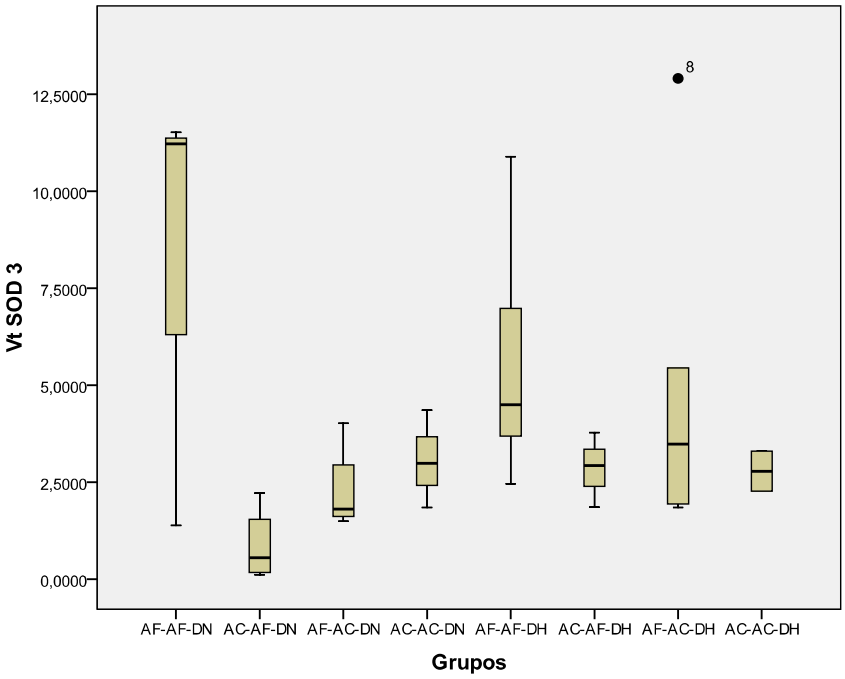


Figura 31: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - SOD3

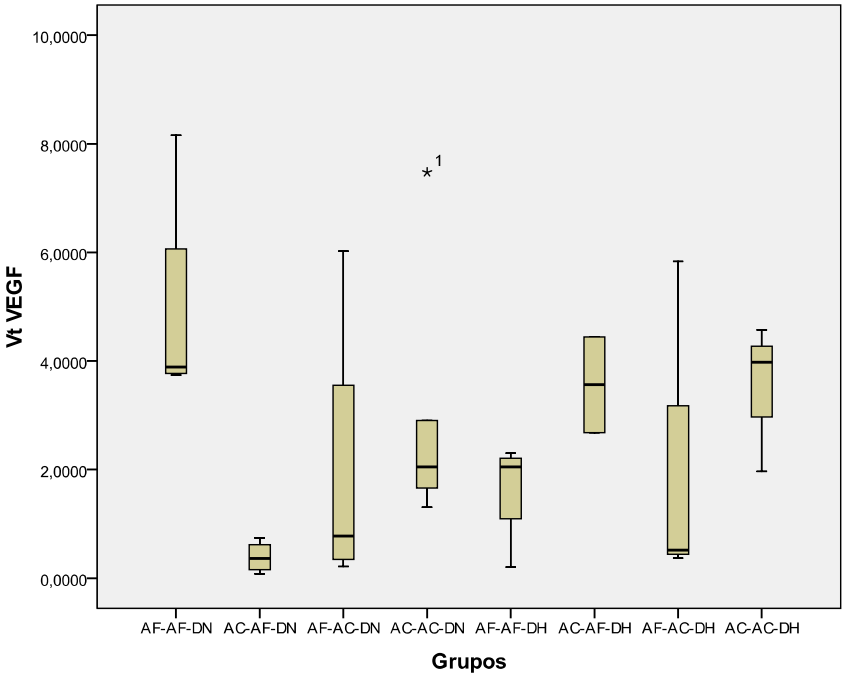


Figura 32: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - VEGF

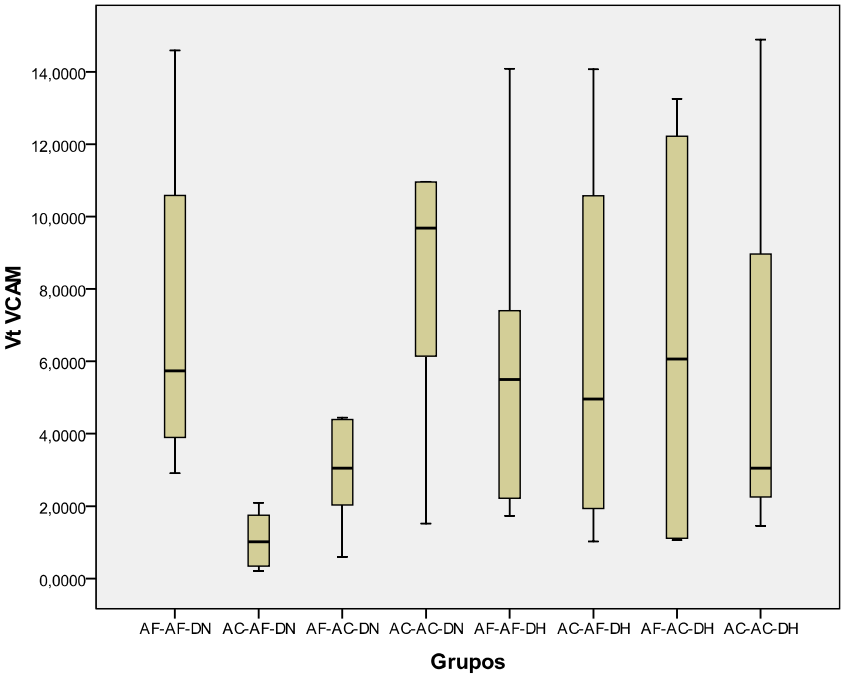


Figura 33: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - VCAM

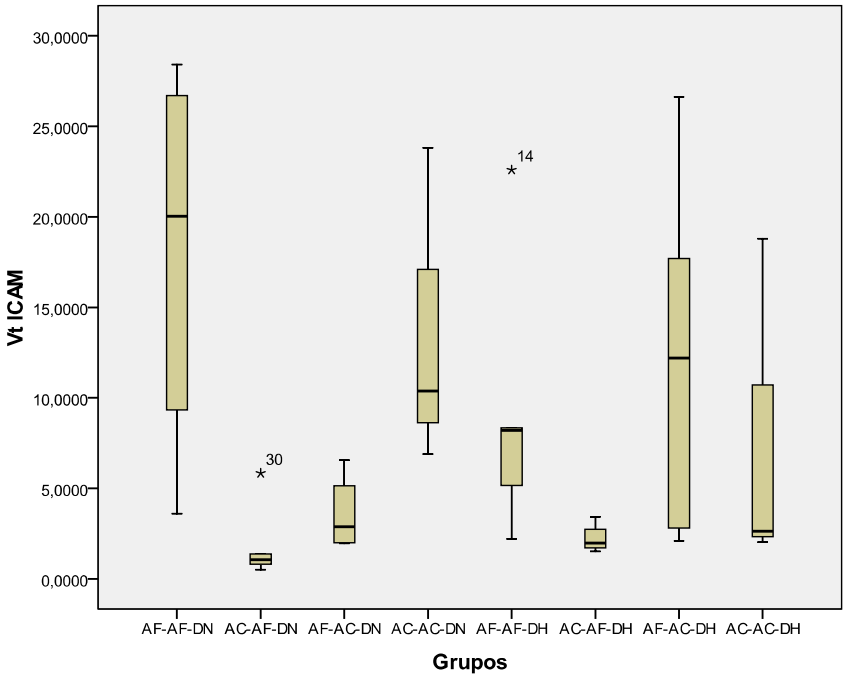


Figura 34: Gráfico demonstrando a ativação endotelial - ICAM

8. DISCUSSÃO

Camundongos knockouts para o receptor de LDL (LDLr-/-) tem sido muito usados como modelo para investigar mecanismos envolvidos com metabolismo lipídico e um modelo in vivo de aterosclerose (Ying et al., 2010). Uma das características mais marcantes deste modelo é apresentar níveis de colesterol no plasma (cerca de 5nmol/L nos knockouts e 2nmol/L nos selvagens) ligeiramente aumentados quando em dieta normal, e desenvolvem aterosclerose lentamente.

Quando alimentados com dieta hipercolesterolêmica, eles apresentam elevação de colesterol (>25 nmol/L), rápido desenvolvimento de aterosclerose (Zadelaaret al, 2007), inflamação e danos hepáticos a longo prazo devido ao aumento da sensibilidade para a absorção de LDL oxidada (Bieghs et al., 2012). Quando alimentado com dieta Western (rica em gorduras, pobre em fibras) podem desenvolver diabetes e obesidade (MacDonald et al., 2008).

