Petra de Mello Motta Arantes

**Efeitos pulmonares da fumaça de cigarro associada ao
particulado de diesel exaurido (DEP) em camundongos**

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

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Educação e Saúde

Orientador: Prof. Dr. Milton de Arruda
Martins

São Paulo

2015

Petra de Mello Motta Arantes

**Efeitos pulmonares da fumaça de cigarro associada ao
particulado de diesel exaurido (DEP) em camundongos**

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

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Educação e Saúde

Orientador: Prof. Dr. Milton de Arruda
Martins

São Paulo

2015

· · · · · *Dedicatória* · · · ·

`A Mamis, Papis e Vevo!!!

Família que amo!!!

Ao Professor Milton!!!

A Deus!!!

· · · · · ■ · · · · · ■ · · · · · ■ *Agradecimientos* · · · · ·

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha Mamis (Regina), mãe coruja, meu Papis (Marcus), pai exemplar, e meu irmão Vevo (Estevão), irmão fiel; minha amada família!!! Sem palavras!! Vocês são tudo para mim, além de por si só serem pessoas muito especiais e maravilhosas!! Vocês são verdadeiros exemplos de união, cumplicidade, determinação e bem querer!!! O apoio de vocês foi muitíssimo importante e fundamental para a realização e conclusão desta etapa!!! Amo vocês e O NOSSO AMOR É ESSENCIAL para cada dia da minha vida! Obrigada!!!

À minha família de modo geral que, em todas as conversas, risadas, lágrimas e convivência, contribuiu para que eu me tornasse esta pessoa que sou.

Agradeço a todos os meus familiares e, em especial, à minha Vovis que sempre me quis bem e se orgulhava a cada conquista minha! E à minha tia-madrinha Ette pela amizade, amor e carinho, e, com certeza, por estar presente efetivamente, em meio à correria, encontros e desencontros me auxiliando na revisão de texto desta tese! VOCÊ É LINDA! Obrigada!!!

Ao Professor Milton, pela orientação, apoio, paciência e entendimento desde o início e em todos os momentos e quesitos profissionais e pessoais! Por me incentivar, ser exemplo de atitudes e comportamentos em relacionamentos interpessoais e profissionais, os quais pretendo incorporar em minha vida profissional, acadêmica e pessoal! E por sua humanidade!!! Obrigada pela oportunidade de conhecer novas culturas e o mundo da pesquisa nelas, além de crescer com elas! Além de, é claro, pela

oportunidade de desenvolver o estudo que originou esta tese e a abertura de caminhos futuros! Simplesmente posso dizer que o senhor é UMA EXCELENTE PESSOA E UM EXCELENTE E ADMIRÁVEL profissional! Obrigada!!!

À Alessandra, poxa Alê, obrigada por tudo, pelo carinho, por todos os conselhos, trabalho de bancada, discussões de dados e, com certeza, por me iniciar na pesquisa com o “fumo”! Ah, e no mundo do blues, por que não? rsrs!!! Obrigada pela mão (literalmente rsrs), orações e amizade! Bjoos! TE ADORO SEMPRE! Obrigada!!!

À Fernanda Lopes, pela convivência tanto no laboratório quanto nos almoços, caronas, risadas e “toques”. Obrigada, Fê, por me auxiliar em todos os momentos. Agradeço sua ajuda durante todo o percurso para elaboração desta tese. Você foi fundamental! Obrigada!!!

À Francine, é Fran,... obrigada por sua coluna e olhos, rsrs. O BAL cada vez mais surpreendente levou a hipóteses legais! Afinal, resultado é resultado! Isso é pesquisa, né?! Obrigada por tudo em todo o percurso!! Obrigada pela amizade! TE ADORO, LINDA! Obrigada!!!

À Fernanda Arantes, Fê,... obrigada pelas co-orientações em paralelo rsrs, durante todo o período de dúvidas e discussões, pelas risadas, toques e ombro amigo. Você é muito linda, brilhante e um exemplo de profissional! Obrigada por tudo, AMIGA! Obrigada!!!

À Clarice, Claris,... obrigadinha. Você me ajudou muito... obrigada pela ajuda nos experimentos!! Obrigada por me ensinar a te conhecer e ser EXEMPLO DE FORTALEZA! Obrigada pela cumplicidade sempre, happy hours, viagens - Uhuuu,

muito delíciaaaa, essas vão ficar nas nossas histórias, baladinhas para extravasar e confiança! Você se fez AMIGA em muitos momentos deste trabalho!!! Obrigada!!!

Ao Paolo, pelas macrodiscussões que contribuíram muito para o desenvolvimento do projeto e das discussões nesta dissertação. Obrigada, “jovem Einstein” brilhante, tanto como profissional, intelectual e humano! Obrigada também pelas consultas rsrs! Obrigada!!!

Aos alunos de iniciação, essenciais na boa vontade, disciplina e eximiedade! Obrigada, Renato, Agostinho e Bernardo. Obrigada ainda à Ligia e Paty... MAIS QUE ALUNAS LINDAS E ESPECIAIS!! Obrigada tanto pela ajuda nos experimentos e compilação de dados quanto pelo amor e amizade. Vocês são muito especiais e promissoras! Obrigada!!!

Quero também externar a imensa honra de poder, durante este trabalho, ter convivido e recebido a colaboração da professora e companheira de viagens Dra. Mariângela Macchione. Obrigada, Macchi, pelo fornecimento do DEP, pela contribuição intelectual e pela amizade! VOCÊ É UMA PROFISSIONAL ADMIRÁVEL E INIGUALÁVEL!!! Bjinhos! Obrigada!!!

E também ao Dr. Chin, pelo apoio, paciência e grande habilidade em ensinar a pensar na Bio Mol! Obrigada!!!

À pesquisadora Walcy e às meninas do laboratório por cederem o laboratório para a realização dos ensaios de imunofluorescência! Obrigada!!!

Ao professor Paulo Saldiva e ao Marco Martins, por me auxiliarem e engrandecerem o conhecimento sobre a poluição atmosférica. Obrigada!!!

À Rosana e Edninha,...lindas, e como SEMPRE PRONTAS E EXTREMAMENTE PERFECCIONISTAS. Obrigada, mulheres de minha vida, por todo o auxílio com os papéis e tudo o mais. Obrigada!!!

Ao Davi, eita, Davi você foi super! Obrigada por ajudar com os camunguinhas, com as caixas, descarte de formol, e muitas outras ajudas durante os experimentos, além de vários outros favores! E pela convivência com a PESSOA DÓCIL E PRESTATIVA que você é! Obrigada!!!

A todos os profissionais do Laboratório de Histologia e Imunohistoquímica, em especial à Kelly e à Ângela, pela boa vontade, apoio técnico e logístico. Vocês foram essenciais!! Obrigada!!!

Aos funcionários do Biotério: Luis e Ivan, por cuidarem e auxiliarem com a manutenção dos animais, fundamentais para esta pesquisa! Obrigada!!!

Agradeço aos funcionários da Secretaria do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas – Faculdade de Medicina – USP. Rose e Angélica. Chegou a hora, obrigadinha!!! Rsrs. Obrigada!!!

Aos meus AMIGOS DE CAMUNGUINHAS! Àqueles que estiveram nos experimentos de bancada e aos que não, a todos do lab que apareceram e dividiram quaisquer momentos desses anos!!! Obrigada, meninas e meninos!! A CONVIVÊNCIA SEMPRE É UMA ÓTIMA EXPERIÊNCIA!! Obrigada... Bia, Felipe, Rafa, Adenir, Professora Lúcia, Fê Roncon, Naty, Fê Bruni, Fabi, Camila!!! A convivência com vocês deixa saudades!! Obrigada!!!

À Rubia, por ser minha amiga de anos e dividir e estar presente em vários momentos gostosos e de dificuldade tanto no âmbito profissional quanto pessoal durante esses anos, e por ter uma grande relação de AMIZADE-AMOR! Obrigada, Rubinha!!!

À Sara, por ser um anjo! Isso, um anjo! Por ser amiga de laboratório há anos e por me dar apoio e estar ao meu lado, literalmente, no final desta trajetória, me auxiliando na revisão e estruturação do artigo e da tese! VOCÊ É UM EXEMPLO DE BONDADE E HUMANIDADE! Obrigada, Sarinha, SaraLi!!! Obrigada!!!

A todos os amigos e colegas de aventuras, “sujinhos ou não”, “de copo ou não”, de Sampa e adjacências, fundamentais para que eu pudesse enfrentar esta jornada com sorriso no rosto. Vocês foram fantásticos! Galerinha!! Obrigada a todos e desculpe quem esqueci. Acreditem, minha memória é bem mais birutinha que meu coração! Obrigada!!!

A Paulinha e Flá, companheiras da “Pimenta Rocha” – minha casinha. Obrigada pelo apoio e incentivo direto ou indireto que influenciaram neste trabalho. Obrigada, meninas, por todos os momentos que dividimos em nossa rep, sempre um crescimento pessoal! Bjoos! Obrigada!!!

Flá, obrigadinha pelos dias passados ao lado para eu escrever e conquistar mais este passo em minha vida. Obrigada!!!

E por último e não menos que principal, obrigada a Deus por poder defender este trabalho e ser cercada de pessoas e anjos que me fazem feliz! Amém!!!

Verdadeiramente agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o bom desenvolvimento deste trabalho e, com certeza, aos “suportters”: FFM (Fundação Faculdade de Medicina), FAPESP(Fundação de Amparo

à Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao Laboratório de Investigação Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (LIM/HC).

Obrigada a todos!!!! Com amor!!!!

Este trabalho recebeu apoio financeiro da FAPESP

(Processo 2008/57121-6)

· · · · · *Epígrafe* · · · ·

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original”. Albert Einstein*

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. 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*.

.....	<i>Sumário</i>	
-------	----------------	------

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC)	2
1.1.1 Epidemiologia da DPOC.....	2
1.1.2 Fatores de Risco para Desenvolvimento da DPOC.....	3
1.1.3 Fisiopatogênese e Histopatologia da DPOC	4
1.1.4 Modelos Experimentais em DPOC	12
1.1.5 Modelos Experimentais Temporais em DPOC	15
1.2 DPOC x POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA.....	17
1.2.1 Aspectos Gerais	17
1.2.2 Mecanismos de Defesa Pulmonar.....	18
1.2.3 Toxicidade e Ação do DEP	20
2. MÉTODOS	24
2.1 ANIMAIS	24
2.2 EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO	27
2.3 INSTILAÇÃO DE DEP.....	30
2.4 AVALIAÇÃO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA	32
2.5 LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)	33
2.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA	34

2.7	ANÁLISE DOS DADOS.....	41
3.	RESULTADOS.....	43
3.1	ANÁLISE DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA	43
3.2	ANÁLISE DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA).....	47
3.3	ANÁLISE DA MORFOMETRIA PULMONAR.....	52
3.4	QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO ESPAÇO PERIBRÔNQUICO..	55
3.5	QUANTIFICAÇÃO DE EDEMA NA REGIÃO PERIBRONCOVASCULAR	57
3.6	CÉLULAS POSITIVAS PARA Mac-2 E MMP-12 NO PARÊNQUIMA PULMONAR.....	59
3.7	PROPORÇÃO DE VOLUME DE FIBRAS DE ELASTINA NO PARÊNQUIMA PULMONAR.	61
3.8	PROPORÇÃO DE VOLUME DE FIBRAS DE COLÁGENO TIPO III NO PARÊNQUIMA PULMONAR.	64
4.	DISCUSSÃO	67
4.1	EFEITOS DA FUMAÇA DE CIGARRO	69
4.2	EFEITOS DO PARTICULADO DE DIESEL EXAURIDO	72
4.3	EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DA FUMAÇA DE CIGARRO E DO PARTICULADO DE DIESEL EXAURIDO.....	75
5.	CONCLUSÕES	79
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

..... *Listas*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	por cento
µg	microgramas
µL	microlitros
µm	micrômetros
bits	<i>Binary digits</i>
°C	grau Celsius
cm	centímetros
CO	monóxido de carbono
cv	cavalo vapor
Dr.	doutor
et al.	e outros
g	gramas
H₂O	água
Hz	Hertz
Inc.	<i>Incorporation</i>
Kg	quilogramas
L	litros
mg	miligramas

min	minutos
mL	mililitros
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanogramas
nm	nanômetro
ppb	partes por bilhão
ppm	partes por milhão
Prof.	professor
rpm	rotações por minuto
s	segundos

LISTA DE SIGLAS

α-1 AT	alfa-1 antitripsina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Grupo Controle
CAPPesq	Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa
DAB	<i>3,3´diaminobenzidine</i>
DAPI	<i>4,6 diamidino-2phenylindole</i>
DATASUS	Banco de Dados do Sistema Único de Saúde
DEP	<i>Diesel Exhausted Particle</i>
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EN	Elastase Neutrofílica
Ers	<i>Respiratory system elastance</i>
FC	Grupo Fumaça de Cigarro
FC + DEP	Grupo Fumaça de Cigarro e Diesel
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GOLD	<i>Global Initiative on Obstructive Lung Disease</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
LBA	Lavado Broncoalveolar
LBT	Leucotrieno B4
LIM	Laboratórios de Investigação Médica

Lm	<i>Mean Linear Intercept</i>
MCP	<i>Monocyte Chemotactic Protein</i>
MMP	<i>Matrix Metalloprotease</i>
PAHs	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PM	<i>Particulate Matter</i>
Rrs	<i>Respiratory system resistance</i>
SA	Sociedade Anônima
SBPT	Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia
SD	<i>Standard Deviation</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
V	Grupo Veículo
VEF	Volume Expiratório Forçado
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais.....	26
Figura 1 - Caixa de exposição à fumaça de cigarro (modificada de Biselli et al., 2011). Os animais do grupo FC e FC+DEP foram mantidos nesta caixa por 30 minutos ao dia, 5 dias por semana, por 1, 3 e 6 meses. A cada dia, os grupos foram invertidos de lado para que a exposição fosse homogênea	28
Tabela 2 - Concentração dos principais componentes por unidade do cigarro da marca Derby® Vermelho (Souza Cruz SA, Rio de Janeiro, RJ, BR)	29
Tabela 3 - Principais componentes de metais (ppb) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - PAHs (ng/g) do material particulado, proveniente da queima de diesel de motores de ônibus de transporte urbano da cidade de São Paulo (modificada de Laks et al., 2008)	31
Figura 2 - Valores de elastância do sistema respiratório (Ers) medidos nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 1, 3 e 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com V em 1 mês (p=0,012) **Comparado com FC em 3 meses (p=0.021).....	45
Figura 3 - Valores de resistência do sistema respiratório (Rrs) medidos nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 1, 3 e 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com V e DEP em 1 mês (p=0,008) **Comparado com V e DEP em 3 meses (p=0.009) ***Comparado com V e DEP em 6 meses (p≤0.001)	46
Figura 4 - Perfil inflamatório no lavado broncoalveolar (LBA) nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro	

e Diesel (FC+DEP), após 1 mês de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com o grupo V em macrófagos ($p=0,037$)..... 49

Figura 5 - Perfil inflamatório no lavado broncoalveolar (LBA) nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 3 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com os grupos V, DEP e FC+DEP em células totais ($p\leq 0,001$) **Comparado com os grupos DEP e FC+DEP em linfócitos ($p\leq 0,001$) ***Comparado com os grupos V, DEP e FC+DEP em macrófagos ($p\leq 0,001$)..... 50

Figura 6 - Perfil inflamatório no lavado broncoalveolar (LBA) nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com V e FC+DEP em células totais ($p\leq 0,001$) **Comparado com V, FC e DEP em células totais ($p\leq 0,001$) ***Comparado com V, FC e DEP em neutrófilos ($p=0,007$) ****Comparado com V e FC+DEP em linfócitos ($p=0,012$) *****Comparado com V e FC+DEP em macrófagos ($p\leq 0,001$) *****Comparado com V em células epiteliais ($p\leq 0,001$)..... 51

Figura 7 - Intercepto linear médio (Lm) próximo à pleura nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 1, 3 e 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com o grupo FC+DEP, após 1 mês de exposição ($p=0,001$) **Comparado com o grupo V, após 6 meses de exposição ($p<0,001$)..... 53

Figura 8 - Fotomicrografia do parênquima pulmonar dos camundongos, após 6 meses de exposição. Parênquima pulmonar de camundongos que receberam instilação intranasal de veículo - NaCl 0,9% – grupo V (A.1). Parênquima pulmonar de camundongos que foram submetidos à exposição à fumaça de cigarro – grupo FC (A.2), instilação intranasal de solução DEP – grupo DEP (A.3), e aqueles que receberam ambos os tratamentos – grupo FC+DEP (A.4). Magnitude original de 400x e coloração em hematoxilina e eosina 54

Figura 9 - Proporção de células polimorfonucleares no espaço peribroncoalveolar nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça

de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 1, 3 e 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com V e FC, após 3 meses de exposição ($p \leq 0,001$) **Comparado com V, DEP e FC+DEP, após 6 meses de exposição ($p \leq 0,001$) ***Comparado com V, FC e FC+DEP, após 6 meses de exposição ($p \leq 0,001$) ****Comparado com V, FC e DEP, após 6 meses de exposição ($p \leq 0,001$)..... 56

Figura 10 - Proporção de edema peribroncovascular nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 1, 3 e 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com V, FC e DEP em 1 mês ($p \leq 0,001$) **Comparado com V em 3 meses ($p = 0,015$) ***Comparado com V em 6 meses ($p = 0,004$)..... 58

Figura 11 - Expressão de MMP-12 (A) e Mac-2 (B) no parênquima pulmonar por ensaios de imunohistoquímica nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com o grupo V ($p \leq 0,001$) **Comparado com os grupos V e FC ($p \leq 0,001$) ***Comparado com o grupo V ($p \leq 0,001$) 60

Figura 12 - Proporção de volume de elastina no parênquima pulmonar por ensaios de imunohistoquímica nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com V, DEP e FC + DEP ($p \leq 0,001$) **Comparado com V, FC e FC + DEP ($p \leq 0,001$) ***Comparado com V, FC e DEP ($p \leq 0,001$) 62

Figura 13 - Fotomicrografias representativas de parênquima pulmonar de camundongos, imunomarcado para fibras de elastina nos grupos experimentais, após 6 meses de exposição de instilação intranasal de veículo - NaCl 0,9% – grupo Veículo (A.1), exposição à fumaça de cigarro – grupo FC (A.2), instilação intranasal de solução DEP – grupo DEP (A.3), e aqueles que receberam ambos os tratamentos – grupo FC+DEP (A.4). Magnitude original de 400x 63

