

THIAGO TAFAREL GALLI

Efeitos da exposição a poluição ambiental advinda da pelletização do minério de ferro na mecânica pulmonar, inflamação, estresse oxidativo e remodelamento da matriz extracelular em camundongos saudáveis e com enfisema pulmonar induzido por elastase.

**SÃO PAULO
2023**

THIAGO TAFAREL GALLI

Efeitos da exposição a poluição ambiental advinda da pelletização do minério de ferro na mecânica pulmonar, inflamação, estresse oxidativo e remodelamento da matriz extracelular em camundongos saudáveis e com enfisema pulmonar induzido por elastase.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências
Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério

SÃO PAULO
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Galli, Thiago Tafarel

Efeitos da exposição a poluição ambiental advinda da pelletização do minério de ferro na mecânica pulmonar, inflamação, estresse oxidativo e remodelamento da matriz extracelular em camundongos saudáveis e com enfisema pulmonar induzido por elastase / Thiago Tafarel Galli. -- São Paulo, 2023.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientadora: Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério.

Descritores: 1.Doença pulmonar obstrutiva crônica
2.Poluição ambiental 3.Estresse oxidativo
4.Inflamação 5.Remodelamento 6.Modelos animais.

USP/PM/DBD-266/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATORIA

Beatriz, dedico este trabalho como um símbolo de perseverança e dedicação. Você é a minha luz, a razão pela qual me esforço todos os dias para ser o melhor que posso ser. Que esta tese seja um exemplo para você de que é possível alcançar seus objetivos com determinação e paixão.

“Ninguém vai bater tão forte como a vida, mas a questão não é o quão forte você consegue bater. É o quão forte você consegue apanhar e continuar seguindo em frente”.

Silvester Stallone

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus amados pais, João e Ivânia, cujo amor, apoio e incentivo foram fundamentais em cada passo desta jornada acadêmica. Sem a sua dedicação inabalável e encorajamento constante, eu não estaria aqui hoje, realizando este sonho. Vocês são minha inspiração e a base sólida que sustenta cada conquista que alcanço.

À minha amada esposa, Carolina, agradeço por estar ao meu lado durante toda esta trajetória. Seu amor, paciência e compreensão foram essenciais para que eu pudesse me dedicar ao estudo e à pesquisa. Obrigado por ser meu porto seguro, minha fonte de motivação e por compartilhar comigo as alegrias e desafios dessa caminhada e o mais importante ser a mãe da nossa pequena Beatriz.

Agradeço também a toda minha família, que sempre esteve presente, oferecendo seu apoio incondicional e incentivando meu crescimento acadêmico. Suas palavras de encorajamento e orgulho têm sido um combustível para mim ao longo desta jornada.

Por fim, agradeço a todos aqueles que acreditaram em mim, aos amigos e colegas que me apoiaram, aos professores e mentores que me guiaram e a todos os que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica. Sem a colaboração e o suporte de cada um de vocês, este trabalho não seria possível.

Que esta dedicação expresse minha gratidão eterna e o reconhecimento pelo amor e apoio incansáveis da minha família. Vocês são o meu maior tesouro e a razão pela qual me esforço para alcançar o melhor em cada aspecto da vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1.1. Fatores de Risco.....	23
1.1.2. Aspectos Fisiopatológicos da DPOC.....	26
1.1.3. Estresse Oxidativo no DPOC:	37
1.1.4. Modelo Experimental de Enfisema Induzido por Elastase:.....	40
1.2. Poluição atmosférica.....	42
1.2.1. Padrões de Qualidade do Ar	50
1.3. Efeitos da Exposição ao Material Particulado	52
1.4. Município de Vitória.....	55
2. JUSTIFICATIVA.....	59
3. OBJETIVOS.....	60
4. MATERIAIS E MÉTODOS	62
4.1. Animais	62
4.2. Grupos Experimentais.....	62
4.3. Protocolo Enfisema Pulmonar Induzido por Elastase	64
4.4. Protocolo de Exposição Ambiental.....	65
4.5. Protocolo de Exposição no Modelo de Enfisema Pulmonar Induzido por Elastase	66
4.6. Avaliação da Mecânica Respiratória	67

4.7.	Avaliação do Fluido do Lavado Broncoalveolar (FLBA)	68
4.8.	Avaliação da Histopatologia e Imunohistoquímica	70
4.9.	Análise Morfométrica.....	72
4.10.	Análise de Imagens	73
4.11.	Medidas do Intercepto Linear Médio (Lm).....	74
4.12.	Análise do Particulado	75
4.13.	Análise Estatística.....	76
5.	RESULTADOS	77
5.1.	Avaliação da Mecânica Pulmonar (Verão)	77
5.1.1.	Resistência do Sistema Respiratório (Rrs)	78
5.1.2.	Elastância do Sistema Respiratório (Ers)	79
5.1.3.	Resistência de Vias Aéreas (Raw)	79
5.1.4.	Resistência do Tecido Pulmonar (Gtis)	80
5.1.5.	Elastância do Tecido Pulmonar (Htis).....	81
5.2.	Análise do Fluido do Lavado Broncoalveolar (FLBA).....	81
5.3.	Intercepto Linear Médio (LM)	86
5.4.	Análise Morfométrica.....	88
5.4.1.	Marcadores Inflamatórios.....	88
5.4.1.1.	Expressão celular de interleucina 1 β (IL-1 β)	89
5.4.1.2.	Expressão celular de interleucina 6 (IL-6)	92
5.4.1.3.	Expressão celular de interleucina 10 (IL-10)	95

5.4.1.4.	Expressão celular de interleucina 17 (IL-17)	97
5.4.1.5.	Expressão celular de fator de necrose tumoral (TNF- α)	100
5.4.1.6.	Elastase neutrofílica	102
5.4.2.	Remodelamento.....	105
5.4.2.1.	Expressão celular do inibidor tecidual de metaloproteinases da matriz 1 (TIMP-1)	106
5.4.2.2.	Expressão Celular da metaloproteinase 9 (MMP-9)	109
5.4.2.3.	Expressão celular da metaloproteinase 12 (MMP-12)	112
5.4.2.4.	Expressão celular do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β)	114
5.4.2.5.	Fibras colágenas	117
5.4.3.	Expressão celular de mucina 5 AC (MUC5AC) em vias aéreas	119
5.4.4.	Expressão celular de iNOS.....	122
5.4.5.	Expressão celular de fator nuclear kappa B (NF κ B)	125
5.5.	Correlação de Pearson	128
5.6.	Análise Qualitativa (Fotomicrográficas).....	128
5.7.	Resultados Parciais do Material Particulado	132
6.	DISCUSSÃO.....	134
7.	CONCLUSÃO	142
8.	REFERÊNCIAS	143

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Índice de qualidade do ar.	52
Tabela 2 - Diluição dos Marcadores.....	71
Tabela 3 – Avaliação da mecânica pulmonar no verão.....	77
Tabela 4 - Avaliação da mecânica pulmonar no inverno.....	78
Tabela 5 – Avaliação do fluido do lavado broncoalveolar no verão.....	82
Tabela 6 - Avaliação do fluido do lavado broncoalveolar no inverno.....	82
<i>Tabela 7 – Marcadores inflamatórios no verão.</i>	<i>89</i>
Tabela 8 - Marcadores inflamatórios no inverno	89
Tabela 9 – Remodelamento no verão.	105
Tabela 10 - Remodelamento no inverno.	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A fisiopatogênese do estresse oxidativo no enfisema pulmonar envolve a ação de diferentes substâncias nocivas presentes na fumaça do cigarro	40
Figura 2 - Deposito do MP no sistema respiratório de acordo com o tamanho das partículas. Adaptado de NANI et. al., 2013.....	45
Figura 3 - Exposição ao MP. Adaptado de Li, et. al., 2018	55
Figura 4 - Locais de exposição ambiental	65
Figura 5 - Protocolo de exposição ambiental no modelo de enfisema pulmonar induzido por elastase	67
Figura 6 -Contagem de células positivas no septo alveolar e vias aéreas	73
Figura 7 - Avaliação do Intercepto linear médio (μm) no verão.....	86
Figura 8 - Avaliação do Intercepto linear médio (μm) no inverno.	87
Figura 9 - Avaliação do número de células positivas para IL-1 β nos septos alveolares no verão.	90
Figura 10 - Avaliação do número de células positivas para IL-1 β nos septos alveolares no inverno.	91
Figura 11 - Avaliação do número de células positivas para IL-6 nos septos alveolares no verão.....	93
Figura 12 - Avaliação do número de células positivas para IL-6 nos septos alveolares no inverno.	94

Figura 13 - Avaliação do número de células positivas para IL-10 nos septos alveolares no verão.	95
Figura 14 - Avaliação do número de células positivas para IL-10 nos septos alveolares no inverno.	96
Figura 15 - Avaliação do número de células positivas para IL-17 nos septos alveolares no verão.	98
Figura 16 - Avaliação do número de células positivas para IL-17 no septo alveola no inverno.	99
Figura 17 - Avaliação do número de células positivas para TNF- α nos septos alveolares no verão.	100
Figura 18 - Avaliação do número de células positivas para TNF- α nos septos alveolares no inverno.	101
Figura 19 - Avaliação do número de células positivas para elastase neutrofílica nos septos alveolares no verão.	103
Figura 20 - Avaliação do número de células positivas para elastase neutrofílica nos septos alveolares no inverno.	104
Figura 21 - Avaliação do número de células positivas para TIMP-1 nos septos alveolares no verão.	107
Figura 22 - Avaliação do número de células positivas para TIMP-1 nos septos alveolares no inverno.	108
Figura 23 - Avaliação do número de células positivas para MMP-9 nos septos alveolares no verão.	110
Figura 24 - Avaliação do número de células positivas para MMP-9 nos septos alveolares no inverno.	111

Figura 25 - Avaliação do número de células positivas para MMP-12 nos septos alveolares no verão.	112
Figura 26 - Avaliação do número de células positivas para MMP-12 nos septos alveolares no inverno.	113
Figura 27 - Avaliação do número de células positivas para TGF- β nos septos alveolares no verão.	115
Figura 28 - Avaliação do número de células positivas para TGF- β nos septos alveolares no inverno.	116
Figura 29 - Avaliação do número de células positivas para fibras colágenas nos septos alveolares no verão.....	117
Figura 30 - Avaliação do número de células positivas para fibras colágenas nos septos alveolares no inverno.....	118
Figura 31 - Avaliação do número de células positivas para MUC5AC nas vias aéreas no verão.	120
Figura 32 – Avaliação do número de células positivas para MUC5AC nas vias aéreas no inverno.....	121
Figure 33 - Avaliação do número de células positivas para iNOS nos septos alveolares no verão.	123
Figura 34 - Avaliação do número de células positivas para iNOS nos septos alveolares no verão.	124
Figura 35 – Avaliação do número de células positivas para NF κ B nos septos alveolares no verão.	126
Figure 36 Avaliação do número de células positivas para NF κ B nos septos alveolares no inverno.	127

Figura 37 - Fotomicrografias representativas ilustram os processos inflamatórios, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo nos septos alveolares no verão..... 130

Figura 38 - Fotomicrografias representativas ilustram os processos inflamatórios, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo nos septos alveolares no inverno..... 131

Figure 39 - Análise do material particulad., Dados parciais cedidos pela professora Christine Bourotte..... 133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AATD	Deficiência Hereditária de Alfa-1 Anti-Tripsina
Al	Alumínio
Ca	Cálcio
Ca ²⁺	Cálcio Ionizado
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CEUA	Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais
Cl	Cloro
CLM	Cadeia Leve de Miosina
CO	Monóxido de Carbono
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
Cr	Crômio
CVF	Capacidade Vital Forçada
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos Teciduais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ELA L1	Instalações intratraqueais de elastase e exposição ambiental no local 2
ELA L2	Instalações intratraqueais de elastase e exposição ambiental no local 2
ELA	Instalações intratraqueais de elastase e mantidos no biotério

EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Ers	Elastância do Sistema Respiratório
Fe	Ferro
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
FLBA	Fluído do Lavado Broncoalveolar
GOLD	<i>Global Initiative of Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
Gtis	Resistência de Vias Aéreas Menores ou Tecido Pulmonar
H ₂ O ₂	Peroxido de Hidrogênio
HO	Hidroxila
Htis	Elastância de Tecidos Pulmonares
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina 1 beta
iNOS	Oxido Nítrico Sintases Induzida
IQAR	Índice de qualidade do Ar
LM	Intercepto Linear Médio
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MCP-1	Peptídeo Quimiotático de Monócitos
MEC	Matriz Extracelular
Mg	Magnésio
MMP	Metaloproteinase da matriz
Mn	Manganês
MP	Material Particulado
MP _{0,1}	Material Particulado <0,1 μ m
MP ₁₀	Material Particulado 10 μ m
MP _{2,5}	Material Particulado 2,5 μ m

mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
MUC5AC	Mucina 5 AC
Na	Sódio
NACHT	Domínio Central de Ligação a Nucleotídeos e Oligomerização
NaCl 0,9%	Solução Salina
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NFκB	Fator Nuclear kappa B
Ni	Níquel
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NLRs	Receptores do tipo NOD ou receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo
nNOS	Oxido Nítrico Sintases Derivada dos Neurônios
NO	Oxido Nítrico
NO ₂	Dióxido de Nitrogênio
NO _{ex}	Óxido Nítrico exalado
NOS	Óxido Nítrico Sintases
Nrf2	Fator Nuclear Tipo 2
O ₂ ⁻	Superóxido
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAHS	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
Pb	Chumbo

pH	Peroxido Orgânico
PI	Partículas Inaláveis
PIB	Produto Interno Bruto
PMN	Células Polimorfo Nucleares
PTS	Partículas Totais em Suspensão
Raw	Resistência de vias aéreas maiores
RO ₂ ⁻	Peroxil
ROR γ t	<i>Retinoic-acid-related Orphan Receptor</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Rrs	Resistência do Sistema Respiratório
S	Enxofre
SAL L1	Instilação intratraqueal com soro fisiológico estéril e exposição ambiental no local 1
SAL L2	Instilação intratraqueal com soro fisiológico estéril e exposição ambiental no local 2
SAL	Instilação intratraqueal com soro fisiológico estéril e mantido no biotério
Si	Silício
SO ₂	Dióxido de Enxofre
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento beta
Th	Células T- <i>helper</i>
TIMP1	Inibidor da Metalopeptidase 1
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Tregs	Células T reguladoras
VEF1	Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo
Zn	Zinco
α 1-AT	Alfa-1 Anti-Tripsina

RESUMO

GALLI, TT. Efeitos da exposição a poluição ambiental advinda da pelotização do minério de ferro na mecânica pulmonar, inflamação, estresse oxidativo e remodelamento da matriz extracelular em camundongos saudáveis e com enfisema pulmonar induzido por elastase. 2023. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Introdução: A exposição ambiental à poeira mineral e poluentes ambientais presente em cidades industrializadas pode ter efeitos prejudiciais em indivíduos saudáveis e especialmente aqueles com DPOC. **Objetivo:** Avaliar o impacto da exposição ambiental à poeira de metal em duas localidades diferentes em Vitória - ES, Brasil, que são centros de mineração, nos mecanismos pulmonares, inflamação, remodelamento, resposta ao estresse oxidativo em camundongos induzidos com elastase e seus controles e comparar com os animais mantidos no biotério de São Paulo - SP. **Materiais e Métodos:** O estudo utilizou 72 camundongos machos da linhagem C57Bl/6, divididos em 6 grupos: controle não exposto (SAL), não exposto e que receberam elastase (ELA), exposto ao pó de metal em uma empresa de mineração (SAL L1 e ELA L1) e exposto a uma localidade a 5 km de distância da empresa de mineração (SAL-L2 e ELA-L2) durante quatro semanas, no inverno e no verão. No 29º dia do protocolo, foram avaliados a mecânica pulmonar, o fluido do lavado broncoalveolar (FLBA), a inflamação, o remodelamento, o estresse oxidativo e as alterações no septo alveolar (intercepto linear médio - Lm). **Resultados:** ELA, ELA L1 e ELA L2 apresentaram um aumento em Lm em comparação com os grupos SAL ($p < 0,05$). Houve um aumento no número total de células e macrófagos em ELA L1 e ELA L2 em comparação com os outros grupos ($p < 0,05$). Os grupos expostos (ELA L1, ELA L2, SAL L1 e SAL L2) apresentaram aumento na expressão celular de marcadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e neutrófilos) ($p < 0,05$), marcadores de remodelamento (TIMP-1, MMP-9, MMP-12, TGF- β , fibras colágenas e MUC5AC), estresse oxidativo (iNOS) e mecanismos envolvidos (NF κ B) em comparação com ELA e SAL ($p < 0,05$). Embora não tenham sido observadas diferenças nas medidas de mecânica pulmonar entre os grupos, houve correlações baixas a moderadas desses parâmetros (elastância e resistência do tecido pulmonar) aos marcadores avaliados ($p < 0,05$). **Conclusão:** Com exceção das medidas a mecânica pulmonar, a exposição ambiental ao pó de ferro e poluentes ambientais contribuiu para o agravamento da inflamação, remodelamento e resposta ao estresse oxidativo pulmonar em camundongos expostos, com e sem enfisema. Os mecanismos envolvidos dependem da ativação de iNOS e NF κ B.

Palavras-Chave: Doença pulmonar obstrutiva crônica. Poluição ambiental. Estresse oxidativo. Inflamação. Remodelamento. Modelos animais.

ABSTRACT

GALLI, TT. Effects of environmental pollution derived from iron ore pelletization on lung mechanics, inflammation, oxidative stress, and extracellular matrix remodeling in healthy mice and mice with elastase-induced pulmonary emphysema. 2023. Thesis (Doctorate in Medical Sciences) - Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

Introduction: Environmental exposure to mineral dust and environmental pollutants present in industrialized cities can have detrimental effects on healthy individuals, particularly those with COPD. **Objective:** To evaluate the impact of environmental exposure to metal dust in two different locations in Vitória - ES, Brazil, which are mining centers, on lung mechanisms, inflammation, remodeling, oxidative stress response in elastase-induced mice and their controls, and compare them with animals kept in the São Paulo - SP animal facility. **Materials and Methods:** The study used 72 male C57Bl/6 mice, divided into 6 groups: non-exposed control (SAL), non-exposed and elastase-treated (ELA), exposed to metal dust in a mining company (SAL L1 and ELA L1), and exposed to a location 5 km away from the mining company (SAL L2 and ELA L2) for four weeks, in winter and summer. On the 29th day of the protocol, lung mechanics, bronchoalveolar lavage fluid (BALF), inflammation, remodeling, oxidative stress, and alveolar septal changes (mean linear intercept - Lm) were evaluated. **Results:** ELA, ELA L1, and ELA L2 showed an increase in Lm compared to SAL groups ($p < 0.05$). There was an increase in total cell number and macrophages in ELA L1 and ELA L2 compared to the other groups ($p < 0.05$). The exposed groups (ELA L1, ELA L2, SAL L1, and SAL L2) showed increased cellular expression of inflammatory markers (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , and neutrophils) ($p < 0.05$), remodeling markers (TIMP-1, MMP-9, MMP-12, TGF- β , collagen fibers and MUC5AC), oxidative stress (iNOS), and involved mechanisms (NF κ B) compared to ELA and SAL ($p < 0.05$). Although no differences were observed in lung mechanics measurements among the groups, there were low to moderate correlations of these parameters (lung tissue elastance and resistance) with the evaluated markers ($p < 0.05$). **Conclusion:** Except for lung mechanics measurements, environmental exposure to iron dust and environmental pollutants contributed to the worsening of lung inflammation, remodeling, and oxidative stress response in exposed mice, with and without emphysema. The involved mechanisms depend on iNOS and NF κ B activation.

Keywords: Chronic obstructive pulmonary disease. Environmental pollution. Oxidative stress. Inflammation. Remodeling. Animal models

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC):

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma condição pulmonar heterogênea caracterizada por sintomas respiratórios crônicos (dispneia, tosse, produção de escarro e/ou exacerbações) devido a anormalidades das vias aéreas (bronquite, bronquiolite) e/ou dos alvéolos (enfisema) que causam obstrução persistente, frequentemente progressiva, do fluxo de ar. (GOLD, 2023). O tabagismo é amplamente reconhecido como o principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC, aumentando significativamente o risco de morte relacionada à doença. Estima-se que entre 15% e 25% dos fumantes desenvolvam a DPOC, e o tabagismo é responsável por até 80% dos casos de DPOC. No entanto, é importante ressaltar que, mesmo entre os fumantes com a mesma carga tabágica, existem diferenças individuais que influenciam o risco de desenvolver a doença. Além disso, a apresentação clínica da DPOC pode variar de pessoa para pessoa, dependendo da interação complexa entre fatores individuais e ambientais (GOLD 2023).

A DPOC é frequentemente relacionada ao tabagismo, sendo esta a principal causa da doença. No entanto, é importante reconhecer que existem outros fatores, como genéticos e exposição a poluentes ambientais e mecanismos pé existentes que podem contribuir para o desenvolvimento e apresentação clínica da DPOC. Para abordar essa diversidade, foi proposta uma taxonomia (classificação) da DPOC, que busca explorar e compreender as diferentes etiologias da doença. Essa abordagem visa expandir o conhecimento e direcionar estudos específicos para os diferentes tipos de DPOC, além do tabagismo. (GOLD 2023).

Na situação clínica apropriada, a confirmação do diagnóstico de DPOC ocorre quando há presença de limitação não completamente reversível do fluxo de ar ($VEF1/CVF < 0,7$ após broncodilatação) medida por meio de espirometria. No entanto, alguns indivíduos podem apresentar alterações estruturais nos pulmões (como o enfisema) e/ou anormalidades fisiológicas (incluindo VEF1 ligeiramente reduzido, retenção de gases, hiperinsuflação, capacidade de difusão pulmonar reduzida e/ou declínio rápido do VEF1) sem apresentar obstrução do fluxo de ar ($VEF1/CVF \geq 0,7$ após broncodilatação). Esses indivíduos são categorizados como "Pré-DPOC", podendo (ou não) desenvolver obstrução persistente do fluxo de ar (ou seja, DPOC) ao longo do tempo. (GOLD 2023).

A DPOC é uma das principais enfermidades que contribui para a morbidade e mortalidade em escala global. Segundo dados do *Global Burden of Disease Study 2019*, mencionados pela *Global Initiative of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD)*, estima-se que aproximadamente 384 milhões de indivíduos tenham sido afetados pela DPOC em 2020.

O impacto da DPOC na saúde pública é evidente ao considerar sua relação com o número de óbitos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016, a DPOC foi responsável por cerca de 3,04 milhões de mortes, correspondendo a 5,3% de todas as causas de óbito registradas naquele ano (OMS, 2018a).

Observa-se uma tendência crescente na incidência da DPOC, especialmente em populações mais idosas. Enquanto no ano 2000 a DPOC ocupava a quarta posição entre as principais causas de mortalidade no mundo, atualmente ela já se encontra no terceiro lugar (OMS, 2018b).

Projeções indicam que a DPOC continuará exercendo um impacto significativo em termos de morbidade e mortalidade no futuro. Estima-se que até 2030, a doença será responsável por mais de 4,5 milhões de óbitos anuais em todo o mundo, mantendo-se como a terceira maior causa de morte globalmente (OMS, 2018b).

A DPOC não apenas afeta os pulmões, mas também tem consequências significativas em todo o sistema do organismo. O processo inflamatório crônico resulta em alterações nos brônquios (bronquite crônica), bronquíolos (bronquite obstrutiva) e tecido pulmonar (enfisema pulmonar). A extensão dessas alterações varia de indivíduo para indivíduo e está relacionada aos sintomas apresentados (GOLD, 2023).

A gravidade da obstrução do fluxo de ar pode ser determinada pela avaliação da redução do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), e os estágios da DPOC são baseados no VEF1 após a administração de broncodilatador. Além do VEF1 ser um parâmetro espirométrico fundamental para diagnóstico e classificação da gravidade, ele possui importância prognóstica. Sabe-se que o declínio acelerado da VEF1 se associa ao aumento da mortalidade em DPOC (GOLD 2023).

Pacientes com enfisema pulmonar avançado geralmente apresentam características como magreza, respiração acelerada (taquipneia), formato de tórax em barril, som de timpanismo à percussão e utilização dos músculos acessórios da respiração. Em contraste, aqueles com predominância de bronquite crônica tendem a ter tendência à obesidade, sintomas de falta de ar (dispneia), sendo a dispneia o principal determinante da morbidade destes pacientes, cianose e sinais de insuficiência cardíaca direita (FRIEDMAN, 2008)

1.1.1. Fatores de Risco

A DPOC é uma condição multifatorial que envolve diversos elementos. Embora o hábito de fumar seja amplamente reconhecido como o principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC, com a maioria dos pacientes sendo fumantes ativos ou ex-fumantes, existem evidências indicando que fatores

intrínsecos individuais desempenham um papel significativo na suscetibilidade e progressão da doença (GOLD 2023).