Neste trabalho, animais geneticamente modificados para o receptor de LDL (LDLr-/-) foram expostos por longos períodos a níveis ambientais de particulado urbano de São Paulo. Uma parte dos animais recebeu dieta hipergordurosa, que leva a hipercolesterolemia e a aparição de alterações estruturais relacionadas a aterosclerose neste modelo. Associou-se a exposição ambiental a particulados urbanos por períodos distintos: no período gestacional e na fase já adulta (de 30 dias a 1 ano de vida). Além dos desfechos gestacionais, o objetivo foi checar se a associação da inflamação sistêmica associada á hipercolesterolemia e a exposição crônica ao particulado urbano levariam a disfunção endotelial de vasos pulmonares.

Observou-se que a exposição materna durante a gestação ao particulado urbano se mostrou associada ao baixo peso ao nascer (Veras et al, 2008; Veras et al, 2009), animais expostos apresentam uma redução de 8-10% no peso. Uma alteração no desenvolvimento normal da placenta parece estar associada a este efeito (Veras et al; 2008); Neste estudo, além do peso ao nascer, o desenvolvimento da prole foi acompanhado com base no ganho de peso até completar 30 dias de vida; nenhum estudo anterior

realizou tal acompanhamento; e o que observamos foi que por volta do 15º dia de vida o peso médio dos filhotes se equipara. Entretanto, as exposições aos particulados foram interrompidas do dia do nascimento ao 30º dia de vida, fato este que pode ter contribuído para que o peso se equiparasse.

