Fernanda Paula Roncon Santana

**Efeito da hipofunção colinérgica na mecânica e na
histopatologia pulmonar em modelo experimental de
inflamação pulmonar induzida por instilação de poluente em
camundongos**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Inflamatórios
e Alérgicos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Máximo Prado

**São Paulo
2014**

Fernanda Paula Roncon Santana

**Efeito da hipofunção colinérgica na mecânica e na
histopatologia pulmonar em modelo experimental de
inflamação pulmonar induzida por instilação de poluente em
camundongos**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Inflamatórios
e Alérgicos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Máximo Prado

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor
Versão corrigida - original se encontra disponível na FMUSP

Santana, Fernanda Paula Roncon

Efeito da hipofunção colinérgica na mecânica e na histopatologia pulmonar em modelo experimental de inflamação pulmonar induzida por instilação de poluente em camundongos / Fernanda Paula Roncon Santana. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciência Médicas. Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientadora: Carla Máximo Prado.

Descritores: 1.Acetilcolina 2.Proteínas vesiculares de transporte de acetilcolina 3.Inflamação experimental dos pulmões 4.Mediadores da inflamação 5.Poluição do ar 6.Emissões de veículos 7.Camundongos

USP/FM/DBD-270/14

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a três pessoas que me inspiraram:

Aos meus pais, Carla Fernanda e José Carlos, que sempre me apoiaram, acreditando na minha capacidade e que fizeram com que eu nunca desistisse.

Ao meu namorado e amigo Renato, que me ajudou a concretizar este trabalho, me dando força e apoio em toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Escrever uma dissertação de Mestrado é uma experiência única e enriquecedora. Estamos sempre em uma constante busca: estudando, modificando, conhecendo novas técnicas e criando protocolos novos na procura de uma resposta. E essas tentativas, mesmo que às vezes falhas, nos tornam “pesquisadores”. Para aqueles que vivenciaram, parece um trabalho interminável, que só se torna realizável graças à diversas pessoas que participam, diretamente ou indiretamente. E a essas pessoas que gostaria de agradecer:

À Profª. Carla Máximo Prado, por essa grande oportunidade. Sempre muito acolhedora, às vezes até mesmo uma mãe dando “broncas” e conselhos. Muito obrigada pela sua orientação, paciência e por ter confiado em mim para realizarmos esse projeto. Admiro muito como pessoa, orientadora, professora e mãe.

À Nathalia M. Pinheiro, que além de termos a mesma orientadora, fazermos aniversário no mesmo dia, e brigarmos para ver quem é a mais teimosa, se tornou uma grande amiga e companheira de experimentos. Já te vejo como uma grande pesquisadora na qual gostaria de colaborar. Obrigada por toda ajuda, ensinamentos e principalmente por me apresentar à Carla.

À Márcia Bittercourt, por cuidar dos meus animais e sempre disposta a ajudar, mesmo nos pós-plantões. Sua força de vontade me estimula a ser como você.

À Mariana Guerreiro, por ajudar nos experimentos e nos blocos de parafina. Seu sobrenome faz jus a sua pessoa, sempre disciplinada e a mais organizada, veio para dar uma ordem no laboratório.

À Rosana Banzato, pela ajuda e disposição. Se eu te ajudei no segundo tempo você veio nos pênaltis para conseguirmos finalizar este trabalho.

Às alunas de IC, Carol Tavares e Tarsila Falcone, que me ajudaram no momento mais crucial e foram de extrema importância. Enfim, agradeço a todas as alunas da Carla, pelas risadas e companhia, que transformam o dia a dia do laboratório muito mais agradável e divertido.

Aos meus pais, Carla e José Carlos, por serem o meu ponto seguro. Obrigada pelo amor incondicional.

Ao Renato, meu namorado, por vivenciar todos os momentos de alegria e de tristeza de experimentos bem ou mal sucedidos. E por estar sempre do meu lado. Obrigada por ser meu companheiro de vida.

Ao meu primo Gustavo, pela compreensão que eu não poderia jogar vídeo game até eu terminar a minha “lição”. E a todos os meus familiares.

Às minhas amigas, Ju, Mary, e Carol, por vocês estarem sempre à disposição e proporcionando momentos de alegria e descontração. Nossas amizades de anos já as tornam como irmãs, sendo indispensáveis na minha vida. E um agradecimento especial para a Carol, por ter me apresentando a Nathy, pois se não, não estaria aqui escrevendo essas palavras.

A Fezinha e a Glaucia (Gorda), minhas amigas de faculdade, que sempre estiveram pertinho e mesmo assim só nos encontrávamos nos corredores da FMUSP e arredores, onde colocávamos o papo em dia.

Ao Prof^o. Antonio Sesso, que favoreceu meu ingresso para a pesquisa científica, dando oportunidade de aprender diversas técnicas que foram de grande utilidade.

À Prof^a Luciana Caperuto pelos ensinamentos das técnicas de Westerns Blotting. Obrigada por me acolher como uma de suas alunas e por disponibilizar seu laboratório e seu tempo. Sempre muito atenciosa a explicar e tirar dúvidas.

À Adenir Perini, companheira de mecânica onde realizou a parte mais crucial do experimento e dona de uma energia muito boa na qual adorei trabalhar.

Ao Prof^o Milton Arruda Martins, responsável pelo LIM 20, por me receber e disponibilizar o seu laboratório para este projeto.

À Prof^a Iolanda Tibério, orientadora da minha orientadora, pelo carinho e também por me tratar como uma de suas alunas, estando sempre disposta a ajudar.

À Prof^a Fernanda Arantes, pelas dúvidas e a ajuda na padronização do ELISA.

À Prof^a. Fernanda Lopes e a Sara Hamaguchi, responsáveis pelo Flexvent, que foram essenciais para os dias que esse aparelho apresentava comportamentos bipolares.

Ao Prof^o. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, por ceder a DEP para o experimento.

À Prof^a. Mariangela Macchione e a Kelly Yoshisaki, e pelos ensinamentos, dúvidas e ajuda com os resultados.

À Profª Alessandra Choqueta pela ajuda e ensinamentos com a leitura do muco.

À Profª. Suzete Cerutti, pela ajuda e disponibilidade e também pelos cafezinhos quentinhos pós-almoço.

À Fran Almeida e a Petra Mello, na qual tive a oportunidade de trabalharmos juntas em projetos paralelos e que se tornaram muito queridas.

À Clarice Olivo, Beatriz Saraiva, Rosana Paz e Edna Leick, por me ajudarem em qualquer dúvida e no que precisasse no laboratório.

Ao Davi sempre disposto a ajudar, buscar nitrogênio e pelos incentivos nas caixas intermináveis de leituras de lâminas.

Ao Luiz Afonso, responsável pelo biotério, pelos cuidados dos animais.

Ao Selmo, pelos cuidados da criação dessa linhagem um pouco difícil.

A todos os funcionários, alunos e pesquisadores do LIM 20 da FMUSP e Laboratório 22 da UNIFESP, que de alguma forma me ajudaram nessa etapa.

Agradeço a Fundação de amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projeto nº 2011/15817-7 e jovem pesquisador nº2008/55359-5, pelo apoio financeiro realizado para este projeto.

À Deus pela vida, e por estar sempre iluminando o meu caminho!!

**(...) Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador.
Tem que passar além da dor (...)**

Trecho do poema Mar Português
(Fernando Pessoa)

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Poluição Atmosférica	1
1.1.1. Partículas resultantes da combustão do diesel (DEP)	5
1.1.2. DEP x Inflamação	7
1.2. Acetilcolina e Sistema colinérgico.....	14
1.2.1. Sistema Colinérgico no Pulmão	16
1.2.2. Sistema Colinérgico Anti-inflamatório	17
1.3. Justificativa do estudo	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. MÉTODOS.....	27
3.1. Animais e Genotipagem	27
3.1.1. Teste de função motora- <i>Wire Hang</i>	28
3.1.2. Extração de RNA e transcrição reversa e quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	29
3.2. Coleta de Partículas da Exaustão do combustível Diesel.....	31
3.3. Protocolo e Grupos Experimentais	32
3.4. Avaliação da Mecânica do Sistema Respiratório.....	34

3.5.	Coleta e análise do sangue periférico.....	35
3.6.	Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar (LBA)	36
3.7.	Preparação dos tecidos para histologia e colorações.....	36
3.7.1.	Histologia do pulmão.....	37
3.7.2.	Histologia do nariz.....	37
3.7.3.	Coloração de Picro Sirius.....	39
3.7.4.	Coloração de Resorcina Fucsina Oxidada	39
3.7.5.	Coloração de PAS+AB.....	40
3.8.	Imunohistoquímica.....	40
3.9.	Análise morfométrica dos tecidos	42
3.10.	Quantificação de proteínas totais no tecido pulmonar	43
3.11.	Análise das citocinas inflamatórias por imuno-ensaio	45
3.12.	Análises estatísticas	45
4.	RESULTADOS.....	47
4.1.	Teste de função motora – Wire Hang	47
4.2.	PCR para detecção de VAcT no pulmão	47
4.3.	Avaliação da Mecânica Respiratória.....	47
4.4.	Leucócitos no sangue e LBA	50
4.5.	Citocinas inflamatórias.....	54
4.6.	Remodelamento Pulmonar	57
4.7.	Produção de muco nasal e epitelial	59
5.	DISCUSSÃO	63
6.	CONCLUSÃO	73
7.	ANEXOS	74
8.	REFERÊNCIAS.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AQCs	<i>Air quality guidelines</i>
BAFF	Fator de ativação de linfócito B
BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
CETESB	Companhia de tecnologia de saneamento ambiental
ChAT	Acetiltransferase
ChT1	Transportador de colina de alta afinidade
CNTF	Fator neurotrófico ciliar
CXCL2/MIP-2	Proteína 2 inflamatória de macrófago
CT-1	Cardiotrofina-1
DAB	3,3 Diaminobenzidine
DEP	Partícula da exaustão do diesel
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
Gtis	Resistência tecidual
Htis	Elastância tecidual
IL	Interleucina
INF	Interferon
JAK2	Janus kinase 2
KD	<i>Knock-down</i>

LBA	Lavado broncoalveolar
LIF	Fator de inibição de leucemia
LPS	Lipopolissacarídeo
LTC4	Leucotrieno C4
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
MAAs	Macrófagos alveolares
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinase de matriz
mRNA	RNA mensageiro
nAChR	Receptor nicotínico de Acetilcolina
NaCl	Cloreto de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	<i>Natural killer</i>
NP-40	Nonidet™ P 40
OPN	Osteopontina
OSM	Oncostatina M
PAF	Fator ativador plaquetário
PAS	Ácido periódico Schiff
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação de cadeia de polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PM	Material particulado
PMSF	Parametil Sulfonilfluoreto
PROCONVE	Programa de controle da poluição do ar por veículos automotores
Raw	Resistência das vias aéreas
RFO	Resorcina-Fucsina oxidativa
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	Reação de cadeia de polimerase em tempo real
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central

SNP	Sistema nervoso periférico
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TGF	Fator de crescimento transformador
TNF	Fator de necrose tumoral
VACHT	Transportador vesicular de acetilcolina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das alterações que podem ser induzidas por inalação de material particulado (PM).	5
Figura 2. Deposição do muco em camada Gel e Sol na superfície da via aérea.....	8
Figura 3. Esquema de síntese e liberação da Acetilcolina.	15
Figura 4. Esquema da ação da ACh no sistema colinérgico anti-inflamatório.	19
Figura 5 Esquematização do protocolo utilizado para a instilação de DEP ou salina.	33
Figura 6. Cortes histológicos da cavidade nasal	38
Figura 7 Efeito da deficiência colinérgica na avaliação da mecânica pulmonar quanto á resposta máxima.	49
Figura 8 Efeito da deficiência colinérgica quando á quantidade de leucócitos presentes no sangue periférico.	51
Figura 9 Efeito da deficiência colinérgica quanto à quantidade de leucócitos presentes no LBA.	53
Figura 10. Efeito da deficiência colinérgica quanto á dosagem de citocinas de perfil Th1.	55
Figura 11. Efeito da deficiência colinérgica quanto á dosagem de citocinas de perfil Th2.	56
Figura 12. Efeito da deficiência colinérgica nas fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar.	58

Figura 13. Efeito da deficiência colinérgica na produção de muco no epitélio da via aérea. 60

Figura 14. Efeito da deficiência colinérgica na produção de muco no epitélio nasal. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das citocinas pela resposta imune.....	11
Tabela 2. Classificação das citocinas por funções específicas dependendo do tipo de célula e do local de ação..	12
Tabela 3. Grupos experimentais com o número (n) de animais utilizados e divididos de acordo com sua genotipagem e exposição.	33

RESUMO

Santana FPR. Efeito da hipofunção colinérgica na mecânica e na histopatologia pulmonar em modelo experimental de inflamação pulmonar induzida por instilação de poluente em camundongos [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Os motores a diesel são bastante utilizados nos centros urbanos e sua queima é considerada um grande poluidor ambiental e tóxico para a saúde humana. Devido suas características químicas, as partículas de diesel atingem as vias aéreas mais distais, o que pode induzir inflamação pulmonar e piorar doenças como asma brônquica e enfisema pulmonar. Recentemente foi demonstrado por nosso grupo que o sistema colinérgico anti-inflamatório é um importante modulador da inflamação pulmonar. Assim, nosso objetivo no presente estudo foi avaliar se a deficiência colinérgica induzida por alteração genética para redução da expressão da proteína vesicular transportadora de acetilcolina (VACHT) interfere nas alterações funcionais e histopatológicas pulmonares em modelo experimental de instilação repetida de partículas de exaustão de diesel (DEP). Para tanto, camundongos machos geneticamente modificados para redução de VACHT foram utilizados, divididos de acordo com a genotipagem em selvagem (WT) e *knock-down* para VACHT (KD) e submetidos ao protocolo de exposição de DEP, que consistiu em instilação intranasal de 10uL de DEP na concentração de 3mg/mL por 30 dias (5x por semana). Animais dos grupos controle receberam salina seguindo mesmo

protocolo. Foram avaliados: alterações de mecânica do sistema respiratório, resposta inflamatória no lavado broncoalvelar (LBA), imunohistoquímica e Elisa para detecção de citocinas, remodelamento da matriz extracelular pulmonar e presença de muco no epitélio brônquico e nasal. Nossos resultados mostraram que animais selvagens submetidos à DEP apresentaram aumento de macrófagos no LBA e células mononucleares no sangue, da expressão de $\text{TNF-}\alpha$, IL-4, IL-6 e IL-13 no tecido pulmonar, de remodelamento de fibras colágenas no tecido e aumento na produção de muco neutro nas vias aéreas quando comparado ao controle exposto à salina. Estas alterações foram associadas a uma piora da função pulmonar. A deficiência colinérgica nos animais que foram submetidos à instilação de DEP induziu um aumento de neutrófilos e linfócitos no LBA e granulócitos no sangue, da expressão de IL-4 e $\text{TNF-}\alpha$ no pulmão e do conteúdo de fibras elásticas na parede do septo alveolar. Além disso, induziu um aumento de muco ácido no epitélio nasal. Estes dados sugerem que, pelo menos em parte, o sistema colinérgico interfere na inflamação pulmonar induzida por exposição à DEP, uma vez que animais com deficiência colinérgica apresentam piora de alguns parâmetros inflamatórios não observados ou observados em menor escala nos animais selvagens.

Descritores: Acetilcolina, Proteínas Vesiculares de Transporte de Acetilcolina, Inflamação Experimental dos Pulmões, Mediadores da Inflamação, Poluição do Ar, Emissões de veículos; Camundongos.

SUMMARY

Santana FPR. Effects of cholinergic hipofunction in lung mechanics and histopathology in an experimental model of lung inflammation induced by air pollution in mice [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Diesel automotive engines are widely used in urban centers and its exhausts is considered a major environmental and toxic pollutant to human health. Because of their chemical characteristics, diesel particulate reaches more distal airways, which can induce and worsen pulmonary inflammation diseases such as bronchial asthma and pulmonary emphysema. It has recently been demonstrated by our group that the cholinergic anti-inflammatory system is an important modulator of lung inflammation. Thus, the aim of this study was to evaluate whether the cholinergic deficiency induced by reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter protein (VACht) interferes in pulmonary function and histopathological changes in an experimental model of repeated diesel exhaust particles (DEP) instillation. To this end, male mice with reduction in VACht were used, divided according to genotyping for wild-type (WT) and knock-down for VACht (KD), and submitted to DEP exposure protocol, which consisted in intranasal instillation of 10 μ L of DEP in a concentration of 3 mg/mL for 30 days (5x per week). Control groups received saline following the same protocol. We evaluated: respiratory mechanics, inflammation in bronchoalveolar lavage (BAL), immunohistochemistry and ELISA for cytokine detection, pulmonary extracellular matrix remodeling and bronchial and nasal epithelium

mucus. Our results showed that WT animals submitted to DEP protocol showed increased macrophages in BAL and mononuclear cells in peripheral blood, increased expression of TNF- α , IL-4, IL-6 and IL-13 in lung tissue, collagen fibers remodeling in lung parenchyma and increase in neutral mucus production in the airways when compared to the saline exposed animals. These changes were associated with worse lung function. The cholinergic deficiency in the animals instilled with DEP induced an increase in BAL neutrophils and lymphocytes and granulocytes in the peripheral blood, in the expression of IL-4 and TNF- α , and in lung elastic fibers content in alveolar septa. In addition, there was an increase in acid mucus in nasal epithelium. These data suggest that, at least in part, cholinergic system interferes with pulmonary inflammation induced by DEP exposures, since animals with cholinergic deficiency exhibit some inflammatory alterations which are not observed or observed on a smaller scale in wild-type animals.

Descriptors: Acetylcholine, Vesicular acetylcholine transport proteins, Experimental lung inflammation, Inflammation mediators, Air pollution, Vehicle emissions, Mice.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Poluição Atmosférica

A poluição ambiental é considerada atualmente um dos maiores problemas de saúde pública. O ar ambiente nas áreas urbanas e industriais contém complexas misturas de contaminantes que estão nos gases e partículas presentes no ar.

A poluição atmosférica pode ser definida como mudanças da atmosfera que tenham um impacto ambiental ou de saúde humana, pela contaminação por gases, partículas sólidas, líquido em suspensão, material biológico e energia (WHO, 2008). Os poluentes atmosféricos são oriundos de fontes variáveis e são classificados de acordo com sua origem, composição química, tamanho ou forma de liberação em ambientes internos e externos (Bernstein et al., 2004).