Estudos revelam que apenas cerca de 15 a 25% dos indivíduos fumantes desenvolvem DPOC, o que sugere a existência de fatores genéticos e epigenéticos que podem potencializar a resposta inflamatória resultante da exposição crônica à fumaça do cigarro (GOLD 2023). Além do tabagismo, outros fatores ambientais também estão associados à DPOC, como a exposição à poluição atmosférica, poeiras e gases nocivos no ambiente de trabalho, inalação de fumaça proveniente da queima de biomassa e até mesmo o tabagismo passivo

Entre as causas genéticas da DPOC, a deficiência hereditária de Alfa-1 Anti-Tripsina (α 1-AT) é a mais bem documentada. A α 1-AT é uma proteína produzida no fígado e desempenha um papel fundamental na proteção dos tecidos pulmonares contra danos causados por enzimas proteolíticas, como a elastase. Os indivíduos com deficiência de α 1-AT têm níveis reduzidos dessa proteína, o que os torna mais suscetíveis à destruição dos tecidos pulmonares e ao desenvolvimento precoce e acelerado de enfisema (STOLLER; ABOUSSOUAN, 2005). É importante ressaltar que a deficiência de α 1-AT aumenta significativamente o risco de desenvolver DPOC quando associada ao tabagismo e a outras exposições ambientais (HERSH *et al.*, 2011).

Essa interação entre fatores genéticos e ambientais pode desencadear uma resposta inflamatória exacerbada nos pulmões, levando à progressão da doença. Estudos demonstraram um aumento significativo do risco familiar de obstrução do fluxo de ar em pessoas que fumam e têm irmãos com DPOC grave, sugerindo uma possível influência genética (em combinação com fatores ambientais) nessa suscetibilidade. Uma das principais causas genéticas documentadas para a DPOC é a deficiência hereditária de Alfa-1 Anti-Tripsina (AATD), resultante de mutações no gene SERPINA1. Essa deficiência afeta apenas uma pequena parte da população mundial, mas demonstra a interação complexa entre os genes e as exposições ambientais que podem predispor um indivíduo à DPOC. Estudos realizados em populações europeias identificaram

genótipos AATD PiZZ em cerca de 0,12% dos pacientes com DPOC, com variação entre 0,08% e 0,24%. A prevalência desses genótipos varia de 1 em 408 pessoas no norte da Europa a 1 em 1.274 pessoas no leste da Europa (GOLD 2023).

O uso de cigarros eletrônicos, também conhecidos como *vaping*, tornou-se uma prática popular nas últimas décadas, especialmente entre os jovens. Embora inicialmente promovidos como uma alternativa mais segura aos cigarros convencionais, há preocupações crescentes sobre os potenciais efeitos prejudiciais à saúde associados ao uso de cigarros eletrônicos (FARSALINOS *et al.*, 2016).

Embora a pesquisa sobre os efeitos dos cigarros eletrônicos na saúde pulmonar ainda seja limitada e em evolução, estudos recentes sugerem que o uso desses dispositivos pode aumentar o risco de desenvolvimento de doenças pulmonares, incluindo a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (XIE *et al.*, 2020).

Um estudo de revisão publicado no *International Journal of Environmental Research and Public Health* em 2019 analisou a literatura existente sobre os efeitos dos cigarros eletrônicos na saúde pulmonar. Os autores concluíram que o uso de cigarros eletrônicos está associado a efeitos prejudiciais nos pulmões, incluindo inflamação pulmonar, estresse oxidativo e disfunção das vias aéreas, que são fatores de risco importantes para o desenvolvimento de DPOC (JANKOWSKI *et al.*, 2019).

Portanto, a DPOC é uma condição multifatorial em que o tabagismo, fatores genéticos, exposições ambientais e interações complexas desempenham um papel importante. O entendimento desses diferentes aspectos é fundamental para o diagnóstico precoce, o manejo adequado e o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes para essa doença respiratória debilitante.

1.1.2. Aspectos Fisiopatológicos da DPOC

As modificações histopatológicas nos pulmões levam a alterações fisiológicas características da DPOC, que englobam o aumento da produção de muco, disfunção dos cílios respiratórios, restrição do fluxo de ar, hiperinsuflação pulmonar, comprometimento das trocas gasosas e hipertensão pulmonar (AGUSTI *et al.*, 2013).

A DPOC é caracterizada por mudanças histopatológicas que afetam as vias aéreas centrais, periféricas, tecido pulmonar e circulação pulmonar. O processo inflamatório crônico nas vias aéreas desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da doença (MIRZA *et al.*, 2018). Essa inflamação persistente desencadeia alterações estruturais e estreitamento do lúmen das vias aéreas. Além disso, ocorre destruição do tecido pulmonar, levando à perda de conexões alveolares nas vias aéreas menores e redução da elasticidade pulmonar. Essas alterações comprometem a capacidade das vias aéreas de se manterem abertas durante a expiração (BARNES, 2014; MIRZA *et al.*, 2018).

Além das mudanças histopatológicas, a DPOC também provoca importantes alterações fisiológicas no sistema respiratório. A limitação do fluxo de ar resultante do estreitamento das vias aéreas e da perda de elasticidade pulmonar leva a uma redução da capacidade de ventilação pulmonar. Isso resulta em dispneia (falta de ar) e dificuldade em realizar atividades físicas. Além disso, a redução da capacidade de difusão do oxigênio nos pulmões prejudica a oxigenação adequada do sangue, contribuindo para a hipoxemia (baixos níveis de oxigênio no sangue) (BARNES, 2014; MIRZA *et al.*, 2018)

Observa-se um aumento significativo na quantidade de glândulas secretoras de muco e células caliciformes nas vias aéreas. Essa hipersecreção de muco está intimamente relacionada a processos inflamatórios crônicos que ocorrem nas regiões periféricas, como os pequenos brônquios e bronquíolos com diâmetro interno inferior a 2 mm (TANABE *et al.*, 2018). Essa inflamação

persistente desencadeia ciclos repetidos de lesão e reparação da parede das vias aéreas, resultando em um processo de remodelamento estrutural. Durante o processo de reparação, ocorre um aumento na deposição de colágeno e formação de tecido cicatricial nas vias aéreas. Esse remodelamento progressivo leva ao estreitamento do lúmen e, conseqüentemente, à obstrução crônica das vias aéreas (TANABE *et al.*, 2018). Essa obstrução persistente compromete a função respiratória e contribui para a progressão de doenças respiratórias crônicas, como a asma, DPOC e as alterações estruturais e funcionais das vias aéreas são resultado da interação complexa entre processos inflamatórios, estresse oxidativo e disfunção celular. Estudos têm demonstrado que radicais livres originados do estresse oxidativo podem ativar fatores de transcrição, como o fator nuclear KappaB (NFκB), que amplificam a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória e no remodelamento das vias aéreas (TANABE *et al.*, 2018).

A deterioração do tecido pulmonar em indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é frequentemente caracterizada pelo enfisema centrolobular, uma condição na qual ocorre a dilatação e destruição dos bronquíolos respiratórios (HOGG; TIMENS, 2009). Essas alterações histopatológicas são mais prevalentes nas regiões superiores do pulmão. No entanto, em estágios avançados da doença, elas podem se estender de forma difusa por todo o pulmão, resultando também na destruição do leito capilar pulmonar, essas mudanças estruturais no tecido pulmonar têm um impacto significativo na função respiratória dos indivíduos afetados pela DPOC. A destruição dos bronquíolos respiratórios compromete a capacidade do pulmão de realizar trocas gasosas eficientes, resultando em sintomas como falta de ar, tosse crônica e produção de muco excessivo. Além disso, a perda do leito capilar pulmonar contribui para a hipertensão arterial pulmonar, uma complicação comum da DPOC (HOGG; TIMENS, 2009).

As modificações vasculares pulmonares relacionadas à DPOC são caracterizadas pelo aumento da espessura da parede dos vasos, que ocorre desde as fases iniciais da doença. Esse espessamento é a primeira alteração

estrutural observada, seguida pelo aumento da musculatura lisa e pela infiltração da parede vascular (GOLD, 2023). À medida que a DPOC progride, a parede dos vasos torna-se cada vez mais espessa, com acúmulo de músculo liso, proteoglicanos e colágeno (GOLD, 2023).

Essas mudanças histopatológicas nos pulmões e no sistema vascular desempenham um papel crucial na progressão da DPOC e na deterioração da função respiratória. A destruição dos bronquíolos respiratórios compromete a capacidade de troca de gases nos pulmões, enquanto o espessamento da parede vascular interfere no fluxo sanguíneo adequado nos pulmões. Compreender a complexidade dessas alterações é essencial para a detecção precoce, o tratamento adequado e a gestão eficaz da DPOC, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados (GOLD, 2023).

A exposição crônica a substâncias tóxicas, principalmente o tabagismo, é o principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC. Estudos têm demonstrado que a exposição a partículas presentes na fumaça do cigarro desencadeia uma resposta inflamatória nos pulmões, envolvendo a ativação de células inflamatórias, liberação de mediadores inflamatórios e remodelamento dos tecidos pulmonares (BARNES, 2016).

A inflamação crônica nos pulmões da DPOC é caracterizada pela presença de células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos, nas vias aéreas e nos espaços alveolares. Essas células liberam mediadores inflamatórios, como citocinas (interleucina-8, interleucina-6, fator de necrose tumoral alfa) e proteases, que contribuem para a destruição do tecido pulmonar e a obstrução das vias aéreas (BARNES, 2014).

Na DPOC, a ativação do inflamossoma tem sido observada em células inflamatórias presentes nos pulmões, como macrófagos e células epiteliais brônquicas. Essa ativação ocorre em resposta a estímulos oxidativos, como a exposição à fumaça do cigarro e a partículas nocivas presentes no ar ambiente (FU *et al.*, 2022).

Estudos têm demonstrado que a ativação do inflamossoma está associada à inflamação crônica e ao dano tecidual observados na DPOC. A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina (IL-18), pode contribuir para a perpetuação da resposta inflamatória, o remodelamento das vias aéreas e a destruição dos tecidos pulmonares (FU *et al.*, 2022; ZHANG, Jie *et al.*, 2021).

Além disso, evidências indicam que a ativação do inflamossoma pode desencadear respostas de morte celular programada, como a apoptose e a piroptose, contribuindo para o declínio da função pulmonar observado na DPOC (ZHEN, Yu; ZHANG, 2019).

O complexo inflamassoma caspase-1 têm papel essencial na inflamação neutrofílica pulmonar associada à fumaça do cigarro (ELTOM *et al.*, 2014). Os inflamassomas são complexos proteicos encontrados no citoplasma das células, que desencadeiam a ativação de caspases pró-inflamatórias, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias (KELLEY *et al.*, 2019).

Muitas citocinas pró-inflamatórias são produzidas pelo sistema imunológico inato, que desempenha um papel crucial na defesa inicial contra patógenos e substâncias irritantes nos pulmões. Células-chave desse sistema, como macrófagos alveolares e células epiteliais das vias aéreas, reconhecem agentes agressores e liberam citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-8 (IL-8), para recrutar outras células imunes e iniciar a resposta inflamatória (BARNES, 2016; KELLEY *et al.*, 2019)

O sistema imunológico inato é ativado por receptores celulares que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e danos teciduais (DAMPs) gerados durante a lesão. Entre esses receptores, destacam-se os receptores do tipo *Toll* (TLRs) e os receptores do tipo NOD ou receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NLRs), que possuem sequências repetidas de aminoácidos de leucina (KUMAGAI; AKIRA, 2010; SCHATTEGEN; FITZGERALD, 2011). Enquanto os TLRs são geralmente expressos na membrana celular, os NLRs atuam como sensores

citoplasmáticos, monitorando os compartimentos intracelulares em busca de sinais de infecção ou lesão tecidual (KUMAGAI; AKIRA, 2010).

Por meio desses receptores, as células podem regular a fagocitose, a atividade microbicida, a produção de citocinas e a diferenciação das células *cluster of differentiation* (CD), estabelecendo uma conexão essencial entre a imunidade inata e adaptativa (SILVA *et al.*, 2010). Essa interação permite uma resposta imune coordenada e eficiente contra agentes patogênicos e lesões teciduais, contribuindo para a homeostase e a proteção pulmonar.

O complexo inflamassoma é composto por receptores citosólicos do tipo NLRs (reconhecimento de padrões moleculares), os quais possuem um domínio central de ligação a nucleotídeos e oligomerização (NACHT). Esses receptores são uma família de proteínas, codificadas por 22 genes em humanos, e estão divididos em três subfamílias: NOD (NOD1, NOD2, NOD3/NLRC3, NOD4/NLRC5, NOD5/NLRX1, CIITA), NLRPs (NLRP1 ao 14) e IPAF (NLRC4 e NAIP) (BIASIZZO; KOPITAR-JERALA, 2020). Cada um desses receptores possui três regiões funcionais distintas: uma região NOD de regulação na posição central, uma região efetora N-terminal envolvida na sinalização (contendo domínio PYD, CARD ou BIR) e uma região C-terminal composta por repetições ricas em leucina (DAVIS; WEN; TING, 2011).

Dentre os inflamassomas, o inflamassoma NLRP3 tem recebido maior atenção de estudos e desempenha um papel fundamental nas defesas imunológicas do organismo contra infecções bacterianas, fúngicas e virais. No entanto, também tem sido associado à patogênese de diversas doenças inflamatórias, como a doença de Alzheimer, diabetes, gota, doenças autoinflamatórias e aterosclerose (KELLEY *et al.*, 2019). A ativação do inflamassoma NLRP3 requer várias etapas: o primeiro sinal é mediado por TLRs ou receptores de citocinas pró-inflamatórias, que desencadeiam a formação dos receptores NLRP3 (receptor do tipo NOD com domínio pirina 3); em seguida, ocorre o segundo sinal ou sinal de ativação, mediado por vários estímulos PAMP ou DAMP, promovendo a oligomerização do NLRP3 e o recrutamento de ASC e pró-caspase-1, resultando na ativação do complexo

inflamassoma NLRP3. Essa ativação é crucial para a maturação da IL-1 β , uma importante citocina pró-inflamatória (KELLEY *et al.*, 2019; ZHEN, Y; ZHANG, 2019).

Na DPOC, a inflamação pulmonar é uma característica proeminente, manifestando-se pelo aumento de macrófagos, neutrófilos ativados e células T helper (Th) 1 e Th17 (BARNES, 2016). Essas células, juntamente com as células epiteliais e outras células estruturais do pulmão, desencadeiam a liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (BARNES, 2016).

Esses mediadores inflamatórios têm um papel crucial no recrutamento e ativação de mais células inflamatórias da circulação para o tecido pulmonar, amplificando o processo inflamatório (BARNES, 2014). Além disso, eles contribuem para a indução de alterações estruturais no pulmão, como o remodelamento dos brônquios e a destruição dos alvéolos (BARNES, 2014). Essas alterações estruturais resultam em uma obstrução crônica das vias aéreas e comprometimento da função pulmonar.

É importante ressaltar que a inflamação pulmonar persiste mesmo após anos de cessação do tabagismo, o que sugere a presença de mecanismos patológicos contínuos e independentes do tabaco na progressão da DPOC (BARNES, 2016). Isso ressalta a importância de abordagens terapêuticas que visem não apenas a cessação do tabagismo, mas também o controle da inflamação crônica e das suas consequências estruturais no pulmão.

Os macrófagos são estimulados pela fumaça proveniente de cigarros e liberam mediadores inflamatórios, que desempenham um papel crucial na lesão dos pulmões. Esses mediadores inflamatórios incluem o TNF- α , a IL-8, o peptídeo quimiotático de monócitos (MCP-1), o leucotrieno B4 (LTB4) e as espécies reativas de oxigênio. Essas substâncias atuam como efetores inflamatórios, vinculando o ato de fumar ao processo inflamatório observado na DPOC. Além disso, os macrófagos alveolares secretam enzimas elastolíticas, como as metaloproteinase da matriz (MMP-2, MMP-9, MMP-12), catepsinas K,

L e S. A regulação dessas proteínas inflamatórias na DPOC é principalmente controlada pelo NF κ B, que é ativado em macrófagos alveolares de pacientes com DPOC, especialmente durante episódios de exacerbação (SIERRA-VARGAS *et al.*, 2023; TO *et al.*, 2013).

Durante o processo inflamatório, observa-se um aumento de linfócitos T CD4 (T helper) e CD8 (citotóxicos) nas vias aéreas e no tecido pulmonar, indicando uma correlação entre a quantidade de linfócitos T e as áreas de enfisema pulmonar (OSOATA *et al.*, 2009).

Os linfócitos T CD4 têm a capacidade de se diferenciar em células Th1, Th2, Th17 ou células T reguladoras (Tregs), dependendo dos sinais das citocinas presentes no ambiente celular (WANG; YING; WANG; GU *et al.*, 2015). Cada subtipo celular possui fatores de transcrição distintos, receptores de membrana específicos e produção de citocinas particulares (BRUSSELLE; JOOS; BRACKE, 2011).

Em pacientes com enfisema, os linfócitos CD4⁺ Th1 secretam quantidades elevadas de interferon gama (IFN- γ), o que contribui para o acúmulo de células inflamatórias nos pulmões (BARNES, 2014, 2016). A expressão elevada de citocinas associadas à resposta Th1, especialmente do TNF- α , durante os episódios de exacerbação da DPOC, está relacionada a um prognóstico desfavorável devido ao papel dessas citocinas na promoção da resposta inflamatória, produção de muco e deterioração do tecido pulmonar (YU *et al.*, 2020). A diferenciação das células Th1 e a produção de IFN- γ são principalmente reguladas pelo fator de transcrição T-bet nas células T (ZHANG, Y; GU; SUN, 2014).

As células T-helper (Th)17 são conhecidas por produzirem interleucina 17A (IL-17A), interleucina 17F (IL-17F) e interleucina 22 (IL-22) (PARK; LEE, 2010). Essas citocinas também podem ser liberadas por outros tipos de células, como neutrófilos, eosinófilos, células T CD8⁺, basófilos e mastócitos, além do subtipo Th17 (PARK; LEE, 2010). Estudos recentes têm revelado o papel significativo da IL-17A, que é o principal produto das células Th17, na

regulação da expressão de mediadores inflamatórios e no recrutamento de células inflamatórias em diversas doenças inflamatórias (PARK; LEE, 2010). Especificamente na DPOC, as células Th17 têm sido identificadas como predominantemente presentes na mucosa brônquica, onde desempenham um papel importante na resposta inflamatória crônica (REN; LI, 2017).

Essas células Th17 são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição ROR γ t (*retinoic-acid-related orphan receptor*), que serve como um marcador específico desse subtipo celular (REN; LI, 2017). Sua presença na mucosa brônquica sugere sua contribuição para a perpetuação da inflamação crônica observada na DPOC.

As células T reguladoras (Tregs) exercem um papel crucial no controle do processo inflamatório, suprimindo a atividade das células T efetoras. Através da secreção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 10 (IL-10) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), as Tregs modulam a resposta imunológica e mantêm a homeostase do sistema imunológico. Enquanto as células Th17 produzem citocinas pró-inflamatórias, as Tregs atuam para evitar respostas imunes excessivas ou inadequadas. A IL-10 inibe a ativação de células imunes e a produção de mediadores inflamatórios, enquanto o TGF- β regula a diferenciação e função das células T. Em doenças como a DPOC, a disfunção ou diminuição das Tregs pode levar a uma resposta inflamatória exacerbada e agravamento da patologia pulmonar. Portanto, o equilíbrio entre as células Th17 pró-inflamatórias e as Tregs anti-inflamatórias desempenha um papel fundamental na modulação do processo inflamatório na DPOC, sendo essencial para prevenir o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas. (JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKY, 2012).

Diversos estímulos mecânicos têm o potencial de recrutar neutrófilos na DPOC. Entre eles, podemos mencionar o leucotrieno B4 (LTB4), a interleucina 8 (IL-8) e quimiocinas CXC relacionadas, como CXCL1 e CXCL8, GRO- α (oncogene-a relacionado ao crescimento) e ENA-78 (peptídeo epitelial ativador de neutrófilos). Esses mediadores são encontrados em níveis elevados nas vias aéreas de pacientes com DPOC (TRAVES, 2002). Embora os macrófagos

alveolares e as células epiteliais possam ser fontes desses mediadores, os neutrófilos também desempenham um papel importante na produção de IL-8 (TRAVES, 2002).

O remodelamento brônquico na DPOC é caracterizado pelo acúmulo de proteínas da matriz extracelular nas vias aéreas, resultando em fibrose subepitelial, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, bem como hiperplasia das glândulas submucosas. Essas alterações levam ao espessamento da parede brônquica e diminuição do calibre brônquico. Estudos em pacientes com bronquite e em modelos experimentais também têm observado essas alterações, indicando que o remodelamento brônquico está associado à liberação de vários fatores inflamatórios, de crescimento celular e citocinas (MORAES-FERREIRA *et al.*, 2022). Assim, compreender melhor a fisiopatologia da DPOC e buscar tratamentos adequados são estratégias importantes na prevenção da doença.

É amplamente aceito que as proteinases desempenham um papel na fisiopatologia do enfisema (CHURG; COSIO; WRIGHT, 2008). No entanto, ainda existem debates sobre quais são as principais proteinases e suas funções específicas no desenvolvimento e progressão do enfisema. Alguns pesquisadores sugerem que as proteinases das classes serina, cisteína e metalo são provavelmente as mais envolvidas na patogênese da DPOC (CHURG; COSIO; WRIGHT, 2008; SHAPIRO *et al.*, 2003)

A elastase neutrofílica, proteinase 3 e catepsina G são exemplos de serinoproteinases armazenadas em células polimorfo nucleares (PMN) e monócitos, sendo liberadas durante a desgranulação induzida por mediadores pró-inflamatórios. Essas enzimas podem causar a destruição do tecido pulmonar e a produção de muco (ALMEIDA-REIS *et al.*, 2017; THEODORO-JÚNIOR *et al.*, 2017). As cisteino-proteinases, como catepsinas S, B e L, e as serino-proteinases, como a elastase, contribuem para a degradação da matriz extracelular, com participação dos macrófagos. As metaloproteinases, como MMP1, 2, 9, 14 e ADAM, além de promoverem a degradação do colágeno e

elastina, também aumentam a expressão epitelial de MUC5 (ALMEIDA-REIS *et al.*, 2017; THEODORO-JÚNIOR *et al.*, 2017).

As metaloproteinases (MMPs) são um grupo de mais de 20 enzimas proteolíticas estruturais e funcionais que desempenham um papel essencial no remodelamento e reparação dos tecidos (CHENG; YU; YANG, 2009). No contexto pulmonar, acredita-se que essas enzimas desempenham um papel importante na degradação da elastina e, quando associadas ao tabaco, são mediadoras significativas no desenvolvimento do enfisema. Essa crença é baseada no aumento observado das MMPs no lavado broncoalveolar de fumantes com enfisema em comparação com não fumantes (CHURG; WRIGHT, 2005).

No enfisema, a degradação da matriz é impulsionada pela elastase neutrofílica e pela MMP12, que é induzida pelo tabaco e resulta em uma migração acentuada de monócitos para o pulmão. Além disso, acredita-se que a MMP12 possa desempenhar tanto um papel sinalizador quanto um papel direto na destruição da matriz pulmonar (CHURG; WRIGHT, 2005). Experimentos realizados em ratos expostos ao fumo do tabaco e com depleção de MMP12 confirmaram essa ideia, uma vez que esses ratos não desenvolveram enfisema. Esses dados levam à conclusão de que a inibição das MMPs pode impedir total ou parcialmente o desenvolvimento do enfisema (CHURG; COSIO; WRIGHT, 2008).

Estudos também demonstraram que o tipo específico de MMP ausente é importante para determinar o grau de proteção contra o desenvolvimento da doença. Por exemplo, a ausência de MMP12 oferece proteção em 100% dos casos, enquanto a ausência de MMP9 não proporciona a mesma proteção. É interessante observar também que estudos em cultura de macrófagos alveolares humanos têm mostrado que a MMP9 é a principal MMP mediadora do enfisema em humanos, enquanto a MMP12 desempenha um papel mais limitado (CHURG; COSIO; WRIGHT, 2008; MANNINO; BUIST, 2007).

Apesar desses dados promissores, o mesmo estudo demonstrou que, em uma exposição aguda ao tabaco, a presença de MMP-12 é necessária para que o tabaco induza a neutrofilia, e os neutrófilos são necessários para a degradação da matriz. No entanto, em uma exposição crônica (>6 meses), mesmo quando a MMP-12 está inibida, o lavado broncoalveolar apresenta níveis de neutrófilos semelhantes aos observados em animais não expostos, sugerindo que os mecanismos pró-inflamatórios mudam ao longo do tempo (CHURG; COSIO; WRIGHT, 2008). Também foi relatado um aumento da expressão não apenas da MMP-9, mas também da MMP-1 em fumantes com obstrução das vias aéreas em comparação com fumantes sem DPOC e não fumantes (CHENG; YU; YANG, 2009). Outra MMP que tem sido associada à DPOC é a MMP-13, que é expressa principalmente em macrófagos alveolares e no epitélio brônquico. Considerando que os macrófagos alveolares são elementos importantes nos processos inflamatórios da DPOC, liberando mediadores como TNF- α , IL-8 e leucotrienos B₄, que promovem a inflamação neutrofílica, o aumento da MMP-13 nessa patologia indica um papel significativo desse elemento na origem da doença (LEE *et al.*, 2009).

É um fato estabelecido que a interação entre macrófagos e neutrófilos é essencial para a degradação do tecido conjuntivo em um modelo agudo de exposição ao tabaco (SHAPIRO *et al.*, 2003). Pacientes com deficiência de α -1 antitripsina, um inibidor da protease neutrofílica, têm maior propensão à destruição do parênquima pulmonar (BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003). Essa associação foi inicialmente observada há 50 anos, quando cientistas relataram que pacientes com deficiência de α -1 antitripsina desenvolviam enfisema em idade precoce (LAURELL; ERIKSSON, 2013).