Ao contrário do descrito anteriormente em camundongos sem alterações genéticas (Lichtenfels et al., 2007), neste modelo não foi observado nenhuma alteração na razão sexual da prole associada à exposição gestacional ao PM2.5.

Ao iniciarem as exposições durante a fase pós-natal alguns grupos apresentaram uma redução no ganho de peso mesmo antes do início da dieta, esta redução foi mais significativa quando os animais também haviam sido expostos durante o período gestacional.

A introdução da dieta provocou uma redução acentuada no peso dos animais, provavelmente no início isto ocorreu devido à queda no consumo de ração e adaptação dos animais ao novo paladar. Após o segundo mês de consumo desta dieta, o peso destes animais se manteve constante até o final do estudo.

Um estudo realizado por Buettner et al. (2006) com ratos normais e dieta rica em gordura, mostrou que embora haja um consumo calórico maior, os animais mantém ou perdem peso, assim como observamos neste estudo.

Existem evidências em humanos que a exposição ao PM2.5 altera o perfil lipídico sérico, sendo um provável potencializador da aterosclerose. Huang et al. (2012) mostraram que indivíduos expostos por 2 horas ao material particulado fino (PM2,5) apresentaram aumento significativo nos níveis de HDL sérico uma hora após o término da exposição. A quantificação dos níveis de triglicerídeos e colesterol no fígado, foram realizadas segundo método descrito por Carr, et al., (1993) onde as amostras de tecidos do fígado foram solubilizadas em água com adição de Triton X-100. Este método tem a vantagem de medição das classes de lipídeos a partir de uma única amostra, além disso, pode ser adaptado para ser utilizado com placas de micro titulação que conservam a amostra e o reagente.

Animais LDLr -/- submetidos uma dieta hipergordurosa apresentam níveis de colesterol e triglicérides mais elevados quando comparados aos animais não nocautes (Bieghs, et al.; 2012). Os resultados do presente estudo mostraram que entre os grupos que receberam a dieta hipergordurosa houve um aumento significativo nos níveis de colesterol, sem aumento significativo do aumento de triglicérides. Neste estudo, a exposição ao PM2.5 não mostrou afetar os níveis de colesterol nem de triglicérides no fígado. Por motivos técnicos, não foi possível realizar a análise sérica do colesterol e frações.

Previamente, Soares e colaboradores mostraram que animais LDLr -/- expostos a poluição ambiental por 4 meses em câmaras de topo aberto e submetidos a dieta aterogênica também não evidenciaram diferenças no nível de colesterol sérico (Soares et.al, 2009). No entanto, os autores mostraram que animais expostos ao particulado ambiental tinham níveis aumentados de anti-oxLDL, uma forma alterada do LDL quando exposta a radicais livres. Este anticorpo está relacionado com a patogênese da aterosclerose. Por não dispor das amostras de soro destes animais, não foi possível comparar os resultados deste estudo com estudos semelhantes, representando uma importante limitação.

Poucos estudos analisaram a influência da poluição sobre o tecido pulmonar em situações de hiperlipidemia. Existem evidências que a inalação aguda de particulados leva à liberação pulmonar de elementos pró-oxidativos, pró-inflamatórios e/ou vasoativos, como a endotelina. Estudos agudos em animais também sugerem que a inalação a PM leva a ativação plaquetária e liberação de enzimas de coagulação. Seria possível que a interação da hiperlipidemia, que também gera inflamação sistêmica em algum grau de disfunção endotelial em vasos pulmonares, leve ao aumento da expressão de moléculas de adesão, endotelina ou componentes associados ao estresse oxidativo.

Os poucos estudos existentes indicam que a hipercolesterolemia pode causar lesões inflamatórias e estruturais nos pulmões. Naura et al demonstraram que em animais ApoE, a dieta hipercolesterolêmica leva a

elevação de várias citocinas no BAL, além de aumento de deposição de fibrose em região perivascular e peribronquiolar. Duan et al (2010) demonstraram que em coelhos (não transgênicos) hipercolesterolêmicos havia aumento de IL-6 no BALF, associado a remodelamento vascular.

Este é o primeiro estudo a investigar alterações vasculares pulmonares em modelos de hipercolesterolemia ligado a poluição. Nos animais submetidos a dieta aterogênica havia aumento significativo do volume pulmonar. Outros autores já descreveram aumento do volume pulmonar em animais knockouts para ApoE. Este fato pode estar relacionado com o desenvolvimento pulmonar comprometido, como já demonstrado na linhagem de camundongos knockouts ApoE, (Massaro e Massaro, 2011). O estudo realizado por Duan et al (2010) mostrou que coelhos alimentados com dieta hipercolesterolêmica apresentaram aumento no volume pulmonar, espessamento dos septos alveolares e infiltração de células inflamatórias (principalmente linfócitos). Este é o primeiro estudo que mostra alterações de volume pulmonar em animais LDLr-/-. O efeito da poluição não parece ter influenciado os parâmetros de volume pulmonar

Neste estudo foi demonstrado que a dieta hipergordurosa associou-se ao aumento de IL6 no BAL, não havendo efeito da exposição ao particulado. Não observou-se alterações de TNF alpha em nenhum dos grupos.