Figura 14 - Proporção de volume de colágeno tipo III, no parênquima pulmonar por ensaios de imunofluorescência nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de

Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com V, FC e DEP ($p \leq 0,001$). Fotomicrografias representativas de parênquima pulmonar imunomarcado para colágeno tipo III, por meio de ensaios de imunofluorescência nos grupos experimentais, após 6 meses de exposição de instilação intranasal de veículo - NaCl 0,9% – grupo Veículo (A.1), exposição à fumaça de cigarro – grupo FC (A.2), instilação intranasal de solução DEP – grupo DEP (A.3), e aqueles que receberam ambos os tratamentos – grupo FC+DEP (A.4). Magnitude original de 400x..... 65

..... *Resumo e Abstract*
..... *Summary and Abstract*

Arantes PMM. *Efeitos pulmonares da fumaça de cigarro associada ao particulado de diesel exaurido (DEP) em camundongos*[Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é caracterizada por limitação de troca gasosa e considerada uma doença progressiva, não reversível e associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas e gases nocivos, e com implicações extrapulmonares. A fumaça de cigarro (FC) é a principal causa, uma vez que 80% dos casos de DPOC estão associados ao tabagismo. A poluição atmosférica também é considerada um fator de risco para o desenvolvimento, aceleração, exacerbação e mortalidade na DPOC. Além disso, o material particulado resultante da queima do diesel (do inglês, *Diesel Exhaust Particle* - DEP) é a principal fonte de poluição atmosférica relacionado ao tráfego de veículos. Muitos estudos têm demonstrado efeitos nocivos da fumaça de cigarro e da poluição atmosférica para saúde humana, no entanto, poucos se referem à associação desses dois fatores. Considerando que um fumante em área urbana submete-se cotidianamente aos dois fatores exógenos simultaneamente, avaliamos os efeitos da associação da FC e do DEP proveniente de motores movidos a diesel na cidade de São Paulo, no desenvolvimento do enfisema pulmonar, durante 1, 3 e 6 meses de exposição. Os camundongos foram divididos em quinze grupos: controle (C); veículo (V) (NaCl 0,9%); DEP (30µg DEP em 10µL NaCl 0,9%/dia, 5 dias/semana); FC (expostos à FC 30 min/dia, 5 dias/semana); e FC+DEP. Avaliamos a mecânica respiratória; células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA); intercepto linear médio (Lm) e morfometria e remodelamento: edema peribroncovascular, MMP-12, Mac-2, elastina e colágeno III. Houve um aumento significativo na resistência das vias aéreas em FC e FC+DEP, comparado ao V e DEP em 6 meses. Observamos aumento do Lm após 6 meses nos grupos FC, DEP e FC+DEP, comparado ao V. O número total de células no LBA e os macrófagos aumentaram após 3 meses de exposição à FC, e após 6 meses à FC ou DEP. No entanto, houve diminuição de células totais em FC+DEP, após 6 meses de exposição, comparado ao V. As células polimorfonucleares nas vias aéreas aumentaram após 3 e 6 meses, principalmente em DEP e FC+DEP. O edema peribroncovascular aumentou no grupo FC+DEP após 1 mês de exposição, em FC e DEP após 3 meses e em FC e FC+DEP após 6 meses. As proporções de elastina aumentaram nos grupos FC, DEP e FC+DEP; de colágeno III somente em FC+DEP; e a densidade de células MMP-12 positivas em FC, DEP e FC+DEP, e Mac-2 em DEP, todos após 6 meses de exposição. Portanto, a instalação da DPOC, com alargamento dos espaços alveolares, ocorreu após 6 meses de exposição independentemente das partículas exógenas inaladas. No entanto, não detectamos piora do enfisema quando os animais receberam inalação de ambos: FC+DEP. A análise do perfil celular mostrou aumento nas células inflamatórias após a exposição de FC ou DEP, por diferentes vias, enquanto a interação de FC+DEP mostrou um efeito aditivo, atenuando o processo inflamatório após os 6 meses de exposição, apesar de sua intensa atuação no remodelamento tecidual. Nosso trabalho corrobora para esclarecimentos dos efeitos aditivos da interação entre FC e DEP, mimetizando um fumante exposto à poluição atmosférica urbana. O esclarecimento sobre essa complexa interação ainda se faz necessário e é um vasto campo de pesquisa em doenças pulmonares.

Descritores: Doença pulmonar obstrutiva crônica; Hábito de fumar/efeitos adversos; Poluição do ar; Emissões de veículos; Uso de tabaco; Modelos animais; Camundongos.

Arantes PMM. *Pulmonary effects of cigarette smoke associated to diesel exhaustedparticle (DEP) in mice*[Thesis]. São Paulo: Medical School, São Paulo University; 2015.

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by limitation of gas exchange and is considered a non-reversible, progressive disease and associated with an abnormal inflammatory response of the lungs to particles and harmful gases, with extra-pulmonary symptoms. Cigarette smoke (CS) is the major cause, since 80% of COPD cases are associated with smoke. Also, the air pollution is considered a risk factor in the development, acceleration, exacerbation and mortality of COPD. Moreover, diesel exhaust particles (DEP) are a major source of traffic-related air pollution. Many studies have demonstrated the damaging effects of CS and air pollution on human health; however, few have related the association between the two factors. Considering a smoker in an urban area undergoes daily to this two exogenous agents simultaneously, we evaluated the effects of CS associated to DEP, from diesel-powered engines in the São Paulo city, on emphysema development at 1, 3 and 6 months. Mice were divided into fifteen groups: control (C); vehicle (V) (NaCl 0.9%); DEP (30µg DEP in 10µl NaCl 0.9%/day, 5 days/wk); CS (exposed to CS, 30 minutes/day, 5 days/wk); and CS+DEP. We evaluated respiratory mechanics; inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF); mean linear intercept (Lm) and morphometry and remodeling: peribronchovascular edema, MMP-12, Mac-2, elastin and collagen-III. There was a significant increase in airway resistance in CS and CS+DEP compared to group V and DEP at 6 mo. We observed an increase in Lm after 6 mo in the CS, DEP and CS+DEP groups compared to group V. The total number of cells in BALF and macrophage showed an increase at 3 mo of CS exposure and at 6 mo of CS or DEP exposure. However, there was a decrease of the number of total cells at 6 mo in CS+DEP compared to V. Polimorphonuclear cells in airways were increased after 3 and 6 months mainly in the DEP and CS+DEP groups. Peribronchovascular edema was increased in the CS+DEP group after 1 mo, CS and DEP groups after 3 mo and CS and CS+DEP groups after 6 mo. Elastin, increased for the CS, DEP and CS+DEP groups and collagen III only for the CS+DEP group; and the density of MMP-12 positive cells in CS, DEP and CS+DEP, and Mac-2 in DEP, all after 6 months of exposure. Therefore, the onset of COPD, with enlargement of alveolar spaces, occurs after 6 mo of exposure independent of which exogenous particles were inhaled. However, we did not show an impairment in emphysema when animals received both CS+DEP inhalation. Analysis of cell profiles showed an increase in inflammatory cells after CS or DEP exposure, but on different pathways, while interaction of CS+DEP showed an additive effect that attenuated the inflammatory process after 6 mo and that intensively acted on remodeling mechanisms. Our study supports the additives effects of the interaction between CS and DEP, mimicking a smoker exposed to urban air pollution. And reaffirms that this complex interaction still demand more clarification and it is a great field of research in lung disease.

Descriptors: Pulmonary disease, chronic obstructive; Smoking/adverse effects; Air pollution; Vehicle emissions; Tobacco use; Models, animal; Mice.

· · · · · *Introdução* · · · ·

1. INTRODUÇÃO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma patologia tratável, caracterizada pela persistente limitação do fluxo aéreo, geralmente progressiva e associa a resposta inflamatória anormal dos pulmões às partículas e gases nocivos. (GOLD - *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*, 2014).

1.1 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC)

1.1.1 Epidemiologia da DPOC

Segundo a Organização Mundial de Saúde (do inglês, *World Health Organization* - WHO), estima-se uma prevalência mundial de 65 milhões de pessoas que apresentam Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, ocupando o quarto lugar no ranking mundial das causas mais frequentes de morte (WHO, 2010).

Nos Estados Unidos, em 2000, a DPOC apresentou uma prevalência de 24 milhões de pessoas com evidências de limitação de troca gasosa, sendo 10 milhões de adultos devidamente diagnosticados, e um gasto de 14,5 bilhões de dólares no ano de 1996. Ela é, portanto, considerada uma patologia de alta prevalência e alto custo (Chapman et al., 2006).

No Brasil, segundo dados relativos ao ano de 2009 do Banco de Dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS), as doenças do sistema respiratório configuram como a quarta causa mais frequente de mortalidade, estando a DPOC em primeiro lugar nas

estatísticas de mortalidade por doenças respiratórias. No ano de 2010, foram 141.994 hospitalizações, culminando em um custo de R\$ 92.434.415,51, além de 7.937 mortes.

A prevalência da doença aumenta com a idade, com consequente perda funcional pulmonar que ocorre em todos os indivíduos. No Brasil, 15,8% dos adultos com idade acima de 40 anos apresentam DPOC. Segundo a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT), estima-se que entre 3 e 7 milhões de brasileiros tenham DPOC (Jardim; Nascimento, 2007).

Em São Paulo, a prevalência de DPOC, definida por espirometria, foi de 8,4% nos indivíduos entre 40 e 49 anos; 16,2% na faixa entre 50 e 59 anos; e 25,7% nos indivíduos com 60 anos ou mais, segundo estudo realizado em 2005 (Menezes et al., 2008).

O cigarro constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC e a incidência cumulativa pode dobrar ou triplicar com a exposição a esse agente (GOLD, 2014).

Em países desenvolvidos, o tabagismo reduz, em média, 13 anos de vida do fumante (Mannino et al., 2002). No Brasil, na cidade de São Paulo, foi demonstrada uma prevalência de 21,8% de DPOC entre os tabagistas, 15,6% entre ex-fumantes e 12,5% entre não-fumantes (Menezes et al., 2005).

1.1.2 Fatores de Risco para Desenvolvimento da DPOC

O tabagismo é o mais importante fator ambiental na patogênese da DPOC, independentemente da quantidade de cigarros consumidos. A susceptibilidade à doença provavelmente resulta de múltiplos componentes genéticos e de fatores ambientais.

A maioria dos pacientes com DPOC - 80% - são tabagistas; e menos de 2% dos casos relacionam-se à deficiência de α -1 antitripsina (α -1 AT) (Sampsonas et al., 2006;

Molfino, 2007; Teramoto, 2007). O acompanhamento de pessoas até a idade de 75 anos, por um período de 30 anos, mostrou uma incidência de DPOC de 32% em fumantes, de 14% em ex-fumantes e de 12% em não-fumantes (Pelkonen et al., 2006).

Fatores genéticos como a deficiência em α -1 AT e fatores ambientais como exposição ocupacional e poluição atmosférica por queima de madeira e combustíveis também são fatores de risco para a DPOC (Salvi; Barnes, 2009; GOLD, 2014).

A exposição a poluentes atmosféricos está associada a doenças pulmonares, cardiovasculares e câncer de pulmão (Dockery et al., 1993; Schwartz et al., 1994; Pope; Koenig, 2005; Bayram; Dikensoy, 2006).

A atmosfera urbana é uma complexa mistura de poluentes: gases e particulados, contendo componentes líquidos e sólidos que apresentam diversos tamanhos e composição. Os poluentes relacionados ao tráfego referem-se a maior fonte de poluentes da atmosfera urbana, sendo o material particulado de diesel exaurido, do inglês, *Diesel Exhausted Particle* (DEP), o principal componente (Sydbom et al., 2001).

Mesmo em níveis considerados aceitáveis, a poluição atmosférica associa-se à exacerbação de doenças respiratórias, aumentando o número de hospitalizações e mortalidade (Pinkerton et al., 2000; Halonen et al., 2009).

1.1.3 Fisiopatogênese e Histopatologia da DPOC

A DPOC é um sério problema de saúde pública global que, associado ao aumento na expectativa de vida, preocupa a Organização Mundial de Saúde que considera a DPOC como uma epidemia que deve eclodir em 2030 e estima que ocupe a terceira e quinta posição dentre as causas de morte e de incapacitação mundial, respectivamente (WHO, 2010).

As principais DPOCs são o enfisema pulmonar e a bronquite crônica, podendo ser concomitantes ou não, de caráter parcialmente reversível e de gradação variável (Pauwels; Rabe, 2004).

O enfisema pulmonar é definido como uma alteração da arquitetura pulmonar, com destruição de parênquima e consequente aumento dos espaços aéreos distais até os bronquíolos terminais, presença de células inflamatórias como macrófagos, linfócitos CD4+ e CD8+ e aumento do desequilíbrio entre proteases e antiproteases (Voelkel, 2008).

Originalmente, foi descrito por Ruysch, no final do século 17, e pelo médico francês Laënnec, no século 19 (Laënnec, 1819), que notaram variação no tamanho dos espaços alveolares, devido à ruptura das paredes alveolares (Laënnec, 1834).

A bronquite crônica é definida como a presença de tosse com expectoração por pelo menos 3 meses, por 2 anos consecutivos. No entanto, muitos pacientes apresentam graus variados das duas alterações patológicas: tosse produtiva e destruição do parênquima pulmonar. Assim, a definição proposta atualmente não utiliza os termos enfisema e bronquite crônica, mas caracteriza a doença por sua manifestação principal, a limitação do fluxo aéreo (GOLD, 2014).

A DPOC associa-se a uma combinação de mecanismos de inflamação, desequilíbrio protease-antiprotease, estresse oxidativo, apoptose e remodelamento tecidual - que resulta na destruição da matriz extracelular do alvéolo pulmonar, com consequente alargamento do parênquima pulmonar e redução na área capilar para trocas gasosas, além da obstrução em vias aéreas maiores e menores (Gronenberg; Chung, 2004).

INFLAMAÇÃO

A fumaça de cigarro ou de outros agentes nocivos bem como a poluição ativam as células epiteliais pulmonares que produzem mediadores inflamatórios, responsáveis pela ativação de diversos tipos celulares do sistema imune. As células dendríticas, em contato com substâncias exógenas, também acionam respostas inflamatórias e células do sistema imunológico, como macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B (Di Stefano et al., 2004).

Os macrófagos são frequentemente encontrados em estudos de pacientes com DPOC: no parênquima, nas glândulas submucosas e no lavado broncoalveolar (LBA). Em fumantes, o tecido e o espaço alveolar apresentam 25 vezes mais macrófagos do que em não-fumantes. Diante da exposição à fumaça de cigarro, os macrófagos podem ser ativados e, dessa forma, estimulam a liberação de mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumor Necrosis Factor* - TNF)- α , interleucina (IL)-8, quimiocinas como peptídeo quimiotático para monócitos (do inglês, *Monocyte Chemotactic Protein* - MCP)-1, leucotrieno B4 (LBT) e tipos diversos de espécies reativas de oxigênio. Esses mediadores, por sua vez, atraem células responsáveis pela inflamação, como neutrófilos, monócitos e linfócitos T CD8+. Os macrófagos ativados também estimulam a secreção de enzimas metaloproteinases de matriz (do inglês, *Matrix Metalloprotease* - MMP)-2, MMP-9 e MMP-12, catepsinas K, L e S e elastase neutrofílica (EN) proveniente de neutrófilos, além de aumentar a secreção de proteínas inflamatórias e a atividade elastolítica (Retamales et al., 2001; Russel et al., 2002). Podem, portanto, agir como: mediadores do processo inflamatório iniciado pelas toxinas dos cigarros e poluentes, e/ou efetores da lesão pulmonar, promovendo destruição do parênquima.

Os neutrófilos são encontrados em maior quantidade em doenças crônicas que acometem principalmente as vias aéreas e em fases mais avançadas de DPOC

(Finkelstein et al., 1995). Secretam proteínas serinas, incluindo a elastase neutrofílica, catepsinas, proteinase-3 e as MMP-8 e MMP-9, contribuindo para a destruição do parênquima pulmonar e fibras elásticas, e produção de muco (Saetta et al., 1994).

Tanto no parênquima pulmonar quanto nas vias aéreas centrais e periféricas, o número total de linfócitos está aumentado em pacientes com DPOC. Esse aumento correlaciona-se com o grau de destruição alveolar e com a severidade da obstrução. No entanto, há maior aumento de linfócitos T CD8+ comparado aos T CD4+ e, em casos de fumantes, isto é mais evidente. As células T CD8+ promovem citólise e apoptose de células epiteliais alveolares por meio de liberação de perforinas e TNF- α (Retamales et al., 2001). Em camundongos enfisematosos expostos à fumaça de cigarro, o grau da doença é diretamente relacionado com a fração de linfócitos T (Takubo et al., 2002).

Eosinófilos são mais raramente encontrados em pacientes com DPOC e sua presença pode marcar a coexistência de asma, podendo estar presente nas exacerbações da doença (Keatings; Barnes, 1997; Brightling et al., 2000).

DESEQUILÍBRIO PROTEASE-ANTIPROTEASE

Na década de 60, foi observado, em pacientes jovens com deficiência de α -1 AT, o aparecimento precoce de DPOC (Eriksson, 1965). A α -1 AT é uma antiprotease produzida no fígado e liberada no sangue, cuja principal função, no pulmão, é neutralizar a ação de proteases como a EN e MMPs, notórias no surgimento de enfisema pulmonar e bronquite crônica (Shapiro; Ingenito, 2005).

Evidências na literatura apoiam a hipótese de que o principal mecanismo patogênico no enfisema seja um desequilíbrio nos sistemas de protease e antiprotease (Shapiro; Ingenito, 2005), induzindo a uma maior predisposição para a instalação de DPOC e favorecendo a destruição tecidual (Wood; Stockley, 2007).

As infecções pulmonares, exposição a poluentes e o tabagismo também influenciam na gênese da DPOC, promovendo o desequilíbrio entre proteases e antiproteases. A inalação de fumaça de cigarro induz redução da atividade da α -1 AT no lavado broncoalveolar de fumantes, comparado a não-fumantes (Gadek et al., 1979; Carp et al., 1982), e também promove o aumento no número de neutrófilos e macrófagos nos pulmões e a liberação de enzimas proteolíticas, tais como MMP-12, MMP-9, EN, catepsina K, L, S, proteinase-3 (Retamales et al., 2001; Russel et al., 2002). A liberação de proteases e a ação não efetiva das antiproteases levam à proteólise do tecido conectivo pulmonar (fibras) e ao aumento dos espaços alveolares ou enfisema (MacNee, 2005; Churg; Wright 2005).