Posteriormente, pesquisadores conseguiram induzir enfisema em animais experimentais por meio da instilação de enzimas nas vias respiratórias, incluindo a elastase derivada de neutrófilos humanos. Verificou-se que a atividade da elastase é a principal causa provável da destruição do tecido no enfisema. Evidências em modelos animais demonstraram que camundongos geneticamente modificados, que possuem deficiência de elastase neutrofílica,

não desenvolveram enfisema após exposição à fumaça do tabaco (SHAPIRO *et al.*, 2003).

1.1.3. Estresse Oxidativo no DPOC:

O desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do organismo é responsável pelo fenômeno conhecido como estresse oxidativo. As EROs incluem radicais livres, como o $\text{OH}\cdot$ e o $\text{O}_2\cdot^-$, e espécies reativas não radicais, como o H_2O_2 e o $\text{ONOO}\cdot^-$. Essas substâncias podem causar danos às células pulmonares e desencadear respostas inflamatórias. O conceito de estresse oxidativo engloba todas as alterações funcionais e estruturais ocasionadas pelas ROS. Estudos evidenciam que marcadores de estresse oxidativo estão elevados em indivíduos com DPOC quando comparados a indivíduos saudáveis. Essas alterações são mais pronunciadas nos pulmões de pacientes com DPOC, onde as EROs são produzidas principalmente por células inflamatórias em resposta à exposição crônica a fatores prejudiciais, como a fumaça do cigarro e poluentes ambientais. Em indivíduos com DPOC, há um aumento nos marcadores de estresse oxidativo em comparação com controles saudáveis da mesma faixa etária, gênero e hábito de fumar (FARINA *et al.*, 2011).

O estresse oxidativo desempenha um papel crucial no avanço da DPOC, resultando em danos a proteínas, lipídios e DNA das células pulmonares. Esses danos podem levar à disfunção celular, morte celular programada e desequilíbrio no funcionamento normal dos tecidos pulmonares. Além disso, o estresse oxidativo está relacionado ao desenvolvimento de respostas inflamatórias crônicas nos pulmões, contribuindo para a progressão da doença. Pesquisas têm evidenciado que mudanças semelhantes às observadas nos pulmões, como estresse oxidativo e inflamação, estão envolvidas nos mecanismos subjacentes aos efeitos sistêmicos da DPOC (LIN; THOMAS,

2010). As proteínas pulmonares danificadas pelo estresse oxidativo podem sofrer alterações em suas funções e estruturas, afetando a elasticidade e a capacidade dos tecidos pulmonares de funcionarem adequadamente. Os lipídios oxidados podem desencadear a peroxidação lipídica, levando à destruição das membranas celulares e à produção de substâncias tóxicas. Além disso, o estresse oxidativo pode causar danos ao ácido desoxirribonucleico DNA, resultando em mutações genéticas e instabilidade genômica. Também está associado à ativação de vias inflamatórias e à atração de células inflamatórias para os pulmões na DPOC. A DPOC é caracterizada por um aumento do gasto energético em repouso e uma alteração no metabolismo dos aminoácidos. Esse maior gasto energético está associado à inflamação sistêmica, hipóxia tecidual e ao uso regular de medicamentos. Estudos relatam que a associação entre inflamação sistêmica e depleção nutricional ocorre em aproximadamente 26% a 47% dos pacientes com DPOC, dependendo da população estudada (ROCA *et al.*, 2013). A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-8, pode ser induzida pelo estresse oxidativo, perpetuando a inflamação crônica e a progressão da doença. Estudos mostram que processos semelhantes de estresse oxidativo e inflamação estão envolvidos nos efeitos sistêmicos da DPOC, níveis elevados de TNF- α , IL1 β , IL6 e PCR circulantes estão relacionados ao aumento do gasto energético, anorexia, caquexia e os níveis plasmáticos de leptina têm uma forte ligação com o componente inflamatório (WAGNER, 2008; WRIGHT; ZHOU; CHURG, 2012).

Um dos principais desencadeadores desse desequilíbrio oxidativo é o óxido nítrico, que está presente em altas concentrações na fumaça do cigarro (WRIGHT; ZHOU; CHURG, 2012). O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa simples, encontrada normalmente em pequenas quantidades na atmosfera, e é altamente tóxico devido à presença de radicais livres, o que o torna um agente químico altamente reativo (WRIGHT; ZHOU; CHURG, 2012). No trato respiratório, o óxido nítrico (NO) é produzido por várias células, como células epiteliais, nervos, células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos e mastócitos) e células endoteliais vasculares (GELB *et al.*, 2012). Após sua produção, o NO

se difunde rapidamente do local de síntese, atravessando as membranas celulares e interagindo com sítios moleculares intracelulares (MALERBA *et al.*, 2014).

A síntese do NO ocorre pela oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino presentes na L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Essa reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). O NO é sintetizado endogenamente por três isoformas de NOS, sendo duas constitutivas e uma induzida. As isoformas constitutivas (cNOS), presentes principalmente nas células endoteliais (eNOS ou tipo I) e nos neurônios (nNOS ou tipo III), estão envolvidas na vasodilatação e broncodilatação. Já a isoforma induzida (iNOS ou tipo II) é estimulada por citocinas, endotoxinas, interleucinas e outros mediadores inflamatórios (GELB *et al.*, 2012; LI, H *et al.*, 2014; WRIGHT; ZHOU; CHURG, 2012). A iNOS não é expressa constitutivamente, mas é induzida por diversos estímulos, incluindo mediadores endógenos (quimiocinas e citocinas) e fatores exógenos (toxinas bacterianas, infecções virais, alérgenos, poluentes ambientais, etc.) (MALERBA *et al.*, 2014).

Os isoprostanos desempenham diferentes funções biológicas e estão envolvidos na mediação de certos aspectos da lesão oxidativa (JUNG *et al.*, 2012). O 8-isoprostano é um isômero da prostaglandina-F-2 alfa (isoprostano 8-iso-PGF-2 α), que é formado *in vivo* pela peroxidação do ácido araquidônico catalisada por radicais livres. Montuschi *et al.* (2000) demonstrou que o tabagismo causou um aumento agudo de aproximadamente 50% no isoprostano 8-iso-PGF-2 exalado, tornando-o um marcador importante de estresse oxidativo (MONTUSCHI *et al.*, 2000)

A ocorrência do desequilíbrio oxidativo resulta na produção de ânions superóxido, que, em combinação com o óxido nítrico (NO), pode levar à formação de espécies altamente reativas de peroxinitrito, as quais são encontradas em níveis elevados na mucosa das vias aéreas de pacientes com DPOC (OSOATA *et al.*, 2009). A presença de NOex na DPOC tem apresentado resultados contraditórios, no entanto, parece que os hábitos de tabagismo e a

gravidade da doença são os fatores mais relevantes que influenciam os níveis de NOex nesses pacientes (MALERBA *et al.*, 2014).

Fumantes com DPOC apresentaram aumento significativo na expressão da iNOS em comparação com fumantes sem a doença, o que sugere o possível envolvimento da iNOS na patogênese da DPOC e seu potencial como um marcador para identificar fumantes com maior risco de desenvolver a doença (OSOATA *et al.*, 2009)

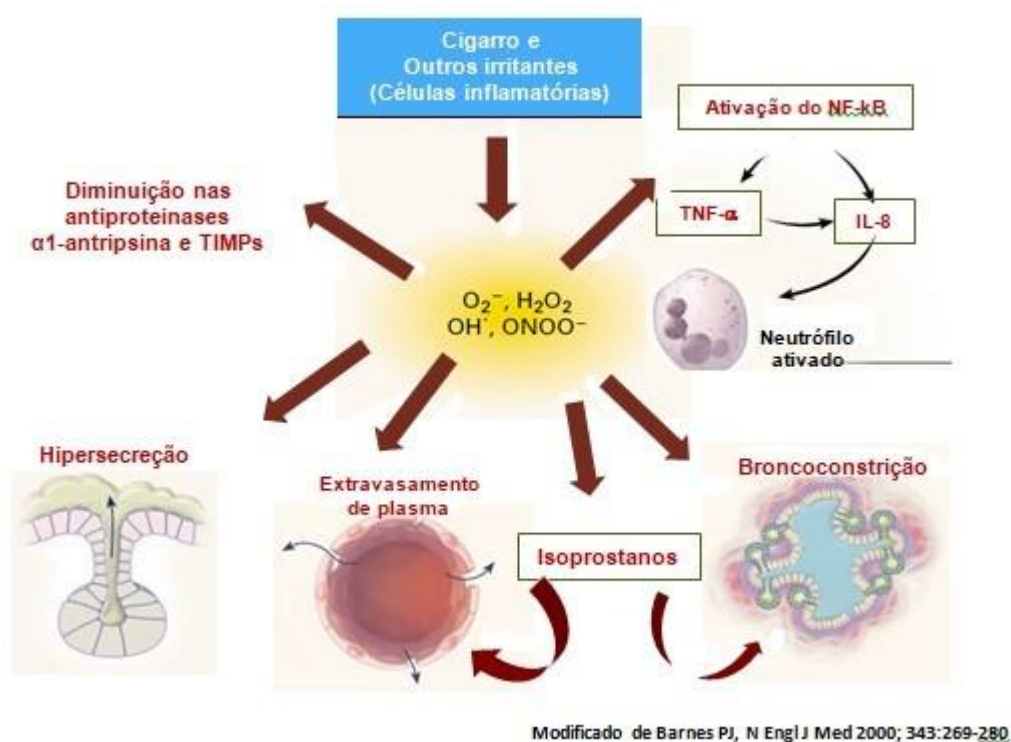


Figura 1 - A fisiopatogênese do estresse oxidativo no enfisema pulmonar envolve a ação de diferentes substâncias nocivas presentes na fumaça do cigarro

1.1.4. Modelo Experimental de Enfisema Induzido por Elastase:

Os modelos experimentais de DPOC em animais são ferramentas valiosas para investigar os mecanismos subjacentes a essa doença complexa, permitindo uma compreensão abrangente das respostas do organismo como um todo. Além disso, esses modelos são essenciais para o desenvolvimento e teste de novas terapias potenciais (FRICKER; DEANE; HANSBRO, 2014).

Dentre as várias espécies utilizadas em estudos científicos, como roedores, cães, cobaias, macacos e ovelhas, os camundongos têm sido amplamente empregados devido às suas vantagens, como informações genômicas bem estabelecidas, disponibilidade de sondas de anticorpos específicas, baixo custo e capacidade de serem geneticamente modificados para destacar processos específicos relacionados à DPOC (VLAHOS; BOZINOVSKI, 2015). No entanto, é importante ter em mente que existem diferenças anatômicas entre camundongos e seres humanos, o que impõe limitações a esse modelo experimental.

Os modelos experimentais de enfisema animal são amplamente utilizados para elucidar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença e para testar novas abordagens terapêuticas (SHAPIRO, 2000). Existem diferentes métodos de indução do enfisema, sendo os mais comuns a indução por exposição ao cigarro e a indução por elastase. Os modelos de elastase variam quanto à dose, número de aplicações, duração do protocolo e forma de administração (ANTUNES; ROCCO, 2011; LOPES, F D T Q S *et al.*, 2013).

TANAKA *et al.* (2011) utilizaram a técnica de instilação intra-traqueal de elastase para induzir enfisema em camundongos, observando um aumento no intercepto linear médio (Lm) e no número de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (TANAKA *et al.*, 2011). Em estudos de nosso grupo observamos que esse modelo apresenta alterações expressiva de inflamação, remodelamento e estresse oxidativo em paredes alveolares e brônquicas (LOPES, F D *et al.*, 2013, 2009). Além disso, TAKAHASHI *et al.* (2008) avaliaram o efeito da sinvastatina nesse modelo de enfisema, demonstrando uma redução significativa do Lm e do número total de células inflamatórias no lavado broncoalveolar.

Com base nesses resultados, optamos por utilizar a administração intra-traqueal de elastase em camundongos C57Bl/6, uma vez que essa cepa tem sido amplamente utilizada em modelos de enfisema e apresenta maior suscetibilidade à indução da doença (DAWKINS; STOCKLEY, 2001). Essa abordagem experimental nos permitirá investigar os efeitos do tratamento com potenciais terapias para o enfisema, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre a DPOC.

1.2. Poluição atmosférica

A poluição do ar é composta principalmente por partículas em suspensão (MP), ozônio, óxidos de nitrogênio ou enxofre, metais pesados e outros gases de efeito estufa, e é uma das principais causas de DPOC em todo o mundo, sendo responsável por cerca de 50% do risco atribuído à DPOC em países de baixa e média renda. Em não fumantes, a poluição do ar é o principal fator de risco conhecido para a DPOC. O risco respiratório associado à poluição do ar é dependente da dose, não havendo aparentes limites "seguros". Mesmo em países com baixos níveis de poluição do ar ambiente, a exposição crônica a partículas finas (MP2,5) e dióxidos de nitrogênio tem efeitos significativos prejudiciais, como a redução do crescimento pulmonar em crianças e aceleração do declínio da função pulmonar em adultos, aumentando o risco de DPOC, especialmente em indivíduos com fatores de risco adicionais. Além disso, a má qualidade do ar devido à poluição também está associada a um maior risco de exacerbações da DPOC, hospitalizações e mortalidade (GOLD 2023).

Nas grandes cidades do mundo ou em polos industriais, diversos estudos realizados têm mostrado que apesar das emissões de poluentes em muitos casos estarem em conformidade com os padrões estabelecidos internacionalmente, as mudanças dos níveis de poluição em curtos períodos,

sazonalmente ou em longos prazos, são capazes de produzir diferentes efeitos nocivos sobre a saúde de populações expostas, tais como irritações, alergias, doenças respiratórias, cardíacas e cânceres (OPAS, OMS, 2008). No ano de 2012, por exemplo, a morte de 4,3 milhões de pessoas foi atribuída à poluição atmosférica (WHO, 2014).

Em áreas urbanas densamente povoadas ou regiões industriais, inúmeros estudos recentes revelam que, mesmo quando as emissões de poluentes estão dentro dos padrões internacionais estabelecidos, as flutuações nos níveis de poluição ao longo do tempo, sazonalmente ou a longo prazo, podem ter efeitos prejudiciais diversos na saúde das populações expostas. Esses efeitos incluem irritações, alergias, doenças respiratórias, cardiovasculares e cânceres (OPAS, OMS, 2008).

Dados atuais mostram que a poluição atmosférica continua a ser uma preocupação global significativa. Por exemplo, estima-se que, somente no ano de 2012, a poluição atmosférica tenha sido responsável pela morte de aproximadamente 4,3 milhões de pessoas (OMS, 2014). Essas estatísticas alarmantes destacam a urgência de abordar e mitigar os impactos da poluição atmosférica em escala mundial.

No contexto do Brasil, é importante ressaltar que o país também enfrenta desafios relacionados à poluição atmosférica. Dados recentes indicam que as principais fontes de poluição do ar no Brasil são as atividades industriais, o transporte rodoviário e as queimadas, especialmente na região Amazônica (IBAMA, 2022). Essa poluição do ar tem impactos negativos na saúde dos brasileiros, contribuindo para o aumento de doenças respiratórias, cardiovasculares e outras condições relacionadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

No contexto dos polos industriais no Brasil, a poluição atmosférica causada pela emissão de material particulado é uma preocupação significativa. Dados atuais revelam que essas regiões industriais são fontes importantes de

emissões de material particulado, com impactos diretos na qualidade do ar e na saúde da população (IBAMA, 2022).

O material particulado proveniente de atividades industriais pode conter uma variedade de compostos químicos, incluindo metais pesados, hidrocarbonetos e substâncias tóxicas. Quando inalado, o material particulado pode penetrar profundamente nos pulmões e até mesmo ser absorvido pela corrente sanguínea, desencadeando efeitos adversos à saúde, como doenças respiratórias, cardiovasculares e até mesmo câncer (WHO, 2021).

As partículas atmosféricas, também conhecidas como material particulado, constituem uma mistura complexa de partículas extremamente pequenas e gotículas de líquido presentes na atmosfera. Essas partículas possuem diversos diâmetros, podendo ser classificadas em categorias distintas. As partículas de maior tamanho são consideradas grossas, com diâmetros que variam de 10 μ m a 2,5 μ m. Já as partículas finas apresentam diâmetro menor que 2,5 μ m, enquanto as partículas ultrafinas têm diâmetros inferiores a 0,1 μ m (NANI GUARIEIRO; NANI GUARIEIRO, 2013).

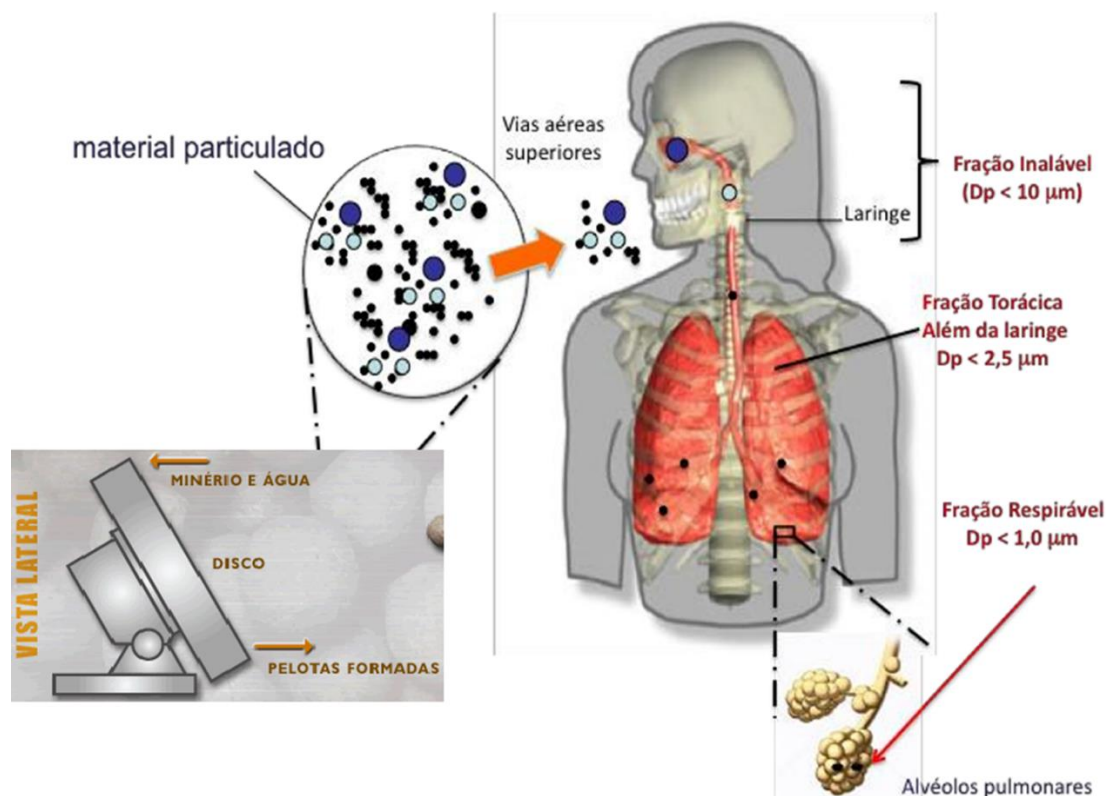


Figura 2 - Depósito do MP no sistema respiratório de acordo com o tamanho das partículas. Adaptado de NANI *et. al.*, 2013.

A composição do material particulado coletado pode variar dependendo da cidade em que é amostrado. Essas partículas podem conter diferentes resíduos provenientes da queima de combustíveis fósseis, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, sulfatos, nitratos, material microbiano e diversos elementos químicos, incluindo ferro, zinco, sílica, sódio e alumínio. É importante destacar que essas partículas têm a capacidade de permanecer na atmosfera por períodos prolongados e também podem desencadear doenças pulmonares (YANG *et al.*, 2020).

Estudos têm demonstrado que o tamanho das partículas está diretamente relacionado ao seu potencial de causar danos aos pulmões. Quanto menor o tamanho da partícula, maior é o impacto prejudicial que o material particulado pode ter no sistema respiratório (CAI; SHAO; WANG, 2015). O material particulado fino (MP_{2,5}) representa um risco significativo, uma vez que pode induzir maior resistência pulmonar e respostas inflamatórias

alérgicas em comparação com partículas de tamanho maior, mesmo quando a dose em massa é equivalente (DE HAAR *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2007).

Partículas com tamanho inferior a 2,5µm têm a capacidade de adentrar os bronquíolos e alvéolos, sendo consideradas as mais danosas para os pulmões (ZHAO, Junling *et al.*, 2019) Essas partículas permanecem suspensas por períodos prolongados na atmosfera, aumentando assim a probabilidade de inalação e a taxa de alteração da composição do ar. Os impactos na saúde humana variam desde o aumento do risco de doenças cardiovasculares e inflamações pulmonares crônicas até a redução da função pulmonar e o aumento de crises asmáticas (CURTIS *et al.*, 2006)

Dados recentes revelam a crescente preocupação em relação ao material particulado de 2,5 µm (MP2,5) e seus efeitos adversos. Estudos têm evidenciado que a exposição a níveis elevados de MP2,5 está associada ao aumento do risco de doenças respiratórias, como bronquite crônica, enfisema pulmonar e redução da função pulmonar (ZHAO, Junling *et al.*, 2019). Além disso, a exposição crônica ao MP2,5 tem sido relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo doenças cardíacas isquêmicas e acidente vascular cerebral (COHEN *et al.*, 2017).

É importante ressaltar que, além da concentração de MP, a composição química desempenha um papel significativo na resposta inflamatória (YANG *et al.*, 2020). Estudos têm apresentado resultados divergentes quanto às respostas Th1 ou Th2 associadas ao MP de 2,5µm. Alguns estudos demonstraram que a exposição a esse tipo de MP induz uma resposta imunológica Th1 em modelos humanos ou animais (HOSSEINI *et al.*, 2016). Por outro lado, outros estudos mostraram que a resposta imunológica Th2 é predominante, especialmente em modelos de camundongos sensibilizados com ovalbumina e expostos ao MP de 2,5µm, onde linfócitos, neutrófilos e a interleucina-4 (IL-4) contribuem para a inflamação das vias aéreas, sendo agravada pela presença de MP (MEI *et al.*, 2018).

A resposta inflamatória desencadeada pelo MP de 2,5 μ m em indivíduos com enfisema tem sido objeto de investigação. Estudos recentes têm mostrado que a exposição ao MP2,5 pode exacerbar a inflamação das vias aéreas e piorar a função pulmonar em pacientes com enfisema (YANG *et al.*, 2020). A presença de MP2,5 no tecido pulmonar de enfisematosos promove a ativação de células inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos, e a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, contribuindo para o agravamento do processo inflamatório e deterioração do estado respiratório (ZHEN, Y; ZHANG, 2019).

Essas descobertas destacam a importância de se compreender a relação entre o MP2,5 e a resposta inflamatória em indivíduos com enfisema, visando a adoção de estratégias preventivas e terapêuticas mais eficazes. A redução da exposição ao MP2,5 e a implementação de medidas de controle da poluição atmosférica são medidas cruciais para minimizar o impacto negativo do material particulado na saúde pulmonar e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com enfisema.

A presença de material particulado na atmosfera é uma preocupação significativa devido aos seus impactos na saúde humana e no meio ambiente. Quando se trata de partículas que contêm metais, há uma preocupação adicional, pois esses metais podem ter propriedades tóxicas e representar um risco para a saúde pulmonar (LI; ZHOU; ZHANG, 2018; ZHAO *et al.*, 2019). Os elementos metálicos também exercem efeitos prejudiciais à saúde e geralmente são provenientes de combustíveis aditivados. A proibição do uso de tetraetil de chumbo como aditivo na gasolina contribuiu para a redução de sua presença na poluição atmosférica (CURTIS *et al.*, 2006).

Estudos têm mostrado que a exposição ao material particulado contendo metais está associada a uma série de efeitos negativos, incluindo o desenvolvimento de doenças respiratórias, como asma, bronquite crônica e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (LI, Ruyi; ZHOU; ZHANG, 2018; WANG *et al.*, 2020). Além disso, alguns metais, como o chumbo e o mercúrio, podem ter efeitos neurotóxicos quando inalados (FONKEN *et al.*, 2011).

A manipulação de metais está intimamente relacionada à presença de material particulado na atmosfera. Quando materiais que contêm metais, como ferro e aço, são manipulados e processados, ocorre a liberação de partículas finas no ar. Essas partículas podem variar em tamanho e composição, incluindo metais como manganês, níquel, zinco, cromo e ferro (GODRI POLLITT *et al.*, 2016). Um estudo longitudinal realizado na Áustria revelou que a exposição ocupacional prolongada estava associada a uma redução das medidas de função pulmonar (HALUZA; MOSHAMMER; HOCHGATTERER, 2014). Outros estudos relataram o aumento de sintomas respiratórios e ocorrência de asma ocupacional em trabalhadores expostos aos vapores de soldagem (HEDMER *et al.*, 2014; WITTCZAK *et al.*, 2012).