Segundo a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2004), dentre os poluentes ambientais encontrados em áreas urbanas, destacam-se o ozônio (O_3), monóxido de carbono (CO), monóxido de nitrogênio (NO) e outros poluentes como o dióxido de enxofre (SO_2), material particulado (PM – *particulate matter*) e dióxido de nitrogênio (NO_2), sendo esses três últimos classificados como “tóxicos do ar”. A concentração dos poluentes na atmosfera varia de acordo com suas características físico-

químicas, tráfego de automotivos, sua absorção e as condições meteorológicas para dispersão das mesmas.

A dispersão desses poluentes depende de fatores como vento, precipitações, umidade relativa do ar, inversões térmicas e localização geográfica (Boubel et al., 1994). Os poluentes também podem ser classificados conforme sua ocorrência: natural ou antropogênica. As antropogênicas são provenientes principalmente da queima de combustível fóssil por veículos automotores, indústrias e usinas de geração de energia. Por outro lado, o natural refere-se a poluentes produzidos por florestas queimadas, erupções de vulcões entre outros (Hiraiwa e van Eeden, 2013).

Devido ao constante crescimento no número de veículos motorizados, os óxidos e o nitrogênio produzidos por eles têm aumentado consideravelmente, tanto que no ano de 1998 a cidade de São Paulo implantou um programa de controle de poluição de veículos automotores, o PROCONVE, na qual todos os veículos deveriam estar de acordo com o limite de emissão de gases. No entanto, a emissão de poluentes por veículos continua sendo a principal fonte de poluição atmosférica da cidade (Olmo et al., 2011).

O PM presente na poluição atmosférica consiste em uma mistura complexa de partículas sólidas e líquidas de substâncias orgânicas e inorgânicas em suspensão. O PM é um dos principais componentes formados durante a combustão do combustível fóssil e pode ser classificado em três categorias identificadas de acordo com seu diâmetro aerodinâmico: PM₁₀ grosso ou bruto (<10 µm), PM_{2,5} fino (<2,5 µm) e nano particulado ou ultrafino (<1 µm). O tamanho do PM, que é formado por partículas inaláveis, interfere no local e na

distribuição deste nas vias aéreas, podendo se depositar na porção superior (PM_{10}), ou inferior ($PM_{2,5}$) do trato respiratório (CETESB, 2014).

Embora diversas medidas estejam sendo realizadas para controlar os níveis de poluição de diversas cidades, nas últimas duas décadas, a poluição ambiental ainda tem representado um problema urbano significativo e estima-se que seja responsável por cerca de 2 milhões de mortes prematuras no mundo por ano. Foi demonstrado que a exposição persistente às partículas de poluição é um dos fatores responsáveis pelo aumento da prevalência de diversas doenças (Pope, 1989; Stenfors et al., 2004; Xu et al., 2009; Kodavanti et al., 2013).

A inalação de elevados níveis de partículas presentes na poluição do ar está associada a um declínio da função pulmonar, aumento dos sintomas respiratórios, doenças alérgicas e mortalidade em populações suscetíveis (Brunekreef e Holgate, 2002; Saldiva et al., 2002; Medeiros et al., 2004; Carvalho-Oliveira et al., 2005; Roberts et al., 2007). Ainda a inalação de PM pode provocar um significativo aumento da inflamação pulmonar, alterações das funções pulmonares e aumento da celularidade na medula óssea e dos parâmetros sanguíneos (Schwartz et al., 1994; Seaton et al., 1995; Pope, 2000; Medeiros et al., 2004).

Em 1987, a Organização Mundial da Saúde, estabeleceu um padrão de qualidade do ar a fim de reduzir os impactos da poluição que somente em 2005 atingiu um nível global. Essas diretrizes visam medir quatro dos poluentes do ar: PM, Ozônio, Dióxido de nitrogênio e de enxofre (WHO, 2008). Em muitas cidades, os níveis médios anuais de PM_{10} superam 70 mg/m^3 . Entretanto, é importante ressaltar que segundo a AQGs (*Air quality guidelines*) para evitar

problemas de saúde, a concentração de PM_{10} deve ser inferior a 20 mg/m^3 (WHO, 2008). Este dado é assustador, considerando que em muitas cidades os níveis de PM são três vezes maiores que o estimado para se evitar problemas de saúde.

A composição do PM presente na poluição atmosférica pode alterar a sua toxicidade, podendo influenciar de modo significativo à intensidade da lesão pulmonar (Brunekreef e Holgate, 2002). Estudos revelaram que moradores de centros urbanos têm deposição e retenção de PMs nos pulmões, associando-os com áreas de fibrose brônquica e hiperplasia da mucosa pulmonar (Saieg et al., 2011). Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* revelaram que a exposição de PM resulta na ativação de respostas inflamatórias e imuno-modulação de citocinas (van Eeden et al., 2001; Gao et al., 2004; Vieira et al., 2012; Saber et al., 2013). Um resumo dos efeitos da poluição no organismo podem ser observados na Figura 1. Apesar destas evidências, nem todos os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da inflamação pulmonar induzida por poluente estão totalmente esclarecidos.

Figura 1. Esquema das alterações que podem ser induzidas por inalação de material particulado (PM). Ilustração modificada de (Pope e Dockery, 2006).

1.1.1. Partículas resultantes da combustão do diesel (DEP)

As cidades metropolitanas são responsáveis pela produção de grandes quantidades de partículas provenientes da combustão de combustíveis de motores veiculares. A cidade de São Paulo conta atualmente com uma frota veicular de 14.759 ônibus movidos ao combustível diesel, sendo responsável pela maior parte do transporte público (SPTrans, 2013). Segundo a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), em 2012, na região metropolitana de São Paulo se concentrou 49% da frota do Estado, o que indica uma concentração das emissões nessa região (CETESB, 2013). Os motores a diesel emitem 100 vezes mais poluentes que os motores movidos à gasolina, porém o combustível diesel é mais utilizado nos centros urbanos por

sua robustez, eficiência, rendimento e baixo custo (Salvi et al., 1999; Riedl e Diaz-Sanchez, 2005; Riedl et al., 2012). O diesel é considerado o maior poluidor ambiental em grandes centros urbanos, sendo o poluente mais tóxico liberado pelos veículos automotivos, sendo também o maior responsável pela liberação de PM nas grandes cidades (Salvi et al., 1999).

O diesel, ao ser queimado completamente produz água (H_2O) e dióxido de carbono (CO_2), no entanto, na maioria dos veículos ocorre à combustão incompleta que resulta na formação de gases, líquidos e partículas sólidas como dióxido de enxofre (SO_2), monóxido de carbono (CO), benzeno, formaldeídos, hidrocarbonetos poliaromáticos, metais de transição e PM (Sydbom et al., 2001; Riedl e Diaz-Sanchez, 2005). São os componentes resultantes da queima incompleta do combustível que constituem a DEP (*diesel exhaust particulates*), um núcleo de carbono, hidrocarbonetos, compostos químicos e PM (Inoue et al., 2007).

As DEPs são também consideradas importantes no desencadeamento de reações inflamatórias locais e sistêmicas, pois são capazes de atingir as vias aéreas mais distais (Lehmann et al., 2008) e possuem a habilidade de reagir com as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e também de adsorver diferentes compostos químicos suspensos na atmosfera, tornando-se mais tóxicas (Zhao et al., 2009; Marchini et al., 2014).

Os centros urbanos possuem altas concentrações de partículas resultantes da combustão de diesel no ar inalado. Indivíduos saudáveis expostos à diesel exaurido podem apresentar sintomas respiratórios agudos, tais como irritação nasal e ocular, dor de cabeça, dispneia, tosse e fadiga (Sydbom et al., 2001).

1.1.2. DEP x Inflamação

1.1.2.1. Mecanismo de defesa e Produção de muco

A via respiratória é composta por cavidade nasal, faringe, laringe traqueia, brônquios, bronquíolos e alvéolos. Essa via é formada pelo epitélio respiratório, e revestida basicamente de um epitélio pseudo-estratificado, composto principalmente por células ciliadas colunares e células caliciformes, mucoprodutoras que produzem e liberam muco como defesa primária do sistema pulmonar contra um agente nocivo. Esse sistema coordenado consiste em células secretoras que liberam uma camada de muco na superfície da via aérea e em células ciliadas que impulsionam este muco e orientam seus batimentos, impedindo assim que bactérias e materiais particulados cheguem até o pulmão, sendo liberadas por deglutição ou tosse (Junqueira e Carneiro, 2004).

O muco produzido pelo sistema respiratório é então composto por glicoproteínas e dividido em duas camadas: uma camada gel (superior) fragmentada, produzida pelas células de secreção mucosa (glandulares e caliciformes), e uma camada sol (camada periciliar- inferior), contínua, produzida pelas células de secreção serosa (Pires-Neto et al., 2007) como demonstrado na Figura 2.

Figura 2. Deposição do muco em camada Gel e Sol na superfície da via aérea, onde células ciliadas impulsionam o muco para sua excreção. Ilustração modificada de (Medical Publishing, 2009).

O adequado transporte do muco depende de suas propriedades reológicas. Assim, o muco é caracterizado principalmente por mucopolissacarídeos ácidos e sulfatados, que alteram as características físico-químicas, tornando-o mais ácido. No pulmão, o aumento na quantidade de glicoproteínas ácidas no muco está relacionado ao aumento da viscosidade do mesmo, diminuindo a frequência de batimento ciliar e do transporte mucociliar, gerando uma deficiência nos mecanismos de defesa pulmonar (Holma, 1989).

Assim, maior quantidade de muco ácido dificulta a remoção e eliminação de microrganismos favorecendo a inflamação pulmonar (Saldiva, 1990). Esta alteração pode levar ainda ao aumento da resistência das vias aéreas e redução da troca gasosa, especialmente em pacientes com doenças obstrutivas, ocorrendo assim, o aumento da morbidade relacionada à doença respiratória (Wagner et al., 2001).

A cavidade nasal tem sido muito estudada em modelos de inflamação por exposição a poluentes. A exposição por um longo tempo de poluição liberada

pelos automóveis é considerada um dos principais fatores que aumenta a prevalência de doenças alérgicas nasais, aumentando a produção de muco em humanos e também em modelos experimentais (Li et al., 2003; Yoshizaki et al., 2010).

Doenças tais como bronquite crônica, bronquiectasia e fibrose cística, entre outras, assim como a exposição a poluentes alteram a composição do muco e a estrutura das vias aéreas (Macchione et al., 1995). Como consequência, pode ocorrer um aumento no número de células de secreção mucosa, diminuição do número de células serosas e ciliadas e da camada periciliar, com aumento da secreção de muco ácido.

1.1.2.2. Inflamação Pulmonar

A resposta inflamatória pulmonar associada à poluição atmosférica ocorre principalmente porque os PM menores que 10 μm são capazes de atingir os pulmões e chegar até as regiões mais distais do pulmão, os alvéolos. De acordo com (Sydbom et al., 2001), as células inflamatórias, as citocinas, quimiocinas e a expressão das moléculas de adesão na mucosa da via aérea caracterizam a resposta inflamatória imediata e crônica após exposição ao diesel exaurido. Neste sentido, (Schins et al., 2004) demonstraram que dentre os componentes orgânicos e biológicos do PM, as endotoxinas e o lipopolissacarídeo (LPS) são aqueles capazes de iniciar inflamação e ativar apoptose de macrófagos alveolares (MAs), mais do que os metais contidos no

DEP. Em contradição, (Molinelli et al., 2002) mostraram que componentes não-orgânicos presentes no PM como os metais, também estão envolvidos na patogênese das partículas que induzem uma inflamação pulmonar.

As citocinas são proteínas sintetizadas por diferentes células como mastócitos, eosinófilos, linfócitos, macrófagos, células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos, entre outras, e são moduladores importantes da inflamação, participando tanto na inflamação aguda quanto na inflamação crônica (Chung e Barnes, 1999). É possível classificar as citocinas com base no tipo de resposta imune (Tabela 1) embora as citocinas individualmente também possam executar funções específicas dependendo do tipo de célula e do local de ação (Tabela 2).

Os macrófagos são células heterogêneas e dependem do microambiente para sofrerem polarizações fenotípicas e adquirirem diferentes capacidades funcionais que culminam com a proteção, o reparo e também a lesão do tecido. Macrófagos são polarizados para o tipo M1 quando citocinas de perfil Th1 são liberadas, como interferon (IFN- γ), ou ainda quando são expostos a patógenos como bactérias (Mantovani et al., 2004). Em contraste, a indução de macrófagos do tipo 2 (M2) ocorre quando estes são expostos a interleucinas de classe Th2, como IL-4 e IL-13, ou ainda interleucinas imunoreguladoras como IL-10, conforme descrito na Tabela 1. Os macrófagos alveolares (MAs) são um dos mais potentes produtores de mediadores pró-inflamatórios nos pulmões expostos à DEP, e uma vez ativados, liberam citocinas que induzem apoptose (Huang et al., 2004), contribuem com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Hiura et al., 1999) e realizam fagocitose. A ativação de MAs e

a consequente resposta inflamatória varia de acordo com tamanho e a quantidade das partículas presentes no poluente inalado (Huang et al., 2004).

Sabe-se que a IL-6 é uma das citocinas que inicia e também é responsável pela extensão do processo inflamatório. A IL-6 é uma citocina multifuncional que é produzida por uma vasta gama de células que induz febre, ativação de linfócitos B e T, entre outras funções (Baumann et al., 1984). No pulmão, diversas células como os MAs, linfócitos, células epiteliais alveolares e células endoteliais são capazes de produzir IL-6 (Bankey et al., 1995; Frampton et al., 1999).

Tabela 1. Classificação das citocinas pela resposta imune.

	Família	Membros
Imunidade Adaptativa	Ligantes do receptor da cadeia γ comum	IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21;
	Ligantes do receptor da cadeia β (CD131)	IL-3, IL-5, GM-CSF;
	Cadeia IL-2 β compartilhada (CD1220)	IL-2, IL-15;
	Receptores compartilhados	IL-13 (IL-13R–IL-4R complexos); TSLP(TSLPR–IL-7R complexos);
Sinalização Pró-inflamatória	IL-1	IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra, IL-37 e IL-1Hy2;
	IL-6	IL-6, IL-11, IL-31, CNTF, CT-1, LIF, OPN, OSM;
Sinalização Anti-inflamatória	TNF α	TNF α , TNF β , BAFF,
	IL-17	IL-17A-F, IL-25 (IL-17E)
	Tipo I IFN	IFN α , IFN β , IFN ω , IFN κ , Limitantes;
	Tipo II IFN	IFN γ
	Tipo III IFN	IFN λ 1 (IL-29), IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B);
	IL-12	IL-12, IL-23, IL-27, IL-35;
	IL-10	IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, IL-29;

As citocinas podem ser agrupadas baseadas onde são atuadas nas células na resposta imune adaptativa, ou promover ou inibir a inflamação. Além disso, podem ser classificados também pelos receptores utilizados na sinalização. (Turner et al., 2014).

Tabela 2. Classificação das citocinas por funções específicas dependendo do tipo de célula e do local de ação.

		Principais fontes	Célula alvo	Principais funções
Citocinas	IL-1	Macrófagos, células B, células dendríticas;	Células B e T, células NK;	Pró-inflamatória, proliferação e diferenciação, proliferação de células da medula óssea, induz febre;
	IL-2	Células T;	Ativa células T e B, células NK;	Proliferação e ativação;
	IL-3	Células T;	Células Tronco	Proliferação e diferenciação de precursores hematopoéticos
	IL-4	Células T-helper	Células B e T e macrófagos;	Proliferação de células B e T citotóxicas; estimula produção de IgG e IgE e aumenta a expressão de MHC de classe II;
	IL-5	Células T-helper	Eosinófilos e células B;	Proliferação e maturação, estimula produção de IgA e IgM;
	IL-6	Células T-helper, macrófagos e fibroblastos;	Células B ativadas, Células do plasma	Diferenciação entre as células do plasma;
	IL-7	Células da estroma da medula óssea, Células epiteliais;	Células Tronco;	Fator de crescimento de células T e B;
	IL-8	Macrófagos;	Neutrófilos;	Quimiotaxia, pró-inflamatória;
	IL-9	Células T;	Células T;	Proliferação e crescimento;
	IL-10	Células T;	Células B e macrófagos;	Inibe a produção de citocinas e função das células mononucleares, antiinflamatória;
	IL-11	Células da estroma da medula óssea;	Células B;	Diferenciação, induz proteínas de fase aguda;
	IL-12 TNF α	Células T; Macrófagos Monócitos;	Células NK; Macrófagos Células tumorais	Ativa células NK; Ativação de células fagocíticas, choque endotóxico Citotoxicidade do tumor, caquexia
Interferons	INF β INF γ	Fibroblastos; Células T	Várias; Várias;	Anti-viral, anti-proliferativa; Anti-viral, ativação de macrófagos, aumento de função de neutrófilos e monócitos, expressão de MHC I e II em células;
	TNF α	Macrófagos Monócitos;	Macrófagos Células tumorais	Ativação de fagócitos, choque endotóxico; Citotoxicidade do tumor, caquexia
Fatores estimuladores de colônias	G-CSF	Fibroblastos, endotélio;	Células Tronco na medula óssea;	Produção de granulócitos;
	GM-CSF	Células T, macrófagos, fibroblastos;	Células Tronco;	Produção de granulócitos, monócitos e eosinófilos;
	M-CSF	Fibroblastos, endotélio;	Células Tronco;	Produção e ativação de monócitos;
	Eritropoetina	Fibroblastos, endotélio;	Células Tronco;	Produção de células vermelhas no sangue;
Outros	TGF β	Células T e B;	Ativação de células B e T;	Inibe proliferação de células T e B. inibe a hematopoiesis, cicatrização de feridas

Fonte: (Turner et al., 2014).

Altos níveis de TNF- α e da proteína inflamatória produzida por macrófago (CXCL2/MIP-2) também estão associados a inflamação induzida por poluente atmosféricos (Driscoll, 2000). Na poluição, os efeitos do TNF- α ainda são contraditórios. Neste sentido, Saber et al., (2013), usando animais geneticamente modificados para não expressarem TNF- α , demonstraram que esta citocina não é importante para a fase aguda da inflamação induzida por DEP.

Entretanto, foi demonstrado que TNF- α e IL-13 podem estimular células mesenquimais das vias aéreas (miofibroblastos e células de músculo liso das vias aéreas) a produzirem fatores de crescimento como TGF- β e fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), que por sua vez desempenham um papel importante no desenvolvimento de fibrose contribuindo assim com remodelamento pulmonar (Walters e Bonner, 2005).

IL-13 e IL-4 são importantes interleucinas mediadoras das respostas inflamatórias alérgicas, que induzem uma resposta Th2. Essas citocinas se encontram comumente aumentadas na asma. Diversos estudos sugerem que a exposição a poluentes como a DEP estimulam uma resposta inflamatória alérgica, elevando citocinas do tipo Th2 (Inoue et al., 2007; Riedl et al., 2012). Estudos que correlacionam a asma com a exposição a poluentes mostraram que os grupos asmáticos e expostos ao poluente tiveram uma potencialização no aumento das citocinas IL-13 e IL-4 (Yanagisawa et al., 2006).