Esse desequilíbrio, sendo de causa genética ou não, está intimamente ligado ao dano tecidual, remodelamento de fibras elásticas e colágenas e ativação de respostas inflamatórias (Barnes et al., 2003).

ESTRESSE OXIDATIVO

A ação antioxidante de enzimas dos pulmões ocorre como mecanismo de defesa. Quando as células epiteliais estão em contato com agentes nocivos, tais como poluentes e fumaça de cigarro, são estimuladas a produzir antioxidantes. As células inflamatórias, por sua vez, desencadeiam estímulos para produção e secreção de diferentes tipos de espécies reativas de oxigênio, tais como radicais livres, peróxidos e peroxinitritos. O elevado nível desses oxidantes e a presença dessas células ativadas promovem a diminuição da capacidade antioxidante das células do pulmão (MacNee, 2001).

O desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes corrobora com a amplificação da inflamação pulmonar, redução da atividade das antiproteases, como a α -1 AT, além da indução de apoptose, contribuindo na gênese da DPOC (Barnes et al., 2003).

Portanto, sinais de estresse oxidativo em pacientes com DPOC podem ser uma via alternativa para o desenvolvimento da doença.

APOPTOSE

O pulmão apresenta-se como um órgão em constante reparo. Segundo este modelo, deve haver um equilíbrio entre a taxa normal de apoptose das células pulmonares e sua renovação. Células locais pulmonares em apoptose são digeridas por meio de macrófagos e células vizinhas (endoteliais e epiteliais). No entanto, diante de estímulos nocivos, a apoptose é desencadeada e induzida em um maior número de células, tanto pelo desequilíbrio entre proteases e antiproteases, estresse oxidativo e alterações em fatores de crescimento, como pelo bloqueio de fator de crescimento endotelial (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF).

O bloqueio do receptor de VEGF pode desencadear apoptose dos vasos pulmonares com consequente destruição do parênquima pulmonar (Kasahara et al., 2000). Os restos celulares ativam processos inflamatórios que levam a uma cascata de eventos que culminam em dano tecidual. Além da perda epitelial, a perda de vasos e a angiogênese comprometida interferem prejudicando a migração de células responsáveis pela digestão dos restos celulares, criando um ambiente favorável ao aumento do número de apoptose, promovendo danos teciduais ainda maiores e característicos na DPOC (Demedts et al., 2006).

PROCESSO DE REPARO DO TECIDO PULMONAR (REMODELAMENTO)

Os processos de destruição do parênquima pulmonar e vias aéreas estão associados a uma subsequente reparação tecidual que promove o aparecimento de tecido semelhante ao original, porém geralmente com arquitetura e funções alteradas (Rennard, 1999).

A destruição alveolar no enfisema pulmonar é proveniente principalmente da degradação das fibras elásticas e de colágeno constituintes da parede alveolar. Por ação enzimática, inicia-se um processo de remodelamento tecidual no qual ocorre um aumento da produção e depósito de novas fibras. No entanto, elas apresentam formas jovens e/ou alteradas, sendo ineficientes para manutenção funcional do tecido, prejudicando, desta forma, as trocas gasosas (Ito et al., 2005).

Apesar de haver controvérsias na literatura com relação ao aumento ou diminuição de fibras no tecido pulmonar acometido pelo enfisema pulmonar, estudos indicam o aumento da quantidade de fibras colágenas (Martin-Mosquero et al., 2006). Lang et al. (1994) compararam pulmões de não-fumantes, fumantes não enfisematosos e fumantes enfisematosos e demonstraram aumento significativo de fibras de colágeno apenas no grupo de fumantes enfisematosos.

Em um modelo experimental de enfisema pulmonar em camundongos submetidos à instilação de elastase, Ito et al. (2005) observaram aumento na quantidade total de fibras colágenas e tendência de diminuição na quantidade de fibras elásticas, além de diminuição de elastância e aumento em histeresividade, o que representa piora da função pulmonar.

Considerando valores quantitativos, alguns autores demonstram o aumento de fibras elásticas e colágenas, explicado pelo estímulo de produção e deposição de fibras novas e pela perda de parênquima pulmonar, culminando no aumento da proporção de fibras em relação ao parênquima (Kuhn et al., 1976).

As fibras elásticas e colágenas estão intimamente ligadas às propriedades viscoelásticas do pulmão avaliadas por parâmetros como complacência, resistência e elastância pulmonar, ou seja, são de suma importância para o funcionamento adequado

do pulmão, principalmente quando se referem a aspectos fisiológicos de mecânica respiratória.

A DPOC possui uma de suas definições baseadas em padrões de mecânica respiratória, afinal, indivíduos clinicamente diagnosticados por DPOC apresentam valores de mecânica alterados, sugerindo aumento de obstrução à passagem de ar e piora das trocas gasosas (GOLD, 2014).

Assim sendo, a definição da DPOC envolve alterações morfofuncionais tanto em grandes como em pequenas vias aéreas e espaços alveolares (Shapiro; Ingenito, 2005).

Nas grandes vias aéreas, encontramos hiperplasia de células caliciformes e aumento de glândulas mucosas, relacionadas com tosse e produção de muco. Nas vias aéreas menores, também há infiltrado inflamatório, predominando macrófagos nas fases iniciais da doença e macrófagos, neutrófilos e linfócitos nas fases mais avançadas. A deposição de colágeno na parede celular e a hipertrofia da musculatura lisa podem ser observadas e associam-se à obstrução da via aérea, juntamente com o edema, a produção de muco e o infiltrado inflamatório (Shapiro; Ingenito, 2005).

A obstrução da via aérea também pode ser comprometida por meio da destruição de fibras elásticas. Ancoradas aos bronquíolos, as fibras elásticas exercem uma tração radial, aumentando seu diâmetro que é reduzido com a destruição das fibras devido à perda da tração, acarretando o aumento da resistência respiratória (Barnes et al., 2003).

No parênquima pulmonar, observa-se alargamento dos espaços alveolares, com infiltrado inflamatório de macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Os macrófagos parecem estar presentes nas fases mais iniciais da DPOC, enquanto os neutrófilos aparecem mais tardiamente (Barnes et al., 2003).

A presença de várias células inflamatórias na via aérea, no lavado broncoalveolar e no parênquima pulmonar dos pacientes, em diferentes estágios da doença, é notória. E os

tempos de surgimento de cada uma dessas células, seu papel no desenvolvimento da doença, suas inter-relações e relações com fatores de risco exógenos distintos são relevantes para melhor elucidação da DPOC.

Devido à perda progressiva e lenta da função pulmonar proveniente da instalação do enfisema pulmonar, os sintomas clínicos aparecem, em geral, por volta dos 40 anos de idade. Os sintomas iniciam-se por dispneia aos grandes e médios esforços, como subir escadas e caminhar, e em estágio mais avançado da doença instala-se a dispneia aos pequenos esforços, tais como tomar banho, vestir roupa, entre outros.

Os diferentes processos e mecanismos associados ao desenvolvimento da DPOC permitem inferir que ela tem como principal característica a aceleração da perda funcional do pulmão, com limitação lenta e progressiva de troca gasosa, culminando em incapacitação e morte prematura (Barnes et al., 2003). E sendo a interação entre os mecanismos não totalmente esclarecida, além de distinta entre a fisiopatologia da DPOC no homem e em modelo animal, avanços futuros no entendimento do desenvolvimento desta patologia podem elucidar vias de indução importantes, associadas ou não aos agentes exógenos inalados, para o estabelecimento da doença.

1.1.4 Modelos Experimentais em DPOC

Experimentos usando animais têm sido largamente utilizados (Mahadeva; Shapiro, 2002) para observação da evolução de doenças como a bronquite crônica, asma e enfisema pulmonar (Slauson; Hahn, 1980). Esses estudos configuram como uma importante ferramenta à medida que permitem elucidar a forma como se dão as respostas celulares, anatômicas e bioquímicas dos pulmões a uma série de injúrias e alterações genéticas.

Roedores, cães, porcos, macacos e ovelhas são utilizados em modelos experimentais de enfisema pulmonar induzido por meio do emprego de diferentes substâncias. Enzimas proteolíticas, como a papaína ou elastase, instiladas ou nebulizadas na via respiratória de animais, são utilizadas baseando-se na patogenia do enfisema pulmonar, promovendo o desequilíbrio dos níveis de substâncias agressoras e protetoras nos ácinos pulmonares. Além dessas metodologias, animais transgênicos e/ou *Knockouts* e a indução por meio da exposição à fumaça do cigarro também reproduzem o modelo de enfisema pulmonar semelhante ao humano (Mahadeva; Shapiro, 2002).

Os modelos experimentais a partir de enzimas proteolíticas produzem destruição do parênquima com consequente aumento dos espaços aéreos de forma bastante semelhante ao que ocorre no enfisema pulmonar humano. Porém, essa metodologia geralmente é baseada em uma única administração de protease (Fló et al., 2006; Di Petta et al., 2011). Já os modelos de indução que utilizam exposição à fumaça de cigarro geralmente são baseados em exposições prolongadas, e têm a vantagem de produzir alterações estruturais semelhantes às encontradas em fumantes crônicos, apresentando um processo inflamatório de agressão contínua e gradual (Toledo et al., 2012).

O modelo de enfisema pulmonar experimental oriundo da exposição à fumaça de cigarro consta na literatura desde 1990. Wright e Churg (1990) demonstraram progressão de enfisema pulmonar em um modelo de porcos expostos à fumaça de cigarro (10 por dia), 5 dias por semana, durante 1, 3, 6 e 12 meses. Nikula et al. (2000) também conseguiram resultados promissores a partir da indução de enfisema pulmonar em ratos submetidos à fumaça de cigarro após 7 e 13 meses de exposição.

Os modelos de exposição ao cigarro em camundongos suportam a exposição à fumaça por cerca de 1 ano, tolerando níveis de carboxihemoglobina de 10-14%. Na maioria dos estudos de exposição, em 2 meses podem desenvolver alterações epiteliais

com infiltrado inflamatório e, em 6 meses, alargamento de espaços aéreos e uma histologia semelhante a do enfisema humano (Biselli et al., 2011; Toledo et al., 2012).

Trabalhos na literatura também mostram a instalação do enfisema pulmonar em camundongos em períodos inferiores a 6 meses, através da exposição desses à fumaça de cigarro mais de uma vez ao dia (Valença et al., 2004, 2009).

No entanto, apesar do interesse constante de vários pesquisadores na metodologia de exposição à fumaça de cigarro, durante certo período, os estudos focaram metodologias mais rápidas e práticas, com a utilização de enzimas proteolíticas (Mahadeva; Shapiro, 2002; Demedts et al., 2006). Atualmente, em função do remodelamento tecidual e da maior aproximação ao enfisema em humanos, vários grupos de pesquisas estão retomando e aprimorando essa primordial abordagem metodológica (Tuder; Petrache, 2012).

Os laboratórios de investigação médica (LIM)-05 (Poluição Atmosférica Experimental), LIM-20 (Terapêutica Experimental I) e LIM-61 (Cirurgia Torácica) desenvolveram diversos estudos utilizando diferentes modelos experimentais de indução de enfisema pulmonar em roedores (Fusco et al., 2002; Fló et al., 2006; Lopes et al., 2009; Biselli et al., 2011; Toledo et al., 2012).

Entre as diversas alternativas, os camundongos têm sido amplamente utilizados devido a uma série de vantagens apresentadas por essa espécie. Dentre elas o bom entendimento de seu sistema imunológico, uma vasta quantidade de reagentes disponíveis para a realização de testes, um ciclo reprodutivo curto, um genoma bem caracterizado favorecendo uma maior viabilidade para estudos genéticos e aplicação de técnicas transgênicas, além da viabilidade financeira (Churg; Wright, 2005; Mahadeva; Shapiro, 2005; Shapiro, 2008).

1.1.5 Modelos Experimentais Temporais em DPOC

Pesquisas com ensaios temporais no estudo da DPOC visam elucidar lacunas no conhecimento sobre a instalação e progressão da patologia. A maioria tem como principal interesse o comportamento de respostas celulares provenientes do desequilíbrio entre proteases e antiproteases principalmente no estágio de instalação da doença (MacNee, 2001; Barnes et al., 2003; Rennard et al., 2006).

Ofulue et al. (1998) demonstraram associação entre atividade elastolítica maior e aumento de neutrófilos, juntamente com o aumento progressivo do Intercepto Linear Médio (do inglês, *Mean Linear Intercept* - Lm) - marcador do grau de distensão alveolar - e a diminuição da densidade das paredes alveolares na evolução do enfisema pulmonar, induzido em ratos expostos à fumaça de cigarro diariamente, durante 1, 2, 3, 4, 5 e 6 meses.

Segundo D'Hulst et al. (2005), as células dendríticas apresentadoras de antígenos também mostram aumento durante a evolução de enfisema em camundongos submetidos à exposição à fumaça de cigarro. No entanto, tanto as células dendríticas quanto as células inflamatórias apresentam um comportamento bifásico, tanto no parênquima pulmonar quanto no LBA, um primeiro aumento inicial durante os primeiros dias de exposição e, posteriormente, após 1 mês de exposição, ocorre uma nova e maior proliferação celular até atingir ponto de saturação.

Posteriormente, na tentativa de entender mais sobre o mecanismo de apoptose, Suzuki et al. (2008) observaram a expressão de marcadores de VEGF em camundongos submetidos à exposição de fumaça de cigarro em curto período de tempo: 10 dias e, em longos períodos de tempo, 1 a 8 meses. A expressão de VEGF decaiu nos primeiros dias de exposição, no entanto, entre 12 e 18 dias de exposição ocorre um pequeno aumento e depois retorna aos menores valores. Além desses ensaios, os autores também avaliaram a

expressão de VEGF em biópsias de pulmões de não-fumantes e fumantes e, nesses últimos, também constataram a diminuição de VEGF. Os dados demonstram, portanto, resultados iniciais e edificadores da hipótese de apoptose por meio da perda de endotélio.

Observando aspectos de senescência, Nyunoya et al. (2006) demonstraram expressão de marcadores moleculares de senescência em ensaios teciduais de cultura de fibroblastos expostos à fumaça de cigarro, durante a progressão do enfisema pulmonar. Em um primeiro momento (após 24 e 48 horas de exposição), a proliferação celular é diminuída, porém, sem expressão de marcadores clássicos de senescência. No entanto, após 7 e 14 dias de exposição, ocorreu diminuição significativa da taxa de proliferação e expressão de marcadores característicos para senescência. Esses resultados são coincidentes com os de outros autores, em ensaios de cultura de fibroblasto oriundo de fumantes (Holz et al., 2004).

Desse modo, a exposição à fumaça de cigarro e os ensaios temporais vêm sendo empregados visando estudos sobre o desenvolvimento de patologias como a DPOC. E, mimetizando a situação humana, representam ferramentas úteis nos estudos com modelos experimentais para investigação dos mecanismos envolvendo o desenvolvimento e a progressão da DPOC. É importante salientar ainda que, a rigor, há diferenças de espécie para espécie quanto aos modelos experimentais usados e deve-se ter cautela para analisá-las e selecioná-las (Groneberg; Chung, 2004).

1.2 DPOC x POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

1.2.1 Aspectos Gerais

As partículas oriundas da queima e exaustão de diesel compreendem a maior porção da poluição atmosférica e, conseqüentemente, o maior componente da poluição atmosférica urbana. O material particulado (do inglês, *Particulate Matter*- PM), proveniente da queima do diesel, é constituído por partículas ultrafinas, com diâmetro igual ou menor que 100nm, altamente insolúveis devido à presença de um núcleo de carbono e tendem a formar agregados com metais, enxofre e espécies orgânicas, sobretudo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, responsáveis pelo alto potencial de toxicidade (McDonald et al., 2004).

Os efeitos agudos da exposição ao DEP incluem irritação no nariz e nos olhos, alterações na função pulmonar, dores de cabeça, fadiga e náuseas. A exposição crônica, por sua vez, associa-se à tosse aumentada, produção de secreção e piora da função pulmonar.

Os poluentes associados ao tráfego influenciam efetivamente a qualidade do ar dos indivíduos que residem ou passam longos períodos de tempo em ambientes urbanos. Evidências epidemiológicas indicam uma relação direta entre os níveis de poluentes urbanos e aumento de risco de saúde, com aumento da morbidade por doenças respiratórias incluindo aumento de sintomas, redução na função pulmonar, aumento de internações hospitalares de pacientes com DPOC e aumento de índices de mortalidade (Holguin, 2008; Halonen et al., 2009).

Além disso, a exposição em humanos saudáveis revelou mudanças na inflamação das vias aéreas (Sydbom et al., 2001), além da associação entre níveis de PM10 e

mortes, não somente por causas respiratórias, mas por causas vasculares, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (Wright et al., 1992).

Ishikawa et al. (1969) estudaram pulmões de autópsias provenientes de residentes em área urbana de St. Louis, EUA, e em área rural de Winnipeg, Canadá. Estimando-se a prevalência e severidade do enfisema pulmonar entre grupos fumantes, observou-se um índice de enfisema severo 4 vezes maior em St. Louis se comparado à Winnipeg, sugerindo efeito sinérgico entre os efeitos da fumaça de cigarro e a poluição atmosférica.

Estudos experimentais em ratos demonstraram um crescente acúmulo de partículas e agregados macrofágicos nos alvéolos pulmonares e nos tecidos peribronquiais intersticiais (Pritchard, 1989; Yu; Yoon, 1991; Falk et al., 1999).

Mauderly et al. (1990) estudaram a suscetibilidade de ratos saudáveis e ratos com enfisema pulmonar provocado por instilação de 6 semanas antes da inalação do DEP. Embora 14 de 63 parâmetros tenham demonstrado interações enfisema – DEP, nenhum indicou aumento quanto à suscetibilidade crônica à inalação de DEP. No entanto, estudos epidemiológicos revelaram que indivíduos com doença pulmonar pré-existente, asma e DPOC, tornam-se mais suscetíveis quando submetidos a poluentes atmosféricos relacionados com o tráfego (Kim et al., 2008; Sint et al., 2008; Arbex et al., 2012).

1.2.2 Mecanismos de Defesa Pulmonar

O aparelho respiratório em exposição direta ao meio externo e a substâncias nocivas requer habilidades de defesa pulmonar na remoção de partículas inaladas, e a susceptibilidade e/ou resistência aos efeitos dessas partículas influenciam as respostas dos pulmões (Rackley; Stripp, 2012).