A emissão de material particulado proveniente da manipulação de metais pode ser uma fonte significativa de exposição ambiental para comunidades residenciais próximas. Por exemplo, um estudo realizado em Ontário, no Canadá, revelou que os indivíduos saudáveis que passaram cinco dias consecutivos em um bairro adjacente a uma usina siderúrgica apresentaram medidas reduzidas da função pulmonar em comparação com aqueles que passaram cinco dias em um campus universitário mais distante. Mesmo após a cessação da produção, essas comunidades podem continuar a ser expostas por meio da inalação de partículas ressuspensas (YOUNG *et al.*, 2002).

Outro estudo realizado por Zheng *et al.* (2013) demonstrou que crianças que vivem em Guiyu, na China, uma cidade conhecida pelo processamento de lixo eletrônico com alta concentração de manganês (Mn), níquel (Ni) e cromo (Cr), apresentaram medidas significativamente menores da função pulmonar em comparação com crianças que residem em uma cidade sem histórico de processamento de lixo eletrônico (ZHENG, Guina *et al.*, 2013).

Nos Estados Unidos, foi observado um maior risco de internações por doenças cardiovasculares e respiratórias em municípios com níveis mais elevados de níquel (Ni) (BELL *et al.*, 2009). Na cidade de Nova York, medidas ambientais locais de níquel (Ni) foram associadas a uma maior probabilidade

de sibilos em crianças de 24 meses (PATEL *et al.*, 2009). Além disso, níveis de zinco (Zn) no ambiente foram relacionados a um aumento nas visitas ao departamento de emergência e hospitalizações por asma em uma população pediátrica em Baltimore (HOSSEINI *et al.*, 2016).

Uma revisão da literatura sobre os efeitos respiratórios de metais presentes no material particulado do ar também apontou um risco aumentado de morbidade respiratória com o aumento das concentrações desses metais (GRAY *et al.*, 2015).

É importante destacar que a presença de material particulado na atmosfera não é exclusivamente proveniente da manipulação de metais. Outras fontes, como a queima de combustíveis fósseis, emissões veiculares, processos industriais e atividades agrícolas, também contribuem para a emissão de partículas no ar. No entanto, a manipulação de metais desempenha um papel significativo nesse contexto, especialmente em ambientes industriais e de construção (JACQUEMIN *et al.*, 2015; NIEUWENHUIJSEN *et al.*, 2015).

Os critérios de qualidade do ar enfocam principalmente agentes considerados prejudiciais à saúde, como dióxido de enxofre (SO²), dióxido de nitrogênio (NO²), monóxido de carbono (CO), ozônio (O³), material particulado (MP¹⁰ ou MP^{2,5}) e chumbo (MOLNÁR *et al.*, 2006). Além desses, existem preocupações em relação a outros agentes para os quais a avaliação e o monitoramento ainda são insuficientes, como compostos orgânicos voláteis, sulfatos, cloretos, metais e dioxinas.

Diante desses riscos, é essencial adotar medidas adequadas de controle e mitigação da emissão de material particulado durante a manipulação de metais. Isso pode incluir a implementação de práticas de segurança ocupacional, o uso de equipamentos de proteção individual, a adoção de tecnologias de controle de emissões e a promoção de boas práticas ambientais. Além disso, políticas regulatórias e normas de qualidade do ar

desempenham um papel fundamental na redução da exposição ao material particulado e seus efeitos prejudiciais (SAXENA *et al.*, 2022)

1.2.1. Padrões de Qualidade do Ar

No Brasil os padrões de qualidade do ar são estabelecidos pela Resolução CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) nº 491/2018 e tem o objetivo de prover um instrumento de gestão da qualidade do ar, ajudar na medição de poluentes presentes e introduzir os efeitos de cada condição do ar sobre a saúde humana (RESOLUÇÃO Nº 491, DE 19 DE NOVEMBRO DE 2018).

No Brasil, os padrões de qualidade do ar são estabelecidos e monitorados com o objetivo de garantir a proteção da saúde humana e a preservação do meio ambiente. Esses padrões são definidos por órgãos regulatórios e levam em consideração diversos poluentes atmosféricos e seus efeitos na saúde. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), por meio da Resolução CONAMA nº 491/2018, estabelece os padrões de qualidade do ar no país. Essa resolução define limites máximos permitidos para diversos poluentes, tais como dióxido de enxofre (SO₂), dióxido de nitrogênio (NO₂), monóxido de carbono (CO), material particulado (MP10 e MP2,5) e ozônio (O₃).

A Resolução CONAMA nº 491/2018 estabelece, por exemplo, que a concentração média anual de dióxido de enxofre (SO₂) não deve ultrapassar 50 microgramas por metro cúbico (µg/m³), enquanto o limite para o dióxido de nitrogênio (NO₂) é de 40 µg/m³. Já o limite para o monóxido de carbono (CO) é de 9 miligramas por metro cúbico (mg/m³) em média móvel de oito horas.

Quanto ao material particulado, a resolução estabelece que a concentração média anual não deve ultrapassar 50 µg/m³ para o MP10 e 25

$\mu\text{g}/\text{m}^3$ para o MP2,5. Além disso, para o ozônio (O_3), o valor máximo permitido é de $160 \mu\text{g}/\text{m}^3$ em média móvel de oito horas.

Esses padrões foram estabelecidos com base em estudos científicos e diretrizes internacionais de qualidade do ar, visando proteger a saúde da população brasileira. A fiscalização e monitoramento da qualidade do ar são realizados por órgãos ambientais, como o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e as secretarias estaduais de meio ambiente.

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) é responsável por monitorar e estabelecer os Padrões de Qualidade do Ar no estado. Esses padrões são fundamentais para avaliar a qualidade do ar e garantir a proteção da saúde e do meio ambiente. De acordo com a CETESB, são considerados os seguintes poluentes atmosféricos e seus respectivos padrões: (TABELA 1)

1. Material Particulado (MP10 e MP2,5): O limite de concentração diário para partículas inaláveis (MP10) é de $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$, e para partículas finas (MP2,5) é de $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Esses valores são utilizados para classificar a qualidade do ar como "Boa" quando os níveis estão abaixo dos limites, indicando que a concentração de material particulado está dentro dos padrões aceitáveis.
2. Dióxido de Enxofre (SO_2): O limite médio de concentração anual é de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$, e o limite horário é de $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Valores abaixo desses limites indicam uma classificação de "Boa" qualidade do ar em relação ao dióxido de enxofre.
3. Dióxido de Nitrogênio (NO_2): O limite médio de concentração anual é de $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$, e o limite horário é de $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Quando os níveis de dióxido de nitrogênio estão abaixo desses valores, a qualidade do ar é considerada "Boa".
4. Ozônio (O_3): O limite médio de concentração horária é de $160 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Níveis de ozônio abaixo desse limite indicam uma classificação de "Boa" qualidade do ar em relação a esse poluente.

5. Monóxido de Carbono (CO): O limite médio de concentração horária é de 9 ppm (partes por milhão). Quando os níveis de monóxido de carbono estão abaixo desse valor, a qualidade do ar é considerada "Boa".
6. Chumbo (Pb): O limite médio de concentração anual é de 0,5 µg/m³. Valores inferiores a esse limite indicam uma classificação de "Boa" qualidade do ar em relação ao chumbo.

Tabela 1 - Índice de qualidade do ar.

Qualidade do Ar	Índice	MP ₁₀ (µg/m ³) 24h	MP _{2.5} (µg/m ³) 24h	O ₃ (µg/m ³) 8h	CO (ppm) 8h	NO ₂ (µg/m ³) 1h	SO ₂ (µg/m ³) 24h
N1 - Boa	0 - 40	0 - 50	0 - 25	0 - 100	0 - 9	0 - 200	0 - 20
N2 - Moderada	41 - 80	>50 - 100	>25 - 50	>100 - 130	>9 - 11	>200 - 240	>20 - 40
N3 - Ruim	81 - 120	>100 - 150	>50 - 75	>130 - 160	>11 - 13	>240 - 320	>40 - 365
N4 - Muito Ruim	121 - 200	>150 - 250	>75 - 125	>160 - 200	>13 - 15	>320 - 1130	>365 - 800
N5 - Péssima	201 - 400	>250 - 600	>125 - 300	>200 - 800	>15 - 50	>1130 - 3750	>800 - 2620

É importante ressaltar que esses padrões são estabelecidos com base em estudos científicos e em diretrizes internacionais, levando em consideração os efeitos desses poluentes na saúde humana e no meio ambiente. (CETESB 2023)

1.3. Efeitos da Exposição ao Material Particulado

A exposição ao material particulado, seja em curto ou longo prazo, pode desencadear a inflamação, a qual é a principal causa das doenças respiratórias. Estudos experimentais demonstraram que o material particulado presente nas células epiteliais das vias respiratórias, que ativa as vias de sinalização inflamatória, afetando as respostas imunológicas e inflamatórias em todo o corpo (HE, Fang *et al.*, 2017). Componentes encontrados no material

particulado possuem a capacidade de causar ou agravar a inflamação aguda, além de causar danos oxidativos nos tecidos pulmonares e vias aéreas (RAO *et al.*, 2018; SHADIE; HERBERT; KUMAR, 2014).

As substâncias transportadas pelo ar geralmente possuem um núcleo de carbono inerte que contém uma variedade de compostos, como hidrocarbonetos poliaromáticos, quinonas, metais e compostos orgânicos voláteis, os quais podem ser absorvidos pelo trato respiratório (GUO *et al.*, 2017). Muitos desses compostos são responsáveis por induzir o estresse oxidativo nas células epiteliais das vias aéreas como resposta ao estímulo (GUO *et al.*, 2017). Como resultado, ocorre um estresse oxidativo local que estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, impulsionando a produção de citocinas associadas à resposta Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, e quimiocinas que perpetuam a inflamação (HE, Miao *et al.*, 2017).

Inicialmente, a inflamação e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos pulmões têm a intenção de remover os estímulos prejudiciais e iniciar o processo de reparo tecidual. No entanto, a persistência da agressão, inflamação pulmonar e o desequilíbrio entre as ROS e a resposta antioxidante podem levar a efeitos sistêmicos e crônicos (RAO *et al.*, 2018). O estresse oxidativo nos pulmões, juntamente com diferentes padrões moleculares, está associado a danos, como lipoproteínas oxidativamente modificadas (oxDNA, ssRNA, dsRNA) e proteínas mitocondriais. Esses danos ativam vários receptores, incluindo os receptores *Toll-like* (TLRs) e o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), desencadeando a produção de citocinas e quimiocinas em todo o corpo (HE, Miao *et al.*, 2017).

A exposição ao material particulado pode causar um aumento na expressão de genes relacionados a fatores de transcrição e citocinas, resultando em uma resposta inflamatória e danos celulares (WANG *et al.*, 2020). Em células endoteliais humanas, a exposição às frações hidrossolúveis e insolúveis do material particulado leva a um aumento na morte celular, maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), alteração do potencial

transmembranar mitocondrial e ativação do fator nuclear NF- κ B (HAN WEI *et al.*, 2011).

A exposição *in vitro* de macrófagos humanos à fumaça resulta em um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-8, enquanto diminui a capacidade de fagocitose e a resposta oxidativa dessas células (NADEAU *et al.*, 2010). Compostos presentes em hidrocarbonetos aromáticos policíclicos ambientais e partículas de escape de diesel podem afetar a função das células T reguladoras, que desempenham um papel importante na regulação da resposta imunológica (NADEAU *et al.*, 2010; ZHAO, Y X *et al.*, 2018).

O estresse oxidativo desempenha um papel crucial nas doenças pulmonares e está associado à exposição a poluentes como ozônio, óxido nítrico e material particulado (MEI *et al.*, 2018). O estresse oxidativo causado pelo material particulado pode ocorrer de várias formas, incluindo a geração direta de ROS na superfície das partículas, a presença de compostos solúveis, como metais de transição e compostos orgânicos, além da disfunção mitocondrial e ativação de células inflamatórias capazes de produzir ROS e espécies reativas de nitrogênio (GUO *et al.*, 2017)

O material particulado contém substâncias químicas revestidas que, quando metabolizadas, podem aumentar a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) dentro das células. Isso tem sido associado a um aumento da resposta inflamatória nas vias respiratórias por meio da ativação das vias de sinalização NF κ B mediadas pelas ROS (WANG *et al.*, 2017). Além disso, o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes está relacionado ao desenvolvimento de doenças que afetam diversos sistemas do organismo, incluindo os pulmões e a vasculatura pulmonar. As ROS induzidas pelo material particulado funcionam como moléculas sinalizadoras, desencadeando a movimentação do fator nuclear tipo 2 (Nrf2) para o núcleo celular e resultando em modificações na transcrição de enzimas antioxidantes (LAWAL, 2017). (Figura 3)

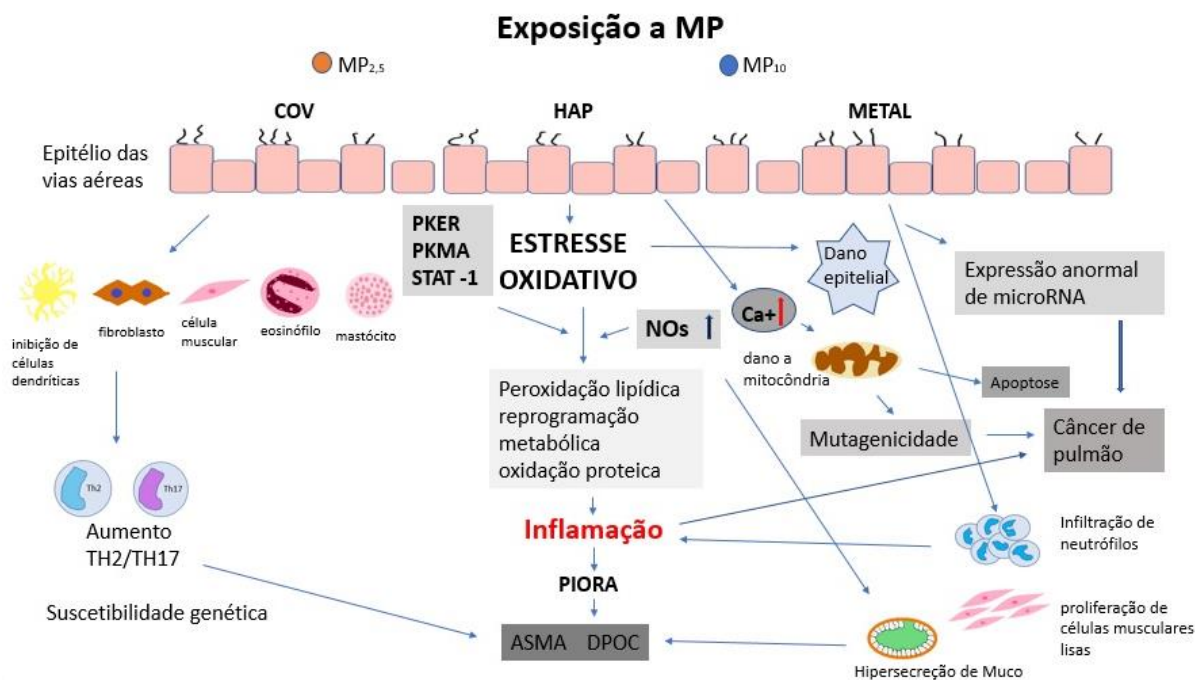


Figura 3 - Exposição ao MP. Adaptado de Li, et. al., 2018

1.4. Município de Vitória

Vitória, a capital do estado do Espírito Santo, é uma cidade com características geográficas, populacionais e econômicas significativas. Localizada na região Sudeste do Brasil, Vitória possui uma área total de aproximadamente 93,38 km² (IBGE, 2021).

A cidade tem uma população estimada de cerca de 365 mil habitantes, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021). Sua população é composta por uma diversidade étnica e cultural, resultante da história de colonização e imigração da região.

Vitória, apresenta características climáticas típicas da região Sudeste do Brasil. O clima predominante em Vitória é o tropical úmido, com estações bem definidas ao longo do ano. Para compreender melhor os dados meteorológicos da cidade, é importante analisar informações sobre temperatura, precipitação e umidade relativa do ar. Em relação à temperatura, Vitória possui uma média

anual de cerca de 24°C, com variações sazonais. Durante o verão, que ocorre entre os meses de dezembro e março, as temperaturas são mais elevadas, podendo alcançar valores acima dos 30°C. Já no inverno, de junho a setembro, as temperaturas são mais amenas, com mínimas em torno de 17°C. (INMET, 2022)

No que diz respeito à precipitação, Vitória possui um regime pluviométrico caracterizado por chuvas bem distribuídas ao longo do ano. Os meses mais chuvosos são geralmente entre outubro e janeiro, enquanto os meses de junho e julho apresentam menor volume de chuvas. A média anual de precipitação em Vitória é de aproximadamente 1.400 milímetros. (INMET, 2022)

Do ponto de vista econômico, Vitória é um importante centro para o estado do Espírito Santo. A cidade tem uma economia diversificada, com destaque para os setores de comércio, serviços, indústria e turismo. O Produto Interno Bruto (PIB) de Vitória é um dos mais altos do estado, impulsionado por sua localização estratégica e pelos investimentos em infraestrutura.

A cidade possui um dos principais portos do país, o Porto de Vitória, que contribui significativamente para a movimentação de cargas e para o comércio exterior. Além disso, Vitória abriga indústrias de diferentes segmentos, como metalurgia, siderurgia, petróleo e gás, alimentos e bebidas, entre outros. Essas atividades industriais geram empregos e impulsionam o desenvolvimento econômico da região. (IBGE, 2021)

A poluição atmosférica é uma preocupação global, e Vitória, assim como outras cidades, enfrenta desafios relacionados à qualidade do ar. Sua proximidade com o oceano, bem como a sua topografia controlam as condições meteorológicas, o que favorece a dispersão de alguns poluentes na região. Existem 3 grupos de principais fontes de emissão de poluentes atmosféricos em Vitória: veículos, indústria minerosiderúrgica e o terceiro grupo com níveis de emissão significativos é o grupo que representa as

operações de portos e aeroportos, principalmente quanto às contribuições para os níveis de SO₂ e NO_x (LORIATO *et al.*, 2018).

Diversos estudos científicos têm abordado a temática da poluição atmosférica em Vitória, fornecendo informações valiosas sobre os poluentes presentes, suas fontes e os impactos na saúde humana e no meio ambiente.

Um estudo realizado por Oliveira *et al.* (2019) investigou a presença de material particulado fino (MP 2,5) no ar de Vitória. Os resultados indicaram que a concentração de MP_{2,5} excedeu os limites estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em algumas áreas da cidade, principalmente nas proximidades de áreas industriais e rodovias. Esse tipo de material particulado está associado a problemas respiratórios, cardiovasculares e até mesmo ao aumento da mortalidade (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Outra pesquisa relevante foi conduzida por Santos *et al.* (2018), que analisaram a presença de poluentes atmosféricos em áreas urbanas e industriais de Vitória. Os resultados demonstraram que as concentrações de dióxido de nitrogênio (NO₂) e ozônio (O₃) ultrapassaram os limites estabelecidos pela legislação brasileira em algumas localidades. Esses poluentes estão associados a problemas respiratórios e podem causar danos ao sistema respiratório e cardiovascular (SANTOS *et al.* 2018).

Um estudo específico sobre a poluição atmosférica causada pela atividade portuária em Vitória foi realizado por Viana *et al.* (2016). Os pesquisadores avaliaram a qualidade do ar nas proximidades do porto e encontraram concentrações significativas de poluentes, como partículas inaláveis, dióxido de enxofre (SO₂) e compostos orgânicos voláteis (COVs). Esses poluentes podem ter efeitos prejudiciais à saúde humana e contribuir para a formação de chuva ácida e impactos negativos no ecossistema (VIANA *et al.* 2016).

Esses estudos científicos destacam a importância de monitorar e controlar a poluição atmosférica em Vitória. Ações como a melhoria da

eficiência dos sistemas de transporte, a redução das emissões industriais e a promoção de fontes de energia limpa são medidas essenciais para mitigar os impactos da poluição atmosférica na cidade.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente sabe-se que muitos fatores podem contribuir para a fisiopatogenia e a exacerbação do enfisema pulmonar, principalmente a poluição. Apesar do papel da poluição urbana e da queima de plantações estarem bem estabelecidas como fatores de piora para os enfisematosos, a poluição advinda do processamento do pó de minério de ferro ainda não está bem estabelecida na literatura.

Aspectos como a influência do pó de ferro e do particulado fino sobre aspectos da mecânica do sistema respiratório, inflamação, remodelamento da matriz extracelular, estresse oxidativo ainda não foram estudados em modelos experimentais de enfisema pulmonar.

Portanto, este estudo visa contribuir para o melhor entendimento da fisiopatologia do enfisema em animais expostos ao particulado, e identificar seus possíveis agentes de interação com estas doenças.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Neste estudo, investigamos os efeitos funcionais da exposição ambiental ao processamento do minério de ferro em Vitória, Espírito Santo. Nosso foco foi a avaliação da mecânica pulmonar, da resposta inflamatória (tanto a nível celular quanto no perfil de citocinas), da expressão do fator de transcrição NF- κ B e da ativação da via do estresse oxidativo (expressão de iNOS). Além disso, investigamos o remodelamento da matriz extracelular, especialmente em relação às fibras colágenas, e os mecanismos reguladores dessas respostas, como a ativação de metaloproteinases, TGF- β e TIMP-1, em duas estações do ano (verão e inverno) em camundongos (C57Bl/6) com enfisema induzido por elastase. Estes dados serão comparados entre os obtidos em animais que receberam elastase e os animais controle, mantidos no biotério em São Paulo.

3.2 Objetivos Específicos

Caracterizar nesse modelo submetido os seguintes parâmetros:

- 1 Alterações da mecânica pulmonar: **Rrs** (resistência do sistema respiratório), **Ers** (elastância do sistema respiratório), **Raw** (resistência de vias aéreas), **Gtis** (resistência do tecido pulmonar) e **Htis** (elastância do tecido pulmonar);
- 2 Número de células totais e o seu diferencial no lavado broncoalveolar;

- a. Infiltrado celular para eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e macrófagos;

3 Nos septos alveolares:

- a. Avaliação do intercepto linear médio (Lm)
- b. Avaliação dos marcadores inflamatórios pela expressão celular de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e elastase neutrofílica;
- c. Avaliação dos marcadores de remodelamento: expressão celular de TIMP-1, MMP-9, MMP-12, TGF- β e conteúdo das fibras colágenas;
- d. Expressão celular de NF κ B;
- e. Avaliação do estresse oxidativo: expressão celular de iNOS.

4 Nas vias aéreas:

- a. Avaliação do marcador de remodelamento: expressão celular de MUC5AC

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo aprovado no dia 21/12/2018. O número de protocolo de pesquisa utilizado foi o nº 919/17. Para a realização do modelo experimental de enfisema induzido por elastase, foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os cuidados necessários foram fornecidos aos animais, de acordo com as diretrizes estabelecidas no "Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório" publicado pelo *National Institute of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985). No início do protocolo experimental, os animais apresentavam uma faixa de peso corporal médio de aproximadamente 20-25g.

4.2. Grupos Experimentais

Os grupos abaixo descritos foram feitos no verão e repetidos no inverno. Sendo assim o número total de animais foram de 12 em cada grupo em razão de ser 6 animais em cada estação.

Modelo animal de exposição ambiental – enfisema

- **Grupo SAL:** instilação intratraqueal com soro fisiológico estéril e mantido no biotério (n=12);
- **Grupo ELA:** instilações intratraqueais de elastase e mantidos no biotério (n=12);
- **Grupo ELA – Local 1:** instilações intratraqueais de elastase e exposição ambiental no local 1 em Vitória-ES. (n=12),
- **Grupo SAL – Local 1:** instilação intratraqueal com soro fisiológico estéril e exposição ambiental no local 1 em Vitória-ES. (n=12),
- **Grupo ELA – Local 2:** instilações intratraqueais de elastase e exposição ambiental no local 2 em Vitória-ES. (n=12),
- **Grupo SAL – Local 2:** instilação intratraqueal com soro fisiológico estéril e exposição ambiental no local 2 em Vitória-ES. (n=12).

Os animais dos grupos SAL e ELA que permaneceram em São Paulo ficaram no biotério de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em um ambiente com temperatura e umidade controladas. As gaiolas em que os animais ficaram alojados possuíam pré-filtros e filtros de ar de alta eficiência que filtram partículas maiores ou iguais a 0,3 μ m e removem contaminantes microscópicos do ar.

Os grupos de SAL e ELA que foram enviados para os locais de exposição, foram enviados em duas dois momentos diferentes (verão e inverno) e permaneceram durante 28 dias em Vitória - ES. O período da análise dos animais do grupo verão foi de novembro de 2018 a fevereiro de 2019 e no grupo inverno foi de junho até setembro de 2019.

No Brasil, há diferenças climáticas significativas entre essas duas estações em relação à temperatura, umidade, quantidade de chuva, velocidade e direção dos ventos. No verão, há mais chuvas, a temperatura é mais alta, assim como a umidade. No inverno, as temperaturas são mais amenas, as chuvas são mais escassas e a umidade é extremamente baixa. Devido a esse fator climático, foi necessário enviar os animais em dois períodos diferentes do

ano para que pudéssemos avaliar a interferência climática no material particulado e, assim, ser capazes de distingui-la.