Diversos estudos demonstraram que as partículas de poluição induzem um aumento de células inflamatórias no pulmão tanto em seres humanos como em animais (Stenfors et al., 2004; Yin et al., 2004; Manzo et al., 2012; Nemmar et

al., 2012; Brandt et al., 2013; Yanamala et al., 2013). A ativação e mobilização de células inflamatórias pelos macrófagos e a produção de mediadores inflamatórios circulantes, estimula o sistema hematopoético, resultando em uma leucocitose, caracterizando uma resposta sistêmica (Salvi et al., 1999; Yokota et al., 2008; Krishnan et al., 2013; Larsson et al., 2013). Estes achados corroboram diversos trabalhos que mostram efeitos da poluição em outros órgãos que não somente o sistema respiratório.

A resposta inflamatória induzida pela poluição é atribuída principalmente ao aumento de espécies reativas de oxigênio (Behndig et al., 2006; Manzo et al., 2012; Marchini et al., 2014). Entretanto, não está totalmente claro se outros mecanismos estão envolvidos nas alterações pulmonares oriundas da exposição a poluentes atmosféricos.

1.2. Acetilcolina e Sistema colinérgico

Acetilcolina (ACh) é uma molécula simples de amina sintetizada a partir de uma colina e uma acetil coenzima (Acetil-CoA) e é catalisada pela via enzimática da colina acetiltransferase (ChAT) que ocorre no citoplasma neuronal, sendo armazenada e liberada pelos terminais nervosos colinérgicos (Prado et al., 2002). A ACh atua como um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) e é transportada para dentro das vesículas sinápticas por meio de um transportador específico em suas membranas, o transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) (Anderson

et al., 1983; Erickson et al., 1994). A ACh é liberada por exocitose e, na fenda sináptica, estimula receptores muscarínicos e/ou nicotínicos de neurônios e também de órgãos alvos. Após a dissociação dos respectivos receptores, a ACh é hidrolisada pela ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) em colina e acetato. A colina é recaptada pelo transportador de colina de alta afinidade (ChT1) (Ribeiro et al., 2006) e reaproveitada para a síntese de uma nova molécula de ACh (Figura 3).

Figura 3. Esquema de síntese e liberação da acetilcolina. A ACh é formada a partir de uma molécula de Acetil-CoA e Colina através da ação da acetiltransferase (AChT), é transportada para a vesícula sináptica pelo transportador vesicular de acetilcolina (VAChT) e liberada para a fenda sináptica onde se liga à receptores muscarínicos ou nicotínicos. A ACh não utilizada é quebrada pela acetilcolinesterase em acetato e colina, sendo essa colina utilizada para a formação de novas moléculas de ACh. Imagem modificada de (<http://neuroanatomyblog.tumblr.com>).

O sistema colinérgico está envolvido em diversas funções fisiológicas do organismo e foi identificado como uma via que interfere na resposta inflamatória (Blalock, 2002; Tracey, 2002). Os receptores de ACh são

encontrados em neurônios e em diferentes células efetoras inervadas pelos neurônios colinérgicos e desempenham um papel na transmissão sináptica, aprendizagem e memória, regulação de ciclo do sono e função neuroendócrina. Já foi detectada a presença destes receptores em tecidos independentes das estruturas neuronais, como células epiteliais, endoteliais, placenta entre outros (Morris, 1966; Wessler et al., 1998; Grando, 2008; Improgo et al., 2011).

1.2.1. Sistema Colinérgico no Pulmão

No pulmão, a inervação colinérgica se dá pelos nervos parassimpáticos que atingem este órgão via nervo vago. O nervo vago é o décimo nervo craniano e contém fibras sensoriais (aférente) e motoras (eferente), e inervam os pulmões pela bainha carotídea, lateral à artéria carótida (Gallowitsch-Puerta e Pavlov, 2007), contendo fibras sensoriais (aférentes) e motoras (eferentes). Os nervos parassimpáticos se encontram predominantemente em vias aéreas e diminuem na periferia (Barnes et al., 1982; Leff et al., 1983), entretanto, estudos com microscopia eletrônica demonstraram que as fibras do nervo vago estão presentes no pulmão de humanos, incluindo os bronquíolos distais e alvéolos (Fox et al., 1980; Hertweck e Hung, 1980).

A estimulação nervosa parassimpática induz a liberação de acetilcolina que promove a contração da musculatura lisa traqueobrônquica e aumento da secreção de muco (Rogers, 2001). Por outro lado, a via simpática que também libera acetilcolina pelas fibras pré-ganglionares, tem como neurotransmissor

pós-ganglionar a noradrenalina, que atua no pulmão relaxando a musculatura lisa (Belmonte, 2005).

A ACh é um dos maiores reguladores da função pulmonar, sendo o transmissor dominante nos axônios pós-ganglionares parassimpáticos e um potente broncoconstritor e estimulador de secreção de muco. Além disso, a ACh também é produzida nas células epiteliais onde regula a proliferação celular, estimula a produção de citocinas e a frequência de batidas ciliares.

A detecção de componentes do sistema colinérgico, tais como a ACh, o transportador de alta afinidade (ChT1), a colina acetiltransferase, o transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), e receptores de ACh em células inflamatórias de vias aéreas sugerem uma importante participação do sistema colinérgico na fisiopatologia das doenças pulmonares (Wessler et al., 1998; Wessler e Kirkpatrick, 2001). Até o momento, as células que expressam componentes do sistema colinérgico reconhecidas no pulmão são os mastócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (Wessler et al., 2003). A produção de acetilcolina em macrófagos humanos, sugere que esta possa estar envolvida em distúrbios alérgicos, incluindo os respiratórios (Wessler et al., 1998; Lips et al., 2007).

1.2.2. Sistema Colinérgico Anti-inflamatório

O sistema colinérgico anti-inflamatório é composto pelo nervo vago aferente, o neurotransmissor ACh e a subunidade do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) (Rosas-Ballina e Tracey, 2009) e consiste em um

mecanismo neural que suprime a resposta inflamatória inata e controla a inflamação por inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias (Fodale e Santamaria, 2008), demonstrado no esquema da Figura 4. Sabe-se que o baço tem um importante papel no efeito anti-inflamatório da ACh (Huston et al., 2006). Assim, esse sistema é ativado inicialmente pela liberação local de citocinas pró-inflamatórias frente a uma lesão ou injúria de determinado tecido. Essa liberação de citocinas estimula o sistema nervoso central via nervo vago onde, por meio da VACHT, é liberado acetilcolina que faz um papel de inibidor nas citocinas pós-inflamatórias após ligar a um receptor nicotínico, principalmente o do tipo α -7 (α 7nAChR). A presença destes receptores foi inicialmente descrita em macrófagos, mas já foi observada em diversas outras células inflamatórias (Tracey, 2007).

Figura 4. Esquema da ação da ACh no sistema colinérgico anti-inflamatório. A ACh está presente no sistema colinérgico anti-inflamatório quando frente a uma injúria ou infecção, citocinas são liberadas e via nervo vago estimula a resposta de neurônios e através do nervo vago aferente é liberado ACh que se liga ao seu receptor específico, inibindo a ação da liberação das citocinas, sendo assim um efeito anti-inflamatório. Figura modificada em (Tracey, 2002).

Mais recentemente (Rosas-Ballina et al., 2011), demonstraram que células T produtoras de ACh são necessárias para inibir a produção de citocinas após a estimulação vagal e potencial de ação originários no nervo vago regulam estas células que podem produzir acetilcolina não neuronal.

A função anti-inflamatória da via colinérgica tem sido demonstrada em vários modelos experimentais em animais, incluindo endotoxemia (Wang et al., 2003), peritonite bacteriana (van Westerloo et al., 2005), pancreatite (van Westerloo et al., 2006), choque hemorrágico hipovolêmico agudo (Guarini et al., 2003), íleo (de Jonge et al., 2005), baço (Rosas-Ballina et al., 2011) e em parada cardíaca (Norman et al., 2011).

Alguns estudos sugeriram que o sistema colinérgico anti-inflamatório está envolvido na sepse e a liberação da acetilcolina atenua a produção de algumas

citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL6 e IL-8 (Bernik et al., 2002; Parrish et al., 2008; Rosas-Ballina et al., 2011). (van Westerloo et al., 2005) demonstraram em um modelo de peritonite séptica que a inibição da via colinérgica anti-inflamatória por vagotomia cervical induziu um aumento da liberação de citocinas além de um aumento do influxo de células inflamatórias para o local da infecção.

Estudos utilizando camundongos geneticamente modificados para o $\alpha 7$ nAChR, mostraram que os camundongos $\alpha 7^{KO}$ tem um aumento da resposta inflamatória caracterizada pelo aumento da liberação de TNF- α (Parrish et al., 2008; Gahring et al., 2013). Em um modelo de endotoxemia (desafio sistêmico) a ativação do receptor $\alpha 7$ nAChR por estimulação do nervo vago reduziu os níveis de TNF- α no plasma, fígado e baço, porém não nos pulmões (Huston et al., 2006).

Poucos trabalhos avaliaram os efeitos da via anti-inflamatória colinérgica no pulmão e em doenças respiratórias. Desta forma, é de grande importância entender se o sistema colinérgico anti-inflamatório está envolvido na regulação de infecções e inflamações pulmonares.

1.2.2.1. Sistema Colinérgico Anti-inflamatório no pulmão – Evidências

Considerando que poucos estudos avaliaram os efeitos do sistema colinérgico anti-inflamatório na inflamação pulmonar, os efeitos da ACh em

situações fisiopatológicas ainda são controversos, podendo estar contribuir ou suprimir a resposta inflamatória.

Utilizando ratos e camundongos com inflamação alérgica aguda de vias aéreas, (Lips et al., 2007) demonstraram que houve redução da ChAT, ChT1 e VACHT no pulmão dos animais sensibilizados e desafiados com alérgeno 24 e 48 horas após o último contato com o antígeno, sugerindo que uma redução da ACh possa estar envolvida na resposta inflamatória alérgica pulmonar.

Em uma recente revisão, (Yang et al., 2014) sugerem que durante uma inflamação pulmonar, possa haver um aumento do mRNA de CHAT o que poderia promover uma síntese alternativa de ACh dependente de $\alpha 7$ nAChR. Os autores ainda sugerem que a liberação de acetilcolina pelas terminações nervosas do nervo vago possa induzir a síntese e a secreção de ACh por células pulmonares não neuronais.

A geração de ACh neuronal ou não neuronal no pulmão pode ter efeito anti-inflamatório por inibir a atividade do NF- κ B principalmente em macrófagos alveolares que expressam o $\alpha 7$ nAChR e células pró-inflamatórias, como os neutrófilos, diminuindo a inflamação e o edema pulmonar (Su et al., 2010; Su, 2012; Yang et al., 2014).

A produção de ACh por macrófagos alveolares que expressam ChAT (Wessler et al., 1998; Wessler e Kirkpatrick, 2001) pode suprimir a resposta inflamatória observada na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Barnes, 2004; Gwilt et al., 2007). Considerando os eosinófilos, embora os efeitos diretos da ACh nestas células não tenham sido ainda descritos, sabe-se que um agonista nicotínico inibe a liberação de leucotrieno (LTC₄) e

metaloproteinase (MMP9) secretados por eosinófilos de sangue periférico estimulados por fator ativador plaquetário (PAF) (Blanchet et al., 2007). Além disso, assim como os neurônios, os linfócitos B e T expressam VACHT e estocam acetilcolina em suas vesículas (Tayebati et al., 2002).

Wessler et al., (2007) observaram uma redução significativa do conteúdo de acetilcolina tanto em vias aéreas quanto em parênquima pulmonar de pacientes portadores de fibrose cística comparativamente aos controles. Por outro lado, o aumento dos níveis teciduais de ACh pode induzir a vasodilatação com aumento da secreção mucosa e constrição das fibras musculares lisas das vias aéreas, além de ativar as células do sistema imune (Wessler e Kirkpatrick, 2001).

Animais depletados de VACHT não sobrevivem por mais de 24 horas, morrendo por insuficiência respiratória, o que sugere que a VACHT e a neurotransmissão colinérgica seja essencial para a sobrevivência (Prado et al., 2006). Desta forma, foi gerado um modelo de camundongos com disfunção colinérgica onde animais homozigotos apresentam redução de aproximadamente 70% nos níveis de VACHT; estes animais embora apresentem fenótipos específicos como insuficiência cardíaca e deficiência muscular, sobrevivem até a vida adulta e podem ser utilizados como modelo para o estudo da importância da ACh.

Resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa mostraram que os animais com deficiência colinérgica parcial apresentam inflamação pulmonar, aumento de deposição de componentes da matriz extracelular e aumento do tônus da musculatura lisa brônquica. Ao submetermos estes animais ao

protocolo de asma experimental, os animais homozigotos tiveram piora da inflamação eosinofílica associada ao edema peribrônquico, remodelamento pulmonar e hiperresponsividade brônquica, sugerindo assim que a deficiência colinérgica possa estar envolvida nas respostas inflamatórias alérgicas. Não existem trabalhos na literatura que tenham investigado os efeitos de VAcHT e do sistema colinérgico em modelo de inflamação pulmonar induzida por poluente atmosférico.

1.3. Justificativa do estudo

Considerando que a poluição atmosférica está associada a maior prevalência de doenças como asma e enfisema pulmonar e o aumento da mortalidade por doenças respiratórias e cardiovasculares, entender os mecanismos envolvidos na inflamação pulmonar induzida por poluentes é de extrema relevância. O sistema colinérgico anti-inflamatório foi descrito há alguns anos e está envolvido na resposta inflamatória em modelos de infecção sistêmica induzida por LPS. Considerando que nosso grupo demonstrou recentemente o envolvimento deste sistema na inflamação pulmonar, nossa hipótese é que a ACh poderia estar envolvida modulando a inflamação pulmonar induzida por poluentes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar se a hipofunção colinérgica interfere nas alterações pulmonares induzidas por instilação repetida de diesel.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar as alterações de mecânica do sistema respiratório
2. Avaliar a resposta inflamatória
3. Avaliar o remodelamento pulmonar

3. MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado e desenvolvido de acordo com as normas pré-estabelecidas pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq – FMUSP) sob o protocolo de número 0766/08 (Anexo 1). Os animais foram mantidos em ciclos de 12 horas de luz/escuro, em salas com temperatura controlada de 21 a 23°C e livre acesso a água e comida e foram manuseados de acordo com o “Guia de cuidados e uso de animais de laboratório” publicado pelo *National Institutes of Health* (NIH).

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Terapêutica Experimental I (LIM-20) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e no Laboratório 22 do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo Campus Diadema (UNIFESP).

3.1. Animais e Genotipagem

Foram utilizados camundongos da linhagem *Knock-down* para a proteína transportadora vesicular de acetilcolina (VACHT). Estes animais foram desenvolvidos por meio da retrocruzamento por três gerações, gerados pela segmentação 5 UTR do gene VACHT por recombinação homóloga em fundo

misto utilizando as linhagens de camundongos 129S6/SvEvTac e C5BL/6 (C57BL/6J e C57BL/6 Uni). Estes camundongos apresentam uma menor expressão da VACHT (KD) e foram desenvolvidos pelo grupo do Professor Marco Antônio M. Prado (University of Western Ontario, Canada).

Estes animais foram criados no Biotério Central da FMUSP onde foram mantidos em heterozigose e quando acasalados geravam homozigotos. Os animais KD apresentam uma redução de aproximadamente 70% da expressão de acetilcolina (Prado et al., 2006) e os animais selvagens (*Wild- types* - WT) não possuem nenhuma deficiência colinérgica.

Camundongos machos de peso médio de 20g e idade aproximada de 6-8 semanas KD e WT foram utilizados para o estudo. Para identificação, os animais foram submetidos à genotipagem de acordo com a descrição feita por (Prado et al., 2006). Esta técnica foi realizada no Biotério Central da FMUSP onde os animais foram genotipados para o início dos estudos.

3.1.1. Teste de função motora- *Wire Hang*

Este teste procura avaliar a função motora e déficit em modelos de roedores de distúrbios do sistema nervoso central (de Castro, 2006).

Foi utilizada uma grade metálica com espaçamento de 1 cm entre barras de 0,8 mm de diâmetro. Inicialmente o animal foi colocado sobre a grade, a qual foi brevemente agitada para que o animal a agarrasse. A grade foi então invertida e mantida 20 cm acima de uma caixa preenchida com maravalha,

uma altura suficiente para fazer com que o animal se mantenha agarrado à grade, mas incapaz de feri-lo durante a queda. A latência para queda foi medida com o uso de um cronômetro até 35 segundos.

Este teste é utilizado para conformar o fenótipo dos animais VACHT que, por sua redução, tem um desenvolvimento motor reduzido, não conseguindo permanecer mais que 10 segundos preso a grade (de Castro, 2006).

3.1.2. Extração de RNA e transcrição reversa e quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

Para quantificar o RNAm de VACHT no pulmão dos camundongos mutantes, foi realizada a reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia de polimerase em tempo real.

Com os animais sob efeito anestésico, o pulmão foi removido e congelado imediatamente em nitrogênio líquido e em sequência em freezer -80°C. O RNA total do pulmão foi extraído utilizando 1 mL de reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). As amostras foram rapidamente homogeneizadas em um polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, modelo PT 10/35) e transferidas para tubos *ependorf* deixando em incubação em temperatura ambiente por 5 minutos no gelo. Em seguida, os tubos são centrifugados por 10 minutos a 12000 g a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante é transferido para um novo tubo *ependorf* e adicionado 200 µL de clorofórmio (Merck); os tubos foram homogeneizados por inversão, deixados

em repouso por 3 minutos seguindo de centrifugação por 15 minutos a 12000g a 4 °C. Após essa etapa, é possível observar 3 diferentes fases: a fase aquosa onde está o RNA de interesse, a interface que contém proteínas e DNA e por último a fase com o clorofórmio e restos de tecido. A fase aquosa é transferida para um novo tubo onde são adicionados 500 µL de isopropanol (Merck) e incubado por 10 minutos após agitação rigorosa, centrifugado (10 min – 4 °C., 12000g) e descartado seu sobrenadante e o pellet resuspendido com água Millique estéril (30 µL).

A quantificação do RNA total foi determinada por um nanoespectrofotometro de comprimento de onda (260/280 nm) onde o comprimento de 260 nm refere-se a quantidade de ácido nucleico e o 280 nm refere-se a quantidade de proteína. A relação entre essas absorbâncias foi considerada boa quando estas se encontravam dentro dos valores 1,8 a 2,0. A transcrição reversa para o cDNA foi realizada utilizando o kit SuperScript III cDNA (Invitrogen Life Technologies).