O aparelho mucociliar é considerado um mecanismo de defesa importante para remoção das partículas inaladas. As células caliciformes, presentes nas vias aéreas

proximais, produzem muco que retém as partículas inaladas que, por sua vez, serão eliminadas posteriormente com o auxílio do movimento ciliar associado à expectoração e deglutição (Harkema; Hotchkiss, 1993).

Apesar dos aspectos protetores do muco, o aumento da sua produção devido à presença de poluentes nos pulmões como o DEP promove o aumento da resistência de vias aéreas, contribuindo para a exacerbação da DPOC (Wright et al., 1992). Em pacientes com DPOC e em fumantes, existe um dano ciliar que, juntamente com o excesso de produção de muco e a não remoção efetiva deste muco, colaboram com a remoção inadequada das partículas inaladas (Williams et al., 2006).

As células epiteliais das vias aéreas também são responsáveis por limitar fisicamente a passagem de poluentes inalados, além de liberarem mediadores inflamatórios e quimiocinas na presença de poluentes, promovendo o influxo de células inflamatórias (Churg; Brauer, 1997; Churg et al., 1999). Os macrófagos presentes nas paredes e superfícies das vias aéreas são os principais responsáveis pela fagocitose das partículas inaladas e como resultado liberam mediadores inflamatórios como IL-8 e TNF. Em pacientes com DPOC e asma, o número de macrófagos e mediadores inflamatórios, tais como IL-1, IL-8 e TNF, está aumentado (Churg et al., 1999; Howarth et al., 2005).

Parte das partículas inaladas depositadas nas porções mais distais das vias aéreas, próximas aos alvéolos, atravessa a camada epitelial dos espaços aéreos distais, entra no interstício pulmonar e permanece nessas regiões subepiteliais, próximas a células como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (Federspiel; Fredberg, 1988), promovendo o aumento de danos teciduais (Li et al., 1996).

Desse modo, a transferência das partículas para o interstício pulmonar é uma consequência da ineficiência do mecanismo de defesa pulmonar. E a inalação de DEP é

responsável também por agravar a inflamação nesses casos, levando à exacerbação da doença (Pinkerton et al., 2000).

1.2.3 Toxicidade e Ação do DEP

A toxicidade, associada a partículas inaladas tais como o DEP, é altamente influenciada por meio do tamanho e composição do particulado (Saldiva et al., 2002). O DEP, por apresentar um tamanho tão reduzido, consegue se dispersar facilmente pelos pulmões, atingindo as regiões mais distais. Em pacientes com DPOC, a eficiência da deposição dessas partículas é maior do que em indivíduos normais, provavelmente devido à redução do fluxo expiratório observado nesses pacientes (Anderson et al., 1990), além da ineficiência nos mecanismos de defesa pulmonar (Wright et al., 1992).

As partículas ultrafinas apresentam-se isoladamente ou formam agregados. Em forma de agregados, mostram um diâmetro aerodinâmico maior. Tanto o diâmetro, massa, volume ou o número dessas partículas são fatores importantes para a toxicidade delas, considerando que a interação entre as partículas e o sistema biológico ocorre via superfície de contato e não com a massa interna dessas partículas (Donaldson; MacNee, 2001).

Morrow (1988) observou que, quando o volume de partículas fagocitadas por macrófago atinge 60% do volume interno desta célula, a atividade de remoção de partículas por esta célula é completamente inibida, permitindo a estimulação contínua das células epiteliais, com aumento da produção de quimiocinas que contribuem para o processo inflamatório (Driscoll et al., 1996).

No entanto, a associação, principalmente entre a composição do particulado e a inflamação, indica que não somente a área da partícula seja o principal fator influenciando em sua toxicidade (Saldiva et al., 2002).

Além disto, o potencial tóxico do DEP pode ser atribuído aos seus múltiplos componentes: metais (Adamson et al., 2000), enxofres e espécies orgânicas, principalmente os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Li et al., 2002).

Exposições de baixas doses de DEP, extraídas por processos com diferentes compostos químicos, demonstram que aqueles cujos componentes orgânicos são em quantidades menores após a extração do DEP promovem efeitos adversos pulmonares menos agressivos do que aqueles cujo material orgânico não foi eliminado (Laks et al., 2008).

Os efeitos agudos secundários à exposição ao material particulado são encontrados principalmente em subgrupos susceptíveis e não em populações saudáveis, exceto quando a concentração desse material esteja muito alta (Donaldson; MacNee, 2001).

Considerando os aspectos epidemiológicos no desenvolvimento dos países subdesenvolvidos e cidades metropolitanas com alto índice de poluição atmosférica urbana e emissões de poluentes provenientes da combustão de diesel, os mecanismos de ação, aspectos de tamanho e composição da partícula de DEP e os efeitos dessas partículas nos pulmões têm sido uma área de intensa exploração (Maier et al., 2008; Hart et al., 2012).

E desde que a exposição a poluentes da atmosfera urbana seja associada à exacerbação de doenças respiratórias, incluindo a DPOC, asma e infecções no trato respiratório inferior, especialmente em crianças e em pessoas idosas (Pinkerton et al., 2000), e os efeitos específicos do DEP nas pessoas com enfisema ainda sejam pouco conhecidos, é importante que estudos contribuam para esclarecer o efeito temporal do desenvolvimento do enfisema pulmonar por meio da exposição à fumaça de cigarro associada à exposição ao DEP.

Desse modo, considerando a escassez de conhecimentos relacionados com a progressão e o comportamento no perfil celular do lavado broncoalveolar, função pulmonar e morfometria pulmonar em camundongos, na instalação e desenvolvimento do enfisema pulmonar associado à exposição ao DEP, este projeto visa uma melhor compreensão da patogênese envolvida na instalação e exacerbação da DPOC, por meio da seguinte questão:

Quais os efeitos da associação da exposição à fumaça de cigarro e ao DEP concomitantemente, e à fumaça de cigarro ou DEP isoladamente sobre as propriedades mecânicas do sistema respiratório, celularidade do lavado broncoalveolar e parâmetros morfométricos no parênquima pulmonar e a relação desses com o tempo de exposição?

Adota-se como hipótese deste trabalho que a severidade dos efeitos da exposição à fumaça de cigarro no sistema respiratório de camundongos aumenta com o prolongamento do tempo de exposição e que a associação com o DEP promove efeitos sinérgicos que podem influenciar a instalação e desenvolvimento da DPOC ao longo do tempo. Desse modo, no presente estudo, objetiva-se analisar a exposição à fumaça de cigarro associada à exposição ao DEP, após 1, 3 e 6 meses de exposição.

· · · · · *Métodos* · · · ·

2. MÉTODOS

Este estudo está aprovado pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Processo nº 0995/08).

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos C57BL6, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), com idade entre 6 e 8 semanas e peso médio entre 25 e 30 gramas. Foram mantidos em gaiolas próprias, recebendo água e alimentação *ad libitum*, no biotério do laboratório, respeitando uma semana de ambientação para se iniciar o protocolo experimental.

Todos os animais receberam cuidados humanos em conformidade com o Guia para o Cuidado e o Uso de Animais de Laboratório (do inglês, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*), publicação da *National Academy of Sciences*, 1996.

A escolha por camundongos C57BL6 se justifica pela utilização da espécie em modelos de enfisema experimental, inclusive em nosso Laboratório de Investigação Médica - LIM-20 (Toledo et al., 2012), e por apresentarem maior susceptibilidade aos efeitos da fumaça de cigarro (Dawkins; Stockley, 2001).

Grupos Experimentais

Após o período de ambientação, em nosso biotério, os animais foram divididos, de forma aleatória, em grupos experimentais e submetidos ao respectivo protocolo de exposição.

Os camundongos machos C57BL6 foram divididos em quinze grupos (n=10 por grupo): controle (C) - expostos ao ar ambiente durante todo o período de protocolo; veículo (V) – recebendo instilação nasal de solução veículo – salina: NaCl 0,9% - durante todo o período de protocolo; fumaça de cigarro (FC) – expostos à fumaça de cigarro durante 30 minutos/dia, 5 dias/semana; DEP – submetidos à instilação nasal de DEP (30µg DEP diluídos em 10µl da solução veículo) 1 vez ao dia, 5 dias/semana; e FC+DEP – expostos a ambos os protocolos: à fumaça de cigarro e DEP, inicialmente submetidos à exposição ao cigarros por 30 minutos/dia, deixados em repouso durante 2 horas e, em seguida, recebendo uma instilação nasal de 30µg DEP diluídos em 10µl NaCl 0,9%/dia, 5 dias/semana, durante todo o período de protocolo. Os camundongos foram estudados após 1, 3 e 6 meses de exposição (Tabela 1).

Tabela 1 – Grupos experimentais

GRUPO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO	TIPO DE TRATAMENTO
C 1m	1 mês	Ar ambiente
C 3m	3 meses	Ar ambiente
C 6m	6 meses	Ar ambiente
V 1m	1 mês	Solução salina – Veículo
V 3m	3 meses	Solução salina – Veículo
V 6m	6 meses	Solução salina – Veículo
FC 1m	1 mês	Fumaça de cigarro
FC 3m	3 meses	Fumaça de cigarro
FC 6m	6 meses	Fumaça de cigarro
DEP 1m	1 mês	DEP
DEP 3m	3 meses	DEP
DEP 6m	6 meses	DEP
FC+DEP 1m	1 mês	Fumaça de cigarro + DEP
FC+DEP 3m	3 meses	Fumaça de cigarro + DEP
FC+DEP 6m	6 meses	Fumaça de cigarro + DEP

2.2 EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO

Caixa de Exposição de Camundongos à Fumaça de Cigarro

A exposição à fumaça de cigarro foi realizada em uma câmara de inalação com duas entradas – uma para o ar sintético e uma para a fumaça de cigarro, como ilustrado anteriormente por Biselli et al. (2011).

A caixa de exposição de camundongos à fumaça de cigarro foi confeccionada em nosso Laboratório de Investigação Médica (LIM-20), de acordo com a metodologia proposta por Wang et al. (1999). O material utilizado foi uma caixa de plástico, com volume aproximado de 28L (40cm x 27cm na base, e 26cm de altura), dividida ao meio com uma tela de metal, a fim de manter grupos de camundongos separados.

O fluxo na entrada de ar sintético foi controlado por um fluxômetro conectado a um torpedo de ar comprimido mantido constante ($2\text{L}/\text{min}^{-1}$). A segunda entrada da caixa recebe ar sintético e fumaça de cigarro, aspirada por um sistema de Venturi, conectado a um cigarro aceso (Figura 1).

Figura 1 - Caixa de exposição à fumaça de cigarro (modificada de Biselli et al., 2011). Os animais do grupo FC e FC+DEP foram mantidos nesta caixa por 30 minutos ao dia, 5 dias por semana, por 1, 3 e 6 meses. A cada dia, os grupos foram invertidos de lado para que a exposição fosse homogênea

A taxa de fluxo de ar na segunda entrada foi regulada por um medidor de vazão, proporcionando à mistura mais ou menos fumaça. A taxa de fluxo em $1,5\text{L}/\text{min}^{-1}$ foi determinada por produzir a concentração de monóxido de carbono (CO) entre 250 e 350ppm, medido pelo detector de gás de CO ToxiPro (TCGD, Modelo 54-45-01V; SN #23564; Bosworth Instrument, Cleveland, OH, EUA).

A concentração de monóxido de carbono no interior da caixa foi monitorada durante os experimentos iniciais em valores em torno de 250 e 350ppm, nos quais a concentração de carboxihemoglobina nos camundongos expostos à fumaça foi mantida em 10% ($\pm 1,8\%$), equivalente a níveis não tóxicos de carboxihemoglobina no sistema de exposição proposto.

Exposição à Fumaça de Cigarro Propriamente Dita

A exposição dos camundongos à fumaça de cigarro foi realizada em capela por meio da câmara de exposição inalatória (Figura 1), durante 30 minutos, 1 vez ao dia, 5 dias por semana, até que os animais fossem submetidos à eutanásia no final dos respectivos tempos do protocolo experimental: 1, 3 e 6 meses.

Dentre os animais selecionados para receber o tratamento de exposição à fumaça de cigarro, os grupos FC e FC+DEP foram mantidos nas caixas de exposição durante a inalação de fumaça e os demais animais dos grupos experimentais, controle, veículo e os expostos à DEP, permaneceram em suas gaiolas.

Os cigarros utilizados foram da marca Derby® vermelho (Souza Cruz SA, Rio de Janeiro, RJ, BR), cuja composição é representada na Tabela 2. Os cigarros foram colocados em uma tubulação conectada à lateral do sistema de Venturi, para que a fumaça fosse aspirada, e trocados antes que o filtro começasse a queimar. Foi consumida uma média de 12 cigarros (± 1), a cada exposição de 30 minutos – de forma a manter a concentração de CO dentro dos limites do protocolo experimental: 250-350ppm.

Tabela 2 -Concentração dos principais componentes por unidade do cigarro da marca Derby® Vermelho (Souza Cruz SA, Rio de Janeiro, RJ, BR)

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
Alcatrão	10mg/cigarro
Nicotina	0,8mg/cigarro
Monóxido de carbono	10mg/cigarro

2.3 INSTILAÇÃO DE DEP

Coleta do Material Particulado

O material particulado da queima de diesel (DEP), utilizado neste estudo, foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental - LIM-05, da FMUSP, e obtido a partir da queima de diesel de motor de ônibus do transporte urbano da cidade de São Paulo, anteriormente descrito por Laks et al. (2008).

Um dispositivo de malha de aço inoxidável foi inserido e adaptado, para coleta do DEP no tubo de escape do ônibus Mercedes Benz MB1620, motor de 210 cv, sem controle eletrônico de injeção de combustível, rodando com diesel contendo enxofre de 500ppm. O ônibus foi escolhido por operar usualmente no transporte público de São Paulo, baseado na informação dada pelo município. O material particulado foi coletado após um dia de tráfego do ônibus metropolitano na cidade de São Paulo e estocado a 4°C para estudos analíticos.

A massa total do material particulado recolhido foi dissolvida em solução salina a 10mg/mL, durante 2 horas, através de agitação magnética e lisada, durante 30 minutos. Posteriormente, foi diluída a 30µg de DEP em 10µl de NaCl 0,9% e armazenada em -20°C até o uso.

Caracterização do DEP

A caracterização do DEP foi analisada de acordo com: (a) concentrações de metais, determinadas por espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (média $\pm$ erro padrão da média (do inglês, *Standard Error of the Mean*) –

SEM); e (b) concentrações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (do inglês, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* - PAHs), determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo os principais componentes do particulado de DEP descritos na Tabela 3 (Laks et al., 2008).

Tabela 3 - Principais componentes de metais (ppb) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - PAHs (ng/g) do material particulado, proveniente da queima de diesel de motores de ônibus de transporte urbano da cidade de São Paulo (modificada de Laks et al., 2008)

METAL	DEP	PAHS	DEP
Níquel (Ni)	81 ± 37	Naftaleno	49,23
Enxofre (S)	626 ± 416	Acenaftileno	179,48
Ferro (Fe)	74,5 ± 2,26	Fluoreno	683,94
Vanádio (V)	37 ± 13	Antraceno	94,73
Chumbo (Pb)	50 ± 47	Pireno	12.838,27
Cádmio (Cd)	29 ± 8	Benz[a]antraceno	1.162,73
Cromo (Cr)	161 ± 116	Benzo[b]fluoranteno	789,93
Cobre (Cu)	17 ± 1	Benzo[k]fluorantenoB	562,28
		Benzo[a]pireno	1.642,28

NOTA: As concentrações dos metais foram determinadas por meio de espectrômetro de fluorescência de raios X por energia dispersiva, e as de PAHs foram determinadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Valores: ± SEM) (Laks et al., 2008).

Protocolo de Exposição ao DEP

Os camundongos dos grupos DEP e FC+DEP receberam uma única instilação intranasal de 30µg de DEP, diluída em 10µL NaCl 0,9% /dia, 5 dias por semana, por 1, 3 ou 6 meses. Os animais submetidos a ambos os protocolos (FC+DEP) receberam a inalação de DEP, após 2 horas do término da exposição à fumaça de cigarro. O grupo veículo recebeu somente 10µL de NaCl 0,9%, 5 dias/semana.

2.4 AVALIAÇÃO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Após 24 horas da última exposição dos respectivos períodos de exposição de cada grupo experimental, 1, 3 e 6 meses de protocolo, os camundongos foram anestesiados com tiopental sódico (0,3g/kg, injeção intraperitoneal - IP) e traqueostomizados, por meio de uma cânula de metal inserida pelo orifício da traqueostomia, fixada com fio de algodão ao redor da traqueia.

Os animais foram colocados em um pletismógrafo, em seguida conectados a um ventilador para pequenos animais (Aparelho Harvard; Modelo 683; Harvard Apparatus Co., South Natick, MA, EUA), com o volume corrente de 10mL/kg e frequência respiratória de 2Hz.

Para abolir o esforço respiratório, os animais receberam pancurônio (0,2mg/Kg IP). Os dados para o cálculo da mecânica foram obtidos quando não houve mais movimentação do animal.

Medidas de resistência do sistema respiratório (do inglês, *Respiratory system resistance* - Rrs) e elastância do sistema respiratório (do inglês, *Respiratory*

systemelastance- Ers) do sistema respiratório foram realizadas como descrito anteriormente (Arantes-Costa et al., 2002). A pressão no pletismógrafo de corpo inteiro e a pressão traqueal foram medidas por meio de transdutores de pressão diferencial (Honeywell International Inc., Freeport, IL, EUA). Sinais de volume e pressão traqueal foram obtidos durante 10 segundos a 200Hz, com um conversor analógico-digital de 12 bits (DT 01-EZ; Data Translation Inc., Marlboro, MA, EUA), e armazenados em um microcomputador.

Em cada medição, 20 ciclos, de acordo com a frequência respiratória, foram analisados para cada dado. Alterações do fluxo de ar foram obtidas por derivação eletrônica do sinal de volume. E a resistência (Rrs) e a elastância (Ers) do sistema respiratório foram obtidas usando a equação de movimento do sistema respiratório:

$$P_{tr} = E_{rs}.V(t) + R_{rs}.V'(t), \text{ onde } (t) \text{ é o tempo.}$$

2.5 LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

Após a obtenção dos dados de função pulmonar, os animais, ainda sob o efeito anestésico, foram exsanguinados via dissecação da aorta abdominal. O sangue foi retirado e centrifugado (1000rpm, durante 10 minutos) a 4°C, e seu sobrenadante armazenado a -70°C.