4.3. Protocolo Enfisema Pulmonar Induzido por Elastase

No decorrer da pesquisa, foi realizada a administração de uma única dose de elastase porcina pancreática (E-1250, Sigma, Califórnia, EUA) intratraqueal nos animais do grupo elastase, utilizando um volume preciso de 50 μ L. Essa substância, conhecida por suas propriedades enzimáticas, desempenha um papel crucial na indução do modelo experimental de enfisema. Por outro lado, os animais do grupo controle foram submetidos à administração de um volume equivalente de 50 μ L de solução salina, um composto isotônico e inerte que não causa impacto significativo no sistema pulmonar (MARTINS-OLIVERA *et al.*, 2016). Essa abordagem experimental permite a comparação direta entre os efeitos da elastase e da solução salina, sendo fundamental para a análise dos resultados obtidos. A utilização de doses precisas e uniformes em ambos os grupos contribui para a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados, minimizando possíveis interferências decorrentes de variações na quantidade administrada.

É importante ressaltar que a escolha da elastase porcina pancreática como agente indutor do enfisema se baseia em sua capacidade comprovada de causar danos estruturais e funcionais nos tecidos pulmonares, replicando aspectos característicos da doença em humanos. Por sua vez, a solução salina é empregada como um controle adequado, proporcionando um ambiente estável e isento de estímulos agressivos. Portanto, a manipulação cuidadosa da administração dessas substâncias nos grupos de estudo permite uma investigação precisa dos mecanismos patológicos subjacentes ao enfisema, contribuindo para uma compreensão mais aprofundada da fisiopatologia dessa condição respiratória.

4.4. Protocolo de Exposição Ambiental

Nos grupos de exposição ambiental, os animais dos grupos SAL e ELA foram submetidos a exposição em dois locais na cidade de Vitória, no Estado do Espírito Santo, Brasil (Figura 4). O Local 1, situado nessa região da cidade, está a empresa mineradora, cuja principal atividade é a pelotização do minério de ferro em pó, transformando-o em esferas para facilitar o transporte marítimo. Por sua vez, o Local 2 está localizado no terraço de um hotel na Ilha do Boi, a aproximadamente 5 quilômetros do Local 1. Nesse local, a corrente de ar direciona os resíduos resultantes da pelotização, gerando a formação de material particulado e a suspensão de partículas no ambiente circundante.

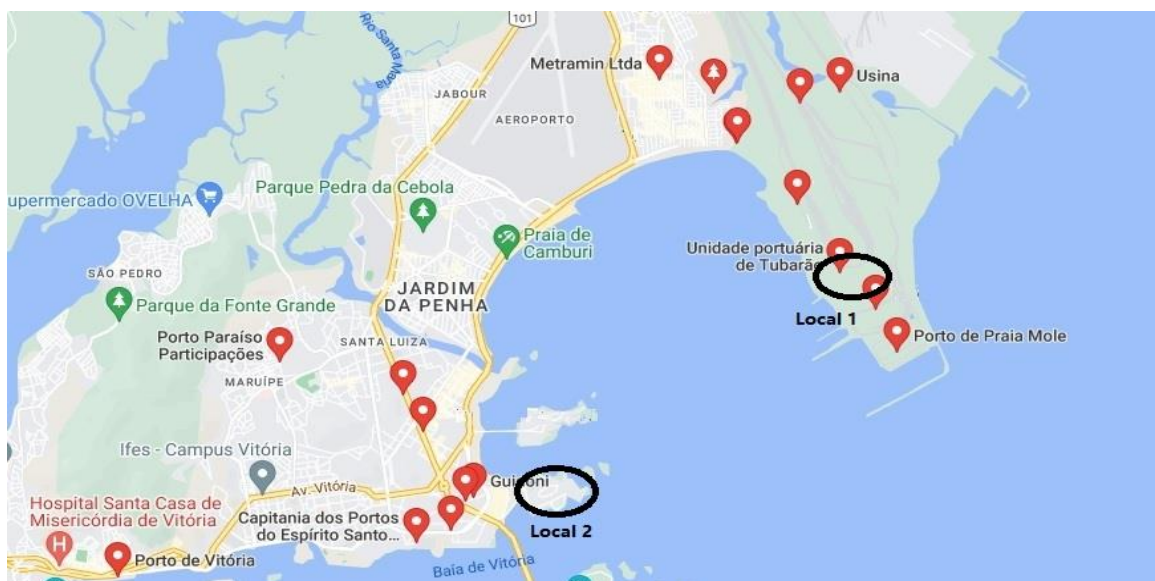


Figura 4 - Locais de exposição ambiental

Essas regiões em Vitória - ES - Brasil foram escolhidas porque são locais onde ocorre maior acúmulo de poeira de minério de ferro e também devido à formação da borda na região do Porto de Tubarão, o que favorece o deslocamento desse material para a região oposta localizada no local 2, devido ao efeito massivo de correntes de vento muito fortes na região.

Devido à heterogeneidade climática entre as estações do ano no Brasil, decidiu-se realizar os experimentos em duas estações com clima completamente diferente, temperatura, umidade e velocidade do vento. Portanto, escolhemos o verão e o inverno.

4.5. Protocolo de Exposição no Modelo de Enfisema Pulmonar Induzido por Elastase

Após a administração intratraqueal da elastase, os animais foram encaminhados para locais de exposição ambiental no estado do Espírito Santo. Lá, eles foram submetidos a um período de quatro semanas de exposição contínua aos fatores ambientais presentes nesses locais específicos, os animais ficaram em salas com temperatura controlada, porém recebendo o ar do ambiente externo. Durante esse período, foram monitorados cuidadosamente para avaliar a resposta pulmonar e os efeitos do ambiente na função e na estrutura pulmonar. Após a conclusão do período de exposição, os animais foram cuidadosamente transportados de volta para a cidade de São Paulo, no estado de São Paulo, Brasil. Essa etapa foi realizada no vigésimo oitavo dia do protocolo experimental, com o objetivo de realizar as análises da mecânica pulmonar e da histopatologia pulmonar.

Ao retornarem a São Paulo, os animais foram submetidos a uma avaliação detalhada, incluindo testes para medir a função pulmonar e exames histopatológicos para avaliar as alterações estruturais nos tecidos pulmonares. Essas análises permitiram uma avaliação abrangente dos efeitos da exposição ambiental e da elastase sobre o sistema respiratório dos animais. O esquema completo do experimento e do fluxo de procedimentos está ilustrado na Figura 5, proporcionando uma representação visual clara de todas as etapas realizadas ao longo do estudo. Essa abordagem metódica e bem planejada

garantiu a obtenção de dados confiáveis e relevantes para a compreensão dos efeitos da exposição ambiental e da elastase no contexto do enfisema.

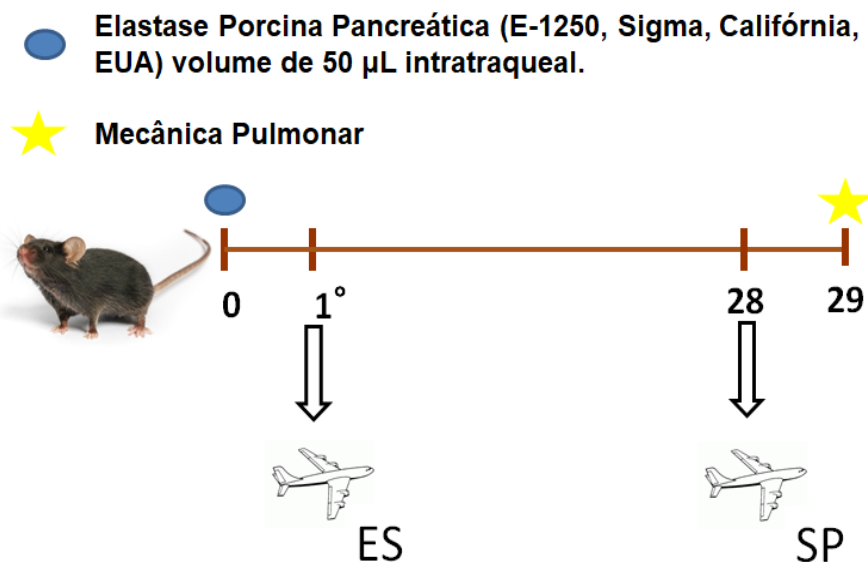


Figura 5 - Protocolo de exposição ambiental no modelo de enfisema pulmonar induzido por elastase

4.6. Avaliação da Mecânica Respiratória

Após 24 horas de conclusão do período exposição ambiental e retorno a São Paulo, os animais foram submetidos a procedimentos anestésicos com Tiopental (50 mg/kg i.p.) e submetidos à traqueostomia. Utilizou-se uma cânula de plástico que foi cuidadosamente inserida e fixada no orifício da traqueostomia, garantindo uma conexão segura. Em seguida, os animais foram conectados a um sofisticado aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (FlexiVent, Scireq, Montreal, Canadá). Durante o processo de ventilação, foram adotados parâmetros específicos, incluindo um volume corrente de 10 ml/kg e uma frequência respiratória de 120 ciclos/min, com um padrão de fluxo inspiratório senoidal.

Com o objetivo de evitar qualquer esforço ventilatório por parte dos animais durante a coleta de dados, administraram-se injeções intraperitoneais de pancurônio (0,2 mg/kg). Assim, foram registrados os valores de pressão gerados durante a ventilação controlada. A fim de calcular a impedância das vias aéreas em relação às diferentes frequências aplicadas, utilizou-se um método que envolveu a geração de oscilações de fluxo com frequências variadas (de 0,25 a 19,625 Hz) por um período de 16 segundos, mantendo a válvula expiratória fechada. A partir desses registros de pressão, calculou-se a impedância das vias aéreas (Pressão/Fluxo) para cada frequência gerada. Para garantir a precisão dos cálculos, aplicou-se uma janela de sobreposição de 75% nos sinais de 16 segundos, selecionando-se três blocos consecutivos de 8 segundos para o cálculo dos parâmetros da mecânica oscilatória. Utilizando equações específicas, determinou-se a resistência das vias aéreas maiores (Raw), a resistência das vias aéreas menores ou dos tecidos (Gtis) e a elastância dos tecidos pulmonares (Htis). Esses parâmetros foram fundamentais para descrever o modelo pulmonar estudado.

Ao final do experimento, os camundongos foram eutanasiados por meio da administração intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg) e, em seguida, realizou-se a heparinização intravenosa com 1000 UI. Antes da secção da aorta abdominal e veia cava, a parede torácica anterior foi cuidadosamente aberta, permitindo a remoção dos pulmões juntamente com o coração. Esses órgãos foram preservados para posteriores análises morfométricas e histológicas/histoquímicas, que seriam realizadas posteriormente em estudos futuros. Todo o procedimento foi conduzido seguindo rigorosos padrões éticos e de cuidados com os animais, garantindo seu bem-estar e respeitando as diretrizes estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa. (MARTINS-OLIVEIRA; ALMEIDA-REIS; THEODORO-JÚNIOR; OLIVA et al., 2016).

4.7. Avaliação do Fluido do Lavado Broncoalveolar (FLBA)

Logo após realizar a avaliação da mecânica do sistema respiratório, avançamos para a próxima etapa do estudo, que envolveu a realização do Fluido do Lavado Broncoalveolar (FLBA). Essa técnica é amplamente utilizada para obter amostras do fluido presente nos pulmões, permitindo a análise e contagem de células presentes nesse ambiente. O procedimento foi iniciado inserindo-se 1,5 mL de solução salina na cânula traqueal, divididos em três doses de 0,5 mL cada. A solução salina foi cuidadosamente introduzida para alcançar as vias aéreas inferiores, garantindo uma amostra representativa do trato respiratório. Em seguida, o FLBA foi coletado e submetido a um processo de centrifugação a $790 \times g$ por 10 minutos, a uma temperatura controlada de 5°C . Esse processo permitiu a separação das células presentes no fluido broncoalveolar.

Após a centrifugação, obteve-se um *pellet* celular contendo as células presentes no FLBA. Para reidratar as células e garantir sua preservação, adicionou-se $300 \mu\text{L}$ de solução salina e agitou-se suavemente a amostra utilizando um vortex. Em seguida, uma porção de $100 \mu\text{L}$ dessa solução foi utilizada para criar uma lâmina para a contagem diferencial de células. Esse processo permitiu a identificação e quantificação dos diferentes tipos de células presentes, tais como neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos.

Além disso, o restante do FLBA foi novamente submetido à centrifugação, dessa vez em um centrífugo especializado, chamado de cytopspin. Esse processo resultou na concentração das células em uma lâmina, que foi posteriormente corada usando o método *Diff Quick*. Através da microscopia óptica, utilizando um aumento de $1000\times$, foi possível distinguir as diferentes células presentes e realizar a contagem de aproximadamente 200 células por animal (MARTINS-OLIVERA *et al.*, 2016; THEODORO-JÚNIOR *et al.*, 2017).

4.8. Avaliação da Histopatologia e Imunohistoquímica

Evidenciamos previamente que a expressão gênica de citocinas, por meio da técnica de PCR, apresentou respostas semelhantes às análises morfométricas (CAMARGO *et al.*, 2018). Com base nesses resultados promissores, optamos por expandir nossa investigação e analisar marcadores adicionais de inflamação, remodelamento e estresse oxidativo, utilizando exclusivamente a análise morfométrica após os estudos de imunohistoquímica.

Após a coleta do Fluido do lavado Broncoalveolar (FLBA), procedemos à retirada de sangue dos animais e à remoção dos corações e pulmões como uma unidade única. Os pulmões foram imediatamente fixados em formaldeído a 4%, mantendo-se uma pressão constante de 20 cmH₂O por um período de 24 horas. Em seguida, foram armazenados em álcool a 70% por até 36 horas, preparando-os para o processamento histológico subsequente. Esse processo envolveu a fixação de fragmentos de tecido pulmonar em parafina, garantindo a preservação adequada das estruturas. A partir dessas amostras, foram obtidos cortes com uma espessura de cinco micrômetros, que foram cuidadosamente dispostos em lâminas de vidro revestidas com 3-aminopropil-trietoxisilano Silane (Sigma), para permitir uma análise histológica precisa dos pulmões.

Os cortes foram submetidos a uma sequência de etapas de preparação, incluindo a desparafinização, reidratação e tratamento com Proteinase K, que foi realizado em duas etapas: inicialmente, por 20 minutos a 37°C, seguido por mais 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram submetidos a lavagens cuidadosas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para eliminar quaisquer resíduos indesejados. Para bloquear a atividade da peroxidase endógena, os cortes foram incubados em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em três intervalos de 10 minutos.

Com o objetivo de avaliar a presença de colágeno, utilizamos a coloração de *Picro-Sirius* nos cortes histológicos. Além disso, preparamos os cortes para a imuno-histoquímica, a fim de investigar a presença e a localização de marcadores relevantes, tais como MMP-9, MMP-12, TIMP-1, iNOS, NF κ B, IL-6, IL-10, IL-17, IL-1 β , TGF- β , TNF- α , MUC5AC e elastase neutrofílica. Os anticorpos primários foram diluídos em solução de Albumina Sérica Bovina (BSA) e aplicados cuidadosamente em cada corte histológico. Todos os detalhes, incluindo as diluições e etiquetas dos anticorpos utilizados, estão devidamente descritos na **Tabela 2**.

Marcadores	Diluição	Anticorpo Primario	Especificações
IL-1 β	1:200	Anti-coelho	SC-7884; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-6	1:100	Anti-coelho	LS Bio Rabbit;LifeSpan C746886
IL-10	1:150	Anti-cabra	SC-1783 Goat monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-17	1:500	Anti-coelho	SC-7927 Rabbit Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
Elastase Neutrofílica	1:500	Anti-cabra	Abcam Reserch, AB6872
TIMP-1	1:400	Anti-coelho	LS-C299465 Mouse Polyclonal; LifeSpan BioScien, Inc, WA, USA
MMP-9	1:600	Anti-coelho	SC-393859 Mouse Monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
MMP-12	1:3000	Anti-coelho	LS Bio Rabbit;LifeSpan C295305
MUCAC	1:500	Anti-rato	Abcam Reserch, AB3649
TGF- β	1:400	Anti-coelho	SC-130348 Mouse Monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
iNOS	1:500	Anti-coelho	SC-7271 Rabbit Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
NF κ B	1:500	Anti-coelho	SC-8008 Mouse Monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA

Tabela 2 - Diluição dos Marcadores

As lâminas foram então incubadas durante toda a noite em uma câmara refrigerada e úmida, mantida a uma temperatura de 4°C. Após um período de incubação de 18 a 22 horas, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpos secundários, conforme listados na Tabela 1. Em seguida, foram realizadas lavagens adicionais em PBS, a fim de remover quaisquer excessos de reagentes, e as proteínas foram visualizadas utilizando o cromógeno diaminobenzidina (DAB) da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA. Para uma melhor visualização e contraste, as seções foram contra-coradas com hematoxilina de *Harris*, um corante histológico amplamente utilizado, fornecido pela Merck, Darmstadt, Alemanha. Finalmente, as seções foram montadas em resina de microscopia, garantindo a preservação e a integridade das amostras para análises posteriores (POSSA *et al.*, 2012).

4.9. Análise Morfométrica

Para realizar a análise morfométrica, utilizamos um microscópio óptico equipado com um retículo de 50 linhas e 100 pontos. Esses pontos possuem uma área conhecida de $62500\mu\text{m}^2$ quando observados com uma ampliação de 400 x (WEIBEL, 2010). A técnica de contagem de pontos foi empregada para realizar a contagem dos septos alveolares. Para isso, sobrepôs-se o retículo nas regiões periféricas dos septos alveolares. Em cada campo selecionado, calculamos a razão entre o número de células positivas e o total de pontos nos septos alveolares. Realizamos a avaliação em 10 campos por animal, com uma ampliação de 1000x.

Essa abordagem permitiu uma análise detalhada da estrutura dos septos alveolares, fornecendo informações sobre a presença e distribuição de células positivas nessa região. Ao utilizar o retículo e a contagem de pontos, pudemos obter dados quantitativos e avaliar a densidade das células de interesse nos septos alveolares.

A ampliação de 1000x nos permitiu examinar as características microscópicas com maior detalhe, proporcionando uma visão mais precisa das células presentes nos septos alveolares. Ao avaliar 10 campos por animal, garantimos uma representatividade adequada e uma análise estatisticamente significativa dos dados obtidos (CAMARGO *et al.*, 2018).

Para a avaliação das vias aéreas, este retículo foi afixado na base do epitélio da via aérea e analisado em três campos ao redor de três vias aéreas de cada lâmina histológica. Para quantificar as células positivas, foi usada: a razão, entre o número de células positivas presentes na área do retículo e número de pontos que coincidiram com a área de tecido. A totalidade das análises foram realizadas com aumento de 1000x; unidade de medida $10^4\mu\text{m}^2$ (figura 6).

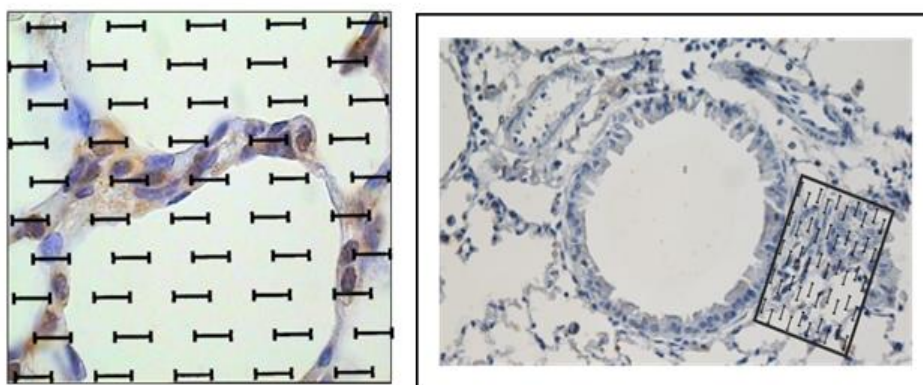


Figura 6 -Contagem de células positivas no septo alveolar e vias aéreas

4.10. Análise de Imagens

A análise do conteúdo de colágeno foi conduzida de forma precisa e minuciosa, utilizando um conjunto de equipamentos avançados. Para capturar as imagens necessárias, empregou-se uma câmera de alta resolução, modelo DFC 420, fabricada pela empresa Leica, sediada em Wetzlar, Alemanha. Essa

câmera foi habilmente acoplada a um microscópio óptico trinocular DM2500, proporcionando uma visualização clara e nítida das estruturas de interesse.

Com o intuito de processar as imagens de maneira eficiente e precisa, utilizou-se o software Image ProPlus 4.5, desenvolvido pelo renomado Instituto Nacional de Saúde (NIH), localizado em Bethesda, Maryland, nos Estados Unidos. Esse software é reconhecido pela sua capacidade de análise de imagens de alta qualidade, possibilitando uma análise detalhada e confiável do conteúdo de colágeno. O método empregado para a detecção das fibras colágenas foi baseado na medição da densidade óptica. O software *Image ProPlus* 4.5 permitiu estabelecer um limiar para identificar as áreas positivas, garantindo uma análise precisa e objetiva. Com base nesses parâmetros, foi possível quantificar as áreas positivas em relação à área total, fornecendo uma medida quantitativa do conteúdo de colágeno presente nos septos alveolares.

Visando uma avaliação abrangente e representativa, foram analisados dez campos dos septos alveolares em cada animal. Essa abordagem rigorosa assegurou uma amostragem adequada e a obtenção de resultados confiáveis. Os resultados foram expressos em forma de porcentagem da área positiva em relação à área total, permitindo uma compreensão mais clara e precisa do conteúdo de colágeno presente nas amostras analisadas (DOS SANTOS *et al.*, 2018; RIGHETTI *et al.*, 2014)

4.11. Medidas do Intercepto Linear Médio (Lm)

A análise microscópica envolveu o uso de um retículo específico composto por 50 linhas retas, observadas com uma ampliação de 200x. Os septos alveolares nas regiões mais externas foram analisados em 15 campos diferentes para cada lâmina. O retículo foi posicionado sobre os septos alveolares e o número de interseções entre as linhas e as paredes dos alvéolos foi contado. Dessa forma, o diâmetro médio dos alvéolos foi calculado levando

em consideração a área do septo alveolar e o número de interseções entre as linhas e o septo. Em seguida, o Lm foi determinado utilizando a fórmula: $Lm = 2500\mu\text{m} / \text{número médio de vezes que as interseções cruzaram as paredes alveolares}$.

Essa abordagem permitiu uma avaliação quantitativa da estrutura dos alvéolos e a determinação do tamanho médio dos mesmos. Ao contar as interseções entre as linhas e as paredes alveolares, pudemos obter uma medida objetiva do diâmetro médio dos alvéolos. A análise foi realizada em 15 campos diferentes para garantir uma representatividade adequada e uma análise estatisticamente significativa dos dados obtidos. Ao calcular o Lm, pudemos quantificar de forma precisa a distância média entre as paredes alveolares, fornecendo informações importantes sobre a estrutura e a organização dos alvéolos pulmonares.

A utilização do retículo específico e a contagem das interseções forneceram uma metodologia confiável e reproduzível para avaliar a estrutura dos alvéolos e obter medidas objetivas do diâmetro médio. (ALMEIDA-REIS *et al.*, 2017).

4.12. Análise do Particulado

A análise e caracterização do material particulado coletado foram conduzidas sob a responsabilidade da renomada Professora Christine Bourotte (Cidade Universitária, São Paulo-SP). Ela aplicou técnicas especializadas para avaliar as propriedades e características do material.

Para a coleta simultânea de material particulado atmosférico, utilizamos equipamentos de amostragem do tipo dicotômico. Esses dispositivos permitiram a captura de dois grupos distintos de partículas, sendo a fração fina (MP2,5) com diâmetro inferior a 2,5 μm e a fração grossa (MP2,5-10) com

diâmetro entre 2,5 μm e 10 μm . Filtros de policarbonato de 47 mm de diâmetro e poros de 8,0 μm e 0,4 μm foram empregados para coletar cada fração correspondente.

O processo de coleta foi realizado em dois locais distintos, a empresa e a ilha do Bói, durante intervalos de 24 horas. Essa abordagem nos permitiu obter dados representativos das características do material particulado nessas áreas específicas. Os filtros utilizados foram devidamente identificados e armazenados de forma adequada para preservar a integridade das amostras coletadas.

Além da coleta do material particulado atmosférico, também realizamos a coleta de poeira de rua, que serve como um indicador adicional das partículas presentes no ambiente. A poeira de rua é conhecida por acumular partículas atmosféricas provenientes de diferentes fontes, incluindo a deposição seca e úmida, bem como a ressuspensão de material previamente depositado. Utilizamos técnicas de varredura em uma área de 3m², empregando pincéis e escovas para coletar a poeira acumulada. O material coletado foi devidamente acondicionado em sacos plásticos identificados para preservar sua integridade durante o transporte e armazenamento.

4.13. Análise Estatística

A Para todas as análises estatísticas, utilizamos o Software Científico de Gráficos SigmaPlot R Versão 11.0. Realizamos uma análise de variância de um fator (ANOVA) seguida do método de *Holm-Sidak* para comparações múltiplas, a fim de avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados foram expressos como médias \pm erros padrão. Para verificar a correlação entre as variáveis, utilizamos a correlação de *Pearson*. Em todas as análises, consideramos um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da Mecânica Pulmonar (Verão)

A **Tabela 3** demonstra os resultados obtidos durante a avaliação da mecânica pulmonar durante o verão para Resistência do Sistema Respiratório (Rrs), Elastância do Sistema Respiratório (Ers), Resistência de Vias Aéreas (Raw), Resistência do Tecido Pulmonar (Gtis) e Elastância do Tecido Pulmonar (Htis).