A expressão gênica foi avaliada em tempo real qRT-PCR usando o Rotor Gene (Qiagen, Roermond, Netherlands) e SYBR Green como corante fluorescente (Qiagen) com GAPDH como um gene constitutivo. As condições da reação foram: 95°C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 5 segundos e 60°C por 10 segundos. Os produtos do PCR foram então submetidos a corrida em um gel de agarose para confirmar o tamanho do fragmento e a especificidade da amplificação. Os *primers* usados e a temperatura de anelamento foram para o GAPDH (5'-3' sense: CCACCACCCTGTTGCTGTAG; 5'-3' antisense: CTTGGGCTACACTGAGGACC; 60°C; NM_008084) e VACHT (5'-3' sense:

CCCTTTTGATGGCTGTG; 5'-3' antisense: GGGCTAGGGTACTCATTAGA; 60°C; NM_10167164). Os dados foram obtidos como valores do número de ciclos (EPA) (ct = número de ciclos como um logaritmo das barras de PCR calculados em cada linha) e utilizadas para determinar os valores de Δct ($\Delta ct = (ct \text{ do gene de interesse}) - (ct \text{ do gene constitutivo})$). Os valores são expressos como porcentagem do controle WT.

3.2. Coleta de Partículas da Exaustão do combustível Diesel

Partículas da exaustão do diesel (DEP) foram adquiridas por meio de um filtro acoplado ao escapamento de um ônibus circulante da cidade de São Paulo, após um dia de sua rotina de viagens em Fevereiro de 2007. Este ônibus era equipado com motor Mercedes Benz® MB 1620, 210-hp com perfil de emissão Euro III e sem injeção eletrônica.

O combustível diesel utilizado continha aproximadamente 500 ppm de enxofre e materiais particulados resultante da combustão de aproximadamente 6 a 7 μm (Yoshizaki et al., 2010). Este material foi mantido em refrigeração a -20 °C e foi cedido pelo Laboratório de Poluição Atmosférica da FMUSP (LIM-05). As características do DEP utilizado foram previamente publicadas por (Laks et al., 2008) e estão descritas no Anexo 2.

3.3. Protocolo e Grupos Experimentais

As partículas de poluição coletadas foram dissolvidas em soro fisiológico 0,09% para 3 mg/mL e mantidas em agitação magnética por 2 horas e sonicação por 30 minutos. Esse material diluído foi armazenado em alíquotas de 1 mL em freezer -20°C. A dose utilizada para este estudo prevê a mimetização de uma exposição de um indivíduo exposto por 24 horas no centro da cidade de São Paulo, em um corredor de ônibus, proporcionalmente a frequência respiratória e volume de ar para um camundongo (Yoshizaki et al., 2010).

Para este experimento foi utilizado um protocolo já estabelecido (Yoshizaki et al., 2010) onde foi aplicado por instilação intranasal, 10 µL da solução de 3 mg/mL, correspondente uma dose de 30 µg de DEP/animal, sendo este procedimento repetido por 30 dias, uma vez ao dia, 5 vezes por semana, como demonstrado no esquema abaixo (Figura 5). Para os grupos controles foi instilado salina (Soro fisiológico 0,09%) em mesmo volume e protocolo.

Figura 5 Esquematização do protocolo utilizado para a instilação de DEP ou salina. ▲ representa o período da instilação nasal de 10 μ L de DEP que ocorreu 5x/semana e † a eutanásia dos animais.

Os animais KD e WT foram então, divididos nos grupos experimentais apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Grupos experimentais com o número (n) de animais utilizados e divididos de acordo com sua genotipagem e exposição.

GRUPOS	n	VACHT	Salina	DEP30 μ g/10 μ L
WT-SAL	8	+/+	X	
KD-SAL	12	-/-	X	
WT-DEP	11	+/+		X
KD-DEP	12	-/-		X

3.4. Avaliação da Mecânica do Sistema Respiratório

Vinte e quatro horas após a última instilação de DEP ou salina, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de 0,2 mL de tiopental sódico (Thiopentax, Cristália) (50 mg/Kg) e foi realizada a traqueostomia. Após, foi inserido uma cânula adaptada em um pequeno corte realizado na traqueia, sendo fixada com fio de algodão. Os animais foram então conectados a um ventilador para pequenos animais (FlexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá) com volume corrente e frequência respiratória fixada em 10 mL/kg e 150 bpm, respectivamente. Foi realizada a dissecação da veia jugular e inserido um cateter de polietileno (BD Intramedic, New Jersey, EUA) para realização da curva dose-resposta com infusão de metacolina intravenosa nas doses de 10, 30, 100, 300, 1000 e 3000 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Os dados de mecânica respiratória foram coletados no momento zero (basal) e após 30 segundos de cada dose, tendo um intervalo de 2 minutos entre as injeções (Toledo et al., 2013).

A mecânica pulmonar oscilatória forçada (Hantos et al., 1992) foi realizada por meio da produção de oscilações de fluxo nas vias aéreas dos animais em diferentes frequências primas (variando entre 0,25 e 19,625Hz) por 16 segundos. Dados de pressão e fluxo foram obtidos e a impedância das vias aéreas foi calculada para cada frequência. Foi obtida a resistência do tecido (G_{tis}) e elastância tecidual (H_{tis}) por aplicação do modelo da mecânica oscilatória, de acordo com a seguinte equação:

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

Onde R_{aw} é a resistência de vias aéreas, I_{aw} é a inertância, G caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares, H caracteriza a energia acumulada no tecido do pulmão, i é a unidade imaginária, f é a frequência e α corresponde à:

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

Foram utilizados para análise os valores basais e da resposta máxima de cada dose de metacolina para G_{tis} e H_{tis} . Os resultados foram apresentados em resposta máxima para cada variável.

3.5. Coleta e análise do sangue periférico

Ainda sob o efeito do anestésico, após as medidas funcionais do pulmão, foi coletado através da veia cava o sangue desses animais e em seguida foram exsanguinados. Foi utilizada uma solução de líquido de Turk 1% para a contagem total de células presente no sangue coletado ainda fresco (1:20); esta contagem foi realizada por microscopia óptica com o hemocítômetro de Neubauer no aumento de 400X. Para a contagem diferencial dos leucócitos, foi efetuado o esfregaço sanguíneo e corado com kit de coloração rápida para hematologia (Instant-Prov, New-Prov, Paraná, BR). A contagem diferencial foi determinada a partir do achado de 100 leucócitos/lâmina e a diferenciação seguiu os critérios hemocitológicos para diferenciação de mononucleares e

granulócitos, com o auxílio de um microscópio óptico com objetiva de imersão (1000X) (Naoum e Naoum, 2006)

3.6. Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar (LBA)

A coleta do LBA foi realizada por meio da infusão pela cânula traqueal, utilizando uma seringa de 0,5 mL de solução salina (soro fisiológico 0,09%) por 3 vezes consecutivas, totalizando um volume de 1,5 mL. O volume recuperado foi centrifugado a 1000 rpm, a 4°C, por 20 minutos. O botão celular foi ressuspenso em 200 µL de solução salina, e seu sobrenadante imediatamente congelado em nitrogênio e armazenado a -80°C para posteriores dosagens de citocinas.

A contagem total de células foi realizada por microscopia óptica com o hemocítômetro de Neubauer em aumento de 400X. Para a contagem diferencial das células, 100 µL do LBA foram citocentrifugados à 450 rpm por 6 minutos em uma citocentrífuga (modelo Cytospin 2, shandon Instruments, Sewickley, PA) e, após seca, a lâmina foi corada com kit de coloração rápida para hematologia (Instant-Prov, New-Prov, Paraná, BR). A contagem diferencial das células foi determinada a partir do achado de no mínimo 300 leucócitos/lâmina e a diferenciação seguiu os critérios hemocitológicos para diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos com o auxílio de um microscópio óptico com objetiva de imersão (100X) (Toledo et al., 2011).

3.7. Preparação dos tecidos para histologia e colorações

3.7.1. Histologia do pulmão

Imediatamente após a coleta do LBA, a caixa torácica anterior foi aberta e o pulmão retirado em monobloco coração-pulmão. Os pulmões do lado esquerdo foram isolados, imediatamente congelados em nitrogênio e armazenados em um freezer -80°C para as análises de citocinas. Já os pulmões do lado direito foram fixados em solução de formaldeído de 10% por 24 horas e após esse período foram transferidos para uma solução de etanol 70%, em seguida foram cortados no seu maior eixo e colocados em cassetes histológicos. Em seguida, as amostras foram colocadas no processador de tecido (TP1020, Leica, Wetzlar, Alemanha) onde o tecido foi clareado e desidratado e parafinizados. Logo após, foi realizada a inclusão de parafina nesses tecidos (Inclusor de parafina - EG1150 e Placa de Gelo - EG1150H, Leica, Wetzlar, Alemanha), obtendo blocos do tecido em parafina. Para obtenção de cortes de 3 µm de espessura, foi realizado o corte histológico no micrótomo (RM-2245, Leica, Wetzlar, Alemanha). As lâminas foram submetidas à coloração com Picro Siruis , Resorcina Fucsina Oxidada (RFO), e Ácido Periódico Schiff com Azul Alciano (PAS+AB) e para imunohistoquímica (Yoshizaki et al., 2010; Toledo et al., 2013{Yoshizaki, 2010 #1}).

3.7.2. Histologia do nariz

Após a retirada do pulmão, a cabeça do animal foi removida para a dissecação do nariz, onde foi retirado o excesso de tecido e a região inferior da mandíbula. Os narizes dos animais foram fixados em solução de formaldeído 10% e após 24 horas foi realizada a sua dissecação em solução de 5% de EDTA por 14 dias (Camargo Pires-Neto et al., 2006). A cavidade nasal foi dividida em três níveis de secções transversais: Proximal, onde o corte é realizado logo após o dente incisivo superior; Medial, com o ponto do corte próximo a papila incisiva e anteriormente ao palato duro; E distal, onde o ponto do corte esta na metade do segundo dente molar (Figura 6). Essas amostras seguiram o mesmo procedimento histológico descrito no item 3.7.1. e foram submetidas a cortes de 5 µm de espessura. As lâminas foram submetidas à coloração de PAS+AB para avaliação de muco no epitélio nasal (Camargo Pires-Neto et al., 2006).

Figura 6. Cortes histológicos da cavidade nasal divididos em três partes: Proximal (1), Medial (2) e Distal (3). Ilustração retida de (Kittel et al., 2004).

3.7.3. Coloração de Picro Sirius

As laminas com corte de pulmão com 3 µm de espessura foram sujeitas a desparafinização e hidratação (Xilol 1,2 e 3; Etanol Absoluto 1 e 2, Etanol 96% e Etanol 70%) e lavadas em água corrente e destilada, e em seguida, coradas por 1 hora com Picro-Sirius Red à temperatura ambiente e logo depois lavadas em água corrente 5 minutos e destilada. A seguir, os cortes foram corados com Hematoxilina de Carazzi durante 6 minutos e lavadas em água corrente por 10 minutos e as laminas foram desidratadas e montadas.

Esta coloração foi utilizada para a avaliação das fibras colágenas no parênquima pulmonar (Toledo et al., 2013).

3.7.4. Coloração de Resorcina Fucsina Oxidada

As laminas com corte de pulmão com 3 µm de espessura foram sujeitas a desparafinização e hidratação (Xilol 1,2 e 3; Etanol Absoluto 1 e 2, Etanol 96% e Etanol 70%). Sobre o corte, foi gotejada uma solução aquosa de OXONA 10% deixando oxidar por 40 minutos. Em seguida, foram lavados em água corrente por 5 minutos e submersos no Etanol 70% e 95% e coradas com uma solução de Resorcina-Fucsina por 1 hora em temperatura ambiente. Após coloração, as laminas foram desidratadas e montadas.

Esta coloração foi utilizada para a avaliação das fibras elásticas no parênquima pulmonar (Toledo et al., 2013).

3.7.5. Coloração de PAS+AB

As lâminas com corte de pulmão com 3 μ m foram sujeitas a desparafinização e hidratação (Xilol 1,2 e 3; Etanol Absoluto 1 e 2, Etanol 96% e Etanol 70%). Em seguida, os cortes foram submersos em uma solução de Ácido Acético Glacial 3% por 3 minutos e em uma solução de Alcian Blue por 1 hora. Após lavar em água corrente por 5 minutos e em água destilada, as lâminas foram submersas em Reagente de Schiff por 10 minutos, depois em uma solução de Hipossulfito de sódio 1% por 5 minutos e por fim foram submetidas a coloração com Hematoxilina de Carazzi por 5 minutos. Após coloração, as lâminas foram desidratadas e montadas.

As lâminas com corte da cavidade nasal de 5 μ m de espessura foram coradas com o kit Alcian Blue pH2,5/PAS A+B (Easy Patch, Brasil).

A coloração de PAS A+B foi utilizada para a avaliação do muco presente no epitélio das vias aéreas e epitélio nasal. Essa coloração cora as substâncias ácidas do muco em azul e as neutras em rosa (Yoshizaki et al., 2010).

3.8. Imunohistoquímica

As lâminas previamente preparadas com silano (3,3 Diaminobenzidine, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) contendo os cortes de pulmão com 3 μ m de espessura foram desparafinizadas e hidratadas (Xilol 60°C, Xilol 1,2 e 3; Etanol

Absoluto 1 e 2, Etanol 96% e Etanol 70%) e submetidas ao seguintes procedimentos descritos:

Recuperação antigênica: através de uma solução de Tripsina 0,25% (*Trypsin from porcine pancreas*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) onde são colocados cerca de 100 µL sobre o corte por 20 minutos à 37°C; ou em tampão (Target Retrieval Solution, DAKO, Califórnia, EUA) exposto ao vapor em panela de pressão (Decloaking Chamber, Bio-core medical, Califórnia, EUA) por 1 minuto a temperatura de 125°C. Após esse período as laminas foram lavadas em água corrente e destilada.

Bloqueio de Peroxidase Endógena e Ligações Inespecíficas: O bloqueio de peroxidase endógena foi realizado através de 7 lavagens por 5 minutos de Água oxigenada (H₂O₂) volume 10 e após lavagem em água corrente por 5 minutos e destilada, as laminas foram submersas em uma solução de caseína por 5 minutos. Após o bloqueio de ligações inespecíficas, as lâminas foram lavadas em uma solução de PBS 3x de 5 minutos.

Incubação com Anticorpo Primário: Conforme protocolo, foram aplicadas sobre cada lamina os seguintes anticorpos diluídos em solução de BSA 5%: anti-IL-6 (M-19) 1:500 (sc-1265-R); anti-IL-4 (C-19) 1:600 (sc-1260); anti-IL-13 (M-17) 1:500 (sc-1776); anti-TNF-α (M18) 1:900 (sc-1348) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). As laminas foram deixadas em uma câmara úmida em geladeira 4 °C, *overnight*.

Incubação com Anticorpo Secundário: No dia seguinte, as lâminas foram lavadas 3x de 5 minutos com PBS e incubadas pelo ABCkits Vectastain (Vector elite: PK-6105 (anti-goat) e PK-6101 (anti-rabbit), Burlingame, CA).

Revelação: Após lavagens das lâminas (PBS 3x de 5 minutos), essas foram reveladas com o cromógeno DAB (3,3 Diaminobenzidina, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Após a revelação, as lâminas foram lavadas por 10 minutos em água corrente.

Contracoloração e Montagem: As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris (QEEL, São Paulo, SP) por 2 minutos, lavadas em água corrente e desidratadas para a montagem.

3.9. Análise morfométrica dos tecidos

Os parâmetros morfométricos foram avaliados através da técnica de pontos e retas. Para a técnica de pontos e retas foi utilizado um microscópio óptico convencional, com auxílio de um retículo de 50 retas e 100 pontos. Esse retículo quando acoplado a uma ocular do microscópio tem sua área conhecida ($10.000 \mu\text{m}^2$ para aumento de 1000x). Foram escolhidos de forma aleatória 10 campos do parênquima pulmonar de cada animal das lâminas coradas para a marcação e fibras colágenas e de fibras elásticas. Assim, são contados os pontos que estão sob o tecido e os pontos na marcação positiva, expressando a porcentagem de fibras (colágenas e elásticas) presentes no parênquima pulmonar.

Para a leitura das lâminas de imunohistoquímica (IL-4, IL-6, IL-13, TNF- α) foi utilizada a mesma técnica de pontos e retas utilizando o retículo de 50 retas e 100 pontos. Foram escolhidos 10 campos aleatórios do parênquima

pulmonar, onde foram contados os pontos que caem no tecido e o número de células positivas, expressando o número de células por μm^2 de tecido pulmonar.

Para a leitura do muco na via aérea (PAS/AB), foi utilizado o retículo com 50 retas e 100 pontos. Foram contados 5 vias aéreas os pontos que caíam no muco ácido (corado em azul), muco neutro (corado em rosa), células ciliadas e células secretoras de muco sendo os valores obtidos representados por porcentagem. Para o epitélio nasal corado com PAS/AB, a leitura foi realizada utilizando a mesma técnica descrita para as lamínas de pulmão.

Para todas as leituras foi utilizado um n de 6 animais por grupo.

3.10. Quantificação de proteínas totais no tecido pulmonar

Para a quantificação das proteínas totais foram utilizados os pulmões posteriormente armazenados a -80°C . Os pulmões, de aproximadamente 100mg, foram individualmente homogeneizados com um polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, modelo PT 10/35) em 1 mL de tampão de extração de proteína [2 mM de Trisma pH7,5; 150 mM de NaCl; 2% de NP40; 0,2% de SDS, 100 mM Trisma pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,00; 10% de Glicerol; 20 mM de Fluoreto de sódio; 30 mM de Pirosofato de sódio tetra hidratado; 0,5% de Deoxicolato de sódio; 1mM de Ortovanadato de sódio; 5 μM Aprotinina, 1 mM de Parametil Sulfonilfluoreto (PMSF) e água destilada]. A seguir, as amostras

foram e centrifugadas a 12.000G/4°C por 15 minutos para a remoção do material insolúvel.

Foi utilizado o método de Bradford na qual usamos o reagente de Bradford (*Protein Assay*, Bio-rad, California, USA) na diluição de 1:5 e uma curva com uma proteína conhecida, albumina de soro bovino (BSA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 (mg/mL). As amostras de pulmão foram diluídas na titulação de 1:10; 6 µL da amostra diluída de pulmão foram adicionados aos 300 µL de reagente de Bradford em uma placa de titulação com 96 poços. Após a pipetagem, as placas foram mantidas no escuro por 10 minutos, e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro de placa (Epoch - Biotek, Vermont, EUA) pelo programa GEN 5.1.1.1 e sob a absorbância de 595 nm.