O lavado broncoalveolar foi obtido por meio da infusão de solução salina estéril no lúmen das vias aéreas, em três alíquotas iguais de 0.5mL de salina tampão fosfato (do inglês, *Phosphate Buffered Saline* - PBS). O volume recuperado foi superior a 95% do fluido instilado e centrifugado (3000rpm, durante 10 minutos) a 4°C, e o

sobrenadante coletado e armazenado a -70°C . O botão de células foi ressuspensionado em 300 μL de PBS e avaliado quanto ao número de células inflamatórias total e diferencial.

Para determinar o número total de células no LBA, as células foram contadas por microscopia ótica em câmara de Neubauer em microscópio óptico - 400x de magnitude.

Para a contagem diferencial, 100 μL do LBA foram aplicados em lâminas e citocentrifugados a 450rpm por 6 minutos (Cytospin™ 4 Cytocentrifuge; Thermo Fisher Scientific Inc., Cheshire, UK). A seguir, as lâminas foram coradas, usando o kit de coloração Diff-Quick Romanowsky (DQS; Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ). Macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e células epiteliais foram identificados segundo a coloração e as características morfológicas. Foram contadas 300 células por lâmina, com o auxílio de um microscópio óptico com objetiva de imersão (1000x) (Arantes-Costa et al., 2014).

2.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Ao término da coleta do LBA, a caixa torácica dos animais foi aberta para a retirada da traqueia canulada e pulmões em monobloco com o coração. Os pulmões foram insuflados com pressão positiva constante a 20cm de pressão aquosa com 10% de formaldeído tamponado por um período de 24 horas, para homogeneizar a distensão do parênquima, em seguida foram mantidos em álcool 70%, por até 7 dias

antes de serem processados. Os fragmentos de tecido pulmonar foram embebidos em parafina para preparo de cortes histológicos de 5µm de espessura.

Morfometria

A análise morfométrica foi feita por meio de uma leitura cega: o pesquisador não sabia a que grupo experimental as lâminas pertenciam.

As lâminas contendo cortes histológicos de 5µm foram submetidas à coloração por hematoxilina e eosina (HE) – utilizada para avaliação da estrutura pulmonar -, como a análise do diâmetro alveolar médio (Weibel; Cruz-Orive, 1997). E também foram preparadas lâminas sem corantes para a realização posterior de marcação por imunohistoquímica.

Quantificação do Intercepto Linear Médio (do inglês, *Mean Linear Intercept- Lm*)

A quantificação foi feita por meio da contagem de pontos, *point counting* (Weibel; Cruz-Orive, 1997), utilizando grade de 50 retas e 100 pontos, acoplada à ocular de um microscópio óptico. O Lm é um índice do diâmetro médio dos espaços aéreos distais, o que permite indicar o grau de distensão alveolar (Margraf et al., 1991) e foi determinado a partir da contagem do número de intersecções entre parênquima pulmonar e as retas desenhadas na ocular, em 15 campos distintos de regiões mais periféricas do parênquima pulmonar por animal, sendo utilizadas as lâminas de pulmões coradas em HE, visualizadas em microscópio óptico em aumento de 400 vezes.

No aumento de 400 vezes, o comprimento somado das 50 retas usadas para a medida foi obtido através da aferição do retículo utilizado, por meio de uma régua da fabricante Zeiss, e a somatória de todos os segmentos do retículo resultou no valor 1250µm. Portanto, o Lm para cada animal foi calculado dividindo-se 1250 pela média do número de intersecções dos 15 campos observados.

Quantificação de Células Inflamatórias no Espaço Peribrônquico

A quantificação das células inflamatórias – polimorfonucleares – ao redor da via aérea, espaço peribrônquico, foi realizada nas lâminas coradas por HE.

A contagem foi realizada por meio da metodologia de contagem do número de pontos, *point counting* (Weibel; Cruz-Orive, 1997), utilizando grade de 50 retas e 100 pontos, acoplada à ocular de um microscópio óptico. O retículo foi ancorado na membrana basal da via aérea, focada em aumento de 400 vezes, e foi quantificado o número de células presentes no campo em relação ao número de pontos que coincidiam com a adventícia da via aérea correspondente. Foram analisadas 5 vias aéreas de mesmo calibre por animal e 3 campos de não-sobreposição por via aérea.

Quantificação de Edema Peribroncovascular

A quantificação do edema no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular - entre a via aérea e o vaso adjacente - foi realizada nas lâminas coradas por HE.

A contagem foi realizada por meio da metodologia de contagem do número de pontos, *point counting* (Weibel; Cruz-Orive, 1997), utilizando grade de 50 retas e 100

pontos, acoplada à ocular de um microscópio óptico. O retículo foi ancorado na membrana basal da via aérea, focada em aumento de 400 vezes e foi quantificado o número de pontos coincidentes ao edema em relação ao número de retas que coincidiam com a parede do vaso correspondente. Foram analisados 5 espaços peribroncovascular distintos por lâmina.

Imunohistoquímica

Os cortes dos pulmões mantidos para os ensaios de imunohistoquímica foram desparafinizados, hidratados e imunocorados pela metodologia da peroxidase estreptavidina-biotina. Após o bloqueio da peroxidase endógena, a recuperação do antígeno foi realizada por pepsina.

Os ensaios de imunohistoquímica foram realizados para quantificação de:

MMP-12: utilizando-se anticorpo policlonal, produzido em cabra anti-MMP-12, com diluição de 1:100 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA).

Macrófagos: utilizando-se anticorpo monoclonal de rato IgG2a anti-Mac-2 de camundongo, na diluição de 1:10000 (Clone M3/38; Cedarlane Laboratories, Burlington, ON, Canadá).

Elastina: utilizando-se anticorpo policlonal, produzido em cabra antielastina, com diluição de 1:200 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA).

O Vectastain ABC Kit (Vectir Elite PK-6105 ou PK-6101, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) ou Envisionision plus Dual Link System Peroxidase (Dako, San Diego, CA, EUA) foram utilizados como anticorpos secundários, e 3,3'-

diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA) foi usado como o cromógeno. Esses anticorpos secundários também foram aplicados sem anticorpo primário em amostras de tecidos positivos e negativos, servindo como controles. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina (Merck, Darmstadt, HS, Alemanha).

Contagem de Células Positivas

A quantificação das células positivas imunomarcadas para MMP-12 e Mac-2 no parênquima alveolar foi realizada por meio da metodologia de contagem do número de pontos - *pointing counting* - (Weibel; Cruz-Orive, 1997), utilizando grade de 50 retas e 100 pontos, com área conhecida, acoplada à ocular de um microscópio óptico.

O retículo foi ancorado nas regiões mais periféricas do parênquima pulmonar, sendo o microscópio focado em aumento de 400 vezes, e foi quantificado o número de células positivas presentes no campo em relação ao número de pontos de intersecções entre parênquima pulmonar e as retas desenhadas na ocular. Foram analisados 15 campos de não-sobreposição por lâmina, e expressos os resultados em células/ μm^2 (de Kluijver et al., 2005), ajustando-se as unidades. Deve esclarecer-se que as áreas de vias aéreas e grandes vasos foram excluídas da área total contada para análise.

Proporção de Elastina

A quantificação da proporção de expressão de elastina no parênquima foi realizada por meio de análise de imagem, utilizando o software Image-Pro Plus (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, EUA).

Foram fotografados, nas regiões mais periféricas do parênquima pulmonar, 15 campos de não-sobreposição por lâmina imunomarcada, focada em aumento de 400 vezes. As imagens armazenadas foram então processadas de acordo com os passos a seguir:

Foi executada a limiarização para segmentar as imagens (Gonzalez; Woods, 2000) e a rotulação, na qual a imagem é agrupada por seus padrões de cores e pontos em componentes baseados na avaliação manual do pesquisador.

O avaliador desenvolve e processa dois *scripts* para cada imagem: Área total e Elastina.

- Área total: o analisador agrupa todos os padrões de cores e pontos equivalentes aos padrões de cores do fundo branco da lâmina, ou seja, a área sem tecido, e calcula também a área total da imagem. Desse modo, subtraindo a área total da imagem do fundo branco obtém-se a área total de parênquima pulmonar.

- Elastina: o analisador agrupa todos os padrões de cores e pontos equivalentes aos padrões de cores das estruturas celulares imunomarcadas que expressam elastina na imagem e, ao processar a imagem, ele obtém o total de elastina naquela imagem.

Portanto, com o processamento dos dois *scripts* para a mesma imagem, obtém-se a proporção de elastina no parênquima pulmonar equivalente.

Imunofluorescência

Os cortes dos pulmões mantidos para os ensaios de imunofluorescência foram desparafinizados, hidratados e, após a recuperação do antígeno, realizada com pepsina, sítios inespecíficos foram bloqueados por meio da adição de albumina sérica

bovina (do inglês, *Bovine Serum Albumin*- BSA) e/ou soro de cabra (1:200). Foi utilizado o seguinte anticorpo primário: anticolágeno III (anticorpo policlonal produzido em coelho, 1:10000, Sigma Aldrich, MO, EUA).

AlexaFluor 488 Fluorescente (Sigma-Aldrich, MO, EUA) foi usado como o anticorpo secundário (1:200) e contracorado com azul de Evans (0,006%). Para a marcação nuclear, foi usada a contracoloração com 4,6 diamidino-2-phenylindole (DAPI).

A proporção de volume de colágeno III foi avaliada no parênquima pulmonar, por meio de análise de imagem, utilizando o software Image-Pro Plus (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, EUA).

Foram fotografados, nas regiões mais periféricas do parênquima pulmonar, 15 campos de não-sobreposição por lâmina imunomarcada, focada em aumento de 400 vezes. Foi executada a limiarização para segmentar as imagens (Gonzalez; Woods, 2000) e a rotulação, assim como no caso das marcações de isoprostano e elastina.

Desse modo, foram desenvolvidos e executados dois *scripts* para cada uma das imagens: a área total de tecido (gama de cores equivalentes à área sem qualquer tecido, subtraída da área total da imagem, o que resulta na obtenção da área total de tecido pulmonar na imagem) e área marcada (gama de cores equivalente à expressão de colágeno III na imagem). Portanto, com o processamento dos dois *scripts* para a mesma imagem, obtém-se a proporção do volume de colágeno III positivamente imunocorado no parênquima pulmonar equivalente.

2.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados das análises quantitativas foram submetidos a análises estatísticas, usando o software Sigma Stat 12 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Os grupos experimentais controle e veículo foram comparados entre si, através do teste t para análise da significância. A comparação entre 4 grupos ou mais foi feita usando o teste Two Way ANOVA, seguida pelo método Holm–Sidak para dados paramétricos. Para a comparação dos dados não paramétricos, usamos o teste ANOVA on Ranks, seguido pelo método de Dunn. Todos os dados são expressos como média e desvio padrão (do inglês, *Standard Deviation* - SD), e consideramos as diferenças entre os grupos como estatisticamente significantes quando os valores de p para o erro alfa foram menores que 0,05.

..... *Resultados*

3. RESULTADOS

Todas as análises verificadas incluíram um grupo experimental controle, exposto ao ar ambiente, e um grupo veículo que recebeu instilação nasal de solução veículo – salina: NaCl 0,9%, durante todo o período de protocolo. Ao compararmos esses dois grupos entre si, não encontramos diferença significativa. Dessa forma, optamos por apresentar somente os resultados do grupo veículo, como controle positivo.

3.1 ANÁLISE DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Os dados de elastância do sistema respiratório (Ers) demonstraram um aumento significativo já no período, após 1 mês de exposição a ambos os fatores exógenos associados FC+DEP, quando comparado ao grupo veículo. Após 3 meses de exposição, embora não notadas diferenças nesse parâmetro, quando comparado ao veículo, o grupo exposto somente ao DEP apresentou um perfil diferenciado, com um aumento significativo em relação ao FC. Após 6 meses de exposição aos diferentes fatores exógenos, nenhuma alteração foi observada entre os grupos experimentais (Figura 2).

A análise da resistência do sistema respiratório (Rrs) também demonstrou aumento significativo após 1 mês de exposição ao FC+DEP, quando comparada tanto ao grupo veículo quanto ao DEP. No entanto, após 3 meses de exposição à fumaça de cigarro, houve uma diminuição significativa nos valores de Rrs, quando comparada

com o veículo e o DEP. Após 6 meses de exposição, os animais expostos à FC somente e FC+DEP mostraram um aumento significativo da resistência, quando comparado aos grupos veículo e DEP (Figura 3).

Figura 2 -Valores de elastância do sistema respiratório (Ers) medidos nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 1, 3 e 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com V em 1 mês ($p=0,012$) **Comparado com FC em 3 meses ($p=0.021$)

Figura 3 - Valores de resistência do sistema respiratório (Rrs) medidos nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 1, 3 e 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com V e DEP em 1 mês ($p=0,008$) **Comparado com V e DEP em 3 meses ($p=0.009$) ***Comparado com V e DEP em 6 meses ($p\leq 0.001$)

3.2 ANÁLISE DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

A análise de células inflamatórias encontradas no lavado broncoalveolar considerou os dados do número total e diferencial dessas células: neutrófilos, linfócitos, macrófagos, células epiteliais e eosinófilos, sendo as comparações estatísticas feitas para cada grupo de células entre os grupos V, FC, DEP e FC+DEP, após 1, 3 e 6 meses de exposição. Não foram apresentados aqui os dados relacionados com o número de eosinófilos por não serem relevantes no modelo experimental estudado, e por não apresentarem diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhum tempo de exposição. Os demais dados são apresentados como número de células multiplicado por 10^4 por microlitros.

Após 1 mês de exposição aos fatores exógenos, há uma diminuição significativa no número de macrófagos, nos animais que receberam DEP e FC+DEP, quando comparada ao grupo veículo (Figura 4).

A exposição durante o período de 3 meses promoveu alterações significativas tanto no número total de células quanto no número macrófagos e de linfócitos (Figuras 5).

Atentando-se para essa exposição pelo período de 3 meses, a fumaça de cigarro foi a exposição mais relevante responsável pelas mudanças no número de células no LBA. Observamos aumento significativo no número de células totais e de macrófagos no LBA, após exposição à fumaça de cigarro, se comparado aos grupos veículo, DEP e FC+DEP (Figura 5). Além disso, a exposição à FC correlacionou-se com o aumento significativo no número de linfócitos quando comparado aos grupos DEP e FC+DEP (Figura 5).

Ademais, aos 6 meses de exposição, todos os tipos celulares avaliados no LBA sofreram alguma alteração por algum fator exógeno (Figura 6).

A exposição à fumaça de cigarro e ao DEP separadamente foi correlacionada com o aumento significativo de células totais e macrófagos, em comparação com o grupo veículo e FC+DEP. Apenas a exposição ao DEP também foi responsável pelo aumento significativo de linfócitos, em comparação com veículo e FC+DEP. No entanto, a exposição a ambos os fatores exógenos FC+DEP não foi associada ao aumento no número de células, mas está correlacionada com a diminuição de células totais e neutrófilos no LBA, em comparação com os grupos veículo, FC e DEP. Além dessas alterações, também foi observada a diminuição de células epiteliais após a exposição de FC+DEP, quando comparada ao grupo veículo (Figura 6).

Figura 4 - Perfil inflamatório no lavado broncoalveolar (LBA) nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 1 mês de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com o grupo V em macrófagos (p=0,037)

Figura 5 - Perfil inflamatório no lavado broncoalveolar (LBA) nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 3 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com os grupos V, DEP e FC+DEP em células totais ($p \leq 0,001$) **Comparado com os grupos DEP e FC+DEP em linfócitos ($p \leq 0,001$) ***Comparado com os grupos V, DEP e FC+DEP em macrófagos ($p \leq 0,001$)

Figura 6 - Perfil inflamatório no lavado broncoalveolar (LBA) nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com V e FC+DEP em células totais ($p \leq 0,001$) **Comparado com V, FC e DEP em células totais ($p \leq 0,001$) ***Comparado com V, FC e DEP em neutrófilos ($p = 0,007$) ****Comparado com V e FC+DEP em linfócitos ($p = 0,012$) *****Comparado com V e FC+DEP em macrófagos ($p \leq 0,001$) *****Comparado com V em células epiteliais ($p \leq 0,001$)

3.3 ANÁLISE DA MORFOMETRIA PULMONAR

Em relação ao desenvolvimento do enfisema pulmonar e, mais especificamente, ao alargamento dos espaços alveolares, é possível verificar uma distensão alveolar em regiões do parênquima pulmonar próximas à pleura, ilustradas por fotomicrografias de lâminas coradas em hematoxilina e eosina dos pulmões de camundongos dos grupos experimentais FC, DEP e FC+DEP, após 6 meses de exposição aos fatores exógenos (Figura 8).

Os dados de morfometria pulmonar foram verificados por meio da medida do intercepto linear médio, o Lm. Após 1 mês de exposição, observamos valores de Lm aumentados significativamente nos grupos expostos à fumaça de cigarro e ao DEP separadamente, quando comparados com FC e DEP associados. No entanto, o dado relevante refere-se ao aumento significativo em valores médios de Lm, mostrados aos 6 meses de exposição, em todos os grupos tratados tanto pelos fatores exógenos separadamente FC ou DEP quanto pelos dois associados FC+DEP, em comparação com o grupo veículo (Figura 7).

Figura 7 - Intercepto linear médio (Lm) próximo à pleura nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 1, 3 e 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com o grupo FC+DEP, após 1 mês de exposição ($p=0.001$) **Comparado com o grupo V, após 6 meses de exposição ($p<0,001$).

Figura 8 - Fotomicrografia do parênquima pulmonar dos camundongos, após 6 meses de exposição. Parênquima pulmonar de camundongos que receberam instilação intranasal de veículo - NaCl 0,9% – grupo V (A.1). Parênquima pulmonar de camundongos que foram submetidos à exposição à fumaça de cigarro – grupo FC (A.2), instilação intranasal de solução DEP – grupo DEP (A.3), e aqueles que receberam ambos os tratamentos – grupo FC+DEP (A.4). Magnitude original de 400x e coloração em hematoxilina e eosina

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO ESPAÇO PERIBRÔNQUICO

A análise de inflamação nas vias aéreas foi realizada pelo número de células polimorfonucleares no espaço peribroncoalveolar por área de adventícia.