Avaliação da Mecânica Pulmonar							
Verão	SAL	SAL L1	SAL L2		ELA	ELA L1	ELA L2
Rrs (cmH ₂ O.s.mL ⁻¹)	0,66 ±	0,80 ±	0,97 ±		1,01 ±	0,76 ±	0,80 ±
	0,02	0,05	0,08*		0,10*	0,04	0,01
Ers (cmH ₂ O.s.mL ⁻¹)	32,58 ±	35,86 ±	42,37 ±		39,73 ±	37,11 ±	38,59 ±
	1,49	3,52	2,15		3,20	3,65	1,83
Raw (cmH ₂ O.s.mL ⁻¹)	0,18 ±	0,28 ±	0,42 ±		0,50 ±	0,28 ±	0,31 ±
	0,02	0,02	0,09*		0,12	0,01	0,03
Gits (cmH ₂ O.s ⁽¹⁻ a).mL ⁻¹)	6,41 ±	6,80 ±	8,06 ±		6,05 ±	6,67 ±	6,94 ±
	0,53	0,68	0,29		0,45	0,56	0,31
Hits (cmH ₂ O.s ⁽¹⁻ a).mL ⁻¹)	33,30 ±	37,83 ±	40,71 ±		36,81 ±	42,95 ±	38,43 ±
	1,91	3,53	2,55		4,79	2,15	1,87

Tabela 3 – Avaliação da mecânica pulmonar no verão

Média ± erro padrão: *p<0.05 quando comparado ao grupo SAL.

A **Tabela 4** demonstra os resultados obtidos durante a avaliação da mecânica pulmonar durante o inverno.

Avaliação da Mecânica Pulmonar							
Inverno	SAL	SAL L1	SAL L2		ELA	ELA L1	ELA L2
Rrs ($\text{cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$)	0,67 ±	0,77 ±	0,70 ±		0,83 ±	0,66 ±	0,61 ±
	0,02	0,07	0,10		0,04	0,05	0,04
Ers ($\text{cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$)	32,75 ±	41,69 ±	37,91 ±		34,22 ±	38,92 ±	32,29 ±
	2,32	3,74	5,63		2,23	4,04	2,30
Raw ($\text{cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$)	0,18 ±	0,23 ±	0,27 ±		0,20 ±	0,17 ±	0,17 ±
	0,01	0,00	0,030*††,**		0,02	0,01	0,01
Gtis ($\text{cmH}_2\text{O.s}^{(f-)}$ a).mL^{-1})	7,15 ±	7,42 ±	6,23 ±		5,92 ±	6,42 ±	6,27 ±
	0,25	0,56	0,51		0,32	0,53	0,33
Htis ($\text{cmH}_2\text{O.s}^{(f-)}$ a).mL^{-1})	28,91 ±	38,83 ±	36,88 ±		39,57 ±	43,91 ±	39,30 ±
	3,23	2,84	3,25		3,36	3,70	3,10

Tabela 4 - Avaliação da mecânica pulmonar no inverno.

Média ± erro padrão: * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL; †† $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA L1; ** $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA L2.

5.1.1. Resistência do Sistema Respiratório (Rrs)

Na avaliação da resistência do sistema respiratório (Rrs) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve um aumento da Rrs nos grupos SAL L2 e ELA quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Não houve diferença entre os demais grupos. Já no inverno, não houve diferenças quando comparados os grupos SAL, SAL L1 e SAL L2. O mesmo ocorreu quando comparados os grupos ELA, ELA L1 e ELA L2.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($0,66 \pm 0,02 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$) e SAL inverno ($0,67 \pm 0,02 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$); SAL L1 verão ($0,80 \pm 0,05 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$) e SAL L1 inverno ($0,77 \pm 0,07 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$); SAL L2 verão ($0,97 \pm 0,08 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$) e SAL L2 inverno ($0,70 \pm 0,10 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$); ELA verão ($1,01 \pm 0,10 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$) e ELA inverno ($0,83 \pm 0,04 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$); ELA L1 verão ($0,76 \pm 0,04$

cmH₂O.s.mL⁻¹) e ELA L1 inverno (0,66 ± 0,05 cmH₂O.s.mL⁻¹); ELA L2 verão (0,80 ± 0,01 cmH₂O.s.mL⁻¹) e ELA L2 inverno (0,61 ± 0,04 cmH₂O.s.mL⁻¹).

5.1.2. Elastância do Sistema Respiratório (Ers)

Na avaliação da elastância do sistema respiratório (Ers) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão não houve diferenças quando comparados os grupos SAL, SAL L1 e SAL L2. O mesmo ocorreu quando comparados os grupos ELA, ELA L1 e ELA L2. Obtivemos os mesmos resultados no inverno.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos: SAL verão (32,58 ± 1,49 cmH₂O.s.mL⁻¹) e SAL inverno (32,75 ± 2,32 cmH₂O.s.mL⁻¹); SAL L1 verão (35,86 ± 3,52 cmH₂O.s.mL⁻¹) e SAL L1 inverno (41,69 ± 3,74 cmH₂O.s.mL⁻¹); SAL L2 verão (42,37 ± 2,15 cmH₂O.s.mL⁻¹) e SAL L2 inverno (37,91 ± 5,63 cmH₂O.s.mL⁻¹); ELA verão (39,73 ± 3,20 cmH₂O.s.mL⁻¹) e ELA inverno (34,22 ± 2,23 cmH₂O.s.mL⁻¹); ELA L1 verão (37,11 ± 3,65 cmH₂O.s.mL⁻¹) e ELA L1 inverno (38,92 ± 4,04 cmH₂O.s.mL⁻¹); ELA L2 verão (38,59 ± 1,83 cmH₂O.s.mL⁻¹) e ELA L2 inverno (32,29 ± 2,30 cmH₂O.s.mL⁻¹).

5.1.3. Resistência de Vias Aéreas (Raw)

Na avaliação da resistência de vias aéreas (Raw) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve um aumento da Raw no grupo ELA quando comparados ao grupo SAL (p≤0,05). Não houve diferenças entre os demais grupos.

No inverno observamos aumento da resistência de vias aéreas (Raw) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2. Houve um aumento da Raw no grupo SAL L2 quando comparados aos grupos SAL, ELA L1 e ELA L2 ($p \leq 0,05$). Não houve diferenças entre os demais grupos.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos: SAL verão ($0,18 \pm 0,01 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$) e SAL inverno ($0,18 \pm 0,01 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$) e SAL L1 verão ($0,28 \pm 0,02 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$) e SAL L1 inverno ($0,23 \pm 0,01 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$).

Observamos diferença da Raw na comparação verão e inverno nos grupos SAL L2 verão ($0,42 \pm 0,09 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$) e SAL L2 inverno ($0,27 \pm 0,03 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$); ELA verão ($0,50 \pm 0,12 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$) e ELA inverno ($0,20 \pm 0,01 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$); ELA L1 verão ($0,28 \pm 0,01 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$) e ELA L1 inverno ($0,17 \pm 0,01 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$); ELA L2 verão ($0,31 \pm 0,03 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$) e ELA L2 inverno ($0,17 \pm 0,01 \text{ cmH}_2\text{O.s.mL}^{-1}$) ($p \leq 0,05$).

5.1.4. Resistência do Tecido Pulmonar (Gtis)

Na avaliação da resistência do tecido pulmonar (Gtis) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão não houve diferenças quando comparados os grupos SAL, SAL L1 e SAL L2. O mesmo ocorreu quando comparados os grupos ELA, ELA L1 e ELA L2. Obtivemos os mesmos resultados no inverno

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos: SAL verão ($6,41 \pm 0,53 \text{ cmH}_2\text{O.s}^{(1-a)}\text{mL}^{-1}$) e SAL inverno ($7,15 \pm 0,25 \text{ cmH}_2\text{O.s}^{(1-a)}\text{mL}^{-1}$); SAL L1 verão ($6,80 \pm 0,68 \text{ cmH}_2\text{O.s}^{(1-a)}\text{mL}^{-1}$) e SAL L1 inverno ($7,42 \pm 0,56 \text{ cmH}_2\text{O.s}^{(1-a)}\text{mL}^{-1}$); SAL L2 verão ($8,06 \pm 0,29 \text{ cmH}_2\text{O.s}^{(1-a)}\text{mL}^{-1}$) e SAL L2 inverno ($6,23 \pm 0,51 \text{ cmH}_2\text{O.s}^{(1-a)}\text{mL}^{-1}$); ELA verão ($6,05 \pm 0,45 \text{ cmH}_2\text{O.s}^{(1-a)}\text{mL}^{-1}$) e ELA inverno ($5,92 \pm 0,32 \text{ cmH}_2\text{O.s}^{(1-a)}\text{mL}^{-1}$); ELA L1 verão

($6,67 \pm 0,56 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$) e ELA L1 inverno ($6,42 \pm 0,53 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$); ELA L2 verão ($6,94 \pm 0,31 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$) e ELA L2 inverno ($6,27 \pm 0,33 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$).

5.1.5. Elastância do Tecido Pulmonar (Htis)

Na avaliação da elastância do tecido pulmonar (Htis) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão não houve diferenças quando comparados os grupos SAL, SAL L1 e SAL L2. O mesmo ocorreu quando comparados os grupos ELA, ELA L1 e ELA L2. Obtivemos os mesmos resultados no inverno.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos: SAL verão ($33,30 \pm 1,91 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$) e SAL inverno ($28,91 \pm 3,23 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$); SAL L1 verão ($37,83 \pm 3,53 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$) e SAL L1 inverno ($38,83 \pm 2,84 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$); SAL L2 verão ($40,71 \pm 2,55 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$) e SAL L2 inverno ($36,88 \pm 3,25 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$); ELA verão ($36,81 \pm 4,79 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$) e ELA inverno ($39,57 \pm 3,36 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$); ELA L1 verão ($42,95 \pm 2,15 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$) e ELA L1 inverno ($43,91 \pm 3,70 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$); ELA L2 verão ($38,43 \pm 1,87 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$) e ELA L2 inverno ($39,30 \pm 3,10 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{s}^{(1-a)}\cdot\text{mL}^{-1}$).

5.2. Análise do Fluido do Lavado Broncoalveolar (FLBA)

A **Tabela 5** demonstra os resultados obtidos durante a avaliação do fluido do lavado broncoalveolar durante o verão para células totais, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos.

Fluido do Lavado Broncoalveolar (<i>cells/10⁴ml</i>)							
Verão	SAL	SAL L1	SAL L2		ELA	ELA L1	ELA L2
Células Totais	1,27 ±	0,79 ±	1,98 ±		3,43 ±	2,20 ±	2,20 ±
	0,11	0,29	0,50		0,47* [#]	0,35	0,48
Eosinófilos	0,00 ±	0,00 ±	0,00 ±		0,01 ±	0,04 ±	0,16 ±
	0,00	0,00	0,00		0,01	0,01	0,14
Neutrófilos	0,00 ±	0,00 ±	0,15 ±		0,15 ±	0,11 ±	0,02 ±
	0,00	0,00	0,01		0,15	0,09	0,01
Linfócitos	0,00 ±	0,01 ±	0,01 ±		0,13 ±	0,02 ±	0,04 ±
	0,00	0,01	0,00		0,07	0,01	0,01
Macrófagos	1,13 ±	0,87 ±	1,91 ±		3,29 ±	2,04 ±	2,14 ±
	0,15	0,27	0,49		0,42* [#]	0,30	0,46

Tabela 5 – Avaliação do fluido do lavado broncoalveolar no verão.

Média ± erro padrão: * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL; [#] $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L1.

A Tabela 6 demonstra os resultados obtidos durante a avaliação do fluido do lavado broncoalveolar durante o verão para células totais, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos

Fluido do Lavado Broncoalveolar (<i>cells/10⁴ml</i>)							
Inverno	SAL	SAL L1	SALL2		ELA	ELA L1	ELA L2
Células Totais	2.68 ±	3.03 ±	2.95 ±		4.02 ±	8.10 ±	8.82 ±
	0.17	0.89	0.68		0.51	1.75* ^{t,#,&}	1.69* ^{t,#,&}
Eosinófilos	0.00 ±	0.09 ±	0.04 ±		0.00 ±	0.00 ±	0.00 ±
	0.00	0.04* ^{t,tt,**}	0.01		0.00	0.00	0.00
Neutrófilos	0.02 ±	0.17 ±	0.08 ±		0.01 ±	0.00 ±	0.00 ±
	0.01	0.07* ^{t,tt,**}	0.01		0.00	0.00	0.00
Linfócitos	0.00 ±	0.12 ±	0.04 ±		0.05 ±	0.00 ±	0.00 ±
	0.00	0.04* ^{t,tt,**}	0.01		0.02	0.00	0.00
Macrófagos	2.65 ±	2.35 ±	2.78 ±		3.96 ±	8.12 ±	8.83 ±
	0.16	0.76	0.68		0.50	1.75* ^{t,#,&}	1.69* ^{t,#,&}

Tabela 6 - Avaliação do fluido do lavado broncoalveolar no inverno.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L2; †† $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA L1; ** $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA L2.

5.2.1.1. Análise das Células Totais

Na contagem das células totais presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L2, SAL L1, ELA, ELA L1, e ELA L2 no verão, houve aumento das células totais no grupo ELA ($3,43 \pm 0,47 \times 10^4$ células/ μ L) quando comparado aos grupos SAL e SAL L1 ($p \leq 0,05$).

No inverno observamos o aumento das células totais nos grupos ELA L1 ($8,10 \pm 1,75 \times 10^4$ células/ μ L) ELA L2 ($8,82 \pm 1,69 \times 10^4$ células/ μ L) quando comparados aos demais grupos, SAL, ELA, SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos ELA verão ($3,43 \pm 0,36 \times 10^4$ células/ μ L) e ELA inverno ($4,02 \pm 0,51 \times 10^4$ células/ μ L); SAL L2 verão ($1,98 \pm 0,50 \times 10^4$ células/ μ L) e SAL L2 inverno ($2,95 \pm 0,68 \times 10^4$ células/ μ L).

Observamos diferenças entre verão e inverno na contagem de células totais presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL verão ($1,27 \pm 0,11 \times 10^4$ células/ μ L) e SAL inverno ($2,68 \pm 0,17 \times 10^4$ células/ μ L); SAL L1 verão ($0,79 \pm 0,29 \times 10^4$ células/ μ L) e SAL L1 inverno ($3,03 \pm 0,89 \times 10^4$ células/ μ L); ELA L1 verão ($2,20 \pm 0,35 \times 10^4$ células/ μ L) e ELA L1 inverno ($8,10 \pm 1,75 \times 10^4$ células/ μ L); ELA L2 verão ($2,20 \pm 0,48 \times 10^4$ células/ μ L) e ELA L2 inverno ($8,82 \pm 1,69 \times 10^4$ células/ μ L) ($p \leq 0,05$).

5.2.1.2. Análise das Células Diferenciais

5.2.1.2.1. Eosinófilos

Na contagem dos eosinófilos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L2, SAL L1, ELA, ELA L1, e ELA L2 no verão não houve diferenças quando comparados os grupos SAL, SAL L1 e SAL L2. O mesmo ocorreu quando comparados os grupos ELA, ELA L1 e ELA L2.

No inverno observamos o aumento dos eosinófilos grupo SAL L1 ($0,9 \pm 0,04 \times 10^4$ células/ μ L) quando comparados aos grupos SAL, ELA, ELA L1 e ELA L2 ($p \leq 0,05$).

5.2.1.2.2. Neutrófilos

Na contagem dos neutrófilos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L2, SAL L1, ELA, ELA L1, e ELA L2 no verão não houve diferenças quando comparados os grupos SAL, SAL L1 e SAL L2. O mesmo ocorreu quando comparados os grupos ELA, ELA L1 e ELA L2.

No inverno observamos o aumento dos neutrófilos no grupo SAL L1 ($0,17 \pm 0,07 \times 10^4$ células/ μ L) quando comparados aos grupos SAL, ELA, ELA L1 e ELA L2 ($p \leq 0,05$).

5.2.1.2.3. Linfócitos

Na contagem dos linfócitos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L2, SAL L1, ELA, ELA L1, e ELA L2 no verão não houve diferenças quando comparados os grupos SAL, SAL L1 e SAL L2. O mesmo ocorreu quando comparados os grupos ELA, ELA L1 e ELA L2.

No inverno observamos o aumento dos linfócitos no grupo SAL L1 ($0,12 \pm 0,04 \times 10^4$ células/ μ L) quando comparados aos grupos SAL, ELA L1 e ELA L2 ($p \leq 0,05$).

5.2.1.2.4. Macrófagos

Na contagem dos macrófagos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L2, SAL L1, ELA, ELA L1, e ELA L2 no verão houve aumento dos macrófagos no grupo ELA ($3,29 \pm 0,42 \times 10^4$ células/ μ L) quando comparado aos grupos SAL e SAL L1 ($p \leq 0,05$).

No inverno observamos o aumento dos macrófagos nos grupos ELA L1 ($8,12 \pm 1,75 \times 10^4$ células/ μ L) ELA L2 ($8,83 \pm 1,69 \times 10^4$ células/ μ L) quando comparados aos demais grupos, SAL, ELA, SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos ELA verão ($3,29 \pm 0,42 \times 10^4$ células/ μ L) e ELA inverno ($3,96 \pm 0,50 \times 10^4$ células/ μ L); SAL L2 verão ($1,91 \pm 0,49 \times 10^4$ células/ μ L) e SAL L2 inverno ($2,78 \pm 0,68 \times 10^4$ células/ μ L).

Observamos diferenças entre verão e inverno na contagem de macrófagos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL verão ($1,13 \pm 0,15 \times 10^4$ células/ μ L) e SAL inverno ($2,65 \pm 0,16 \times 10^4$ células/ μ L); SAL L1 verão ($0,87 \pm 0,27 \times 10^4$ células/ μ L) e SAL L1 inverno ($2,35 \pm 0,76$

células. 10^4 células/ μ L); ELA L1 verão ($2,04 \pm 0,30 \times 10^4$ células/ μ L) e ELA L1 inverno ($8,12 \pm 1,75 \times 10^4$ células/ μ L); ELA L2 verão ($2,14 \pm 0,46 \times 10^4$ células/ μ L) e ELA L2 inverno ($8,83 \pm 1,69 \times 10^4$ células/ μ L) ($p \leq 0,05$).

5.3. Intercepto Linear Médio (LM)

A **Figura 7** demonstra o Intercepto linear médio (LM) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve um aumento do LM nos grupos ELA, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL, SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

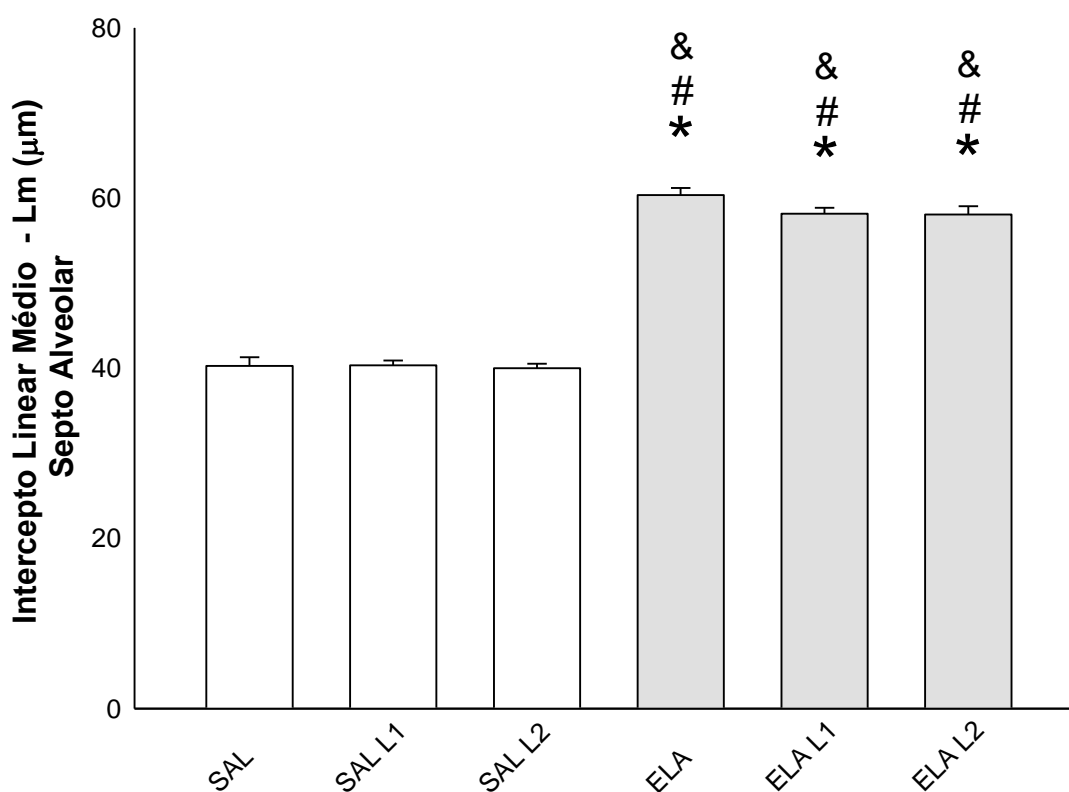


Figura 7 - Avaliação do Intercepto linear médio (μ m) no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1; & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

A **Figura 8** demonstra o Intercepto linear médio (LM) nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no inverno houve um aumento do LM nos grupos ELA, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL, SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

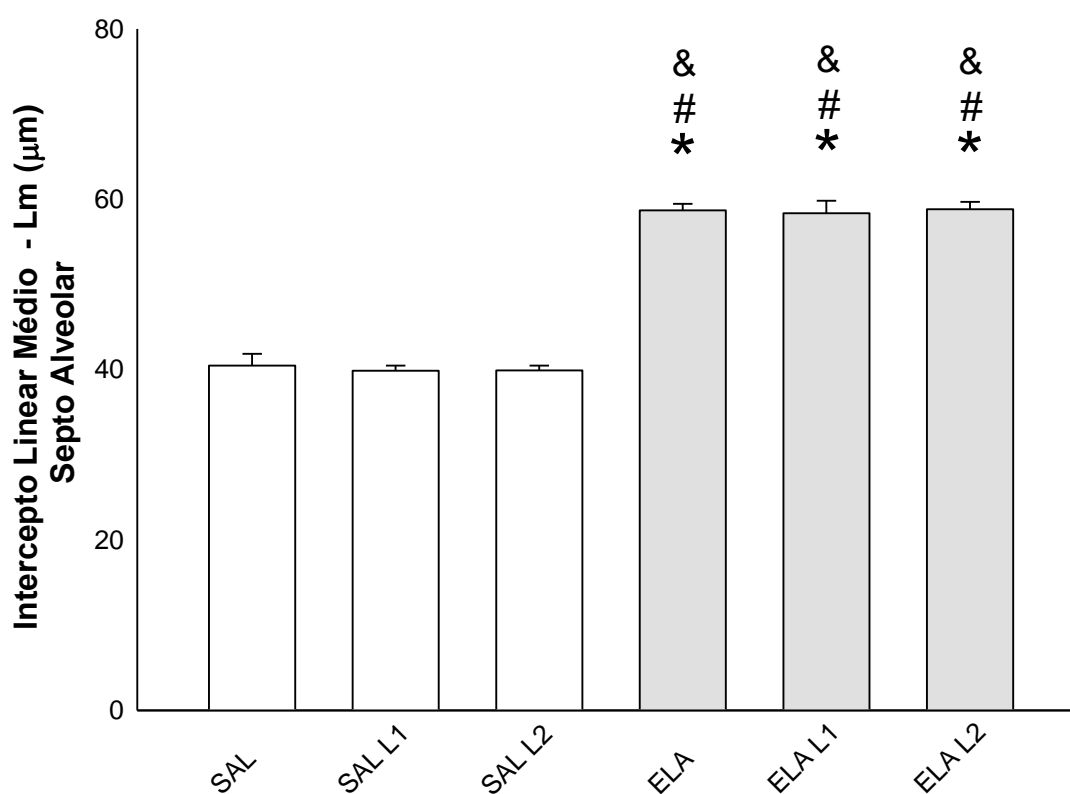


Figura 8 - Avaliação do Intercepto linear médio (μm) no inverno.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L2; †† $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA L1; ** $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA L2.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($40,26 \pm 1,02 \mu\text{m}$) e SAL inverno ($40,47 \pm 0,14 \mu\text{m}$); SAL L1 verão ($40,34 \pm 0,56 \mu\text{m}$) e SAL L1 inverno ($39,86 \pm 0,61 \mu\text{m}$); SAL L2 verão ($39,99 \pm 0,53 \mu\text{m}$) e SAL L2 inverno ($39,91 \pm 0,57 \mu\text{m}$); ELA verão ($60,35 \pm 0,84 \mu\text{m}$) e ELA inverno ($58,69 \pm 0,79 \mu\text{m}$); ELA L1 verão ($58,17 \pm 0,70 \mu\text{m}$) e ELA L1 inverno ($58,36 \pm 1,45 \mu\text{m}$); ELA L2 verão ($58,07 \pm 0,96 \mu\text{m}$) e ELA L2 inverno ($58,83 \pm 0,87 \mu\text{m}$).

5.4. Análise Morfométrica

5.4.1. Marcadores Inflamatórios

A **Tabela 7** demonstra os resultados obtidos durante a análise morfométrica dos marcados inflamatórios durante o verão para interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), Interleucina 17 (IL-17), fator de necrose tumoral (TNF- α) e elastase neutrofílica nos septos alveolares.