Utilizando o software GraphPad InStat (versão 3.0, Califórnia, EUA), os valores obtidos em absorbância e corrigidos pelo seu branco (Bradford), por meio da equação da reta obtida pela curva estabelecida de BSA foram transformados e expressados em mg/mL (Caperuto et al., 2008).

Essa quantificação foi utilizada para a correção da proteína para o método de imuno-ensaio (ELISA).

3.11. Análise das citocinas inflamatórias por imuno-ensaio

Para a detecção das citocinas IL-4 e TNF- α , foi realizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit DuoSet para camundongos (R&D Systems, Minneapolis, MN), conforme instruções do fabricante.

Para homogenato do tecido pulmonar preparado no item 3.10., as curvas padrão utilizadas IL-6 e TNF- α foram efetuadas nas concentrações: 0 pg/mL (diluente do kit), 15,625 pg/mL, 31,25 pg/mL, 62,5 pg/mL, 125 pg/mL, 250 pg/mL, 500 pg/mL e 1000 pg/mL.

Para as citocinas mensuradas, foram efetuadas as leituras em espectrofotômetro de placa (Epoch - Biotek, Vermont, EUA) utilizando o programa GEN 5.1.1.1 com um comprimento de onda de 450 nm; e foram corrigidas pela proteína total, e expressadas por pg/mg. Para a análise das citocinas foram utilizados um n de 4 a 5 animais por grupo.

3.12. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados através do software Sigma Stat 10 (Califórnia, EUA). Para a comparação entre os grupos e suas genotipagens, os dados com distribuição paramétrica foram submetidos à análise One-Way de variância seguida pelo teste *Student-Newman-Keuls*. Foram consideradas as diferenças entre os grupos como estatisticamente significantes quando o valor de P para o erro alfa for menor que 0,05. Os gráficos foram elaborados

utilizando-se o software Sigma Plot 10 (Califórnia, EUA) e estão em forma de barra com média e erro padrão.

4. RESULTADOS

4.1. Teste de função motora – Wire Hang

O tempo que o animal consegue manter-se na grade invertida foi cronometrado, e analisado estatisticamente. Esta análise foi realizada antes do início do protocolo. Os animais do grupo KD (mutante) conseguiram permanecer um tempo significativamente menor ($8,00 \pm 1,19$) do que os animais selvagens (WT) ($32,76 \pm 1,10$) ($P < 0,001$).

4.2. PCR para detecção de VACHT no pulmão

A expressão gênica de VACHT foi significativamente menor no pulmão dos animais mutantes ($0,29 \pm 0,08$) comparado com os animais WT ($0,74 \pm 0,16$) ($P < 0,05$), mostrando uma redução de cerca de 60% na expressão gênica de VACHT no pulmão.

4.3. Avaliação da Mecânica Respiratória

Não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos nos valores basais de resistência (Gtis) e elastância tecidual (Htis). Pode-se observar na

Figura 7, os valores da resposta máxima de Gtis (Painel A) e de Htis (Painel B). Ao observarmos o efeitos da exposição de DEP nos animais estudados, notamos que esses grupos apresentam um aumento de Gtis [(WT-DEP: $14,99 \pm 0,95$) e (KD-DEP: $13,66 \pm 0,65$)] quando comparado aos respectivos controles que receberam instilações intranasais de salina [(WT-SAL: $12,10 \pm 0,47$) e (KD-SAL: $11,54 \pm 0,04$)], ($P < 0,05$ para todas as comparações)]. Ao avaliarmos Htis, notamos resposta semelhante, onde há um aumento nos grupos que receberam instilações de DEP [(WT-DEP: $90,56 \pm 8,14$) e (KD-DEP: $81,52 \pm 7,24$)] quando comparados aos seus respectivos grupos controles instilados com salina [(WT-SAL: $68,35 \pm 3,36$) e (KD-SAL: $62,24 \pm 2,82$)], ($P < 0,05$)]. A deficiência colinérgica não interferiu na resposta máxima de Gtis e Htis nos grupos instilados com salina e tampouco nos animais instilados com DEP.

Figura 7 Efeito da deficiência colinérgica na avaliação da mecânica pulmonar quanto á resposta máxima. **(A)** Gráfico representativo quanto à resposta máxima da resistência (Gtis) do tecido pulmonar, os animais submetidos ao protocolo de DEP apresentaram um aumento de Gtis comparados com os grupos SAL **(B)** Gráfico representativo quanto à resposta máxima da elastância (Htis) do tecido pulmonar, os animais submetidos ao protocolo de DEP apresentaram um aumento de Htis comparados com os grupos SAL (* $P < 0,05$ respectivos grupos SAL) (n de 8-10 animais por grupo).

4.4. Leucócitos no sangue e LBA

Em relação aos leucócitos presentes no sangue periférico, na Figura 8 podem-se observar os valores dos leucócitos diferenciados em mononucleares (monócitos e linfócitos) no Painel A e em granulócitos (neutrófilos e eosinófilos) apresentados no Painel B.

Os animais que receberam DEP apresentaram aumento de células mononucleares (Figura 8-A) no sangue [(WT-DEP: $1691,78 \pm 209,31$) e (KD-DEP: $1908,22 \pm 154,19$)] ao serem comparados com os animais que receberam apenas salina [(WT-SAL: $752,50 \pm 105,57$; e (KD-SAL: $1124,56 \pm 99,55$), ($P < 0,02$)].

Os animais WT-DEP não apresentaram aumento de granulócitos em relação ao grupo WT-SAL (Figura 8-B). Entretanto, os animais com deficiência colinérgica submetidos ao protocolo de DEP (KD-DEP: $855,46 \pm 163,34$), apresentaram um maior número de granulócitos no sangue comparativamente aqueles obtidos nos animais selvagem que também foram expostos à DEP [(WT-DEP: $464,50 \pm 57,90$), ($P < 0,01$)] e também em relação aos grupos controle [(WT-SAL: $249,95 \pm 28,63$) e (KD-SAL: $344,50 \pm 50,18$), ($P < 0,001$)].

Figura 8 Efeito da deficiência colinérgica quando á quantidade de leucócitos presentes no sangue periférico. **(A)** Gráfico representativo quanto à quantidade de células mononucleares (mm³), foi observado um aumento desse tipo celular nos grupos expostos à DEP comparado com os grupos SAL (*P<0,02 para todas as comparações). **(B)** Gráfico representativo quanto à quantidade de granulócitos (mm³), foi observado um aumento de granulócitos apenas no grupo com a deficiência colinérgica exposto à DEP comparado com os grupos SAL e também com o grupo WT-DEP (*P<0,001 para os grupos SAL e **P<0,01 para WT-DEP) (n de 8-10 animais por grupo).

Ao ser quantificado as células do lavado broncoalveolar (LBA), observa-se na Figura 9 que a instilação de DEP induziu um aumento do número de macrófagos [(WT-DEP: $1,41 \pm 0,13$) e (KD-DEP: $1,62 \pm 0,26$) quando comparado aos grupos SAL [(WT-SAL: $0,73 \pm 0,10$) e (KD-SAL: $0,95 \pm 0,10$), $P < 0,02$]]. Não houve diferença significativa no número de macrófagos entre animais WT-DEP e KD-DEP.

A exposição à DEP nos animais WT não induziu alterações significativas no número de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos em relação ao grupo WT-SAL. Entretanto, a exposição à DEP dos animais com deficiência colinérgica induziu um aumento de linfócitos (KD-DEP: $0,18 \pm 0,03$) em relação ao WT-SAL [($0,06 \pm 0,01$), ($P < 0,03$)] e de neutrófilos (KD-DEP: $0,06 \pm 0,02$) em relação ao seu controle salinas (KD-SAL: $0,02 \pm 0,00$), ($P < 0,03$), (Painel 9-C).

Não houve diferença significativa na quantificação de eosinófilos no LBA em nenhum dos grupos experimentais estudados (Figura 9-D).

Figura 9 Efeito da deficiência colinérgica quanto à quantidade de leucócitos presentes no LBA. **(A)** Gráfico representativo quanto à quantidade de macrófagos no LBA, os grupos expostos à DEP apresentaram um aumento de macrófagos comparados com grupos SAL (* $P < 0,02$). **(B)** Gráfico representativo quanto à quantidade de neutrófilos no LBA, o grupo KD-DEP apresentou um aumento dessa célula comparado com grupos KD-SAL (* $P < 0,03$). **(C)** Gráfico representativo quanto à quantidade de linfócitos no LBA, o grupo KD-DEP apresentou um aumento dessa célula comparado com grupos WT-SAL (* $P < 0,03$). **(D)** Não houve diferença quanto ao número de eosinófilos (Média e média do erro padrão) (n de 8-10 animais por grupo).

4.5. Citocinas inflamatórias

A expressão de citocinas foi avaliada nas células do parênquima pulmonar por imunohistoquímica. A exposição à DEP induziu aumento de IL-6 [(KD-DEP: $20,04 \pm 1,07$); (WT-DEP: $21,97 \pm 1,43$)] e TNF- α [(KD-DEP: $12,76 \pm 0,72$); (WT-DEP: $10,37 \pm 0,34$)], comparados com os seus controles [IL-6: (KD-SAL: $16,73 \pm 0,64$); (WT-SAL: $11,68 \pm 1,40$) e TNF- α : (KD-SAL: $8,05 \pm 0,53$); (WT-SAL: $3,01 \pm 0,50$); ($P < 0,05$)] (Figura 10 A e B). Ainda, a exposição à poluição aumentou as citocinas IL-4 [(WT-DEP: $5,72 \pm 1,00$); (KD-DEP: $9,74 \pm 1,17$)] e IL-13 [(WT-DEP: $12,18 \pm 0,93$); (KD-DEP: $11,76 \pm 1,12$)] comparado ao grupo selvagem salina [IL-4: (WT-SAL: $1,40 \pm 0,31$); e IL-13: (WT-SAL: $5,35 \pm 0,65$); ($P < 0,05$ para todas as comparações)] (Figura 11 A e B).

A deficiência colinérgica nos animais salina aumentou nas citocinas TNF- α (KD-SAL: $8,05 \pm 0,53$), IL-6 (KD-SAL: $16,73 \pm 0,64$), IL-4 (KD-SAL: $7,05 \pm 0,40$) e IL-13 (KD-SAL: $10,06 \pm 0,47$) em relação ao WT ($P < 0,05$).

A deficiência colinérgica nos animais exposto à DEP induziu uma amplificação da expressão das citocinas TNF- α e IL-4 em células positivas no parênquima pulmonar comparados nos grupos de animais selvagens expostos ao poluente ($P < 0,05$). Corroborando os dados de imunohistoquímica mostrando o efeito da deficiência colinérgica amplificando TNF- α (Figura 10-C) e IL-4 (Figura 11-C), na quantificação destas proteínas por ELISA observamos que tanto TNF- α quanto IL-4 estão aumentadas no grupo KD-DEP [TNF- α ($250,34 \pm 18,23$); IL-4: ($35,32 \pm 2,93$)] em relação à WT-DEP [TNF- α ($167,26 \pm 19,41$); IL-4: ($21,83 \pm 2,55$)] ($P < 0,05$).

Figura 10. Efeito da deficiência colinérgica quanto à dosagem de citocinas de perfil Th1. Gráficos representativos de IL-6 (A) e TNF- α (B) por Imunohistoquímica no parênquima pulmonar ($10^4 / \mu m^2$), os grupos expostos à DEP e o grupo KD-SAL aumentaram tanto a liberação de IL-6 quanto de TNF- α comparado com o grupo WT-SAL, (* $P < 0,05$); Houve ainda um maior aumento de TNF- α no grupo KD-DEP em comparação ao WT-DEP (** $P < 0,05$). (C) Gráfico representativo quanto a dosagem de TNF- α presente no homogenato pulmonar pelo método de ELISA (pg/mg) onde confirmado o efeito da DEP nos grupos expostos ao serem comparados com os grupos SAL (* $P < 0,02$) e um aumento dessa citocina no grupo KD-DEP em relação WT-DEP (** $P < 0,05$). (D-G) Fotomicrografias (microscópio de luz) representativas do parênquima pulmonar de camundongos expostos à DEP mutantes e selvagens quanto a células positivas para TNF- α : (D) WT-SAL; (E) WT-DEP; (F) KD-SAL e (G) KD-DEP; seta vermelha aponta células positivas para TNF- α (escala de 10 μm) (n de 4-6 animais por grupo).

Figura 11. Efeito da deficiência colinérgica quanto à dosagem de citocinas de perfil Th2. Gráficos representativos de IL-13 (A) e IL-4 (B) por Imunohistoquímica no parênquima pulmonar ($10^4/\mu m^2$), os grupos expostos à DEP e o grupo KD-SAL aumentaram tanto a liberação de IL-13 quanto de IL-4 comparado com o grupo WT-SAL, (* $P < 0.05$); Houve ainda um maior aumento de IL-4 no grupo KD-DEP em comparação ao WT-DEP (** $P < 0.05$). (C) Gráfico representativo quanto a dosagem de IL-4 presente no homogenato pulmonar pelo método de ELISA (pg/mg) onde confirmado o efeito da DEP nos grupos expostos ao serem comparados com o grupo WT-SAL (* $P < 0.01$) e um aumento dessa citocina no grupo KD-DEP em relação WT-DEP (** $P < 0.05$). (D-G) Fotomicrografias (microscópio de luz) representativas do parênquima pulmonar de camundongos expostos à DEP mutantes e selvagens quanto a células positivas para IL-4: (D) WT-SAL; (E) WT-DEP; (F) KD-SAL e (G) KD-DEP; seta vermelha aponta células positivas para IL-4 (escala de 10 μm) (n de 4-6 animais por grupo).

4.6. Remodelamento Pulmonar

Na Figura 12 pode-se observar a porcentagem de fibras colágenas no parênquima pulmonar nos quatro grupos estudados. Os animais dos grupos WT-DEP ($24,99 \pm 0,32$) e KD-DEP ($27,03 \pm 0,82$) apresentaram aumento da deposição de fibras colágenas no parênquima pulmonar comparativamente aos animais do grupo WT-SAL ($19,37 \pm 0,55$) e KD-SAL ($22,65 \pm 0,52$). (* $P < 0,03$ para todas as comparações). A deficiência colinérgica nos animais salina induziu aumento de fibras colágenas em relação ao WT-SAL ($P < 0,03$). Considerando os animais exposto à DEP, não houve nenhum efeito da deficiência colinérgica em relação à deposição de fibras colágenas na matriz extracelular do parênquima pulmonar (KD-DEP = WT-DEP).

Considerando o conteúdo de fibras elásticas no parênquima pulmonar (Figura 12-B) a exposição ao poluente DEP induziu um aumento de fibras elásticas no parênquima pulmonar somente nos animais com deficiência genética (KD-DEP: $37,54 \pm 2,26$) em relação aos demais grupos [(WT-SAL: $28,40 \pm 0,62$); (KD-SAL: $26,28 \pm 1,37$) e (WT-DEP: $30,80 \pm 1,89$), ($P < 0,01$)]. Não houve diferença significativa entre os grupos WT-DEP e WT-SAL.

Figura 12. Efeito da deficiência colinérgica nas fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar. **(A)** Gráfico representativo do remodelamento pulmonar quanto à produção de fibras colágenas. Ambos os grupos expostos à DEP apresentaram um aumento de fibras colágenas comparados com os grupos SAL; ainda, a deficiência colinérgica induziu um aumento no grupo controle comparado ao WT-SAL (* $P < 0,03$ e # $P < 0,03$). **(B-E)** Fotomicrografias (microscópio de luz) representativas do parênquima pulmonar de camundongos expostos à DEP mutantes e selvagens quanto a fibras de colágenas; seta vermelha aponta fibras colágenas em rosa: **(B)** WT-SAL; **(C)** WT-DEP; **(D)** KD-SAL e **(E)** KD-DEP; Coloração de Picro Sirius (escala de 10µm). **(F)** Gráfico representativo do remodelamento pulmonar quanto à produção de fibras elásticas. Os grupos de animais mutantes expostos à DEP apresentaram um aumento da produção de fibras elásticas no parênquima pulmonar comparados com os demais grupos, (* $P < 0,01$). **(G-J)** Fotomicrografias (microscópio de luz) representativas do parênquima pulmonar de camundongos expostos à DEP mutantes e selvagens quanto a fibras elásticas; seta vermelha aponta fibras elásticas em roxo: **(G)** WT-SAL; **(H)** WT-DEP; **(I)** KD-SAL e **(J)** KD-DEP; Coloração de RFO (escala de 10µm) (n= 6 animais por grupo).

4.7. Produção de muco nasal e epitelial

Na Figura 13-A pode-se observar a porcentagem de muco total, neutro e ácido no epitélio brônquico dos quatro grupos estudados. Os animais expostos à DEP, tanto WT quanto KD, apresentaram um aumento da produção de muco neutro [(WT-DEP: $5,51 \pm 1,44$); (KD-DEP: $4,65 \pm 1,27$)], e consequentemente, de muco total [(WT-DEP: $5,70 \pm 1,43$); (KD-DEP: $5,06 \pm 1,23$)] em relação aos grupos de animais que receberam instilações com salina [muco neutro: (WT-SAL: $1,33 \pm 0,40$); (KD-SAL: $1,86 \pm 0,32$) e muco total: (WT-SAL: $1,66 \pm 0,45$); (KD-SAL: $2,27 \pm 0,31$)] ($P < 0,05$ para todas as comparações). Não houve diferença significativa quanto à produção de muco ácido em nenhum dos grupos experimentais.

Também foi quantificada a área de células secretoras e ciliadas (Painel B). Houve um aumento de células secretoras de muco na via aérea nos grupos de animais que receberam DEP [(WT-DEP: $21,63 \pm 2,22$); (KD-DEP: $19,27 \pm 1,33$)] ao serem comparados com os grupos SAL [(WT-SAL: $14,34 \pm 1,88$); (KD-SAL: $11,81 \pm 1,57$)], ($P < 0,05$). Houve ainda diminuição da porcentagem de células ciliadas no epitélio brônquico nos grupos que foram expostos à DEP [(WT-DEP: $78,37 \pm 2,22$); (KD-DEP: $80,73 \pm 1,33$)] comparados aos controles que receberam SAL [(WT-SAL: $85,66 \pm 1,88$); (KD-SAL: $88,19 \pm 1,57$)], respectivamente] ($P < 0,05$ para todas as comparações) (Figura 13-B). A deficiência colinérgica não interferiu com a quantidade e com o tipo de muco e também não modificou a porcentagem de células ciliadas ou secretoras nos animais expostos à DEP quando comparados aos animais selvagens também expostos ao poluente.