O número de células polimorfonucleares não demonstrou diferença significativa após 1 mês de exposição, por quaisquer partículas exógenas. No entanto, após 3 meses, foi observado um aumento significativo de células polimorfonucleares por meio da exposição ao DEP somente e à associação entre FC+DEP, quando comparado aos grupos veículo e FC. Além disso, após 6 meses, ocorreu aumento significativo no número celular, após exposição a todas as partículas exógenas: FC e DEP separadamente e FC+DEP associados (Figura 9).

Figura 9 - Proporção de células polimorfonucleares no espaço peribroncoalveolar nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 1, 3 e 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com V e FC, após 3 meses de exposição ($p \leq 0,001$) **Comparado com V, DEP e FC+DEP, após 6 meses de exposição ($p \leq 0,001$) ***Comparado com V, FC e FC+DEP, após 6 meses de exposição ($p \leq 0,001$) ****Comparado com V, FC e DEP, após 6 meses de exposição ($p \leq 0,001$)

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE EDEMA NA REGIÃO PERIBRONCOVASCULAR

A análise de edema na região peribroncovascular foi realizada por meio da presença de edema entre vaso e via aérea por área adventícia. A proporção de edema mostrou aumento significativo após 1 mês de exposição, por ambas as partículas exógenas associadas FC+DEP, quando comparadas a todos os outros grupos experimentais V, FC e DEP. No entanto, após 3 meses de exposição, o aumento significativo do edema peribroncovascular correlacionou-se com a exposição de FC e DEP separadamente, em relação ao grupo veículo. E após 6 meses de exposição, observou-se aumento significativo tanto para FC separadamente quanto para FC+DEP associados, em relação ao grupo veículo (Figura 10).

Figura 10 - Proporção de edema peribroncovascular nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 1, 3 e 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com V, FC e DEP em 1 mês ($p \leq 0,001$) **Comparado com V em 3 meses ($p = 0,015$) ***Comparado com V em 6 meses ($p = 0,004$)

3.6 CÉLULAS POSITIVAS PARA Mac-2 E MMP-12 NO PARÊNQUIMA PULMONAR

A quantificação de células positivas para Mac-2 e MMP-12 no parênquima pulmonar foi realizada somente após 6 meses de exposição, tempo no qual foram detectadas as principais alterações referentes à presença de destruição alveolar em todos os grupos experimentais tratados com quaisquer partículas exógenas.

A expressão de MMP-12 foi aumentada significativamente após a exposição a todas as partículas exógenas: FC e FC+DEP, comparadas ao grupo veículo; e DEP, comparada com o grupo veículo e FC (Figura 11A). Entretanto, a expressão de Mac-2 foi aumentada significativamente somente após exposição ao DEP, quando comparada ao grupo veículo (Figura 11B).

Figura 11 - Expressão de MMP-12 (A) e Mac-2 (B) no parênquima pulmonar por ensaios de imunohistoquímica nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com o grupo V ($p \leq 0,001$) **Comparado com os grupos V e FC ($p \leq 0,001$) ***Comparado com o grupo V ($p \leq 0,001$)

3.7 PROPORÇÃO DE VOLUME DE FIBRAS DE ELASTINA NO PARÊNQUIMA PULMONAR

A proporção de volume de fibras de elastina no parênquima pulmonar também foi analisada somente após 6 meses de exposição. Foi observado um aumento significativo e respectivamente gradual na proporção do volume de elastina nos animais expostos aos diferentes fatores exógenos FC, DEP e FC+DEP (Figura 12).

Fotomicrografias representativas com imunomarcagem específica para elastina, dos pulmões de camundongos dos grupos experimentais V, FC, DEP e FC+DEP, aos 6 meses de exposição, são ilustradas na Figura 13 respectivamente por A.1, A.2, A.3 e A.4.

Figura 12 - Proporção de volume de elastina no parênquima pulmonar por ensaios de imunohistoquímica nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com V, DEP e FC + DEP ($p \leq 0,001$) **Comparado com V, FC e FC + DEP ($p \leq 0,001$) ***Comparado com V, FC e DEP ($p \leq 0,001$)

Figura 13 - Fotomicrografias representativas de parênquima pulmonar de camundongos, imunomarcado para fibras de elastina nos grupos experimentais, após 6 meses de exposição de instilação intranasal de veículo - NaCl 0,9% – grupo Veículo (A.1), exposição à fumaça de cigarro – grupo FC (A.2), instilação intranasal de solução DEP – grupo DEP (A.3), e aqueles que receberam ambos os tratamentos – grupo FC+DEP (A.4). Magnitude original de 400x

3.8 PROPORÇÃO DE VOLUME DE FIBRAS DE COLÁGENO TIPO III NO PARÊNQUIMA PULMONAR

As análises das fibras de colágeno, por imunofluorescência, realizadas também após 6 meses de exposição, detectaram um aumento significativo de colágeno tipo III induzido somente após exposição a FC+DEP associados, em comparação com veículo, FC e DEP (Figura 14). Essas fibras podem ser observadas nas fotomicrografias representativas dos pulmões dos camundongos dos grupos experimentais veículo, FC, DEP e FC+DEP, após 6 meses de exposição (Figura 14: A.1, A.2, A.3 e A.4).

Figura 14 - Proporção de volume de colágeno tipo III, no parênquima pulmonar por ensaios de imunofluorescência nos grupos experimentais Veículo (V), Fumaça de Cigarro (FC), Diesel (DEP) e Fumaça de Cigarro e Diesel (FC+DEP), após 6 meses de exposição. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. *Comparado com V, FC e DEP ($p \leq 0,001$). Fotomicrografias representativas de parênquima pulmonar imunomarcado para colágeno tipo III, por meio de ensaios de imunofluorescência nos grupos experimentais, após 6 meses de exposição de instilação intranasal de veículo - NaCl 0,9% – grupo Veículo (A.1), exposição à fumaça de cigarro – grupo FC (A.2), instilação intranasal de solução DEP – grupo DEP (A.3), e aqueles que receberam ambos os tratamentos – grupo FC+DEP (A.4). Magnitude original de 400x

· · · · · *Discussão* · · · ·

4. DISCUSSÃO

Vários estudos na literatura demonstram os efeitos deletérios da poluição e da fumaça de cigarro à saúde humana, no entanto, poucos investigaram a associação dos dois fatores.

O ambiente em que a pessoa está inserida é relevante no que tange a doenças pulmonares. A influência da poluição do ar em relação à morbidade de indivíduos com DPOC, residentes em áreas periurbanas, confirma sua importância desde que o aumento nas concentrações de partículas ultrafinas (PM 2,5) esteja relacionado com o aumento dos sintomas respiratórios, da necessidade de medicamentos e do risco na exacerbação da DPOC severa (Hansel et al., 2013).

Como já mencionado, muitos estudos demonstram que níveis ambientais elevados de poluentes promovem a piora de doenças respiratórias, como a DPOC. Demonstramos previamente, em nosso laboratório, por meio de estudo experimental, que animais expostos a poluentes ambientais apresentaram enfisema mais grave do que aqueles que foram mantidos em ar filtrado, ou seja, sem a presença de poluentes (Lopes et al., 2009)

Os poluentes atmosféricos urbanos estão associados à piora dos sintomas respiratórios em indivíduos que vivem em ambientes urbanos e com doenças pulmonares pré-existentes (Vieira et al., 2012; Jung et al., 2012; Mehta et al., 2012). Estudos epidemiológicos demonstram o aumento da incidência de internações por exacerbação de doenças respiratórias após registros de aumento nos níveis de poluentes na atmosfera. Níveis elevados de dióxido de nitrogênio foram associados com subsequentes aumentos nas visitas médicas por DPOC e por bronquites crônicas (Mehta et al., 2012).

A principal fonte emissora dos poluentes atmosféricos urbanos é a frota de veículos automotores. Níveis aumentados de DEP têm sido detectados nas comunidades de Nova York quando ocorre aumento do volume de tráfego de veículos (Maciejczyk et al., 2004; Patel et al., 2009). Estudos epidemiológicos demonstram a associação entre o aumento agudo nas concentrações ambientais de *elemental* ou *black carbon* – geralmente utilizado como indicador de DEP –, e aumento dos sintomas de doenças respiratórias e das admissões hospitalares (Bell et al., 2009; Gent et al., 2009; Patel et al., 2010; Spira-Cohen et al., 2011).

Dessa forma, no presente estudo, nós avaliamos, por meio de pesquisa experimental, os efeitos da exposição às partículas oriundas da queima do diesel (DEP), proveniente de ônibus públicos que transitam na cidade de São Paulo, durante desenvolvimento do enfisema pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro, avaliando os mecanismos que norteiam o impacto dessa poluição na doença.

Mimetizando pessoas que vivem em áreas metropolitanas e que são tabagistas, nós expusemos os camundongos à fumaça de cigarro e/ou DEP por 1, 3 e 6 meses, para avaliarmos se a exposição conjunta da fumaça de cigarro e/ou diesel poderia piorar a inflamação e a destruição tecidual promovida pela exposição ao fumo. A destruição, por si só, já havia sido demonstrada em estudo desenvolvido em nosso laboratório após seis meses de exposição à fumaça de cigarro apenas (Toledo et al., 2012).

Inicialmente, em nosso estudo, após 1 mês de exposição, o principal fator exógeno atuante foi a associação entre FC e DEP, enquanto após 3 meses de protocolo as alterações referiram-se principalmente ao desempenho de cada fator exógeno isolado: FC ou DEP, sendo a fumaça de cigarro o principal deles. Na instalação da DPOC, caracterizada pelo alargamento dos espaços alveolares após 6 meses de exposição, todos

os fatores exógenos: FC ou DEP sozinhos e FC+DEP influenciaram tanto a morfologia quanto a função e perfil inflamatório.

O sexto mês de exposição foi o período no qual detectamos a instalação da DPOC. E embora ambos os fatores (FC e DEP) mostrarem-se importantes para a instalação do enfisema, a associação desses não promoveu uma piora do enfisema obtido. A lesão tecidual após 6 meses de exposição tanto por ação da fumaça de cigarro quanto pela exposição ao diesel isoladamente, e a exposição aos dois fatores exógenos em associação mantiveram o mesmo grau de lesão tecidual.

Além do alargamento dos espaços alveolares, nós detectamos aumento significativo na resistência do sistema respiratório na mecânica pulmonar, principalmente em camundongos expostos à FC ou FC+DEP. Observamos um aumento de células inflamatórias no LBA em animais expostos à FC ou DEP isoladamente e uma diminuição da inflamação em animais expostos a ambos FC+DEP.

Portanto, é importante ressaltar o efeito aditivo da associação dos fatores exógenos que podem atuar em vias diferentes quando expostos isoladamente: FC ou DEP, ou em associação: FC+DEP, além de agir de forma diferente ao longo do tempo.

4.1 EFEITOS DA FUMAÇA DE CIGARRO

Diferentes modelos de enfisema experimental têm sido descritos. Em geral, são necessários longos períodos de exposição à fumaça de cigarro para detectarmos o alargamento dos espaços alveolares (Hautamaki et al., 1997; Cavarra et al., 2001; Shapiro et al., 2003; Foronjy et al., 2006).

Embora alguns autores tenham descrito presença de enfisema em tempos mais curtos, isso foi obtido usando protocolos de exposição com múltiplas exposições diárias

(Valença et al., 2004), ou utilizando animais propensos ao desenvolvimento do enfisema pulmonar, como linhagens que expressam níveis muito baixos de α -1 antitripsina (Takubo et al., 2002). Entretanto, a maioria dos protocolos descrevem tempos de 4 a 7 meses para detecção de enfisema por meio da exposição à fumaça de cigarro em camundongos (Hautamaki et al., 1997; Cavarra et al., 2001; Shapiro et al., 2003; Guerassimov et al., 2004; Foronjy et al., 2006).

Os resultados que encontramos são compatíveis com dados anteriormente relatados. O enfisema não foi detectado em animais após 1 ou 3 meses de exposição à fumaça de cigarro e/ou de diesel. No entanto, o alargamento dos espaços alveolares foi observado após 6 meses de exposição em todos os grupos experimentais: FC, DEP e FC+DEP.

Após 3 meses de exposição à FC, as principais alterações observadas relacionam-se ao aumento do número de células inflamatórias totais no LBA, linfócitos e macrófagos, que são os tipos celulares que caracterizam um processo de inflamação persistente para o desenvolvimento da DPOC, referente à resposta do organismo tentando combater o fator exógeno (Di Stefano et al., 2004; Bracke et al., 2006; Domagala-Kulawik, 2008; He et al., 2015).

A mecânica pulmonar em pacientes com DPOC demonstra aumento da resistência do sistema respiratório relacionada à redução do fluxo aéreo, principal alteração funcional da DPOC (Barnes et al., 2003; da Costa et al., 2014). Em nosso estudo, essa alteração é observada após seis meses de exposição à FC e FC+DEP.

Na DPOC, além da obstrução ao fluxo de ar, também está presente a diminuição da elastância, devido à perda do recolhimento elástico decorrente da destruição das fibras constituintes do parênquima. Em nosso estudo, não obtivemos diminuição da elastância, entretanto outros fatores como o aumento da inflamação tecidual e de edema

peribrônquico podem estar relacionados com o aumento desse parâmetro, por tornar o tecido mais resistente à deformação elástica.

O aumento significativo de células inflamatórias no LBA, edema peribroncovascular e células polimorfonucleares nas vias aéreas dos pulmões do presente estudo, observado após seis meses de exposição à FC, pode ser associado à redução do diâmetro interno das vias aéreas e sua capacidade de distensão, explicando a resposta funcional com o aumento na resistência das vias aéreas, o que é congruente com a literatura sobre estudos clínicos e experimentais (Lange et al., 1990; da Costa et al., 2014). Ademais, a mudança da arquitetura pulmonar, com destruição do parênquima e de fibras elásticas, com o aumento da deposição de elastina no parênquima pode causar distorção e espessamento das paredes das vias aéreas, promovendo o aumento da resistência ao fluxo aéreo.

Acreditamos que o processo inflamatório, caracterizado também pelo aumento da expressão de MMP-12 (metaloproteinase derivada de macrófagos) e da deposição de fibras de elastina e colágeno, possa estar associado ao aumento da resistência das vias aéreas. Tais achados corroboram com os efeitos elastolíticos, similares aos encontrados com os macrófagos alveolares de fumantes (Shapiro et al., 1993; Babusyte et al., 2007) e o aumento da deposição de elastina no parênquima.

Dessa maneira, neste estudo, a exposição à fumaça de cigarro isoladamente promoveu, a partir do terceiro mês de exposição, aumento das células inflamatórias no LBA e, com 6 meses de exposição, nossos resultados são congruentes com os da literatura, considerando o aumento dos espaços aéreos distais, o aumento de resistência do sistema respiratório, o aumento de células inflamatórias no LBA e o aumento de edema e remodelamento tecidual (Harrison et al., 2008; Bezerra et al., 2011; Lopes et al., 2013; Kratzer et al., 2013; He et al., 2015).

4.2 EFEITOS DO PARTICULADO DE DIESEL EXAURIDO

Embora na maioria dos estudos, a poluição ambiental seja responsável pelo agravamento do quadro clínico dos pacientes com doenças pulmonares (Anderson et al., 1997; Yang et al., 2005), em um número menor de estudos ela é vista como causa de doença pulmonar por si só.

Apesar de o tabagismo ser o principal fator relacionado ao desenvolvimento da DPOC, a poluição atmosférica compete para tal nível de importância. Autores demonstram, em seres humanos, uma diminuição significativa no volume expiratório forçado (VEF) em crianças que vivem em áreas com alto índice de material particulado (Gauderman et al., 2004).

Outros autores demonstram, ainda, uma associação positiva entre exposição a poluentes e desenvolvimento da DPOC, sendo que a queima de biomassa, de combustível sólido e a poluição gerada pelo tráfego independentemente mostram riscos similares aos de fumantes para o desenvolvimento da doença (Schikowski et al., 2005; Hu et al., 2010; Kurmi et al., 2011; Kodgule; Salvi, 2012).

Sendo assim, um interesse particular neste estudo foi a detecção do alargamento dos espaços aéreos distais em animais expostos ao DEP somente após 6 meses de exposição.

Yoshizaki et al. (2015) já demonstraram previamente esse mesmo resultado em camundongos expostos ao DEP após 3 meses de exposição. Em nosso estudo, com 3 meses de exposição ao DEP, observamos inflamação peribroncoalveolar, além da presença de edema peribroncovascular que, possivelmente, estejam associados à destruição tecidual demonstrada após 6 meses de exposição.

Além disso, em nosso estudo, o alargamento dos espaços alveolares, após 6 meses de exposição somente ao DEP, pode ser explicado, em parte, pelo poluente utilizado e

grau de exposição, o que também elucidaria as diferenças entre o nosso trabalho e os dados encontrados por outros autores. No nosso caso, os animais foram expostos às partículas de diesel obtidas diretamente do local de saída do motor de ônibus, o que não representa exatamente a exposição à poluição atmosférica em humanos.

Estudos epidemiológicos estimam que a DPOC ocorra em 25-45% dos pacientes que nunca fumaram, o que contempla a poluição atmosférica, dentre outros fatores, como contribuinte para o desenvolvimento da doença (Salvi; Barnes, 2009).

Embora o alargamento dos espaços aéreos (observados pelo aumento do Lm) seja característico do enfisema, é possível que diferentes doenças pulmonares possam demonstrar respostas semelhantes do parênquima pulmonar por mecanismos fisiopatológicos diferentes. A esse respeito, apesar de os animais expostos ao DEP apresentarem aumento nos espaços aéreos, a fisiopatologia dessa alteração histológica pode ser diferente do enfisema induzido pelo fumo. De fato, diferentes protocolos experimentais mostraram desenvolver alargamento do espaço aéreo (Kasahara et al., 2000; Demedts et al., 2006; Henson et al., 2006; Rennard et al., 2006). Se diferentes partículas podem ativar diferentes mecanismos que levam ao enfisema ou se o enfisema pode ser uma resposta única para todos os tipos de partículas indutoras, com ativação dos mesmos mecanismos, a questão ainda se encontra em debate.

Acreditamos que, neste estudo, a fumaça de cigarro e o diesel agiram de forma diferente para a instalação da DPOC. Após um mês de exposição ao DEP ou FC, não houve nenhuma alteração relevante. No entanto, após 3 meses de exposição, a exposição de FC correlacionou-se com o aumento das células inflamatórias no LBA. E a exposição ao DEP não estimulou essas células inflamatórias, mas foi responsável por um importante e significativo aumento de células polimorfonucleares nas vias aéreas, mostrando um perfil de resposta diferenciado para diferentes partículas exógenas.