Estudos anteriores mostraram que a exposição à poluição do ar aumenta as expressões de proteínas envolvidas em processos inflamatórios, disfunção endotelial e estresse oxidativo (Brook et.al, 2010). Os dados deste estudo mostram que as expressões proteicas de ICAM, VCAM, endotelina, SOD3, NOX2, VEGF, IL 1β, INOS, ENOS e isoprostano foram menores em todos os grupos em comparação ao grupo não exposto a poluição e com dieta habitual. Uma das hipóteses para este acontecimento é uma resposta adaptativa ao longo período de exposição à poluição do ar ou um contrabalanço dos mecanismos de homeostasia sobre os efeitos da exposição (Rowan-Carroll et al., 2013; Maresh et al., 2011). Rowan-Carroll et al. (2013) verificaram que camundongos expostos a poluição atmosférica por 16 semanas apresentam um aumento na expressão de genes envolvidos na

síntese lipídica no tecido pulmonar, o que sugere um aumento na síntese de gotículas lipídicas nas células do pulmão após a exposição. Estas gotículas parecem desempenhar o papel de capturar partículas e substâncias tóxicas até elas poderem ser removidas pelos mecanismos de degradação e, portanto proteger a célula de mais danos.

9. CONCLUSÃO

A exposição a poluição atmosférica somada a uma dieta hipercolesterolêmica, foi capaz de apontar resultados constatadores sobre os efeitos do material particulado associados a indução de uma dieta rica em gordura em camundongos C57BL6 knockout para receptor de LDL:

- Baixo peso no nascimento da prole;
- Redução de ganho de peso após o início da introdução a dieta hipercolesterolêmica.
- Aumento significativo dos níveis de colesterol e triglicérides associados a dieta quando comparados a animais não knockouts.
- Aumento de IL6 no lavado broncolaveolar também relacionados a dieta.
- Aumento no volume pulmonar quando relacionados a dieta hipercolesterolêmica.
- Diminuição da expressão endotelial de proteínas, contrariando a tendência deste modelo.

À luz destes resultados, instiga-se a pesquisa e inserção de novas variáveis, uma vez que a exposição a poluição, seguida de dieta diferenciada, sugerem que o organismo resiste a condições menos favoráveis, criando a oportunidade para a continuar testando os limites da sobrevivência.

10. REFERÊNCIAS

Alexeeff, SE; Coull B.A.; Gryparis A. Medium-term exposure to traffic-related air pollution and markers of inflammation and endothelial function. *Environ Health Perspect*. 2011. v.119: p.481– 486.

Amy RWM, Bowes D, Burri PH, Haines J, Thurlbeck WM. Postnatal growth of the mouse lung. J. Anat. 1977. v.124(1): p.131-151.

Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, Mulder A, Gomes HA, Fernezlian SM, James A, Mauad T. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. Eur. Respir J. 2008. v.32: p.61-69

Arbex MA, Böhm GM, Saldiva PH, Conceição GM, Pope AC 3rd, Braga AL. Assessment of the effects of sugar cane plantation burning on daily counts of inhalation therapy, 2000.

Arquivo Brasileiro de Cardiologia - v.69 n.2 - São Paulo, 1997.

Baird, C. *Química Ambiental.* 2ª edição, Editora Bookman, Porto Alegre, 2002.

Batalha JR, Guimarães ET, Lobo DJ, Lichtenfels AJ, Deur T, Carvalho HA, Alves ES, Domingos M, Rodrigues GS, Saldiva PH. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the Tradescantia micronuclei assay, São Paulo, 1999.

Batalha JR, Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Koutrakis P, Godleski JJ. Concentrated ambient air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. Environ Health Perspect. 2002.

Ballester F, Corella D, Perez-Hoyos S, et al. Air pollution and mortality in Valencia, Spain: a study using the APHEA methodology. J Epidemiol Community Health 1996. v.50: p. 527–33.

Barker DJP. The fetal and infant origins of diasease. Europen Journal of Clinical Investigation, 1995. v.25: p.457 - 463.

Bauer, M; Moebus, S; Möhlenkamp, S; Dragano, N; Nonnemacher, M; Fuchsluger, M; Kessler, C; Jakobs, H; Memmesheimer, M; Erbel, R; Jöckel, K-H; Hoffmann, B; on behalf of the HNR Study Investigative Group. Urban Particulate Matter Air Pollution Is Associated With Subclinical Atherosclerosis, 2010.

Bieghs V, Van Gorp PJ, Wouters K, Hendrikx T, Gijbels MJ, et al. LDL Receptor Knock-Out Mice Are a Physiological Model Particularly Vulnerable to Study the Onset of Inflammation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. PLoS, v.7, n.1, 2012.

Bell ML, Ebisu K, Peng RD, Dominici F. Adverse health effects of particulate air pollution: modification by air conditioning. Epidemiology. 2009 Sep. v. 20(5): p. 682-6.

Bobak M, Leon DA. Air pollution and infant mortality in the Czech Republic, 1986–88. Lancet 1992. v.340: p. 1010–14.

Böhm GM, Saldiva PH, Pasqualucci CA, Massad E, Martins Mde E, Zin WA, Cardoso WV, Criado PM, Komatsuzaki M, Sakae RS, et al. Biological effects of air pollution in São Paulo and Cubatão. Environ Res. 1989.