Figura 13. Efeito da deficiência colinérgica na produção de muco no epitélio da via aérea **(A)** Gráfico representativo do mecanismo de defesa e produção de muco no epitélio brônquico: os grupos expostos à DEP apresentaram um aumento da produção de muco neutro e total comparados com grupos controles (* $P < 0,05$). **(B)** Gráfico representativo da quantidade de células secretoras presentes no epitélio brônquico: Os grupos expostos à DEP apresentaram um aumento desse tipo celular, e uma diminuição da quantidade de células ciliadas comparados com grupos controles (* $P < 0,05$). **(C-F)** Fotomicrografias representativas dos grupos, seta vermelha aponta muco neutro em rosa: **(C)** WT-SAL; **(D)** WT-DEP; **(E)** KD-SAL e **(F)** KD-DEP; Coloração de PAS/AB (escala de 10 μm) (n= 6 animais por grupo).

Considerando a presença de muco no epitélio nasal dos camundongos (Figura 14-A), o grupo de animais selvagens expostos à DEP não apresentou diferença quanto ao muco total, ácido e neutro comparado como o grupo salina.

Por outro lado, a deficiência colinérgica somente em animais que receberam instilações de DEP aumentou a produção de muco ácido (KD-DEP: $5,58 \pm 2,38$); e consequentemente de muco total (KD-DEP: $5,88 \pm 2,21$) no epitélio nasal comparados com os demais grupos [muco ácido: (WT-SAL: $0,41 \pm 0,18$); (WT-DEP: $1,76 \pm 1,00$); (KD-SAL: $1,08 \pm 0,56$) e muco total: (WT-SAL: $0,93 \pm 0,21$); (WT-DEP: $2,19 \pm 1,04$); (KD-SAL: $1,56 \pm 0,55$)] ($P < 0,03$ para todas as comparações).

Figura 14. Efeito da deficiência colinérgica na produção de muco no epitélio nasal. **(A)** Gráfico representativo do mecanismo de defesa e produção de muco no epitélio nasal. O grupo KD-DEP aumentou a produção de muco ácido e muco total ao serem comparados com os demais grupos (* $P < 0,03$). **(B-E)** Fotomicrografias representativas dos grupos, seta vermelha aponta muco ácido em azul: **(B)** WT-SAL; **(C)** WT-DEP; **(D)** KD-SAL e **(E)** KD-DEP; Coloração de PAS/AB (escala de 10µm) (n=6 animais por grupo).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado se a deficiência colinérgica induzida pela redução parcial da proteína VACht está envolvida na resposta inflamatória pulmonar em animais expostos à DEP em quantidade correspondente a inalada por um indivíduo que se encontra por 24 horas em corredores de ônibus da cidade de São Paulo (Yoshizaki et al., 2010). Foi demonstrado que a instilação de DEP em animais com deficiência colinérgica induziu aumento de granulócitos no sangue periférico. No pulmão dos animais mutantes, houve um aumento de neutrófilos, de citocinas IL-4 e TNF- α e de deposição de fibras elásticas nos septos alveolares. Além disso, foi observado aumento de muco ácido no epitélio nasal. Estes dados sugerem que a deficiência colinérgica pode predispor o desenvolvimento da inflamação pulmonar frente à exposição de DEP.

A poluição é considerada um fator de risco de mortalidade e está associada a um aumento da morbidade relacionada a doenças respiratórias e cardiovasculares (Brunekreef e Holgate, 2002). Entre os mecanismos envolvidos estão o aumento da capacidade oxidativa e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Behndig et al., 2006; Nemmar et al., 2012). Entretanto, nem todos os mecanismos fisiopatológicos estão bem estabelecidos em relação à inflamação pulmonar causada por partículas da poluição.

A deficiência colinérgica está envolvida em diversas patologias como doença Alzheimer (Terry et al., 2007), doença de Huntington (Smith et al.,

2006) e hipertensão arterial (Li et al., 2011) e seu efeito no controle da inflamação tem sido intensamente estudado nos últimos anos (Pavlov e Tracey, 2006). A liberação de ACh na junção neuromotora e sua ação no sistema nervoso periférico, onde se liga à receptores muscarínicos e/ou nicotínicos (Pavlov e Tracey, 2005), depende da presença de VACHT que a transporta até a vesícula sináptica. A VACHT é expressa no sistema nervoso central e periférico, e é encontrada em diferentes órgãos incluindo coração, trato gastrointestinal e outros (Pavlov e Tracey, 2005).

Animais com depleção total de VACHT (*Knock-out*) morreram minutos após o nascimento, sugerindo que a VACHT e a neurotransmissão colinérgica sejam essenciais para a vida (Prado et al., 2006). Assim, Prado et al., (2006) geraram um modelo de camundongo com depleção parcial de VACHT (*knock-down*), onde esses animais apresentam aproximadamente 70% de redução nos níveis de VACHT, o que está diretamente associado a redução proporcional nos níveis de ACh liberada na fenda sináptica. Estes animais tem redução de VACHT em diversos órgãos como o sistema nervoso (corpo estriado, medula, hipocampo e córtex) (Prado et al., 2006) e coração (Lara et al., 2010). Ainda evoluem com insuficiência cardíaca por volta dos 6 meses de vida (Lara et al., 2010) e apresentam diversas alterações da função cognitiva, motora e muscular (Prado et al., 2006).

Nosso grupo demonstrou previamente que estes camundongos mutantes, sem nenhuma indução de doença pulmonar, apresentam hiperresponsividade brônquica, inflamação e remodelamento das fibras de colágeno na matriz extracelular dos brônquios, associada ao aumento de TNF- α no pulmão (Pinheiro et al., 2012). A VACHT já foi identificada no epitélio das vias aéreas

(Lips et al., 2005) e em células secretoras da traqueia e brônquios de roedores e de macacos (Adriaensen et al., 2003; Proskocil et al., 2004; Lips et al., 2007). Demonstramos no presente estudo que há redução do gene VACHT (cerca de 60% de redução) avaliada por PCR no pulmão dos animais mutante. Além disso, corroborando dados anteriores (de Castro, 2006), os animais mutantes apresentam redução de tempo no teste de função motora, confirmando a repercussão funcional da falta da ACh.

Os animais com a deficiência colinérgica que receberam instilações intranasais de salina por 30 dias (WT-SAL) apresentaram um aumento das células positivas para TNF- α , IL-4, IL-6 e IL-13 e um aumento de fibras colágenas no parênquima pulmonar. Esses dados confirmam a importância da acetilcolina na manutenção da homeostasia do sistema respiratório e confirmam trabalhos prévios de nosso grupo (Pinheiro et al., 2012).

O sistema colinérgico anti-inflamatório foi descrito há uma década e tem a ACh como seu principal mediador (Tracey, 2002). Sabe-se que a liberação de acetilcolina pelas fibras do nervo vago estimulam células não neuronais, como linfócitos T presentes no baço, a liberar ACh que, ao ligar-se a receptores nicotínicos induz redução da resposta inflamatória (Rosas-Ballina et al., 2011). Assim, no presente estudo, utilizamos essa linhagem de camundongos para verificar se o sistema colinérgico anti-inflamatório interfere no desenvolvimento da resposta inflamatória induzida por poluentes da combustão do diesel, uma vez que a ACh é o principal mediador desta via colinérgica anti-inflamatória (Tracey, 2002).

A DEP utilizada foi coletada a partir de um filtro acoplado ao escapamento de um ônibus em circulação da cidade de São Paulo durante um dia de rotina.

Diversos modelos de poluição pela inalação de partículas de diesel são descritos na literatura, dentre estes são encontrados modelos agudos por instilação intratraqueal, e modelos crônicos com instilação intranasal ou inalação da fumaça da queima do diesel. Optamos então em utilizar um modelo sub-crônico de 30 dias, com instilação intranasal 5 vezes por semana (3mg/mL/animal), o mesmo já padronizado por Yoshizaki et al., (2010).

Nossos resultados mostraram que a instilação de DEP foi eficiente para induzir alterações pulmonares. Os PMs encontrados na DEP são importantes desencadeadores de reações inflamatórias alérgicas locais e sistêmicas, pois são capazes de atingirem os alvéolos pulmonares e assim atingirem a corrente sanguínea (Brunekreef e Holgate, 2002; Roberts et al., 2007; Lehmann et al., 2008). Os animais selvagens expostos à DEP (WT-DEP) apresentaram um aumento de células mononucleares no sangue periférico, assim como um aumento de macrófagos no LBA. Houve maior expressão de IL-6, TNF- α , IL-13 e IL-4 por células inflamatórias, sugerindo que este modelo é adequado para estudar efeitos da poluição atmosférica no pulmão, mimetizando alguns efeitos descritos em humanos exposto a poluentes (Stenfors et al., 2004; Behndig et al., 2006).

Corroborando nossos achados, diversos estudos mostraram um aumento das células inflamatórias no sangue tanto em modelos experimentais quanto em humanos expostos a poluentes (Salvi et al., 1999; Roberts et al., 2007; Yokota et al., 2008). Já Krishnan et al., (2013) não demonstraram alterações nas células inflamatórias do sangue de indivíduos que foram expostas ao poluente por 22 horas. O aumento de células pulmonares induzidas pela DEP também é controverso na literatura, e os resultados dependem dos diversos

protocolos, tempos de exposição e espécie, além dos diferentes componentes do poluente utilizado, o que dificulta a interpretação clara dos resultados existentes. É fato que a maioria dos trabalhos demonstram em algum momento aumento da inflamação pulmonar tanto em modelos experimentais (Li et al., 2010; Yoshizaki et al., 2010; Nemmar et al., 2012), quanto em humanos expostos aos poluentes (Stenfors et al., 2004; Behndig et al., 2006).

A exposição à DEP em animais mutantes manteve o aumento de células mononucleares no sangue periférico. Além disso, aumentou também o número de granulócitos no sangue, o que não havia sido observado nos animais WT-DEP, sugerindo que a deficiência colinérgica predispõe um aumento de leucócitos circulantes neste modelo. A resposta inflamatória é caracterizada pelo aumento da permeabilidade de células endoteliais com recrutamento de células inflamatórias para o local da injúria. Neste sentido, no pulmão dos animais mutante exposto à DEP houve manutenção do número de macrófagos e aumento de linfócitos e de neutrófilos que não tinham sido detectados nos animais WT-DEP. Outros trabalhos já haviam demonstrado participação de outras células como linfócitos, neutrófilos e mastócitos em pulmão de humanos expostos à DEP (Stenfors et al., 2004; Behndig et al., 2006).

A avaliação das citocinas presentes na inflamação pulmonar é uma ferramenta importante para entendermos os mecanismos inflamatórios que ocorrem após a exposição ao poluente. Sabe-se que TNF- α e IL-6 são citocinas bastante envolvidas na inflamação pela exposição a poluentes (Hashimoto et al., 2001; Win-Shwe et al., 2013) e caracterizam uma resposta perfil Th1. Por outro lado a IL-4 e a IL-13 usualmente estão aumentadas em respostas que envolvem perfil Th2 (Inoue et al., 2009; Barton et al., 2014). A

deficiência colinérgica nos animais expostos à DEP induziu uma elevação das células positivas para TNF- α e IL-4. Para confirmar os resultados da imunohistoquímica, avaliamos por ELISA o conteúdo de IL-4 e TNF- α no homogenato pulmonar e confirmamos os dados obtidos. Essas citocinas já estavam aumentadas no grupo selvagem exposto à DEP (WT-DEP) e esta resposta foi amplificada nos animais KD-DEP, o que justifica o aumento de neutrófilos e linfócitos observados neste grupo. Não houve interferência da deficiência colinérgica nos animais expostos ao DEP nos níveis de IL-6 e IL-13.

Diversos trabalhos demonstraram que a inflamação causada por poluentes atmosféricos pode ter tanto um perfil de resposta inflamatória Th1 quanto de Th2, além de muitas vezes predispor doenças alérgicas como asma brônquica (Yanagisawa et al., 2006; Inoue et al., 2009). Porém, Yoshizaki et al., (2010) demonstraram que as citocinas de perfil Th2, como IL-4, IL-10 e IL-13 no LBA encontraram-se inalteradas nos grupos que foram exposto à DEP. Por outro lado, Saber et al., (2013) observaram que a expressão de mRNA de IL-6 estavam aumentadas imediatamente após a exposição à DEP enquanto TNF- α aumentou tardiamente. Outros corroboraram estes achados (Yu et al., 2002; Roberts et al., 2007). Além disso, alguns estudos também evidenciaram aumento de IL-4 na DEP (Inoue et al., 2009).

Diversos trabalhos em infecção sistêmica mostraram a importância do sistema colinérgico anti-inflamatório na redução de células inflamatórias. A produção de ACh por células não neuronais já foi demonstrada, e sabe-se que linfócitos e neutrófilos são capazes de produzir ACh (Kawashima e Fujii, 2004). Da mesma forma, foi previamente demonstrado, que a produção da ACh não

neuronal depende, pelo menos em parte de VACHT (Arvidsson et al., 1997; Lima Rde et al., 2010).

Corroborando com o aumento de citocinas nos animais mutantes, Rosas-Ballina et al., (2011) demonstraram que a liberação de ACh pelo nervo vago atenua a produção de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-8 no baço. Além disso, Su et al., (2007) mostraram que a estimulação do receptor nicotínico atenua a inflamação em um modelo de lesão pulmonar aguda induzido por LPS. Embora os exatos mecanismos da via anti-inflamatória ainda estejam sendo elucidados, diversos estudos sugerem que a ACh ao se ligar nos receptores nicotínicos, inibe a translocação de NF- κ B para o núcleo e ativa a via JAK2-STAT3, o que impede a liberação de citocinas pró-inflamatórias por ativação de SOCS3 e inibição de NF- κ B (Parrish et al., 2008; Rosas-Ballina e Tracey, 2009). Este pode ser um dos mecanismos envolvidos neste modelo de poluição e deficiência colinérgica.

O processo inflamatório repetido e crônico induz, na tentativa de manter a função adequada do órgão lesado, um processo de reparo (Mauad et al., 2007). No pulmão o processo de remodelamento é caracterizado por aumento de componente da matriz extracelular (MEC) (Araujo et al., 2008), hipertrofia da camada muscular lisa (James et al., 2012) e hipertrofia e hiperplasia de células caliciformes com aumento da produção de muco (Sagai et al., 1996; Ishihara e Kagawa, 2002), entre outros fatores. Ao avaliar a matriz extracelular nos animais WT-DEP, observou-se aumento de fibras colágenas e aumento na produção de muco neutro nas vias aéreas, devido o aumento de células secretoras e redução de células ciliadas induzido pela exposição de DEP. Não houve aumento de muco no epitélio nasal em 30 dias. Yoshizaki et al., (2010)

também observaram um aumento da expressão do gene Muc5AC no pulmão dos animais expostos à DEP após 60 dias, entretanto poucos avaliaram alterações da MEC em modelos de poluentes. Dai et al., (2003) demonstraram que o DEP induziu um aumento da expressão do gene procolágeno em implantes de traqueia, sugerindo que o DEP possa induzir processos de fibrose.

A deficiência de VACHT, além de manter as alterações observadas no WT-DEP, ainda induziu um aumento de fibras elásticas e grande quantidade de muco ácido no epitélio nasal, fato não observado nos animais WT-DEP.

Poucos trabalhos avaliaram epitélio nasal em modelos de exposição ao poluente. Interessante que Yoshizaki et al., (2010), observaram um aumento de muco ácido no epitélio nasal nos animais que receberam DEP somente após 60 dias de instilação. Neste sentido, nossos dados sugerem que a deficiência colinérgica predispõe algumas alterações induzidas pela DEP e que talvez o acúmulo de muco ácido no nariz, seja um mecanismo de defesa ativado nestes animais que já possuem uma predisposição a resposta inflamatória exacerbada.

A mecânica respiratória é uma importante ferramenta para avaliar a função pulmonar por meio das medidas de complacência e resistência do sistema respiratório. Níveis elevados de resistência e elastância (inverso da complacência) indicam repercussões funcionais de alterações morfológicas do tecido pulmonar.

A instilação de DEP induziu um aumento da resposta máxima tanto à resistência do tecido pulmonar dado pelo valor de G_{tis} , quanto da resposta máxima da elastância do tecido pulmonar (H_{tis}), sugerindo uma

hiperresponsividade tecidual. Laks et al., (2008) também mostraram um aumento da elastância do sistema respiratório após 24 horas de instilação de DEP. Já Nemmar et al., (2012) observaram um aumento da resistência do tecido pulmonar após realização da curva dose reposta a metacolina nos animais que foram expostos ao poluente.

Considerando à avaliação da mecânica respiratória nos animais com deficiência colinérgica expostos à DEP, não foi observada nenhuma alteração diferente das obtidas no grupo selvagem (WT-DEP). Esses dados sugerem que embora esses animais mutantes apresentem aumento da resposta inflamatória pulmonar, estas alterações não foram suficientes para piorar os parâmetros funcionais pulmonares. Talvez a avaliação da função pulmonar no pletismógrafo do corpo interior, onde a cavidade nasal estaria incluída poderia mostrar amplificação da resposta obtida nos selvagens, uma vez que os KD-DEP apresentaram aumento significativo de muco no nariz, o que pode aumentar a resistência do sistema respiratório.

Alguns fatores limitam o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos. Um deles é que neste momento não foi possível avaliar NF- κ B e a via JAK2-STAT 3, que parece ser um dos mecanismos pelo qual a ACh controla a inflamação. Outro ponto importante, é que no presente estudo não foram avaliados as espécies reativas de oxigênio (ROS), que sabidamente são importantes em modelos de poluição.

Concluindo, nossos resultados demonstraram que a deficiência de VACHT predispõe a inflamação pulmonar induzida pela exposição de DEP, aumentando alguns parâmetros em 30 dias que não estão aumentados nos animais selvagens. Houve maior recrutamento de células inflamatórias e

elevada produção de TNF- α e IL-4 no pulmão dos mutantes exposto à DEP, além de aumento do muco ácido no epitélio nasal. Esses dados sugerem que a manutenção dos níveis normais de ACh pode proteger ou controlar as alterações inflamatórias pulmonares induzidas pelos poluentes. Esta via pode ser um dos mecanismos envolvidos nos efeitos dos poluentes na piora das doenças respiratórias.

6. CONCLUSÃO

A exposição à DEP elevou os níveis de macrófagos no LBA, assim como as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-4. Houve ainda um aumento da produção de muco neutro nas vias aéreas e um aumento de fibras colágenas no parênquima pulmonar.