Este perfil sugere uma associação de DEP principalmente com uma inflamação do parênquima em contraste à observada na fumaça de cigarro, onde o aumento das células no LBA indica um processo inflamatório mais localizado nas vias aéreas. O mesmo pode ser também evidenciado no trabalho de Yoshizaki et al., (2015) que demonstra maiores alterações inflamatórias no tecido do que no LBA.

Duas alternativas devem ser discutidas. Os aglomerados de partículas de diesel podem suprimir a resposta da inflamação no LBA por meio do comprometimento da capacidade fagocitária dos macrófagos (Lundborg et al., 2006), e podem ser retidos, principalmente, no tecido devido à quantidade extra de fluidos através do edema peribroncovascular e vice-versa.

No entanto, apesar do DEP não ter sido capaz de alterar a resistência do sistema respiratório após 6 meses de exposição, agindo diferentemente da fumaça de cigarro sozinha, o DEP pode ser associado ao aumento das células polimorfonucleares no espaço peribroncovascular dos pulmões e também ao aumento de células inflamatórias totais no LBA, macrófagos e linfócitos. Alguns autores (Zhao et al., 2009; Vieira et al., 2012) descreveram anteriormente essa associação entre inflamação e DEP, no entanto, os resultados em nosso estudo foram observados durante e após uma exposição crônica a essa partícula exógena.

Como consequência desse processo inflamatório, observamos aumento do depósito de elastina configurando presença de remodelamento tecidual (Leigh et al., 2004; Morales et al., 2011).

Assim, o DEP se mostra atuante principalmente após o terceiro mês de exposição. No entanto, demonstra um perfil de ação mais na região do parênquima do que em vias aéreas e que o sexto mês de exposição é relacionado às principais alterações demonstrando a instalação da doença.

Pode, portanto, produzir lesões pulmonares semelhantes àsquelas encontradas em enfisema humano e, então, pode ser corresponsável pelo aparecimento da doença em indivíduos expostos ao diesel.

4.3 EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DA FUMAÇA DE CIGARRO E DO PARTICULADO DE DIESEL EXAURIDO

A combinação de fumaça de cigarro e DEP promoveu o mesmo grau de alargamento dos espaços aéreos observado nos grupos expostos somente a um dos fatores, após os 6 meses de exposição. Entretanto, apesar de causarem o mesmo grau de lesão tecidual, a aparente falta de interação sugere que os mecanismos fisiopatológicos envolvidos apresentam algumas diferenças entre os dois fatores.

No entanto, o alargamento do espaço aéreo não é a única característica da DPOC, e não se pode ditar a interação dos fatores baseados somente nesse parâmetro. Ainda assim, já está demonstrado que as exposições a poluentes em seres humanos poderiam aumentar os sintomas da DPOC e o número de internações, agravando a condição de saúde dos pacientes (Schikowski et al., 2005; Larsson; Lofdahl, 2007; Gan et al., 2013).

A interação entre FC e DEP pode ser vista em nosso estudo, no primeiro mês de exposição, tempo no qual, separadamente, nenhuma das partículas exógenas produzira nenhuma alteração relevante. No entanto, os animais expostos à FC+DEP apresentaram alterações da função pulmonar, com presença de aumento da elastância e resistência do sistema respiratório, provavelmente relacionadas com uma diminuição de macrófagos no LBA, demonstrando um efeito supressivo na inflamação, causado por um efeito aditivo entre FC e DEP.

Apesar de na literatura não encontrarmos muitos estudos associando a FC e DEP, os autores mostraram propriedades supressoras no perfil inflamatório relacionadas ao DEP e aumento da susceptibilidade de indivíduos expostos à poluição para infecções, aceleração ou exacerbações de doenças respiratórias pré-existentes (Lopes et al., 2009; Lundborg et al., 2006; Yang et al., 2005).

O perfil inflamatório observado em nosso modelo, após 6 meses de exposição ao FC+DEP, também é intrigante. Apesar de as células inflamatórias do LBA aumentarem em camundongos expostos à fumaça do cigarro ou ao DEP isoladamente, essas células apresentaram-se reduzidas quando ambos os fatores foram combinados. Células inflamatórias – macrófagos e neutrófilos – são consideradas como fatores chave para o desenvolvimento do enfisema. Geralmente são observadas nos pulmões dos doentes com DPOC (Saetta et al., 1997; Di Stefano et al., 1998) e a ausência dessas em animais geneticamente modificados impede o desenvolvimento da doença (Hautamaki et al., 1997; Shapiro et al., 2003).

A diminuição de células inflamatórias que observamos em animais expostos a ambos FC+DEP, apesar do alargamento do espaço aéreo presente, de alguma forma é surpreendente. Podemos especular que essas células foram mantidas no parênquima pulmonar, onde muitas das partículas de DEP poderiam ter sido alocadas, e onde podem continuar sendo importantes para a destruição do parênquima.

Em nosso estudo, o remodelamento do parênquima pulmonar, com aumento das fibras de elastina e de colágeno tipo III após a exposição de 6 meses a ambos os fatores exógenos: FC+DEP, juntamente com a presença de edema peribroncovascular e células polimorfonucleares no espaço peribronquico e células MMP-12 positivas no parênquima pulmonar, mostra que, apesar da supressão pela inflamação no LBA, há inflamação no tecido e isso poderia contribuir para o remodelamento do tecido.

Alguns autores forneceram evidências de que, na progressão do enfisema, fibras elásticas e de colágeno sofrem destruição e o remodelamento desses componentes é acionado (Jeffery, 2001). Fibras mais recentes, no entanto, podem não ter as mesmas propriedades mecânicas das mais antigas, levando a uma mudança imprevisível na mecânica pulmonar, podendo impedir a esperada diminuição na elastância do pulmão, geralmente observada em enfisema.

Alternativamente, a composição do DEP e a associação com os compostos da fumaça de cigarro podem contribuir para uma deposição específica nos pulmões, e seu aglomerado na superfície epitelial alveolar poderia ser o principal responsável, além de ampliar o remodelamento do tecido (Ma et al., 2014).

Partículas de DEP quando combinadas à fumaça do cigarro podem interromper a reação inflamatória dos pulmões, e o enfisema observado seria produzido por vias alternativas, como interrupção do sistema de reparação de matriz, bloqueio de VEGF, apoptose direta do epitélio ou estresse oxidativo não mediados por células inflamatórias (Kasahara et al., 2000; MacNee, 2001; Wang et al., 2005; Demedts et al., 2006; Henson et al., 2006; Rennard et al., 2006).

· · · · · *Conclusões* · · · ·

5. CONCLUSÕES

O presente estudo investigou os efeitos da coexposição de fumaça de cigarro e DEP em camundongos no período de 1, 3 e 6 meses, apresentando desenvolvimento de enfisema após 6 meses de exposição, independente das partículas exógenas inaladas.

As alterações mecânicas estão associadas principalmente ao aumento de resistência do sistema respiratório após a exposição à FC e FC+DEP, somente após 6 meses.

A análise temporal do perfil celular mostrou um aumento nas células inflamatórias apenas 3 meses após a exposição à FC, enquanto FC+DEP atenuou o processo inflamatório após 6 meses.

O presente estudo demonstrou não haver um efeito aditivo exercido pela exposição à fumaça de cigarro e ao DEP na progressão do enfisema pulmonar. Os animais que receberam a inalação de FC e DEP associados não demonstraram piora no enfisema.

No entanto, o remodelamento pulmonar foi mais intenso quando houve coexposição ao DEP e à fumaça de cigarro do que a exposição a cada um deles isoladamente.

A exposição à fumaça de cigarro promoveu alterações nas vias aéreas e no parênquima pulmonar e a exposição ao DEP alterou principalmente o parênquima, demonstrando haver diferenças entre os mecanismos fisiopatológicos.

Após 1 mês de exposição, o principal fator exógeno atuante foi a associação entre FC e DEP, enquanto após 3 meses as alterações referem-se principalmente ao desempenho de cada fator exógeno isoladamente: FC ou DEP, sobretudo a FC. Além disto, a instalação da DPOC, com alargamento dos espaços alveolares, ocorreu após 6 meses de exposição independentemente das partículas exógenas inaladas, associadas ou não.

· · · · · *Referências Bibliográficas* · · · ·

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamson IY, Frieditis H, Hedgecock C, Vincent R. Zinc is the toxic factor in the lung response to an atmospheric particulate sample. *Toxicology and applied pharmacology*. 2000;166(2):111-9.

Anderson HR, Spix C, Medina S, Schouten JP, Castellsague J, Rossi G, Zmirou D, Touloumi G, Wojtyniak B, Ponka A, Bacharova L, Schwartz J, Katsouyanni K. Air pollution and daily admissions for chronic obstructive pulmonary disease in 6 European cities: results from the APHEA project. *The European respiratory journal*. 1997;10(5):1064-71.

Anderson PJ, Wilson JD, Hiller FC. Respiratory tract deposition of ultrafine particles in subjects with obstructive or restrictive lung disease. *Chest*. 1990;97(5):1115-20.

Arantes-Costa FM, Zoriki S, Santos MH, Kobata CH, Vieira JE, Martins MA. Effects of ventilation, humidity and temperature on airway responsiveness to methacholine in rats. *The European respiratory journal*. 2002;19(6):1008-14.

Arantes-Costa FM, Grund LZ, Martins MA, Lima C. Airborne pollutant ROFA enhances the allergic airway inflammation through direct modulation of dendritic cells in an uptake-dependent mechanism. *International immunopharmacology*. 2014;22(1):9-20.

Arbex MA, Santos Ude P, Martins LC, Saldiva PH, Pereira LA, Braga AL. Air pollution and the respiratory system. *J Bras Pneumol*. 2012;38(5):643-55.

Babusyte A, Stravinskaite K, Jeroch J, Lotvall J, Sakalauskas R, Sitkauskiene B. Patterns of airway inflammation and MMP-12 expression in smokers and ex-smokers with COPD. *Respiratory research*. 2007;8:81.

Banco de dados do Sistema Único de Saúde [Internet]. 2009 (Disponível em <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>).

Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *The European respiratory journal*. 2003;22(4):672-88.

Bayram H, Dikensoy O. [Effects of air pollution on respiratory health]. *Tuberkuloz ve toraks*. 2006;54(1):80-9.

Bell ML, Ebisu K, Peng RD, Samet JM, Dominici F. Hospital admissions and chemical composition of fine particle air pollution. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009;179(12):1115-20.

Bezerra FS, Valenca SS, Pires KM, Lanzetti M, Pimenta WA, Schmidt AC, Porto LC, Zin WA. Long-term exposure to cigarette smoke impairs lung function and increases HMGB-1 expression in mice. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2011;177(2):120-6.

Biselli PJ, Lopes FD, Moriya HT, Rivero DH, Toledo AC, Saldiva PH, Mauad T, Martins MA. Short-term exposure of mice to cigarette smoke and/or residual oil fly ash produces proximal airspace enlargements and airway epithelium remodeling. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2011;44(5):460-8.

Bracke KR, D'Hulst A I, Maes T, Moerloose KB, Demedts IK, Lebecque S, Joos GF, Brusselle GG. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. *Journal of immunology*. 2006;177(7):4350-9.

Brightling CE, Ward R, Woltmann G, Bradding P, Sheller JR, Dworski R, Pavord ID. Induced sputum inflammatory mediator concentrations in eosinophilic bronchitis and asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;162(3 Pt 1):878-82.

Carp H, Miller F, Hoidal JR, Janoff A. Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized

methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79(6):2041-5.

Cavarra E, Bartalesi B, Lucattelli M, Fineschi S, Lunghi B, Gambelli F, Ortiz LA, Martorana PA, Lungarella G. Effects of cigarette smoke in mice with different levels of alpha(1)-proteinase inhibitor and sensitivity to oxidants. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(5):886-90.

Chapman KR, Mannino DM, Soriano JB, Vermeire PA, Buist AS, Thun MJ, Connell C, Jemal A, Lee TA, Miravittles M, Aldington S, Beasley R. Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. *The European respiratory journal*. 2006;27(1):188-207.

Churg A, Brauer M. Human lung parenchyma retains PM2.5. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(6):2109-11.

Churg A, Gilks B, Dai J. Induction of fibrogenic mediators by fine and ultrafine titanium dioxide in rat tracheal explants. *The American journal of physiology*. 1999;277(5 Pt 1):L975-82.

Churg A, Wright JL. Proteases and emphysema. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2005;11(2):153-9.

da Costa GM, Faria AC, Di Mango AM, Lopes AJ, Lopes de Melo P. Respiratory impedance and response to salbutamol in healthy individuals and patients with COPD. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2014;88(2):101-11.

Dawkins PA, Stockley RA. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2001;56(12):972-7.

de Kluijver J, Schrumpf JA, Evertse CE, Sont JK, Roughley PJ, Rabe KF, Hiemstra PS, Mauad T, Sterk PJ. Bronchial matrix and inflammation respond to inhaled steroids despite ongoing allergen exposure in asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2005;35(10):1361-9.

Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory research*. 2006;7:53.

D'Hulst A I, Maes T, Bracke KR, Demedts IK, Tournoy KG, Joos GF, Brusselle GG. Cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in scid-mice. Is the acquired immune system required? *Respiratory research*. 2005;6:147.

Di Petta A, Greco KV, Castro EO, Lopes FD, Martins MA, Capelozzi VL, Moreira LF, Sannomiya P. Insulin modulates inflammatory and repair responses to elastase-induced emphysema in diabetic rats. *International journal of experimental pathology*. 2011;92(6):392-9.

Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Saetta M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;158(4):1277-85.

Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FL, Capelli A, Adcock IM, Donner CF. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2004;34(8):1156-67.

Dockery DW, Pope CA, 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG, Jr., Speizer FE. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *The New England journal of medicine*. 1993;329(24):1753-9.

Domagala-Kulawik J. Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2008;59 Suppl 6:19-34.

Donaldson K, MacNee W. Potential mechanisms of adverse pulmonary and cardiovascular effects of particulate air pollution (PM10). *International journal of hygiene and environmental health*. 2001;203(5-6):411-5.

Driscoll KE, Howard BW, Carter JM, Asquith T, Johnston C, Detilleux P, Kunkel SL, Isfort RJ. Alpha-quartz-induced chemokine expression by rat lung epithelial cells: effects of in vivo and in vitro particle exposure. *The American journal of pathology*. 1996;149(5):1627-37.

Eriksson S. Studies in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Acta medica Scandinavica Supplementum*. 1965;432:1-85.

Falk R, Philipson K, Svartengren M, Bergmann R, Hofmann W, Jarvis N, Bailey M, Camner P. Assessment of long-term bronchiolar clearance of particles from measurements of lung retention and theoretical estimates of regional deposition. *Experimental lung research*. 1999;25(6):495-516.

Federspiel WJ, Fredberg JJ. Axial dispersion in respiratory bronchioles and alveolar ducts. *Journal of applied physiology*. 1988;64(6):2614-21.

Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;152(5 Pt 1):1666-72.

Fló C, Lopes FD, Kasahara DI, Silva AC, Jesus RC, Rivero DH, Saldiva PH, Martins MA, Jacob-Filho W. Effects of exercise training on papain-induced pulmonary emphysema in Wistar rats. *Journal of applied physiology*. 2006;100(1):281-5.

Foronjy RF, Mirochnitchenko O, Propokenko O, Lemaitre V, Jia Y, Inouye M, Okada Y, D'Armiento JM. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173(6):623-31.

Fusco LB, Pêgo-Fernandes PM, Xavier AM, Pazetti R, Rivero DHRF, Capelozzi VL, Janete FB. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. *J Bras Pneumol*. 2002;28:1-7.

Gadek JE, Fells GA, Crystal RG. Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science*. 1979;206(4424):1315-6.

Gan WQ, FitzGerald JM, Carlsten C, Sadatsafavi M, Brauer M. Associations of ambient air pollution with chronic obstructive pulmonary disease hospitalization and mortality. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;187(7):721-7.

Gauderman WJ, Avol E, Gilliland F, Vora H, Thomas D, Berhane K, McConnell R, Kuenzli N, Lurmann F, Rappaport E, Margolis H, Bates D, Peters J. The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *The New England journal of medicine*. 2004;351(11):1057-67.

Gent JF, Koutrakis P, Belanger K, Triche E, Holford TR, Bracken MB, Leaderer BP. Symptoms and medication use in children with asthma and traffic-related sources of fine particle pollution. *Environmental health perspectives*. 2009;117(7):1168-74.

GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease). Executive Summary: Global Strategy for Diagnosis, Management and Prevention of COPD 2014(Disponível em <http://www.goldcopd.com>).

Gonzales RC, Woods RE. *Processamento de imagens digitais*. São Paulo: Edgard Blücher LTDA2000.

Groneberg DA, Chung KF. Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory research*. 2004;5:18.

Guerassimov A, Hoshino Y, Takubo Y, Turcotte A, Yamamoto M, Ghezzi H, Triantafillopoulos A, Whittaker K, Hoidal JR, Cosio MG. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;170(9):974-80.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC: The National Academies Press; 1996. 140 p.

Halonen JJ, Lanki T, Yli-Tuomi T, Tiittanen P, Kulmala M, Pekkanen J. Particulate air pollution and acute cardiorespiratory hospital admissions and mortality among the elderly. *Epidemiology*. 2009;20(1):143-53.

Hansel NN, McCormack MC, Belli AJ, Matsui EC, Peng RD, Aloe C, Paulin L, Williams DL, Diette GB, Breyse PN. In-home air pollution is linked to respiratory morbidity in former smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;187(10):1085-90.

Harkema JR, Hotchkiss JA. Ozone- and endotoxin-induced mucous cell metaplasias in rat airway epithelium: novel animal models to study toxicant-induced epithelial transformation in airways. *Toxicology letters*. 1993;68(1-2):251-63.

Harrison OJ, Foley J, Bolognese BJ, Long E, 3rd, Podolin PL, Walsh PT. Airway infiltration of CD4+ CCR6+ Th17 type cells associated with chronic cigarette smoke induced airspace enlargement. *Immunology letters*. 2008;121(1):13-21.

Hart JE, Eisen EA, Laden F. Occupational diesel exhaust exposure as a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2012;18(2):151-4.

Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*. 1997;277(5334):2002-4.

He ZH, Chen P, Chen Y, He SD, Ye JR, Zhang HL, Cao J. Comparison between cigarette smoke-induced emphysema and cigarette smoke extract-induced emphysema. *Tobacco induced diseases*. 2015;13(1):6.