Braga ALF, Zanobetti A, Schwartz J. The lag structure between particulate air pollution and respiratory and cardiovascular deaths in 10 US cities. J Occup Environ Med 200.

Brook, R. D., B. Franklin, W. Cascio, Y. Hong, G. Howard, M. Lipsett et al. "Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association." Circulation 109(2004): 2655-71.

Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA III, et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: an update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2010. v.121: p.2331–2378.

Brook, R.D. Cardiovascular effects of air pollution. Clinical Science, 2008. v.115 p.175-187.

Buettner R, Parhofer KG, Woenckahaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC. Defining hight-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. Journal of Molecular Endocrinology 2006. v.36: p.485-501.

Cadle, S.H.; Mulawa, P.H.; Ball, J.; Donase, C.; Weibel, A.; Sagebiel, J.C.; Knapp, K.; Snow, R. Particulate Emission Rates from In-Use High-Emitting Vehicles Recruited in Orange County, California. Environ Sci Tecnol.; 1997. v. 31(12): p.3405-12

Cançado, J.E.D.; Braga, A.; Pereira, L.A.A.; Arbex, M. A.; Saldiva, P.H.N.; Santos, U.P.. Repercussões clínicas da exposição à poluição atmosférica. J Bras Pneumol. 2006. v.32(Supl 1): p. S5-S11.

Carr, T.P.; Andersen, C.J.; Rudel, L.L. Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. Clin.Biochem. v.26: p. 39-42,1993.

Cetesb. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2008/CETESB-São Paulo: CETESB, 2009 Série Relatórios/CETESB, ISSN 0103-4103. 290p.:il.Color.

Cetesb. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo, 2010/CETESB. - São Paulo: CETESB, 2011. Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103. 67p.:il.color.

Cetesb. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo 2011/CETESB. - São Paulo: CETESB, 2012. Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103. 37-40p

Chuang KJ, Chan CC, Su TC, Lee CT, Tang CS. The effect of urban air pollution on inflammation, oxidative stress, coagulation, and autonomic dysfunction in young adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007. v.176: p.370–376.

Colombini, MP Air pollution and its impact on the cardiovascular system. Revendo Ciências Básicas, São Paulo 2008. 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.v.153: p.3–50.

CONAMA nº. 418 de 25 de Novembro de 2009. Disponível em :http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=618. Acesso em 20 de março de 2013.

Controlar - Programa de Inspeção e Manutenção de Veículos em Uso. 2010.http://www.controlar.com.br/OPrograma_SobreOPrograma.aspx. Acesso em 20 de março de 2013.

Costa NSX, Ribeiro Jr. G, Alemany AAS, Castro KR, Saldiva PHN, Dolhnikoff M, Veras MM. Murine fetal lung development is impared by maternal pregestacional and gestacional exposure to particulate urban air pollution. 4th Symposium of the Latin American Society of Toxicologic Pathology: a panoramic view of toxicologic pathology, 2012.

Courtois, A.; Andujar, P.; Ladeiro, Y.; Baudrimont, I.; Delannoy, E.; Leblais, V.; Begueret, H.; Galland, M.A.B.; Brochand, P.; Marano, F. Impairament of NO – dependent relaxation in intralobar pulmonary arteries: comparison or urban particulate matter and manufactured nanoparticles. Environmental Health Perspectives. 2008. v. 116, Nº 10, p. 294-1299.

Datasus - Caderno de Informação de Saúde - Brasil - 2009 a junho de 2010. Disponível em http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?acao=11&id=24170. Acesso em 07 de abril de 2013.

Daugherty, A. Mouse models of atherosclerosis. *American Journal of the Medical Sciences*, v. 323, p.3-10, 2002.

Dockery, D.W. Epidemiologic Evidence of Cardiovascular Effects of Particulate Air Pollution. 2001.

Donaldson K, Stone V, Seaton A, MacNee W. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: Potential mechanisms. Environmental Health Perspectives. 2001; 109:523–527.

Dominici, F.; Peng, R.D.; Bell, M.L.; Pham, L.; McDermott, A.; Zeger, S.L.; Samet, J.M. Fine Particulate Air Pollution and Hospital Admission for Cardiovascular and Respiratory Diseases. JAMA. 2006;295:1127-1134

Duan, S.; Zhang, Y.; Wu, S.; Jiang, L.; Zhang, J.; Gan,Y.; Chen, P.; Zhao, .S. and Li, G. Atorvastatin attenuates inflammatory infiltration and vascular remodeling in lung of hypercholesterolemia rabbits. Experimental Lung Research, v.36, p.573–592, 2010

Dubowsky SD, Suh H, Schwartz J, Coull BA, Gold DR. Diabetes, obesity, and hypertension may enhance associations between air pollution and markers of systemic inflammation. Environmental Health Perspectives. 2006. v.114(7): p.992–998.

Fazio, S.; Linton, M.F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front Biosci.* v.6, p.D515-525, 2001.

Hansson, G.K. (2005) Mechanisms of disease: inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. The New England Journal of Medicine, 352 (16): 1685 – 1695.