Marcadores Inflamatórios ($\text{cells}/10^4 \mu\text{m}^2$)						
Verão	SAL	SAL L1	SAL L2	ELA	ELA L1	ELA L2
IL- 1 β	1,79 \pm 0,12	8,23 \pm 0,55*†	8,33 \pm 0,53*†	3,82 \pm 0,37*	14,10 \pm 0,73*†, #, &	13,82 \pm 0,77*†, #, &
IL- 6	4,38 \pm 0,68	37,25 \pm 0,93*†	36,33 \pm 0,87*†	12,21 \pm 0,63*	42,27 \pm 0,71*†, #, &	43,11 \pm 0,66*†, #, &
IL- 10	7,25 \pm 0,54	38,89 \pm 0,80*†	41,90 \pm 0,30*†, #	15,67 \pm 1,18*	48,38 \pm 0,42*†, #, &	48,37 \pm 0,84*†, #, &
IL- 17	6,52 \pm 0,18	25,31 \pm 1,93*†	28,04 \pm 1,38*†	14,58 \pm 1,69*	44,40 \pm 1,65*†, #, &	44,26 \pm 1,48*†, #, &
TNF - α	2,02 \pm 0,22	44,39 \pm 0,60*†	44,82 \pm 0,57*†	4,91 \pm 0,51*	50,55 \pm 0,86*†, #, &	50,72 \pm 0,83*†, #, &
Elastase. Neutrofílica	3,97 \pm 0,40	9,67 \pm 0,59*†	9,97 \pm 1,16*†	6,63 \pm 0,61*	13,11 \pm 0,53*†, #, &	12,63 \pm 0,48*†, #, &

Tabela 7 – Marcadores inflamatórios no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L2; †† $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA L1; ** $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA L2.

A **Tabela 8** demonstra os resultados obtidos durante a análise morfométrica dos marcadores inflamatórios durante o inverno para interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 17 (IL-17), fator de necrose tumoral (TNF- α) e elastase neutrofílica nos septos alveolares.

Marcadores Inflamatórios ($cells/10^4 \mu m^2$)						
Inverno	SAL	SAL L1	SAL L2	ELA	ELA L1	ELA L2
IL- 1 β	1,71 \pm 0,17	8,52 \pm 0,33*†	8,84 \pm 0,78*†	4,02 \pm 0,23*	13,68 \pm 0,65 *†,#,&	14,53 \pm 0,69*†,#,&
IL- 6	4,16 \pm 0,64	36,84 \pm 1,21*†	35,81 \pm 1,11*†	12,63 \pm 0,73*	44,00 \pm 1,51*†,#,&	44,88 \pm 1,96*†,#,&
IL- 10	6,91 \pm 0,59	39,77 \pm 1,17*†	42,42 \pm 0,97*†	15,42 \pm 1,15*	47,06 \pm 0,79*†,#,&	49,81 \pm 1,11*†,#,&
IL- 17	7,22 \pm 0,17	22,87 \pm 0,58*†	24,88 \pm 1,26*†	14,65 \pm 0,12*	43,44 \pm 2,55*†,#,&	41,98 \pm 0,57*†,#,&
TNF – α	2,19 \pm 0,27	44,47 \pm 0,49*†	44,09 \pm 0,59*†	4,29 \pm 0,60*	50,20 \pm 0,76*†,#,&	51, 35 \pm 0,61*†,#,&
Elastase. Neutrofílica	3,85 \pm 0,25	8,45 \pm 0,33*	8,72 \pm 1,05*	6,26 \pm 0,54*	12,21 \pm 0,72*†,#,&	12,37 \pm 1,03*†,#,&

Tabela 8 - Marcadores inflamatórios no inverno

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

5.4.1.1. Expressão celular de interleucina 1 β (IL-1 β)

A **Figura 9** demonstra o número de células positivas para IL-1 β presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve aumento da quantidade de células positivas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento da quantidade de células positivas para IL-1 β nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

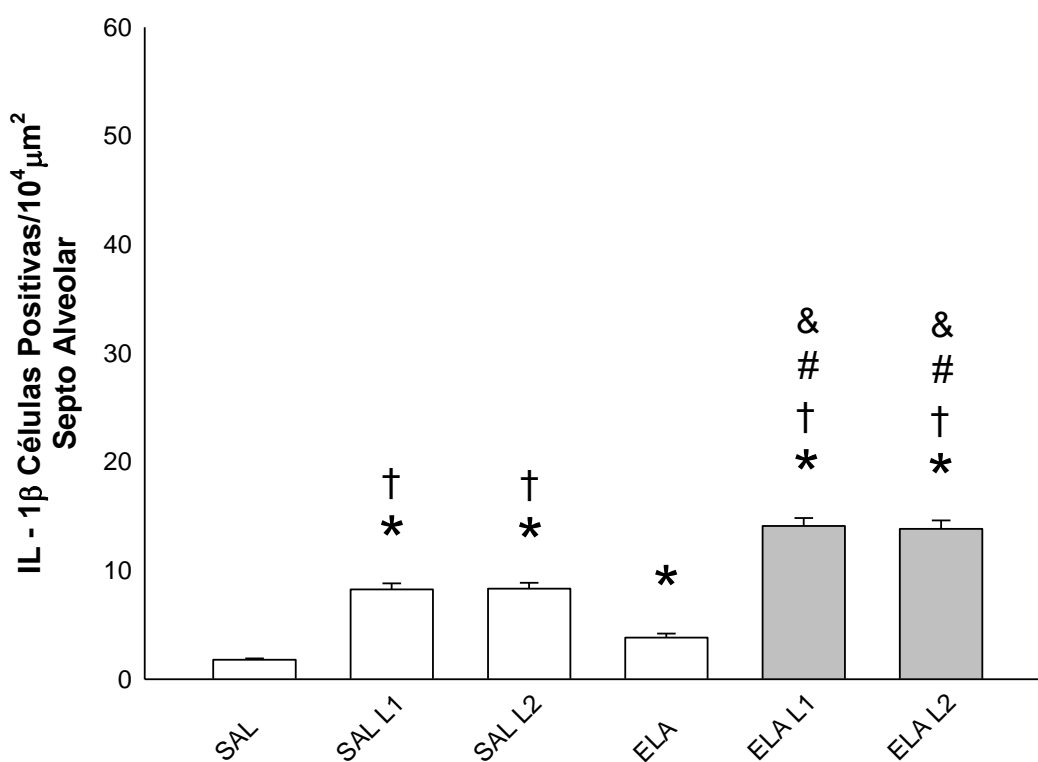


Figura 9 - Avaliação do número de células positivas para IL-1 β nos septos alveolares no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Os resultados da contagem de células positivas para IL-1 β presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 10**. Observamos aumento da quantidade de células positivas para IL-1 β nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento na quantidade de células positivas para IL-1 β nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

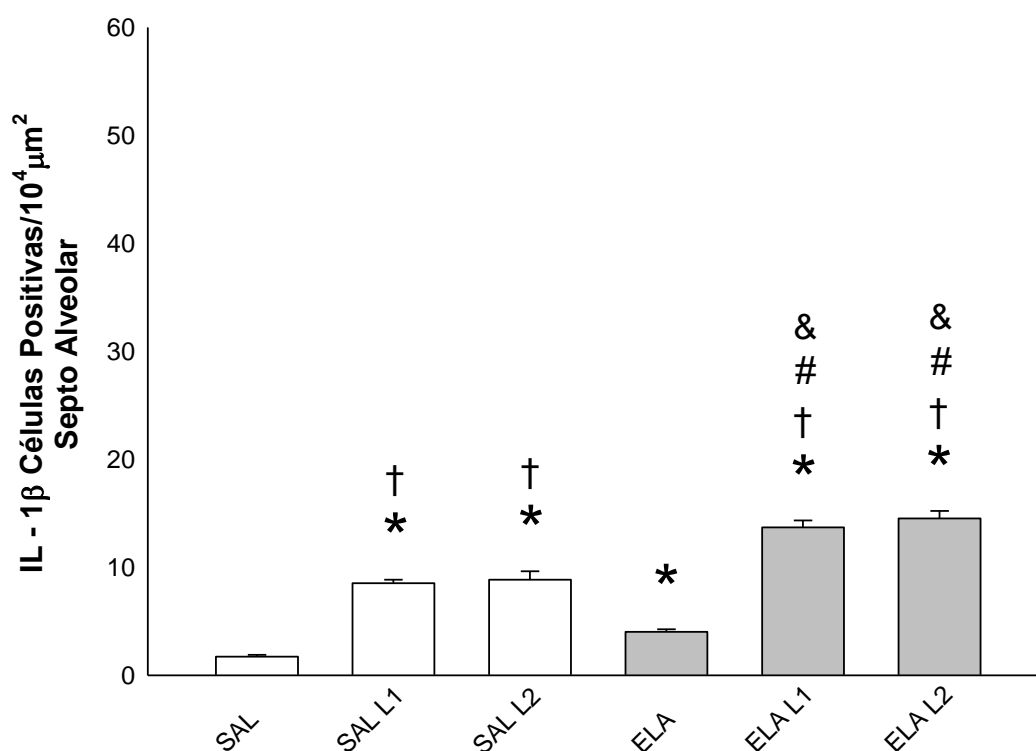


Figura 10 - Avaliação do número de células positivas para IL-1 β nos septos alveolares no inverno.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($2,02 \pm 0,22$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e SAL inverno ($2,10 \pm 0,27$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); SAL L1 verão ($44,39 \pm 0,60$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e SAL L1 inverno ($44,51 \pm 0,49$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); SAL L2 verão ($44,82 \pm 0,57$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e SAL L2 inverno ($44,76 \pm 0,58$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); ELA verão ($4,21 \pm 0,50$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA inverno ($4,70 \pm 0,60$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); ELA L1 verão ($50,33 \pm 0,86$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA L1 inverno ($50,60 \pm 0,76$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); ELA L2 verão ($50,72 \pm 0,82$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA L2 inverno ($52,13 \pm 0,61$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$).

5.4.1.2. Expressão celular de interleucina 6 (IL-6)

A **Figura 11** demonstra o número de células positivas para IL-6 presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve aumento da quantidade células positivas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento da quantidade células positivas para IL-6 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

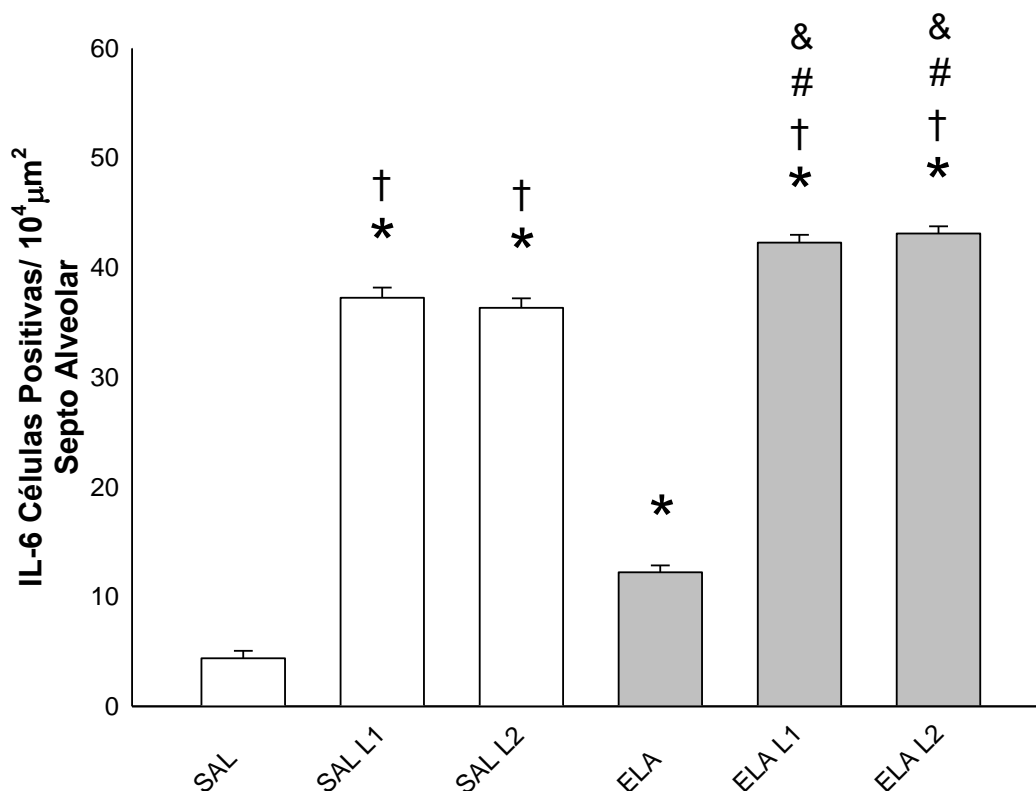


Figura 11 - Avaliação do número de células positivas para IL-6 nos septos alveolares no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Os resultados da contagem de células positivas para IL-6 presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 12**. Observamos aumento da quantidade de células positivas para IL-6 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento na quantidade de células positivas para IL-6 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1, e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

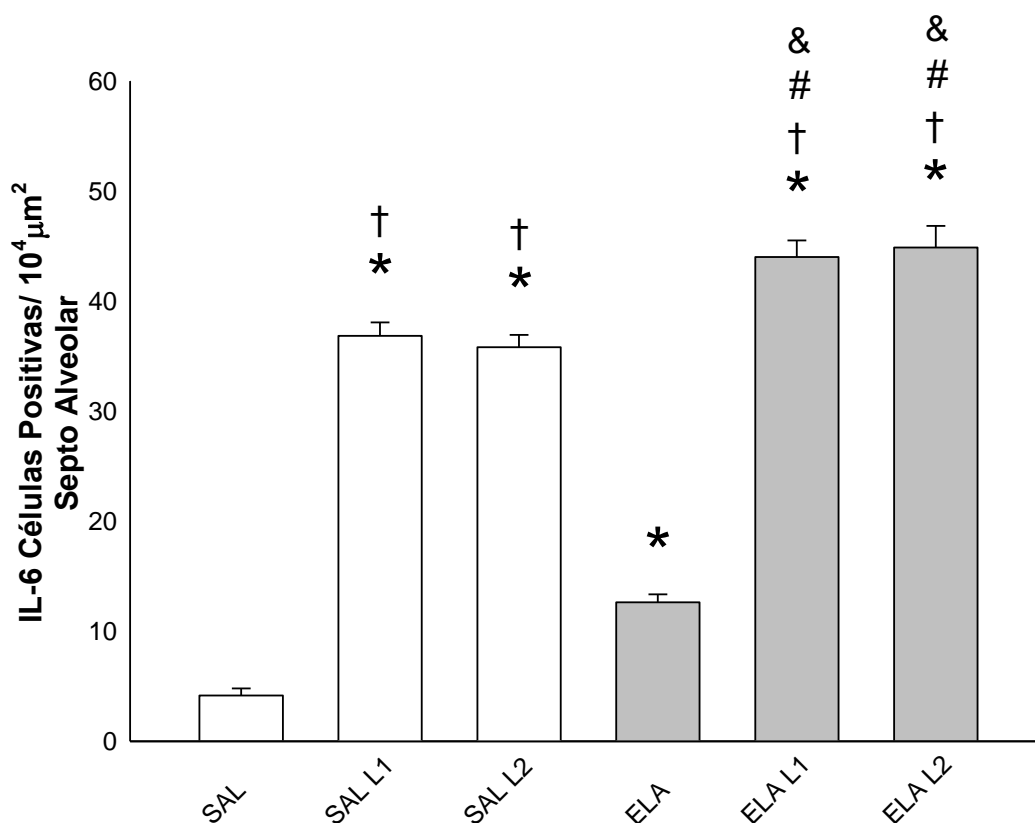


Figura 12 - Avaliação do número de células positivas para IL-6 nos septos alveolares no inverno.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($4,38 \pm 0,68$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL inverno ($4,16 \pm 0,64$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); SAL L1 verão ($37,25 \pm 0,93$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L1 inverno ($36,84 \pm 1,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); SAL L2 verão ($36,33 \pm 0,87$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 inverno ($35,81 \pm 1,11$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA verão ($12,21 \pm 0,63$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA inverno ($12,63 \pm 0,73$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA L1 verão ($42,27 \pm 0,71$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA L1 inverno ($44,00 \pm 1,51$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA L2 verão ($43,11 \pm 0,66$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA L2 inverno ($44,88 \pm 1,96$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$).

5.4.1.3. Expressão celular de interleucina 10 (IL-10)

A **Figura 13** demonstra o número de células positivas para IL-10 presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve aumento da quantidade de células positivas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento da quantidade de células positivas para IL-10 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo SAL L1 e aumento nas células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo SAL L2 ($p \leq 0,05$).

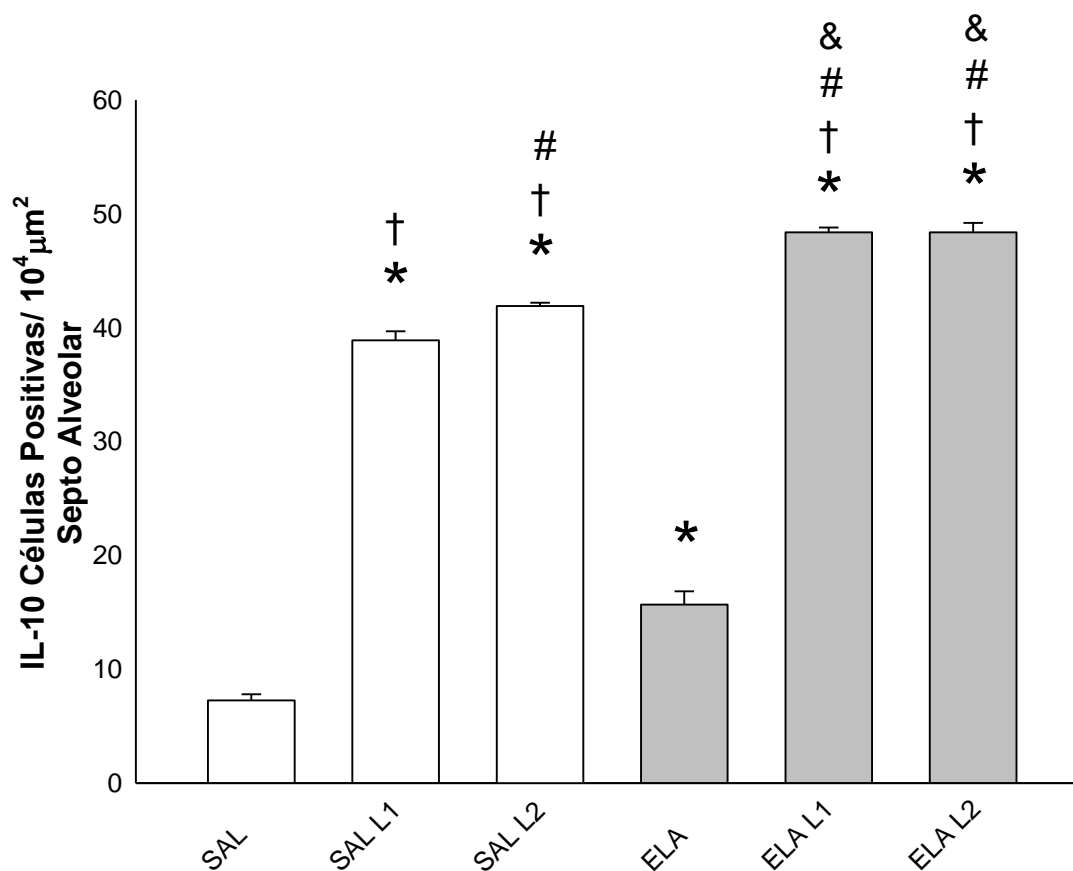


Figura 13 - Avaliação do número de células positivas para IL-10 nos septos alveolares no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Os resultados da contagem de células positivas para IL-10 presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 14**. Observamos aumento da quantidade de células positivas para IL-10 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento na quantidade de células positivas para IL-10 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

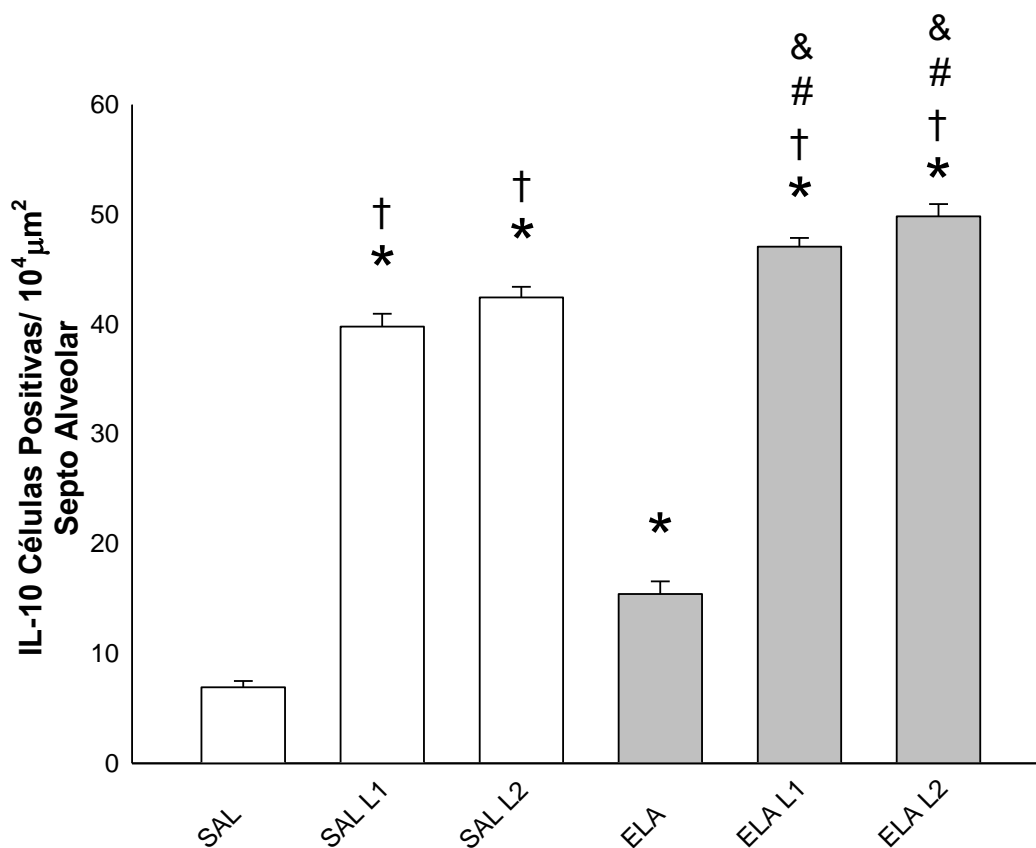


Figura 14 - Avaliação do número de células positivas para IL-10 nos septos alveolares no inverno.

*Média ± erro padrão: *p≤0.05 quando comparado ao grupo SAL; †p≤0.05 quando comparado ao grupo ELA; #p≤0.05 quando comparado ao grupo SAL L1 &p≤0.05 quando comparado ao grupo SAL L2.;*

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($7,25 \pm 0,54$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e SAL inverno ($6,91 \pm 0,59$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); SAL L1 verão ($38,89 \pm 0,80$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e SAL L1 inverno ($39,77 \pm 1,17$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); SAL L2 verão ($41,90 \pm 0,30$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e SAL L2 inverno ($42,42 \pm 0,97$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); ELA verão ($15,67 \pm 1,69$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA inverno ($15,42 \pm 1,15$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); ELA L1 verão ($48,38 \pm 0,42$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA L1 inverno ($47,06 \pm 0,79$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); ELA L2 verão ($48,37 \pm 0,84$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA L2 inverno ($49,81 \pm 1,11$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$).