Henson PM, Vandivier RW, Douglas IS. Cell death, remodeling, and repair in chronic obstructive pulmonary disease? *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006;3(8):713-7.

Holguin F. Traffic, outdoor air pollution, and asthma. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2008;28(3):577-88, viii-ix.

Holz O, Zuhlke I, Jaksztat E, Muller KC, Welker L, Nakashima M, Diemel KD, Branscheid D, Magnussen H, Jorres RA. Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture. *The European respiratory journal*. 2004;24(4):575-9.

Howarth PH, Babu KS, Arshad HS, Lau L, Buckley M, McConnell W, Beckett P, Al Ali M, Chauhan A, Wilson SJ, Reynolds A, Davies DE, Holgate ST. Tumour necrosis factor (TNF α) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax*. 2005;60(12):1012-8.

Hu G, Zhou Y, Tian J, Yao W, Li J, Li B, Ran P. Risk of COPD from exposure to biomass smoke: a metaanalysis. *Chest*. 2010;138(1):20-31.

Ishikawa S, Bowden DH, Fisher V, Wyatt JP. The "emphysema profile" in two midwestern cities in North America. *Archives of environmental health*. 1969;18(4):660-6.

Ito S, Ingenito EP, Brewer KK, Black LD, Parameswaran H, Lutchen KR, Suki B. Mechanics, nonlinearity, and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodeling. *Journal of applied physiology*. 2005;98(2):503-11.

Jardim JR, Nascimento O. Respiratory health in Brazil. *Chronic respiratory disease*. 2007;4(1):45-9.

Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(10 Pt 2):S28-38.

Jung KH, Hsu SI, Yan B, Moors K, Chillrud SN, Ross J, Wang S, Perzanowski MS, Kinney PL, Whyatt RM, Perera FP, Miller RL. Childhood exposure to fine particulate matter and black carbon and the development of new wheeze between ages 5 and 7 in an urban prospective cohort. *Environment international*. 2012;45:44-50.

Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(11):1311-9.

Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(2):449-53.

Kim JJ, Huen K, Adams S, Smorodinsky S, Hoats A, Malig B, Lipsett M, Ostro B. Residential traffic and children's respiratory health. *Environmental health perspectives*. 2008;116(9):1274-9.

Kodgule R, Salvi S. Exposure to biomass smoke as a cause for airway disease in women and children. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2012;12(1):82-90.

Kratzer A, Salys J, Nold-Petry C, Cool C, Zamora M, Bowler R, Koczulla AR, Janciauskiene S, Edwards MG, Dinarello CA, Taraseviciene-Stewart L. Role of IL-18 in second-hand smoke-induced emphysema. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2013;48(6):725-32.

Kuhn C, Yu SY, Chraplyvy M, Linder HE, Senior RM. The induction of emphysema with elastase. II. Changes in connective tissue. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1976;34(4):372-80.

Kurmi OP, Gaihre S, Semple S, Ayres JG. Acute exposure to biomass smoke causes oxygen desaturation in adult women. *Thorax*. 2011;66(8):724-5.

Laënnec RTH. De l'auscultation médiate ou traité du diagnostic des maladies des poumon et du coeur. 1st ed Paris: Brosson & Chaudé. 1819.

Laënnec RTH. A treatise on diseases of the chest and on mediate auscultation. 4th ed Forbes J, translator London: Longman. 1834.

Laks D, de Oliveira RC, de Andre PA, Macchione M, Lemos M, Faffe D, Saldiva PH, Zin WA. Composition of diesel particles influences acute pulmonary toxicity: an experimental study in mice. *Inhalation toxicology*. 2008;20(11):1037-42.

Lang MR, Fiaux GW, Gillooly M, Stewart JA, Hulmes DJ, Lamb D. Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. *Thorax*. 1994;49(4):319-26.

Lange P, Groth S, Nyboe J, Mortensen J, Appleyard M, Jensen G, Schnohr P. Decline of the lung function related to the type of tobacco smoked and inhalation. *Thorax*. 1990;45(1):22-6.

Larsson SA, Lofdahl CG. [The COPD national guidelines do have a future]. *Lakartidningen*. 2007;104(24-25):1891.

Leigh R, Southam DS, Ellis R, Wattie JN, Sehmi R, Wan Y, Inman MD. T-cell-mediated inflammation does not contribute to the maintenance of airway dysfunction in mice. *Journal of applied physiology*. 2004;97(6):2258-65.

Li K, Keeling B, Churg A. Mineral dusts cause elastin and collagen breakdown in the rat lung: a potential mechanism of dust-induced emphysema. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;153(2):644-9.

Li N, Wang M, Oberley TD, Sempf JM, Nel AE. Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *Journal of immunology*. 2002;169(8):4531-41.

Lopes FD, Pinto TS, Arantes-Costa FM, Moriya HT, Biselli PJ, Ferraz LF, Lichtenfels AJ, Saldiva PH, Mauad T, Martins MA. Exposure to ambient levels of particles emitted by traffic worsens emphysema in mice. *Environmental research*. 2009;109(5):544-51.

Lopes FD, Toledo AC, Olivo CR, Prado CM, Leick EA, Medeiros MC, Santos AB, Garippo A, Martins MA, Mauad T. A comparative study of extracellular matrix remodeling in two murine models of emphysema. *Histology and histopathology*. 2013;28(2):269-76.

Lundborg M, Dahlen SE, Johard U, Gerde P, Jarstrand C, Camner P, Lastbom L. Aggregates of ultrafine particles impair phagocytosis of microorganisms by human alveolar macrophages. *Environmental research*. 2006;100(2):197-204.

Ma JY, Young SH, Mercer RR, Barger M, Schwegler-Berry D, Ma JK, Castranova V. Interactive effects of cerium oxide and diesel exhaust nanoparticles on inducing pulmonary fibrosis. *Toxicology and applied pharmacology*. 2014;278(2):135-47.

Maciejczyk PB, Offenberg JH, Clemente J, Blaustein M, Thurston GD, Chi Chen L. Ambient pollutant concentrations measured by a mobile laboratory in South Bronx, NY. *Atmos Environ*. 2004;38:5283-94.

MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *European journal of pharmacology*. 2001;429(1-3):195-207.

MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Proceedings of the American Thoracic Society. 2005;2(4):258-66; discussion 90-1.

Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease * 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. Thorax. 2002;57(10):908-14.

Mahadeva R, Shapiro SD. Animal models of pulmonary emphysema. Current drug targets Inflammation and allergy. 2005;4(6):665-73.

Maier KL, Alessandrini F, Beck-Speier I, Hofer TP, Diabate S, Bitterle E, Stoger T, Jakob T, Behrendt H, Horsch M, Beckers J, Ziesenis A, Hultner L, Frankenberger M, Krauss-Etschmann S, Schulz H. Health effects of ambient particulate matter--biological mechanisms and inflammatory responses to in vitro and in vivo particle exposures. Inhalation toxicology. 2008;20(3):319-37.

Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Ford ES, Redd SC. Chronic obstructive pulmonary disease surveillance--United States, 1971-2000. Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries. 2002;51(6):1-16.

Margraf LR, Tomashefski JF, Jr., Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. The American review of respiratory disease. 1991;143(2):391-400.

Martin-Mosquero C, Peces-Barba G, Rubio ML, Ortega M, Rodriguez-Nieto MJ, Martinez Galan L, Gonzalez-Mangado N. Increased collagen deposition correlated with lung destruction in human emphysema. Histology and histopathology. 2006;21(8):823-8.

Mauderly JL, Bice DE, Cheng YS, Gillett NA, Griffith WC, Henderson RF, Pickrell JA, Wolff RK. Influence of preexisting pulmonary emphysema on susceptibility of rats to inhaled diesel exhaust. The American review of respiratory disease. 1990;141(5 Pt 1):1333-41.

McDonald JD, Eide I, Seagrave J, Zielinska B, Whitney K, Lawson DR, Mauderly JL. Relationship between composition and toxicity of motor vehicle emission samples. Environmental health perspectives. 2004;112(15):1527-38.

Mehta AJ, Schindler C, Perez L, Probst-Hensch N, Schwartz J, Brandl O, Karrer W, Tschopp JM, Rochat T, Kunzli N, Team S. Acute respiratory health effects of urban air pollutants in adults with different patterns of underlying respiratory disease. *Swiss medical weekly*. 2012;142:w13681.

Menezes AM, Jardim JR, Perez-Padilla R, Camelier A, Rosa F, Nascimento O, Hallal PC. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO Study in Sao Paulo, Brazil. *Cadernos de saude publica*. 2005;21(5):1565-73.

Menezes AM, Perez-Padilla R, Hallal PC, Jardim JR, Muino A, Lopez MV, Valdivia G, Pertuze J, Montes de Oca M, Talamo C, Team P. Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part II. Burden of chronic obstructive lung disease in Latin America: the PLATINO study. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2008;12(7):709-12.

Molfino NA. Current thinking on genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2007;13(2):107-13.

Morales MM, Pires-Neto RC, Inforsato N, Lancas T, da Silva LF, Saldiva PH, Mauad T, Carvalho CR, Amato MB, Dolhnikoff M. Small airway remodeling in acute respiratory distress syndrome: a study in autopsy lung tissue. *Critical care*. 2011;15(1):R4.

Morrow PE. Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology*. 1988;10(3):369-84.

Nikula KJ, March TH, Seagrave J, Finch G, Barr E, Menache M, Hahn F, Hobbs C. A mouse model of cigarette smoke-induced emphysema. *Chest*. 2000;117(5 Suppl 1):246S-7S.

Nyunoya T, Monick MM, Klingelutz A, Yarovinsky TO, Cagley JR, Hunninghake GW. Cigarette smoke induces cellular senescence. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006;35(6):681-8.

Ofulue AF, Ko M, Abboud RT. Time course of neutrophil and macrophage elastolytic activities in cigarette smoke-induced emphysema. *The American journal of physiology*. 1998;275(6 Pt 1):L1134-44.

Patel MM, Chillrud SN, Correa JC, Feinberg M, Hazi Y, Kc D, Prakash S, Ross JM, Levy D, Kinney PL. Spatial and Temporal Variations in Traffic-related Particulate Matter at New York City High Schools. *Atmospheric environment*. 2009;43(32):4975-81.

Patel MM, Chillrud SN, Correa JC, Hazi Y, Feinberg M, Kc D, Prakash S, Ross JM, Levy D, Kinney PL. Traffic-related particulate matter and acute respiratory symptoms among New York City area adolescents. *Environmental health perspectives*. 2010;118(9):1338-43.

Pauwels RA, Rabe KF. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet*. 2004;364(9434):613-20.

Pelkonen M, Notkola IL, Nissinen A, Tukiainen H, Koskela H. Thirty-year cumulative incidence of chronic bronchitis and COPD in relation to 30-year pulmonary function and 40-year mortality: a follow-up in middle-aged rural men. *Chest*. 2006;130(4):1129-37.

Pinkerton KE, Green FH, Saiki C, Vallyathan V, Plopper CG, Gopal V, Hung D, Bahne EB, Lin SS, Menache MG, Schenker MB. Distribution of particulate matter and tissue remodeling in the human lung. *Environmental health perspectives*. 2000;108(11):1063-9.

Pope JS, Koenig SM. Pulmonary disorders in the training room. *Clinics in sports medicine*. 2005;24(3):541-64, viii.

Pritchard JN. Dust overloading causes impairment of pulmonary clearance: evidence from rats and humans. *Experimental pathology*. 1989;37(1-4):39-42.

Rackley CR, Stripp BR. Building and maintaining the epithelium of the lung. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(8):2724-30.

Rennard SI. Inflammation and repair processes in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;160(5 Pt 2):S12-6.

Rennard SI, Togo S, Holz O. Cigarette smoke inhibits alveolar repair: a mechanism for the development of emphysema. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006;3(8):703-8.

Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciurba FC, Rogers RM, Hayashi S, Hogg JC. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(3):469-73.

Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, Fitzgerald M, Barnes PJ. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2002;283(4):L867-73.

Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabbri LM. Structural aspects of airway inflammation in COPD. *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace / Fondazione clinica del lavoro, IRCCS [and] Istituto di clinica fisiologica e malattie apparato respiratorio, Università di Napoli, Secondo ateneo*. 1994;49(3 Suppl 1):43-5.

Saetta M, Turato G, Corbino L, Ruggieri MP, Pieno M, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. Mechanisms of damage in COPD. *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace / Fondazione clinica del lavoro, IRCCS [and] Istituto di clinica fisiologica e malattie apparato respiratorio, Università di Napoli, Secondo ateneo*. 1997;52(6):586-8.

Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Diaz E, Koutrakis P, Suh H, Tsuda A, Godleski JJ. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;165(12):1610-7.

Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet*. 2009;374(9691):733-43.

Sampsonas F, Karkoulas K, Kaprianos A, Spiropoulos K. Genetics of chronic obstructive pulmonary disease, beyond α_1 -antitrypsin deficiency. *Current medicinal chemistry*. 2006;13(24):2857-73.

Schikowski T, Sugiri D, Ranft U, Gehring U, Heinrich J, Wichmann HE, Kramer U. Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women. *Respiratory research*. 2005;6:152.

Schwartz DA, Davis CS, Merchant JA, Bunn WB, Galvin JR, Van Fossen DS, Dayton CS, Hunninghake GW. Longitudinal changes in lung function among asbestos-exposed workers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994;150(5 Pt 1):1243-9.

Shapiro SD, Kobayashi DK, Pentland AP, Welgus HG. Induction of macrophage metalloproteinases by extracellular matrix. Evidence for enzyme- and substrate-specific responses involving prostaglandin-dependent mechanisms. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(11):8170-5.

Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, Belaaouaj A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *The American journal of pathology*. 2003;163(6):2329-35.

Shapiro SD, Ingenito EP. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2005;32(5):367-72.

Shapiro SD. The use of transgenic mice for modeling airways disease. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2008;21(5):699-701.

Sint T, Donohue JF, Ghio AJ. Ambient air pollution particles and the acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Inhalation toxicology*. 2008;20(1):25-9.

Slauson DO, Hahn FF. Criteria for development of animal models of diseases of the respiratory system: the comparative approach in respiratory disease model development. *The American journal of pathology*. 1980;101(3 Suppl):S103-22.

Spira-Cohen A, Chen LC, Kendall M, Lall R, Thurston GD. Personal exposures to traffic-related air pollution and acute respiratory health among Bronx schoolchildren with asthma. *Environmental health perspectives*. 2011;119(4):559-65.

Suzuki M, Betsuyaku T, Nagai K, Fuke S, Nasuhara Y, Kaga K, Kondo S, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Nishimura M. Decreased airway expression of vascular endothelial growth factor in cigarette smoke-induced emphysema in mice and COPD patients. *Inhalation toxicology*. 2008;20(3):349-59.

Sydbom A, Blomberg A, Parnia S, Stenfors N, Sandstrom T, Dahlen SE. Health effects of diesel exhaust emissions. *The European respiratory journal*. 2001;17(4):733-46.

Takubo Y, Guerassimov A, Ghezzi H, Triantafillopoulos A, Bates JH, Hoidal JR, Cosio MG. Alpha1-antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice: parallels with human disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(12 Pt 1):1596-603.

Teramoto S. 1. COPD pathogenesis from the viewpoint of risk factors. *Internal medicine*. 2007;46(2):77-9.

Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJ, Moriya HT, Mauad T, Lopes FD, Martins MA. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *The European respiratory journal*. 2012;39(2):254-64.

Tuder RM, Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(8):2749-55.

Valença SS, da Hora K, Castro P, Moraes VG, Carvalho L, Porto LC. Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. *Toxicologic pathology*. 2004;32(3):351-6.

Valença SS, Pimenta WA, Rueff-Barroso CR, Ferreira TS, Resende AC, Moura RS, Porto LC. Involvement of nitric oxide in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2009;20(3):175-81.

Vieira RP, Toledo AC, Silva LB, Almeida FM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Santos AB, Rivero DH, Hizume DC, Lopes FD, Olivo CR, Castro-Faria-Neto HC, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution. *Medicine and science in sports and exercise*. 2012;44(7):1227-34.

Voelkel NF. Symposium: Thomas L. Petty Aspen Lung Conference: lung injury and repair. Conference summary. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2008;5(3):354-7.

Wang RD, Wright JL, Churg A. Transforming growth factor-beta1 drives airway remodeling in cigarette smoke-exposed tracheal explants. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2005;33(4):387-93.

Wang XD, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russell M. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(1):60-6.

Weibel ER, Cruz-Orive, L.M. Morphometric methods. Crystal RG, West JB, Weibel ER, Barnes PJ, editors *The lung: scientific foundations*. Philadelphia, PA. Lippincott-Raven 1997. p. 333-44.

WHO (World Health Organization). *The World Health Report 2010: Reducing risks, promoting health life*. [Internet]. 2010 (Disponível em <http://www.who.int/en/>).

Williams OW, Sharafkhaneh A, Kim V, Dickey BF, Evans CM. Airway mucus: From production to secretion. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006;34(5):527-36.

Wood AM, Stockley RA. Alpha one antitrypsin deficiency: from gene to treatment. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2007;74(5):481-92.

Wright JL, Cagle P, Churg A, Colby TV, Myers J. Diseases of the small airways. *The American review of respiratory disease*. 1992;146(1):240-62.

Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *The American review of respiratory disease*. 1990;142(6 Pt 1):1422-8.

Yang Q, Chen Y, Krewski D, Burnett RT, Shi Y, McGrail KM. Effect of short-term exposure to low levels of gaseous pollutants on chronic obstructive pulmonary disease hospitalizations. *Environmental research*. 2005;99(1):99-105.

Yoshizaki K, Brito JM, Moriya HT, Toledo AC, Ferzilan S, Ligeiro de Oliveira AP, Machado ID, Farsky SH, Silva LF, Martins MA, Saldiva PH, Mauad T, Macchione M. Chronic exposure of diesel exhaust particles induces alveolar enlargement in mice. *Respiratory research*. 2015;16:18.

Yu CP, Yoon KJ. Retention modeling of diesel exhaust particles in rats and humans. *Research report*. 1991(40):1-24.

Zhao H, Ma JK, Barger MW, Mercer RR, Millecchia L, Schwegler-Berry D, Castranova V, Ma JY. Reactive oxygen species- and nitric oxide-mediated lung inflammation and mitochondrial dysfunction in wild-type and iNOS-deficient mice exposed to diesel exhaust particles. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2009;72(8):560-70.