Gemma Vilahur,1, 2 Teresa Padro,1, 2 and Lina Badimon1, 2, 3. Atherosclerosis and Thrombosis: Insights from Large Animal Models. Journal of Biomedicine and Biotechnology v.1 2011, Article ID 907575, 12 pages.

Glass,CK; Witztum, JL. Atherosclerosis: The Road Ahead - Review. Specialized Center of Research on Molecular Medicine and Atherosclerosis. Department of Medicine - Division of Endocrinology and Metabolism - Department of Cellular and Molecular Medicine - University of California, San Diego 9500 Gilman Drive - La Jolla, California 92093.

Gouveia, N.; Freitas, C.U.; Martins, L.C.; Marcílio, I.O. Hospitalizações por causa respiratórias e cardiovasculares associadas à contaminação atmosférica no Município de São Paulo, Brasil. Cad.Saúde Públlica, Rio de Janeiro, 2006. v.22(12): p.2669-2677.

Han,S.G; Howatt, D.A.; Daugherty, A.; Gairola, C.Gray. Atherogenic and pulmonary responses of ApoE- and LDL receptor-deficient mice to sidestream cigarette smoke. 2012.

Hoffmann B, Moebus S, Mo¨ hlenkamp S, et al., Heinz Nixdorf Recall Study Investigative Group. Residential exposure to traffic is associated with coronary atherosclerosis. Circulation 2007. v.116:p.489–496.

Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M, Weibel E. 2010. An Official Research Policy Statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for Quantitative Assessment of Lung Structure. Am J Respir Crit Care Med v.181:p.394-418.

Huang, Y.C. T.; Rappold, A.G., Graff, D.W.; Ghio, A.J., and Devlin, R.B. Synergistic effects of exposure to concentrated ambient fine pollution particles and nitrogen dioxide in humans
Inhalation Toxicology, 2012. v.24(12): p. 790–797

Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation*. 1997. v.96:p.4219–4225.

Kaufman JD. Does air pollution accelerate progression of atherosclerosis? J Am Coll Cardiol. 2010. v.56(22): p.1809–1811.

Khan ZA, Chakrabarti S (2007) Cellular signaling and potential new treatment targets in diabetic retinopathy. Exp Diabetes Res 2007 31867.

Kunzli N, Jerrett M, Mack WJ, et al. Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. Environ Health Perspect 2005. v.113:p.201–206.

Künzli N, Jerrett M, Garcia-Esteban R, et al. Ambient air pollution and the progression of atherosclerosis in adults. PLoS ONE. 2010. v.5(2):e9096. (doi:10.1371/journal).

Lei Municipal 11.733 de 27 de março de 1995. Disponível em http://www.tjsp.j.us.br/Handlers/FileFetch.ashx?id_arquivo=19486. Acesso em 25 de março de 2013.

Lei Municipal 12.157 de 09 de agosto de 1996. Disponível em: http://www3.prefeitura.sp.gov.br/cadlem/secretarias/negocios_juridicos/cadlem/integra.asp?alt=10081996L%201215700000. Acesso em 25 de março de 2013.

Lei Municipal 12.490, de 03 de Outubro de 1997. Disponível em http://www3.prefeitura.sp.gov.br/cadlem/secretarias/negocios_juridicos/cadlem/integra.asp?alt=04101997L%20124900000. Acesso em 25 de março de 2013.

Lei Municipal 14.717 de 17 de abril de 2008. Disponível em: http://www3.prefeitura.sp.gov.br/cadlem/secretarias/negocios_juridicos/cadlem/integra.asp?alt=18042008L%201471700000. Acesso em 25 de março de 2013.

Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr et al. An Atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule in rabbit endothelium. 1993. Arterioscler Thromb v.13: p.197-204

Lichtenfels AJFC, Gomes JB; Gomes, Pieri PC, Miraglia SGEK, Hallak J, Saldiva PHN. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil American Society for Reproductive Medicine/Canadian Fertility Andrology Society—ASRM/CFAS 2005, October 15–19, 2007.

Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature Reviews*, v.407, p.233-241, 2000.
Massaro D, Massaro GD. Developmental Alveologenesis: New Roles for ApoE and LDL Receptor. 2011. v.70(5): p.458-461

M. Narayanaswamy, K. C.Wright, and K. Kandarpa, “Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research,” *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 11, no. 1, pp. 5–17, 2000.

MacDonald, M.L.E.;Singaraja, R.R.;Bissada, N.;Ruddle, P.; Watts,R.;Karasinska,J.M.;Gibson,W.T.;Fievet,C.;Vance,J.E.;Staels,B.;Hayden,M.R. Absence of stearoyl-CoA desaturase-1 ameliorates features of the metabolic syndrome in LDLR-deficient mice. Journal of Lipid Research v. 49, 2008.

Maresh, J.G; Campen, M.J.; Reed, M.D.; Darrow, A.L.; Shohet, R.V. Hypercholesterolemia potentiates aortic endothelial response to inhaled diesel exhaust. Inhalation Toxicology. v.23, n.1, p.1-10. 2011.