Os animais mutantes, deficientes de VACht expostos à DEP mostraram além das respostas inflamatórias presentes no grupo Selvagem, um aumento de neutrófilo no LBA, aumento de granulócitos no sangue periférico, além de um aumento das citocinas TNF- α e IL-4. Houve ainda um aumento de fibras elásticas no parênquima pulmonar e produção de muco ácido no epitélio nasal

Esses dados sugerem a importância da acetilcolina nos efeitos pró-inflamatórios da DEP no pulmão.

7. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação da Comissão de Ética para Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq – FMUSP).

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03/12/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0766/08**, intitulado: "**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO E DA HISTOPATOLOGIA PULMONAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE REDUÇÃO DA FUNÇÃO COLINÉRGICA EM CAMUNDONGOS GENETICAMENTE MODIFICADOS** " apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Milton de Arruda Martins**
Pesquisador (a) Executante: **Carla Máximo Prado**

CAPPesq, 03 de Dezembro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo 2. Características da DEP utilizado neste trabalho foram avaliadas e determinadas através dos métodos de espectrometria de fluorescência de raio-X de energia dispersiva e por cromatografia líquida de alta eficiência caracterizada por Laks et al., (2008).

Metais	DEP (ppb)	PAHs	DEP (ng/g)
Niquel (Ni)	181±37	Naftalina	49,23
Enxofre (S)	626±416	Acenaftileno	179,48
Ferro (Fe)	74.556±2.266	Fluoreno	683,94
Vanádio (V)	37±13	Antracina	94,73
Chumbo (PB)	50±47	Pireno	12.838,27
Cádmio (Cd)	29±8	Benzo[a]antraceno	1.162,73
Cromo (Cr)	161±116	Benzo[b]fluoranteno	789,9
Cobre (Cu)	17±1	Benzo[k]fluoranteno	562,73
		Benzo[a]pireno	1.642,28

8. REFERÊNCIAS

- Adriaensen, D., I. Brouns, J. Van Genechten e J. P. Timmermans (2003). "Functional morphology of pulmonary neuroepithelial bodies: extremely complex airway receptors." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **270**(1): 25-40.
- Anderson, D. C., S. C. King e S. M. Parsons (1983). "Pharmacological characterization of the acetylcholine transport system in purified Torpedo electric organ synaptic vesicles." Mol Pharmacol **24**(1): 48-54.
- Araujo, B. B., M. Dolhnikoff, L. F. Silva, J. Elliot, J. H. Lindeman, D. S. Ferreira, A. Mulder, H. A. Gomes, S. M. Fernezlian, A. James e T. Mauad (2008). "Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma." Eur Respir J **32**(1): 61-9.
- Arvidsson, U., M. Riedl, R. Elde e B. Meister (1997). "Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems." J Comp Neurol **378**(4): 454-67.
- Bankey, P. E., J. G. Williams, K. S. Guice e S. N. Taylor (1995). "Interleukin-6 production after thermal injury: evidence for nonmacrophage sources in the lung and liver." Surgery **118**(2): 431-8; discussion 438-9.
- Barnes, P. J. (2004). "Alveolar macrophages as orchestrators of COPD." COPD **1**(1): 59-70.
- Barton, D. B., B. C. Betteridge, T. D. Earley, C. S. Curtis, A. B. Robinson e P. R. Reynolds (2014). "Primary alveolar macrophages exposed to diesel particulate matter increase RAGE expression and activate RAGE signaling." Cell Tissue Res.

- Baumann, H., G. P. Jahreis, D. N. Sauder e A. Koj (1984). "Human keratinocytes and monocytes release factors which regulate the synthesis of major acute phase plasma proteins in hepatic cells from man, rat, and mouse." J Biol Chem **259**(11): 7331-42.
- Behndig, A. F., I. S. Mudway, J. L. Brown, N. Stenfors, R. Helleday, S. T. Duggan, S. J. Wilson, C. Boman, F. R. Cassee, A. J. Frew, F. J. Kelly, T. Sandstrom e A. Blomberg (2006). "Airway antioxidant and inflammatory responses to diesel exhaust exposure in healthy humans." Eur Respir J. 2006 Feb;27(2):359-65.
- Belmonte, K. E. (2005). "Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary disease." Proc Am Thorac Soc **2**(4): 297-304; discussion 311-2.
- Bernik, T. R., S. G. Friedman, M. Ochani, R. DiRaimo, L. Ulloa, H. Yang, S. Sudan, C. J. Czura, S. M. Ivanova e K. J. Tracey (2002). "Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway." J Exp Med **195**(6): 781-8.
- Bernstein, J. A., N. Alexis, C. Barnes, I. L. Bernstein, A. Nel, D. Peden, D. Diaz-Sanchez, S. M. Tarlo e P. B. Williams (2004). "Health effects of air pollution." J Allergy Clin Immunol **114**(5): 1116-23.
- Blalock, J. E. (2002). "Harnessing a neural-immune circuit to control inflammation and shock." J Exp Med **195**(6): F25-8.
- Blanchet, M. R., A. Langlois, E. Israel-Assayag, M. J. Beaulieu, C. Ferland, M. Laviolette e Y. Cormier (2007). "Modulation of eosinophil activation in vitro by a nicotinic receptor agonist." J Leukoc Biol **81**(5): 1245-51.
- Boubel, R. W., D. L. Fox, D. B. Tumer e A. C. Stern (1994). Fundamentals of Air Pollution. n. ed. San Diego, Academic Press Inc.
- Brandt, E. B., M. B. Kovacic, G. B. Lee, A. M. Gibson, T. H. Acciani, T. D. Le Cras, P. H. Ryan, A. L. Budelsky e G. K. Khurana Hershey (2013). "Diesel exhaust

- particle induction of IL-17A contributes to severe asthma." J Allergy Clin Immunol.
- Brunekreef, B. e S. T. Holgate (2002). "Air pollution and health." Lancet **360**(9341): 1233-42.
- Camargo Pires-Neto, R., A. Julia Lichtenfels, S. Regina Soares, M. Macchione, P. Hilario Nascimento Saldiva e M. Dolhnikoff (2006). "Effects of Sao Paulo air pollution on the upper airways of mice." Environ Res **101**(3): 356-61.
- Carvalho-Oliveira, R., R. M. Pozo, D. J. Lobo, A. J. Lichtenfels, H. A. Martins-Junior, J. O. Bustilho, M. Saiki, I. M. Sato e P. H. Saldiva (2005). "Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in Sao Paulo, Brazil." Environ Res **98**(1): 1-7.
- CETESB (2013). Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2013. Relatórios. São Paulo, Governo do Estado de São Paulo -Secretaria do Meio Ambiente - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo: 1-113.
- CETESB. (2014). "Qualidade do ar - Poluentes." Acessado em 23/07/2014, 2014, de <http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/Informa??es-B?sicas/21-Poluentes>.
- Chung, K. F. e P. J. Barnes (1999). "Cytokines in asthma." Thorax **54**(9): 825-57.
- Dai, J., C. Xie, R. Vincent e A. Churg (2003). "Air pollution particles produce airway wall remodeling in rat tracheal explants." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(3 Pt 1): 352-8.
- de Castro, B. M. (2006). Funções motoras em camundongos deficientes do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Farmacologia. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. **Mestrado**: 46.
- de Jonge, W. J., E. P. van der Zanden, F. O. The, M. F. Bijlsma, D. J. van Westerloo, R. J. Bennink, H. R. Berthoud, S. Uematsu, S. Akira, R. M. van den Wijngaard e G. E. Boeckxstaens (2005). "Stimulation of the vagus nerve attenuates

- macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway." Nat Immunol **6**(8): 844-51.
- Driscoll, K. E. (2000). "TNFalpha and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress." Toxicol Lett **112-113**: 177-83.
- EPA, U. S. E. P. A. (2004). The particle pollution report: Current understanding of air quality and emissions through 2003. Research Triangle Park, North Carolina, U.S. Environmental Protection Agency
Office of Air Quality Planning and Standards
Emissions, Monitoring, and Analysis Division
1-32.
- Erickson, J. D., H. Varoqui, M. K. Schafer, W. Modi, M. F. Diebler, E. Weihe, J. Rand, L. E. Eiden, T. I. Bonner e T. B. Usdin (1994). "Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus." J Biol Chem **269**(35): 21929-32.
- Fodale, V. e L. B. Santamaria (2008). "Cholinesterase inhibitors improve survival in experimental sepsis: a new way to activate the cholinergic anti-inflammatory pathway." Crit Care Med **36**(2): 622-3.
- Fox, B., T. B. Bull e A. Guz (1980). "Innervation of alveolar walls in the human lung: an electron microscopic study." J Anat **131**(Pt 4): 683-92.
- Frampton, M. W., A. J. Ghio, J. M. Samet, J. L. Carson, J. D. Carter e R. B. Devlin (1999). "Effects of aqueous extracts of PM(10) filters from the Utah valley on human airway epithelial cells." Am J Physiol **277**(5 Pt 1): L960-7.
- Gahring, L. C., E. Y. Enioutina, E. J. Myers, G. J. Spangrude, O. V. Efimova, T. W. Kelley, P. Tvrdik, M. R. Capecchi e S. W. Rogers (2013). "Nicotinic receptor alpha7 expression identifies a novel hematopoietic progenitor lineage." PLoS One **8**(3): e57481.

- Gallowitsch-Puerta, M. e V. A. Pavlov (2007). "Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway." Life Sci **80**(24-25): 2325-9.
- Gao, F., A. Barchowsky, A. A. Nemec e J. P. Fabisiak (2004). "Microbial stimulation by *Mycoplasma fermentans* synergistically amplifies IL-6 release by human lung fibroblasts in response to residual oil fly ash (ROFA) and nickel." Toxicol Sci **81**(2): 467-79.
- Grando, S. A. (2008). "Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: biological and clinical significance of non-canonical ligands of epithelial nicotinic acetylcholine receptors." J Pharmacol Sci **106**(2): 174-9.
- Guarini, S., D. Altavilla, M. M. Cainazzo, D. Giuliani, A. Bigiani, H. Marini, G. Squadrito, L. Minutoli, A. Bertolini, R. Marini, E. B. Adamo, F. S. Venuti e F. Squadrito (2003). "Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock." Circulation **107**(8): 1189-94.
- Gwilt, C. R., L. E. Donnelly e D. F. Rogers (2007). "The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation?" Pharmacol Ther **115**(2): 208-22.
- Hantos, Z., B. Daroczy, B. Suki, S. Nagy e J. J. Fredberg (1992). "Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs." J Appl Physiol (1985) **72**(1): 168-78.
- Hashimoto, K., Y. Ishii, Y. Uchida, T. Kimura, K. Masuyama, Y. Morishima, K. Hirano, A. Nomura, T. Sakamoto, H. Takano, M. Sagai e K. Sekizawa (2001). "Exposure to diesel exhaust exacerbates allergen-induced airway responses in guinea pigs." Am J Respir Crit Care Med **164**(10 Pt 1): 1957-63.
- Hertweck, M. S. e K. S. Hung (1980). "Ultrastructural evidence for the innervation of human pulmonary alveoli." Experientia **36**(1): 112-3.

- Hiraiwa, K. e S. F. van Eeden (2013). "Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants." Mediators Inflamm **2013**: 619523.
- Hiura, T. S., M. P. Kaszubowski, N. Li e A. E. Nel (1999). "Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages." J Immunol **163**(10): 5582-91.
- Holma, B. (1989). "Effects of inhaled acids on airway mucus and its consequences for health." Environ Health Perspect **79**: 109-13.
- Huang, Y. C., Z. Li, S. D. Harder e J. M. Soukup (2004). "Apoptotic and inflammatory effects induced by different particles in human alveolar macrophages." Inhal Toxicol **16**(14): 863-78.
- Huston, J. M., M. Ochani, M. Rosas-Ballina, H. Liao, K. Ochani, V. A. Pavlov, M. Gallowitsch-Puerta, M. Ashok, C. J. Czura, B. Foxwell, K. J. Tracey e L. Ulloa (2006). "Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis." J Exp Med **203**(7): 1623-8.
- Improgo, M. R., A. R. Tapper e P. D. Gardner (2011). "Nicotinic acetylcholine receptor-mediated mechanisms in lung cancer." Biochem Pharmacol. 2011 Oct 15;82(8):1015-21. doi: 10.1016/j.bcp.2011.05.020. Epub 2011 May 27.
- Inoue, K., E. Koike, H. Takano, R. Yanagisawa, T. Ichinose e T. Yoshikawa (2009). "Effects of diesel exhaust particles on antigen-presenting cells and antigen-specific Th immunity in mice." Exp Biol Med (Maywood) **234**(2): 200-9.
- Inoue, K., H. Takano, R. Yanagisawa, M. Sakurai, S. Abe, S. Yoshino, K. Yamaki e T. Yoshikawa (2007). "Effects of components derived from diesel exhaust particles on lung physiology related to antigen." Immunopharmacol Immunotoxicol **29**(3-4): 403-12.
- Ishihara, Y. e J. Kagawa (2002). "Dose-response assessment and effect of particles in guinea pigs exposed chronically to diesel exhaust: analysis of various biological

- markers in pulmonary alveolar lavage fluid and circulating blood." Inhal Toxicol. 2002 Oct;14(10):1049-67.
- James, A. L., J. G. Elliot, R. L. Jones, M. L. Carroll, T. Mauad, T. R. Bai, M. J. Abramson, K. O. McKay e F. H. Green (2012). "Airway smooth muscle hypertrophy and hyperplasia in asthma." Am J Respir Crit Care Med **185**(10): 1058-64.
- Junqueira, L. C. e J. Carneiro (2004). Sistema Respiratório. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Kawashima, K. e T. Fujii (2004). "Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function." Front Biosci **9**: 2063-85.
- Kittel, B., C. Ruehl-Fehlert, G. Morawietz, J. Klapwijk, M. R. Elwell, B. Lenz, M. G. O'Sullivan, D. R. Roth e P. F. Wadsworth (2004). "Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups." Exp Toxicol Pathol **55**(6): 413-31.
- Kodavanti, U. P., R. F. Thomas, A. D. Ledbetter, M. C. Schladweiler, V. Bass, Q. T. Krantz, C. King, A. Nyska, J. E. Richards, D. Andrews e M. I. Gilmour (2013). "Diesel exhaust induced pulmonary and cardiovascular impairment: the role of hypertension intervention." Toxicol Appl Pharmacol **268**(2): 232-40.
- Krishnan, R. M., J. H. Sullivan, C. Carlsten, H. W. Wilkerson, R. P. Beyer, T. Bammler, F. Farin, A. Peretz e J. D. Kaufman (2013). "A randomized cross-over study of inhalation of diesel exhaust, hematological indices, and endothelial markers in humans." Part Fibre Toxicol. 2013 Mar 26;10:7. doi: 10.1186/1743-8977-10-7.
- Laks, D., R. C. de Oliveira, P. A. de Andre, M. Macchione, M. Lemos, D. Faffe, P. H. Saldiva e W. A. Zin (2008). "Composition of diesel particles influences acute pulmonary toxicity: an experimental study in mice." Inhal Toxicol **20**(11): 1037-42.

- Lara, A., D. D. Damasceno, R. Pires, R. Gros, E. R. Gomes, M. Gavioli, R. F. Lima, D. Guimaraes, P. Lima, C. R. Bueno, Jr., A. Vasconcelos, D. Roman-Campos, C. A. Menezes, R. A. Sirvente, V. M. Salemi, C. Mady, M. G. Caron, A. J. Ferreira, P. C. Brum, R. R. Resende, J. S. Cruz, M. V. Gomez, V. F. Prado, A. P. de Almeida, M. A. Prado e S. Guatimosim (2010). "Dysautonomia due to reduced cholinergic neurotransmission causes cardiac remodeling and heart failure." Mol Cell Biol **30**(7): 1746-56.
- Larsson, N., J. Brown, N. Stenfors, S. Wilson, I. S. Mudway, J. Pourazar e A. F. Behndig (2013). "Airway inflammatory responses to diesel exhaust in allergic rhinitis." Inhal Toxicol **25**(3): 160-7.
- Lawther, P. J., R. E. Waller e M. Henderson (1970). "Air pollution and exacerbations of bronchitis." Thorax **25**(5): 525-39.
- Lehmann, A. D., F. Blank, O. Baum, P. Gehr e B. M. Rothen-Rutishauser (2008). "Diesel exhaust particles modulate the tight junction protein occludin in lung cells in vitro." Part Fibre Toxicol. 2009 Oct 8;6:26. doi: 10.1186/1743-8977-6-26.
- Li, D. J., R. G. Evans, Z. W. Yang, S. W. Song, P. Wang, X. J. Ma, C. Liu, T. Xi, D. F. Su e F. M. Shen (2011). "Dysfunction of the cholinergic anti-inflammatory pathway mediates organ damage in hypertension." Hypertension **57**(2): 298-307.
- Li, N., M. Hao, R. F. Phalen, W. C. Hinds e A. E. Nel (2003). "Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects." Clin Immunol **109**(3): 250-65.
- Li, Y. J., H. Takizawa, A. Azuma, T. Kohyama, Y. Yamauchi, S. Takahashi, M. Yamamoto, T. Kawada, S. Kudoh e I. Sugawara (2010). "Nrf2 is closely related to allergic airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particles in mice." Clin Immunol **137**(2): 234-41.

- Lima Rde, F., V. F. Prado, M. A. Prado e C. Kushmerick (2010). "Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter." J Neurochem. 2010 May;113(4):943-51. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06657.x. Epub 2010 Feb 25.
- Lips, K. S., A. Luhrmann, T. Tschernig, T. Stoeger, F. Alessandrini, V. Grau, R. V. Haberberger, H. Koepsell, R. Pabst e W. Kummer (2007). "Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse." Life Sci. 2007 May 30;80(24-25):2263-9. Epub 2007 Jan 23.
- Lips, K. S., C. Volk, B. M. Schmitt, U. Pfeil, P. Arndt, D. Miska, L. Ermert, W. Kummer e H. Koepsell (2005). "Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium." Am J Respir Cell Mol Biol **33**(1): 79-88.
- Macchione, M., M. King, G. Lorenzi-Filho, E. T. Guimaraes, W. A. Zin, G. M. Bohm e P. H. Saldiva (1995). "Rheological determinants of mucociliary transport in the nose of the rat." Respir Physiol **99**(1): 165-72.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi e M. Locati (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-86.
- Manzo, N. D., A. J. LaGier, R. Slade, A. D. Ledbetter, J. H. Richards e J. A. Dye (2012). "Nitric oxide and superoxide mediate diesel particle effects in cytokine-treated mice and murine lung epithelial cells--implications for susceptibility to traffic-related air pollution." Part Fibre Toxicol **9**: 43.
- Marchini, T., N. D. Magnani, M. L. Paz, V. Vanasco, D. Tasat, D. H. Gonzalez Maglio, S. Alvarez e P. A. Evelson (2014). "Time course of systemic oxidative stress and inflammatory response induced by an acute exposure to Residual Oil Fly Ash." Toxicol Appl Pharmacol **274**(2): 274-82.