Massaro, D. and Massaro, G.D. Developmental Alveologenesis: New Roles for ApoE and LDL Receptor. PEDIATRIC RESEARCH. Vol. 70, No. 5, 2011

Mills NL, Törnqvist H, Gonzalez MC, Vink E, Robinson SD, Söderberg S, Boon NA, Donaldson K, Sandström T, Blomberg A, Newby DE. Ischemic and

thrombotic effects of dilute diesel-exhaust inhalation in men with coronary heart disease. N Engl J Med. 2007 Sep 13;357(11):1075-82

Mills NL, Tornqvist H, Robinson SD, et al. Air pollution and atherothrombosis. Inhalation. Toxicology. 2007; 19:81–89.

Monaci, F., Moni, F., Lanciotti, E., Grechi, D., Barglagi, R. (2000). Bio-monitoring of airborne metals in urban environments: new tracers of vehicle emission, in place of lead. Environmental Pollution v.107(3), p.321-32.

Naura, A.S; Hans, C.P.; Zerfaoui, M.; Errami, Y; Ju, J.; Kim, H.; Matrougui, K.; Kim, J.G.; Boulares, A.H. Hight-fat diet induces lung remodeling in ApoE-deficient mice: an association with an increase in circulatory and lung inflammatory factors. Laboratory Investigation, v.89, p.1243-1251, 2009.

Ngai,Y.F.; Quong,W.L.;.Glier, M.B; Glavas, M.M.; Babich, S.L.;Innis, S.M.;Kieffer, T.J.; Gibson, W.T.Ldlr/Mice Display Decreased Susceptibility toWestern-Type Diet-Induced Obesity Due to IncreasedThermogenesis. Endocrinology,v.151, n.11, p.5226 –5236, 2010.

Nawrot TS, Perez L, Ku¨ nzli N, et al. A meta-analysis finds that exposure to traffic and air pollution rank very highly as likely triggers of acute coronary events. Public health importance of triggers of myocardial infarction: a comparative risk assessment. Lancet 2011. v.377 p.732–740.

O'Neill MS, Veves A, Sarnat JA, et al. Air pollution and inflammation in type 2 diabetes: a mechanism for susceptibility. *Occup Environ Med*. 2007. v.64:p.373–379.

Osmond C, Barker DJP. Fetal, Infant and chilhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. Environ Health Perspect. 2000. v.18: p.545-553.

Pereira LA, Loomis D, Conceicao GM, et al. Association between air pollution and intrauterine mortality in Sao Paulo, Brazil. Environ Health Perspect 1998. v.106:p.325–9.

Peters A, Doring A, Wichmann HE, Koenig W. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet*. 1997. v.349:p.1582–1587.

Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. Circulation 2001. v.103:p.2810–2815.

Phalen, R.F.; Phalen, R.N. Introduction To Air Pollution Science: A Public Health Pesrpective. 2011. Jones & Barlett Learning. 1ª edição.

http://samples.jbpub.com/9780763780449/80449_Ch01_001_rev.pdf.Acesso em 06 de março de 2013.

Polichetti, G.; Coccoa, S.; Spinalia, A.; Trimarcoa, V.; Nunziatab, A. Effects of particulate matter (PM10, PM2.5 and PM1) on the cardiovascular system. Toxicology 261 (2009) 1–8

Pope CA . Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? Environ Health Perspect. 2000. Pope CA; Dockery DW. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. J Air Waste Manag Assoc. 2006 Jun;v.56(6):p.709-42.

Poppi Ré N. & Santiago-Silva M. R . Identification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Methoxylated Phenols in Wood Smoke Emitted During Production of Charcoal. Chromatographia 55 (2002) p.475-481.

R. W. Mahley, K. H. Weisgraber, and T. Innerarity, “Canine lipoproteins and atherosclerosis. II. Characterization of the plasma lipoproteins associated with atherogenic and nonatherogenic hyperlipidemia,” *Circulation Research*, vol. 35, no. 5, pp. 722–733, 1974.

Reeves PG; Nielsen FH; Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J.Nutri Nov;123(11):1939-51 (1993).

Ribeiro Jr. G, Costa NSX, Alemany AAS, Cavalcante, MF, Abdalla DSP, Saldiva PHN, Veras, MM. Influences of gestational and postnatal expousure to air pollution and hypercholesterolemic diet on atherosclerosis progression. 4th Symposium of the Latin American Society of Toxicologic Pathology: a panoramic view of toxicologic pathology, 2012.

Ritz B, Wilhelm M, Hoggatt KJ, Ghosh JK. Ambiente air pollution and preterm birth in the environment and pregnancy outcomes study at the University of California, Los Angeles. Am J Epidemiol, 2007; 166(9): p.1045-1052.

Rivero, DHRF, Sassaki C, Lorenzi, GF; Saldiva, PH. PM(2.5) Induces acute eletrocardiographic alterations in healthy rats. Environ Res. 2005 Oct 99 (2): 262-6. Epub 2005 Jan 26

Ross R. Mechanisms of disease - Atherosclerosis - An inflammatory disease. New England Journal Of Medicine. 1999; 340(2):115–126.

Rowan-Carroll, A.; Halappanavar, S.; Williams, A.; Somers, C.M.; Yauk, C.L. Mice exposed in situ to urban air pollution exhibit pulmonary alterations in gene expression in the lipid droplet synthesis pathways. Environ Mol. Mutagen. v.54,n.4,p.240 a 249. 2013.

Ruckerl R, Greven S, Ljungman P, et al. Air pollution and inflammation (interleukin-6, C-reactive protein, fibrinogen) in myocardial infarction survivors. *Environ Health Perspect*. 2007;115:1072–1080.

Ruckerl R, Ibald-Mulli A, Koenig W, et al. Air pollution and markers of inflammation and coagulation in patients with coronary heart disease. American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine. 2006; 173(4):432–441.

Saldiva PH. Air pollution in urban areas: the role of automotive emissions as a public health problem. Int J Tuberc Lung Dis. 1998.

Saldiva PH, Pope CA 3rd, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, Barone I, Bohm GM. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. Arch Environ Health. 1995 Mar-Apr;50(2):159-63.

Saldiva PH, Lichtenfels AJ, Paiva PS, Barone IA, Martins MA, Massad E, Pereira JC, Xavier VP, Singer JM, Böhm GM. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminary report. Environ Res. 1994 May;65(2):218-25.

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

Schauer, J.J., Lough, G.C., Shafer, M.M., Christensen, W.F., Arndt, M.F., DeMinter, J.T., Park, J.-S., 2006. Characterization of Metals Emitted from Motor Vehicles. Health Effect Institute.

Sioutas, C.; Koutrakis, P.; Burton, R.M. Technique to Expose Animals to Concentrated Fine Ambient Aerosols. 1995

Soares SR, Bueno-Guimarães HM, Ferreira CM, Rivero DH, De Castro I, Garcia ML, Saldiva PH. Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice in vivo. Environ Res. 2003 Jul;92(3):191-6

Soares, S.R.C; Oliveira, R.C.; Sanchez, E.R.; Catanozi, S.; Silva,L.F.F.; Mauad, T.; Gidlund, M.; Goto, H.; Garcia, M.L.B. Air pollution and antibodies against modified lipoproteins are associated with atherosclerosis and vascular remodeling in hyperlipemic mice. Atherosclerosis 207 (2009) 368–373

Sumita NM, Mendes ME, Macchione M, Guimarães ET, de Lichtenfels AJ, de Lobo DJ, Saldiva PH, Saiki M.Tradescantia pallida cv. purpurea boom in the characterization of air pollution by accumulation of trace elements. J Air Waste Manag Assoc. 2003 May;53(5):574-9.

T. Gardner and D. Johnson, “Cardiovascular system,” in *Experimental Surgery and Physiology: Induced Animal Models of Human Disease*, M. M. Swindle and R. J. Adams, Eds., pp. 74–124, Lippincott,Williams &Wilkins, Philadelphia, Pa, USA, 1988.

Thorpe, A.; Harrison, R. M. Sources and properties of non-exhaust particulate matter from road traffic: A review. Sci. Total Environ, 2008. 1;400(1-3): 270-82.

Törnqvist H, Mills NL, Gonzalez M, Miller MR, Robinson SD, Megson IL, Macnee W, Donaldson K, Söderberg S, Newby DE, Sandström T, Blomberg A. Persistent endothelial dysfunction in humans after diesel exhaust inhalation. Am J Respir Crit Care Med. 2007 Aug 15;176(4):395-400. Epub 2007 Apr 19.

Veras MM. Efeitos da poluição do ar da cidade de São Paulo sobre o processo reprodutivo de camundongos com ênfase no desenvolvimento da placenta e cordão umbilical. Tese de Doutorado. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP, 2008.

Verhoeff AP, Hoek G, Schwartz J, et al. Air pollution and daily mortality in Amsterdam. Epidemiology 1996;7:225–30.

Wang, J.; Xie, P.; Kettrup, A.; Schramm, K.W. Inhibition of progesterone receptor activity in recombinant yeast by soot from fossil fuel combustion emissions and air particulate materials. Sci. Total Environ. 2005. Oct 15;349(1-3):120-8.

Weibel, E.R. Principles and methodos for the morphometric study of the lung and other organ. Lab.Invest. 1963; 12:31-55.

WHO - World Health Organization Centre for Health Development. Ageing. 2005 http://www.who.int/kobe_centre/ageing/en/. Acesso em 06 de março de 2013.

WHO – Particulate matter air pollution: how it harms health. 2005. Fact sheet EURO/04/05 Berlin, Copenhagen, Rome. Disponível em: http://www.chaseireland.org/Documents/WHOParticulateMatter.pdf. Acesso em 06 de março de 2013.

WHO – Health topics – Air pollution. 2011. Disponível em: http://www.who.int/topics/air_pollution/en/. Acesso em 06 de março de 2013.

Woodruff TJ, Grillo J, Schoendorf KC. The relationship between selected causes of postneonatal infant mortality and particulate air pollution in the United States. Environ Health Perspect 1997;105:608–12.

Zadelaar, S.; Kleemann, R.; Verschuren,L.; Weij,J. V.V. ;Hoorn, J.;Princen, H.M., Kooistra, T. Mouse Models for Atherosclerosis and Pharmaceutical Modifiers.ArteriosclerThrombVasc Biol. v.27, p.1706-1721, 2007.

Zeka A, Sullivan JR, Vokonas PS, Sparrow D, Schwartz J. Inflammatory markers and particulate air pollution: characterizing the pathway to disease. *Int J Epidemiol*. 2006;35:1347–1354.