- Mauad, T., E. H. Bel e P. J. Sterk (2007). "Asthma therapy and airway remodeling." J Allergy Clin Immunol **120**(5): 997-1009; quiz 1010-1.
- Medeiros, N., Jr., D. H. Rivero, D. I. Kasahara, M. Saiki, J. J. Godleski, P. Koutrakis, V. L. Capelozzi, P. H. Saldiva e L. Antonangelo (2004). "Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition." Environ Res **95**(1): 62-70.
- Medical Publishing, I. (2009). " Asma [Internet]." Clinical Sciences. Acessado, de <http://clinicalsciences.wordpress.com/article/asma-23lvr9hhdbqmt-74/>.
- Molinelli, A. R., M. C. Madden, J. K. McGee, J. G. Stonehuerner e A. J. Ghio (2002). "Effect of metal removal on the toxicity of airborne particulate matter from the Utah Valley." Inhal Toxicol **14**(10): 1069-86.
- Morris, D. (1966). "The choline acetyltransferase of human placenta." Biochem J **98**(3): 754-62.
- Naoum, F. e P. Naoum (2006). Hematologia Laboratorial. Leucócitos. S.J. Rio Preto.
- Nemmar, A., D. Subramanian, S. Zia, J. Yasin e B. H. Ali (2012). "Airway resistance, inflammation and oxidative stress following exposure to diesel exhaust particle in angiotensin II-induced hypertension in mice." Toxicology **292**(2-3): 162-8.
- Norman, G. J., J. S. Morris, K. Karelina, Z. M. Weil, N. Zhang, Y. Al-Abed, H. M. Brothers, G. L. Wenk, V. A. Pavlov, K. J. Tracey e A. C. Devries (2011). "Cardiopulmonary arrest and resuscitation disrupts cholinergic anti-inflammatory processes: a role for cholinergic alpha7 nicotinic receptors." J Neurosci **31**(9): 3446-52.
- Olmo, N. R., P. H. Saldiva, A. L. Braga, C. A. Lin, P. Santos Ude e L. A. Pereira (2011). "A review of low-level air pollution and adverse effects on human health: implications for epidemiological studies and public policy." Clinics (Sao Paulo) **66**(4): 681-90.

- Parrish, W. R., M. Rosas-Ballina, M. Gallowitsch-Puerta, M. Ochani, K. Ochani, L. H. Yang, L. Hudson, X. Lin, N. Patel, S. M. Johnson, S. Chavan, R. S. Goldstein, C. J. Czura, E. J. Miller, Y. Al-Abed, K. J. Tracey e V. A. Pavlov (2008). "Modulation of TNF release by choline requires alpha7 subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling." Mol Med **14**(9-10): 567-74.
- Pavlov, V. A. e K. J. Tracey (2005). "The cholinergic anti-inflammatory pathway." Brain Behav Immun **19**(6): 493-9.
- Pavlov, V. A. e K. J. Tracey (2006). "Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway." Biochem Soc Trans **34**(Pt 6): 1037-40.
- Pinheiro, N., C. Miranda, M. AB, A. Perini, S. Costa, I. Tiberio, M. Martins, V. Prado, M. Prado e C. Prado (2012). Reduction Of Cholinergic Neurotransmission Causes Lung Mechanics Alterations Associated To Airway Inflammation And Remodeling In Mice. C37. MEDIATORS OF ASTHMA AND ALLERGIC LUNG DISEASE, American Thoracic Society: A4289-A4289.
- Pires-Neto, R. C., P. H. N. Saldiva e M. Dolhnikoff (2007). "Efeitos da poluição atmosférica no epitélio respiratório das vias aéreas superiores." RBM. Revista Brasileira de Medicina **1**: 3-9.
- Pope, C. A., 3rd (1989). "Respiratory disease associated with community air pollution and a steel mill, Utah Valley." Am J Public Health. 1989 May;**79**(5):623-8.
- Pope, C. A., 3rd (2000). "Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk?" Environ Health Perspect **108 Suppl 4**: 713-23.
- Pope, C. A., 3rd e D. W. Dockery (2006). "Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect." J Air Waste Manag Assoc **56**(6): 709-42.
- Prado, M. A., R. A. Reis, V. F. Prado, M. C. de Mello, M. V. Gomez e F. G. de Mello (2002). "Regulation of acetylcholine synthesis and storage." Neurochem Int **41**(5): 291-9.

- Prado, V. F., C. Martins-Silva, B. M. de Castro, R. F. Lima, D. M. Barros, E. Amaral, A. J. Ramsey, T. D. Sotnikova, M. R. Ramirez, H. G. Kim, J. I. Rossato, J. Koenen, H. Quan, V. R. Cota, M. F. Moraes, M. V. Gomez, C. Guatimosim, W. C. Wetsel, C. Kushmerick, G. S. Pereira, R. R. Gainetdinov, I. Izquierdo, M. G. Caron e M. A. Prado (2006). "Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition." Neuron. 2006 Sep 7;51(5):601-12.
- Proskocil, B. J., H. S. Sekhon, Y. Jia, V. Savchenko, R. D. Blakely, J. Lindstrom e E. R. Spindel (2004). "Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells." Endocrinology **145**(5): 2498-506.
- Ribeiro, F. M., S. A. Black, V. F. Prado, R. J. Rylett, S. S. Ferguson e M. A. Prado (2006). "The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1." J Neurochem **97**(1): 1-12.
- Riedl, M. e D. Diaz-Sanchez (2005). "Biology of diesel exhaust effects on respiratory function." J Allergy Clin Immunol **115**(2): 221-8; quiz 229.
- Riedl, M. A., D. Diaz-Sanchez, W. S. Linn, H. Gong, Jr., K. W. Clark, R. M. Effros, J. W. Miller, D. R. Cocker e K. T. Berhane (2012). "Allergic inflammation in the human lower respiratory tract affected by exposure to diesel exhaust." Res Rep Health Eff Inst(165): 5-43; discussion 45-64.
- Roberts, E. S., S. E. Malstrom e K. L. Dreher (2007). "In situ pulmonary localization of air pollution particle-induced oxidative stress." J Toxicol Environ Health A **70**(22): 1929-35.
- Rogers, D. F. (2001). "Motor control of airway goblet cells and glands." Respir Physiol **125**(1-2): 129-44.
- Rosas-Ballina, M., P. S. Olofsson, M. Ochani, S. I. Valdes-Ferrer, Y. A. Levine, C. Reardon, M. W. Tusche, V. A. Pavlov, U. Andersson, S. Chavan, T. W. Mak e

- K. J. Tracey (2011). "Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit." Science **334**(6052): 98-101.
- Rosas-Ballina, M. e K. J. Tracey (2009). "Cholinergic control of inflammation." J Intern Med **265**(6): 663-79.
- Saber, A. T., J. S. Lamson, N. R. Jacobsen, G. Ravn-Haren, K. S. Hougaard, A. N. Nyendi, P. Wahlberg, A. M. Madsen, P. Jackson, H. Wallin e U. Vogel (2013). "Particle-induced pulmonary acute phase response correlates with neutrophil influx linking inhaled particles and cardiovascular risk." PLoS One **8**(7): e69020.
- Sagai, M., A. Furuyama e T. Ichinose (1996). "Biological effects of diesel exhaust particles (DEP). III. Pathogenesis of asthma like symptoms in mice." Free Radic Biol Med. 1996;21(2):199-209.
- Saieg, M. A., P. M. Cury, J. J. Godleski, R. Stearns, L. G. Duarte, L. D'Agostino, H. Kahn, E. M. Pinto, T. Mauad, P. H. Saldiva e F. D. Bernardi (2011). "Differential elemental distribution of retained particles along the respiratory tract." Inhal Toxicol **23**(8): 459-67.
- Saldiva, P. H., R. W. Clarke, B. A. Coull, R. C. Stearns, J. Lawrence, G. G. Murthy, E. Diaz, P. Koutrakis, H. Suh, A. Tsuda e J. J. Godleski (2002). "Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition." Am J Respir Crit Care Med **165**(12): 1610-7.
- Saldiva, P. H. N. (1990). "Aparelho mucociliar: aspectos funcionais e métodos de estudo." J Pneumol. **16**(3): 161- 70.
- Salvi, S., A. Blomberg, B. Rudell, F. Kelly, T. Sandstrom, S. T. Holgate e A. Frew (1999). "Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers." Am J Respir Crit Care Med **159**(3): 702-9.
- Salvi, S. S., A. Frew e S. Holgate (1999). "Is diesel exhaust a cause for increasing allergies?" Clin Exp Allergy **29**(1): 4-8.

- Schins, R. P., J. H. Lightbody, P. J. Borm, T. Shi, K. Donaldson e V. Stone (2004). "Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents." Toxicol Appl Pharmacol **195**(1): 1-11.
- Schwartz, J., D. W. Dockery, L. M. Neas, D. Wypij, J. H. Ware, J. D. Spengler, P. Koutrakis, F. E. Speizer e B. G. Ferris, Jr. (1994). "Acute effects of summer air pollution on respiratory symptom reporting in children." Am J Respir Crit Care Med. 1994 Nov;150(5 Pt 1):1234-42.
- Seaton, A., W. MacNee, K. Donaldson e D. Godden (1995). "Particulate air pollution and acute health effects." Lancet **345**(8943): 176-8.
- Smith, R., H. Chung, S. Rundquist, M. L. Maat-Schieman, L. Colgan, E. Englund, Y. J. Liu, R. A. Roos, R. L. Faull, P. Brundin e J. Y. Li (2006). "Cholinergic neuronal defect without cell loss in Huntington's disease." Hum Mol Genet **15**(21): 3119-31.
- SPTTrans. (2013). "Indicadores/Frota contratada." Acessado em 07/07/2014, 2014, de <http://www.sptrans.com.br/indicadores>.
- Stenfors, N., C. Nordenhall, S. S. Salvi, I. Mudway, M. Soderberg, A. Blomberg, R. Helleday, J. O. Levin, S. T. Holgate, F. J. Kelly, A. J. Frew e T. Sandstrom (2004). "Different airway inflammatory responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel." Eur Respir J. 2004 Jan;23(1):82-6.
- Su, X. (2012). "Leading neutrophils to the alveoli: who is the guider?" Am J Respir Crit Care Med **186**(6): 472-3.
- Su, X., J. W. Lee, Z. A. Matthay, G. Mednick, T. Uchida, X. Fang, N. Gupta e M. A. Matthay (2007). "Activation of the alpha7 nAChR reduces acid-induced acute lung injury in mice and rats." Am J Respir Cell Mol Biol **37**(2): 186-92.
- Su, X., M. A. Matthay e A. B. Malik (2010). "Requisite role of the cholinergic alpha7 nicotinic acetylcholine receptor pathway in suppressing Gram-negative sepsis-induced acute lung inflammatory injury." J Immunol **184**(1): 401-10.

- Sydbom, A., A. Blomberg, S. Parnia, N. Stenfors, T. Sandstrom e S. E. Dahlen (2001). "Health effects of diesel exhaust emissions." Eur Respir J. 2001 Apr;17(4):733-46.
- Tayebati, S. K., D. El-Assouad, A. Ricci e F. Amenta (2002). "Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes." J Neuroimmunol **132**(1-2): 147-55.
- Terry, A. V., Jr., D. A. Gearhart, S. E. Warner, G. Zhang, M. G. Bartlett, M. L. Middlemore, W. D. Beck, Jr., S. P. Mahadik e J. L. Waller (2007). "Oral haloperidol or risperidone treatment in rats: temporal effects on nerve growth factor receptors, cholinergic neurons, and memory performance." Neuroscience **146**(3): 1316-32.
- Toledo, A. C., F. M. Arantes-Costa, M. Macchione, P. H. Saldiva, E. M. Negri, G. Lorenzi-Filho e M. A. Martins (2011). "Salbutamol improves markers of epithelial function in mice with chronic allergic pulmonary inflammation." Respir Physiol Neurobiol **177**(2): 155-61.
- Toledo, A. C., C. P. Sakoda, A. Perini, N. M. Pinheiro, R. M. Magalhaes, S. Grecco, I. F. Tiberio, N. O. Camara, M. A. Martins, J. H. Lago e C. M. Prado (2013). "Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model." Br J Pharmacol **168**(7): 1736-49.
- Tracey, K. J. (2002). "The inflammatory reflex." Nature **420**(6917): 853-9.
- Tracey, K. J. (2007). "Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway." J Clin Invest **117**(2): 289-96.
- Turner, M. D., B. Nedjai, T. Hurst e D. J. Pennington (2014). "Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease." Biochim Biophys Acta.
- Valavanidis, A., K. Fiotakis e T. Vlachogianni (2008). "Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and

- composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms." J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev **26**(4): 339-62.
- van Eeden, S. F., W. C. Tan, T. Suwa, H. Mukae, T. Terashima, T. Fujii, D. Qui, R. Vincent e J. C. Hogg (2001). "Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10))." Am J Respir Crit Care Med **164**(5): 826-30.
- van Westerloo, D. J., I. A. Giebelen, S. Florquin, M. J. Bruno, G. J. Larosa, L. Ulloa, K. J. Tracey e T. van der Poll (2006). "The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice." Gastroenterology **130**(6): 1822-30.
- van Westerloo, D. J., I. A. Giebelen, S. Florquin, J. Daalhuisen, M. J. Bruno, A. F. de Vos, K. J. Tracey e T. van der Poll (2005). "The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis." J Infect Dis **191**(12): 2138-48.
- Vieira, R. P., A. C. Toledo, L. B. Silva, F. M. Almeida, N. R. Damaceno-Rodrigues, E. G. Caldini, A. B. Santos, D. H. Rivero, D. C. Hizume, F. D. Lopes, C. R. Olivo, H. C. Castro-Faria-Neto, M. A. Martins, P. H. Saldiva e M. Dolhnikoff (2012). "Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution." Med Sci Sports Exerc **44**(7): 1227-34.
- Wagner, J. G., J. A. Hotchkiss e J. R. Harkema (2001). "Effects of ozone and endotoxin coexposure on rat airway epithelium: potentiation of toxicant-induced alterations." Environ Health Perspect **109 Suppl 4**: 591-8.
- Walters, D. M. e J. C. Bonner (2005). Signal PTransduction and cytokine Expression in particulate matter (PM)-induced airway remodeling. Air Pollutants and the respiratory tract. W. M. Foster and D. L. Costa. **204**: 233-258.
- Wang, H., M. Yu, M. Ochani, C. A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J. H. Li, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C. J. Czura e K. J. Tracey (2003). "Nicotinic acetylcholine

- receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation." Nature **421**(6921): 384-8.
- Wessler, I., F. Bittinger, W. Kamin, F. Zepp, E. Meyer, A. Schad e C. J. Kirkpatrick (2007). "Dysfunction of the non-neuronal cholinergic system in the airways and blood cells of patients with cystic fibrosis." Life Sci **80**(24-25): 2253-8.
- Wessler, I., H. Kilbinger, F. Bittinger, R. Unger e C. J. Kirkpatrick (2003). "The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology." Life Sci **72**(18-19): 2055-61.
- Wessler, I., C. J. Kirkpatrick e K. Racke (1998). "Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans." Pharmacol Ther **77**(1): 59-79.
- Wessler, I. K. e C. J. Kirkpatrick (2001). "The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways." Pulm Pharmacol Ther **14**(6): 423-34.
- WHO. (2008). "World Health Organization." Acessado.
- Win-Shwe, T. T., Y. Fujitani, H. Sone, A. Furuyama, H. Nitta e S. Hirano (2013). "Effects of acute single intranasal instillation of secondary organic aerosol on neurological and immunological biomarkers in the brain and lung of BALB/c mice." J Toxicol Sci **38**(1): 71-82.
- Xu, X., N. Kherada, X. Hong, C. Quan, L. Zheng, A. Wang, L. E. Wold, M. Lippmann, L. C. Chen, S. Rajagopalan e Q. Sun (2009). "Diesel exhaust exposure induces angiogenesis." Toxicol Lett **191**(1): 57-68.
- Yanagisawa, R., H. Takano, K. I. Inoue, T. Ichinose, K. Sadakane, S. Yoshino, K. Yamaki, T. Yoshikawa e K. Hayakawa (2006). "Components of diesel exhaust particles differentially affect Th1/Th2 response in a murine model of allergic airway inflammation." Clin Exp Allergy **36**(3): 386-95.
- Yanamala, N., M. K. Hatfield, M. T. Farcas, D. Schwegler-Berry, J. A. Hummer, M. R. Shurin, M. E. Birch, D. W. Gutkin, E. Kisin, V. E. Kagan, A. D. Bugarski e A. A.

- Shvedova (2013). "Biodiesel versus diesel exposure: Enhanced pulmonary inflammation, oxidative stress, and differential morphological changes in the mouse lung." Toxicol Appl Pharmacol **272**(2): 373-83.
- Yang, X., C. Zhao, Z. Gao e X. Su (2014). "A novel regulator of lung inflammation and immunity: pulmonary parasympathetic inflammatory reflex." QJM.
- Yin, X. J., C. C. Dong, J. Y. Ma, J. M. Antonini, J. R. Roberts, C. F. Stanley, R. Schafer e J. K. Ma (2004). "Suppression of cell-mediated immune responses to listeria infection by repeated exposure to diesel exhaust particles in brown Norway rats." Toxicol Sci **77**(2): 263-71.
- Yokota, S., N. Ohara e T. Kobayashi (2008). "The effects of organic extract of diesel exhaust particles on ischemia/reperfusion-related arrhythmia and on pulmonary inflammation." J Toxicol Sci **33**(1): 1-10.
- Yoshizaki, K., J. M. Brito, A. C. Toledo, N. K. Nakagawa, V. S. Piccin, M. S. Junqueira, E. M. Negri, A. L. Carvalho, A. P. Oliveira, W. T. Lima, P. H. Saldiva, T. Mauad e M. Macchione (2010). "Subchronic effects of nasally instilled diesel exhaust particulates on the nasal and airway epithelia in mice." Inhal Toxicol **22**(7): 610-7.
- Yu, M., X. Zheng, H. Witschi e K. E. Pinkerton (2002). "The role of interleukin-6 in pulmonary inflammation and injury induced by exposure to environmental air pollutants." Toxicol Sci **68**(2): 488-97.
- Zhao, H., J. K. Ma, M. W. Barger, R. R. Mercer, L. Millecchia, D. Schwegler-Berry, V. Castranova e J. Y. Ma (2009). "Reactive oxygen species- and nitric oxide-mediated lung inflammation and mitochondrial dysfunction in wild-type and iNOS-deficient mice exposed to diesel exhaust particles." J Toxicol Environ Health A **72**(8): 560-70.