5.4.1.4. Expressão celular de interleucina 17 (IL-17)

A **Figura 15** demonstra o número de células positivas para IL-17 presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L2, SAL L1, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve aumento da quantidade de células positivas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento da quantidade de células positivas para IL-17 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

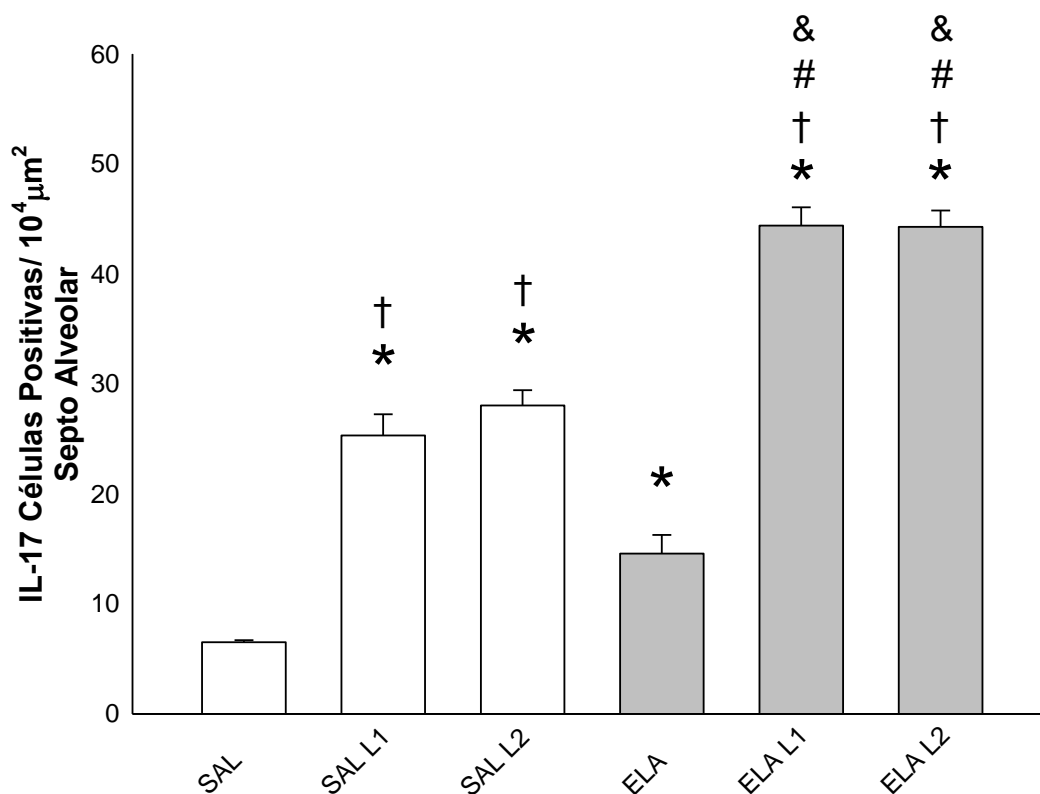


Figura 15 - Avaliação do número de células positivas para IL-17 nos septos alveolares no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Os resultados da contagem de células positivas para IL-17 presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 16**. Observamos aumento da quantidade de células positivas para IL-17 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1, e ELA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento na quantidade de células positivas para IL-17 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

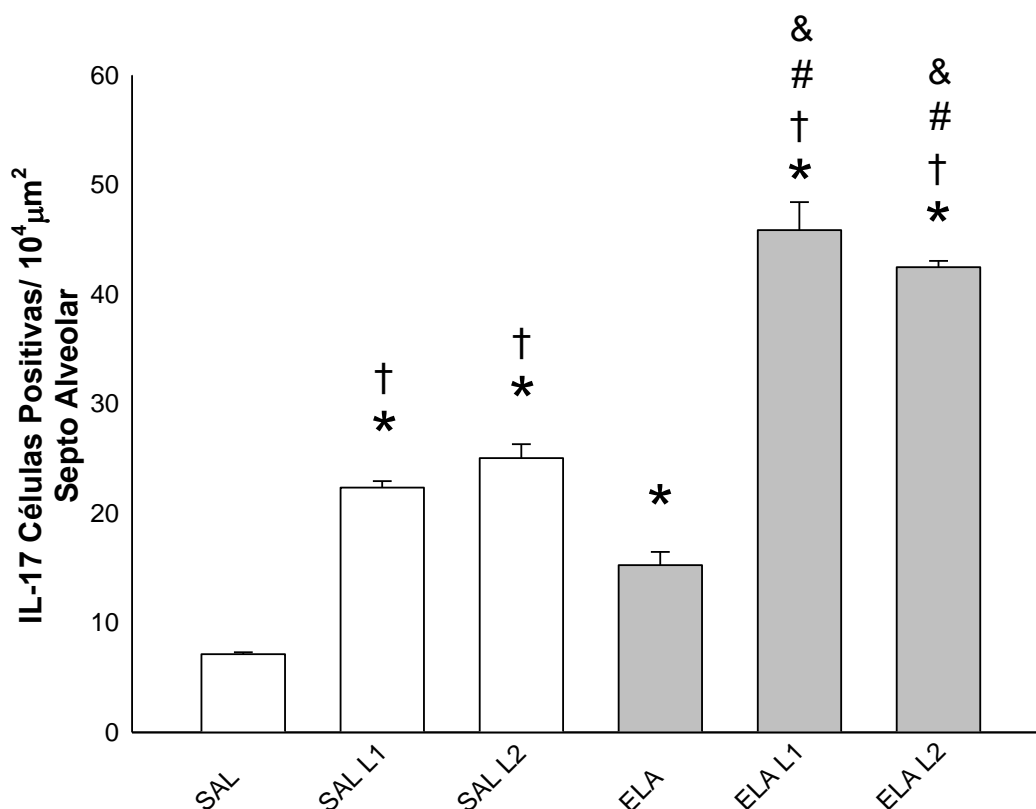


Figura 16 - Avaliação do número de células positivas para IL-17 no septo alveola no inverno.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($6,52 \pm 0,18$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL inverno ($7,22 \pm 0,17$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); SAL L1 verão ($25,31 \pm 1,93$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L1 inverno ($22,87 \pm 0,58$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); SAL L2 verão ($28,04 \pm 1,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 inverno ($24,88 \pm 1,26$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA verão ($14,58 \pm 1,69$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA inverno ($14,65 \pm 0,12$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA L1 verão ($44,40 \pm 1,65$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA L1 inverno ($43,44 \pm 2,55$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA L2 verão ($44,26 \pm 1,48$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA L2 inverno ($41,98 \pm 0,57$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$).

5.4.1.5. Expressão celular de fator de necrose tumoral (TNF- α)

A **Figura 17** demonstra o número de células positivas para TNF- α presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve aumento da quantidade de células positivas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento da quantidade de células positivas para TNF- α nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

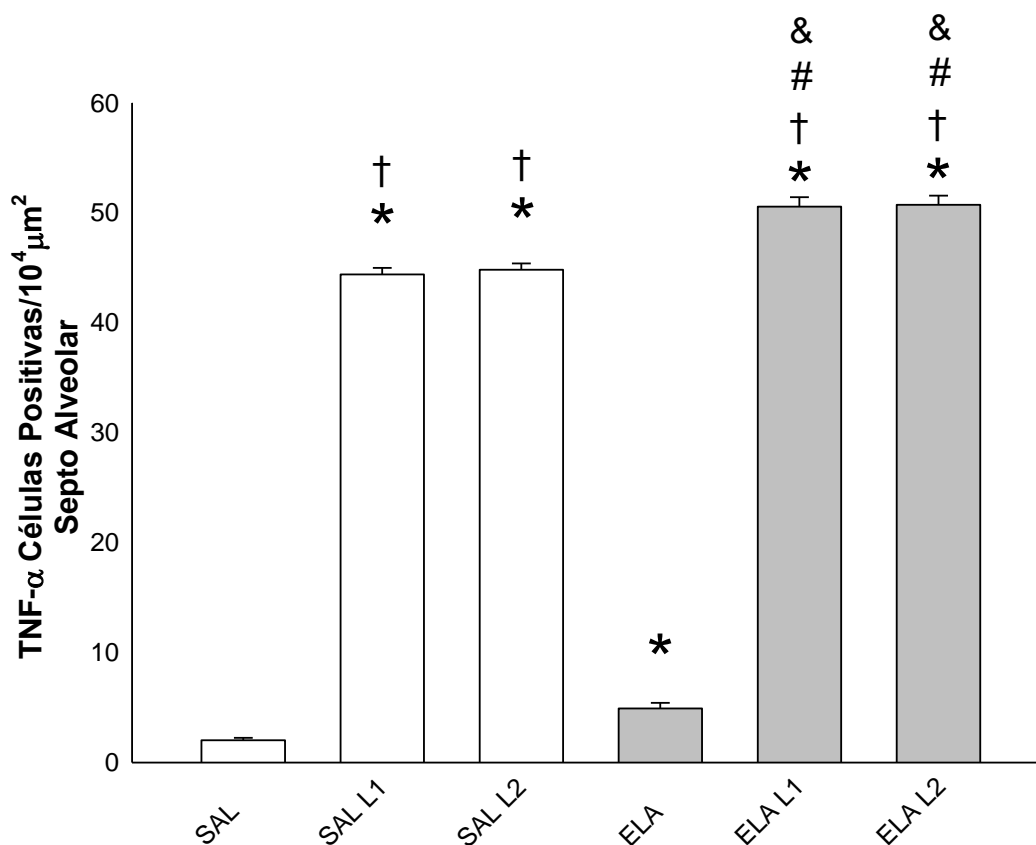


Figura 17 - Avaliação do número de células positivas para TNF- α nos septos alveolares no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Os resultados da contagem de células positivas para TNF- α presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 18**. Observamos aumento da quantidade de células positivas para TNF- α nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento na quantidade de células positivas para TNF- α nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

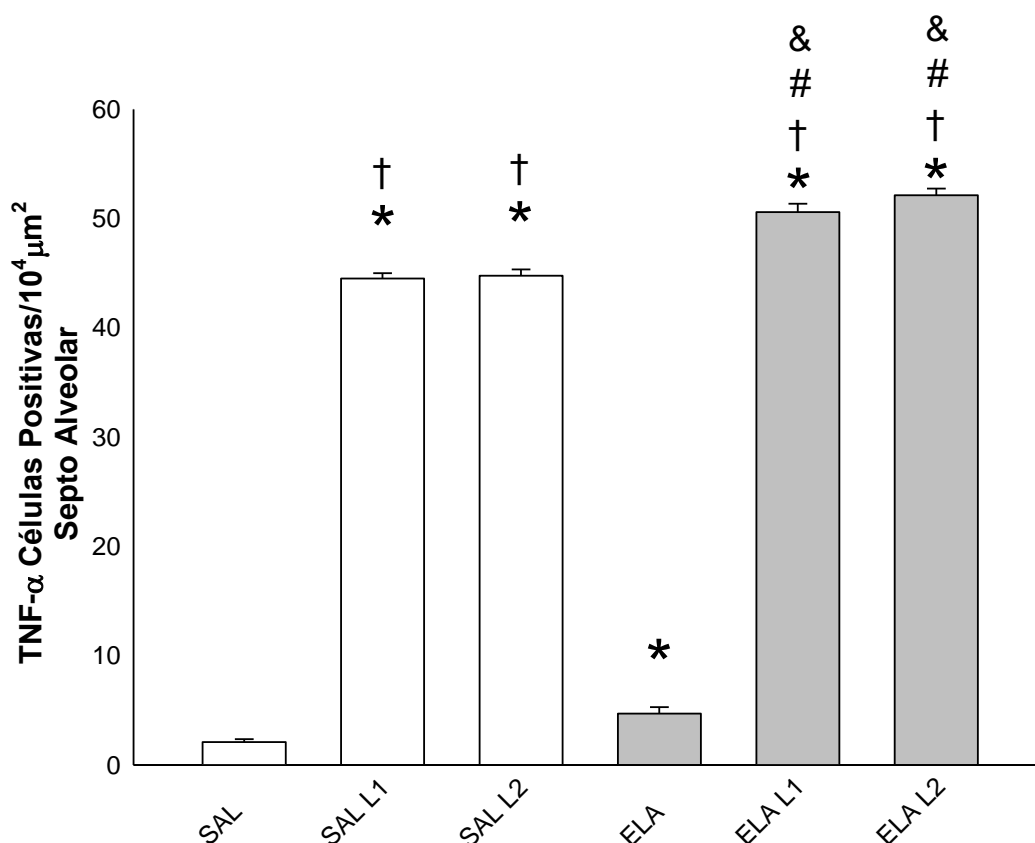


Figura 18 - Avaliação do número de células positivas para TNF- α nos septos alveolares no inverno.

*Média ± erro padrão: *p≤0.05 quando comparado ao grupo SAL; †p≤0.05 quando comparado ao grupo ELA; #p≤0.05 quando comparado ao grupo SAL L1 &p≤0.05 quando comparado ao grupo SAL L2.*

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($2,02 \pm 0,22$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e SAL inverno ($2,19 \pm 0,27$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); SAL L1 verão ($44,39 \pm 0,60$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e SAL L1 inverno ($44,47 \pm 0,49$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); SAL L2 verão ($44,82 \pm 0,57$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e SAL L2 inverno ($44,09 \pm 0,59$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); ELA verão ($4,91 \pm 0,51$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA inverno ($4,29 \pm 0,60$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); ELA L1 verão ($50,55 \pm 0,86$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA L1 inverno ($50,20 \pm 0,76$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); ELA L2 verão ($50,72 \pm 0,83$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA L2 inverno ($51,35 \pm 0,61$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$).

5.4.1.6. Elastase neutrofílica

A **Figura 19** demonstra o número de células positivas para elastase neutrofílica presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve aumento da quantidade de células positivas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento da quantidade de células positivas para elastase neutrofílica nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

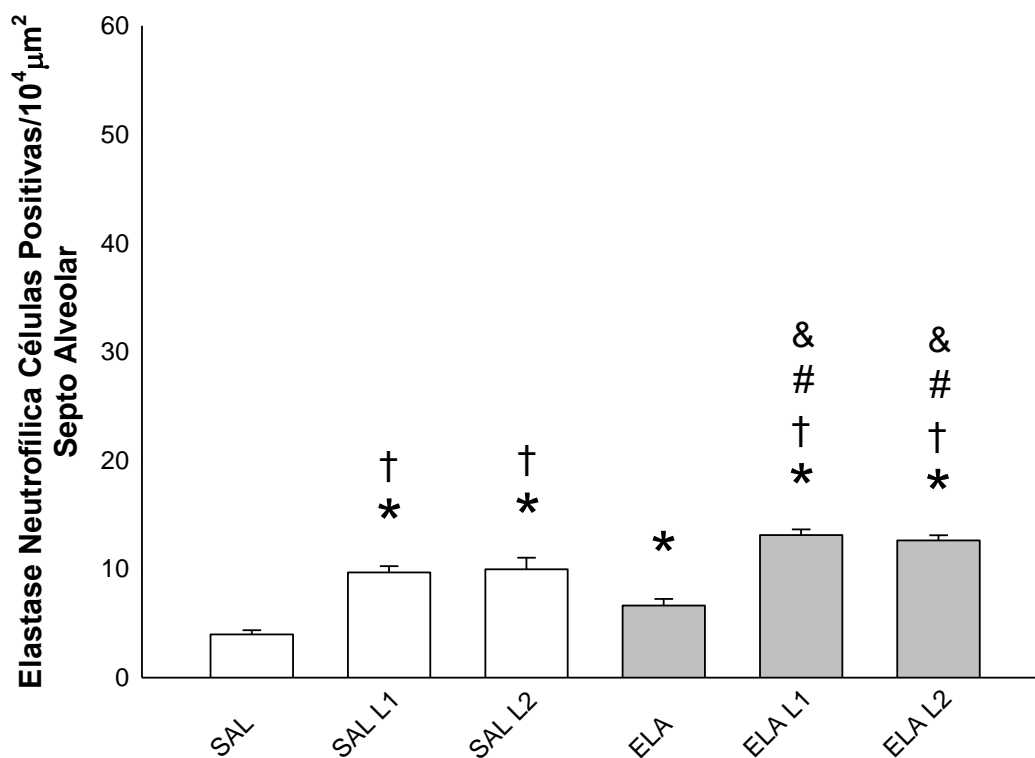


Figura 19 - Avaliação do número de células positivas para elastase neutrófila nos septos alveolares no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Os resultados da contagem de células positivas para elastase neutrófila presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 20**. Observamos aumento da quantidade de células positivas para elastase neutrófila nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento na quantidade de células positivas para elastase neutrófila nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos ELA, SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

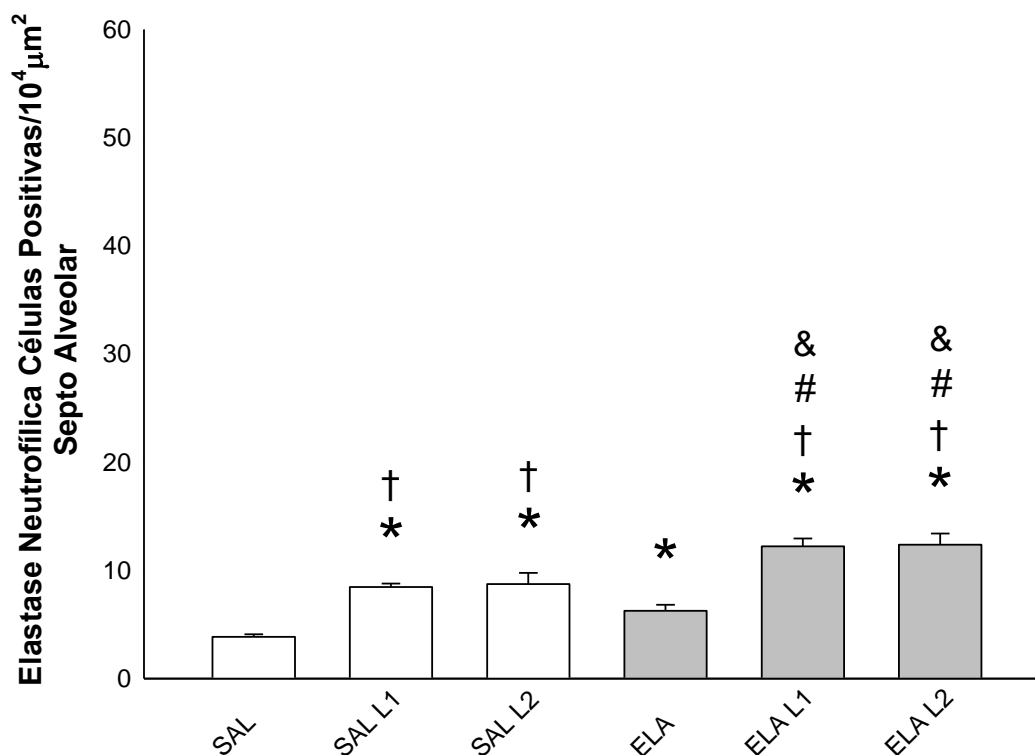


Figura 20 - Avaliação do número de células positivas para elastase neutrofílica nos septos alveolares no inverno.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0.05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($3,97 \pm 0,04$ células/10⁴μm²) e SAL inverno ($3,85 \pm 0,25$ células/10⁴μm²); SAL L1 verão ($9,67 \pm 0,59$ células/10⁴μm²) e SAL L1 inverno ($8,45 \pm 0,33$ células/10⁴μm²); SAL L2 verão ($9,97 \pm 0,59$ células/10⁴μm²) e SAL L2 inverno ($8,72 \pm 1,05$ células/10⁴μm²); ELA verão ($6,63 \pm 0,64$ células/10⁴μm²) e ELA inverno ($6,26 \pm 0,54$ células/10⁴μm²); ELA L1 verão ($13,11 \pm 0,53$ células/10⁴μm²) e ELA L1 inverno ($12,21 \pm 0,72$ células/10⁴μm²); ELA L2 verão ($12,63 \pm 0,48$ células/10⁴μm²) e ELA L2 inverno ($12,37 \pm 1,03$ células/10⁴μm²).

5.4.2. Remodelamento

A **Tabela 9** demonstra os resultados obtidos durante a análise morfológica dos marcadores de remodelamento durante o verão para Inibidor tecidual de metaloproteinases da matriz 1 (TIMP-1), metaloproteinase 9 (MMP-9) metaloproteinase 12 (MMP-12), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e fibras colágenas nos septos alveolares.

Remodelamento (10 ⁴ cells/mL)						
Verão	SAL	SAL L1	SAL L2	ELA	ELA L1	ELA L2
TIMP-1	2,55 ± 0,47	16,46 ± 1,06*†	20,12 ± 2,38*†	3,49 ± 0,61	52,94 ± 1,85*†, #, &	57,35 ± 1,17*†, #, &
MMP-9	10,48 ± 0,45	35,30 ± 1,80*†	36,95 ± 0,69*†	18,69 ± 1,24*	51,69 ± 2,41*†, #, &	54,09 ± 2,42*†, #, &
MMP-12	6,29 ± 0,69	36,23 ± 1,07*†	35,48 ± 1,42*†	11,97 ± 0,93*	49,06 ± 0,74*†, #, &	50,53 ± 0,86*†, #, &
TGF- β	1,85 ± 0,25	39,80 ± 0,82*†	40,46 ± 0,75*†	6,97 ± 0,74*	45,28 ± 0,77*†, #, &	46,76 ± 0,50*†, #, &
Fibras Colágenas (%)	6,32 ± 0,90	20,18 ± 1,35*†	18,88 ± 1,73*†	11,61 ± 1,09*	25,79 ± 0,95*†, #, &	26,77 ± 1,40*†, #, &

Tabela 9 – Remodelamento no verão.

Média ± erro padrão: *p<0.05 quando comparado ao grupo SAL; †p<0.05 quando comparado ao grupo ELA; #p<0.05 quando comparado ao grupo SAL L1 &p<0.05 quando comparado ao grupo SAL L2.

A **Tabela 10** demonstra os resultados obtidos durante a análise morfológica dos marcadores de remodelamento durante o verão para Inibidor tecidual de metaloproteínas da matriz 1 (TIMP-1), metaloproteínase 9 (MMP-9) metaloproteínase 12 (MMP-12), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e fibras colágenas nos septos alveolares.

Remodelamento (10 ⁴ cells/mL)						
Inverno	SAL	SAL L1	SAL L2	ELA	ELA L1	ELA L2
TIMP-1	3,66 ±	17,05 ±	22,72 ±	4,40 ±	52,55 ±	57,22 ±
	0,85	1,21*†	3,15*†	0,60	1,33*†, #, &	1,23*†, #, &
MMP-9	10,76 ±	33,70 ±	37,59 ±	18,50 ±	50,07 ±	49,37 ±
	0,91	1,32*†	1,78*†	1,41*	1,84*†, #, &	0,99*†, #, &
MMP-12	6,36 ±	36,52 ±	35,79 ±	12,16 ±	50,54 ±	51,04 ±
	0,61	0,93*†	1,07*†	1,05*	1,61*†, #, &	1,00*†, #, &
TGF- β	1,95 ±	39,54 ±	40,16 ±	7,76 ±	45,43 ±	45,67 ±
	0,21	0,71*†	0,44*†	0,57*	0,58*†, #, &	0,46*†, #, &
Fibras Colágenas (%)	6,37 ±	20,71 ±	20,15 ±	11,97 ±	25,49 ±	27,07 ±
	0,92	1,23*†	1,87*†	0,73*	0,56*†, #, &	1,32*†, #, &

Tabela 10 - Remodelamento no inverno.

Média ± erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

5.4.2.1. Expressão celular do inibidor tecidual de metaloproteínas da matriz 1 (TIMP-1)

A **Figura 21** demonstra o número de células positivas para TIMP-1 presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve aumento da quantidade de células positivas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL

($p \leq 0,05$). Observamos também aumento da quantidade de células positivas para TIMP-1 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

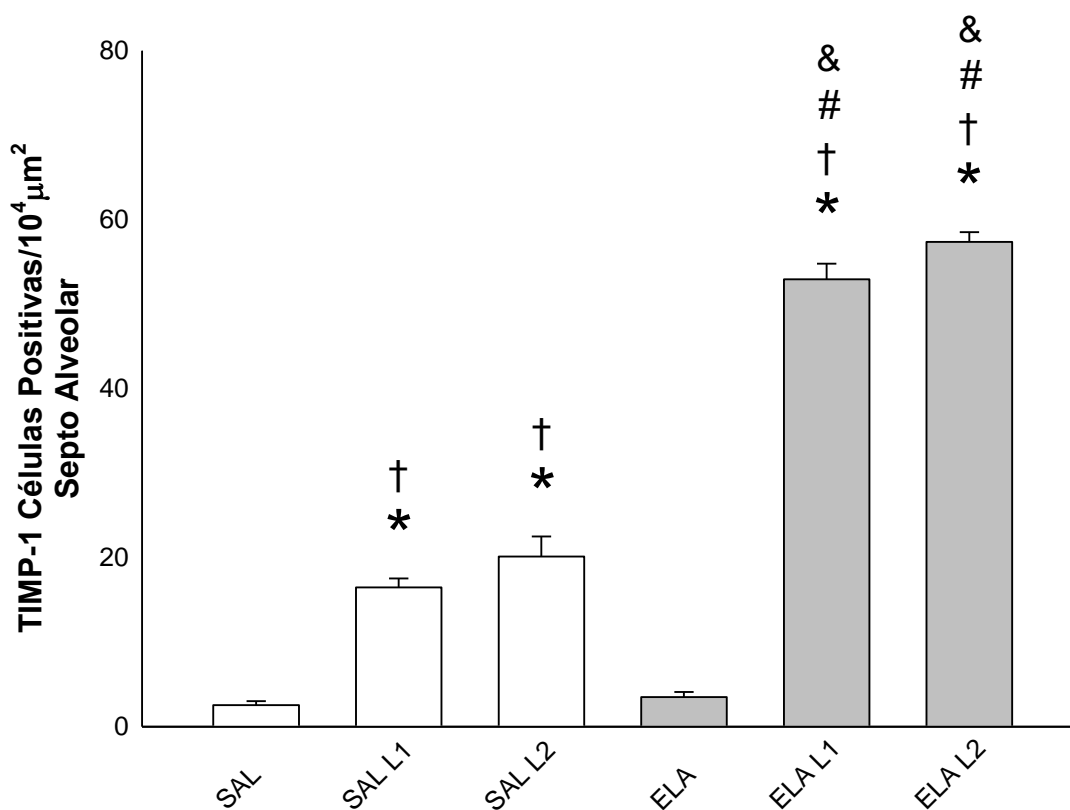


Figura 21 - Avaliação do número de células positivas para TIMP-1 nos septos alveolares no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Os resultados da contagem de células positivas para TIMP-1 presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 22**. Observamos aumento da quantidade de células positivas para TIMP-1 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento na

quantidade de células positivas para TIMP-1 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

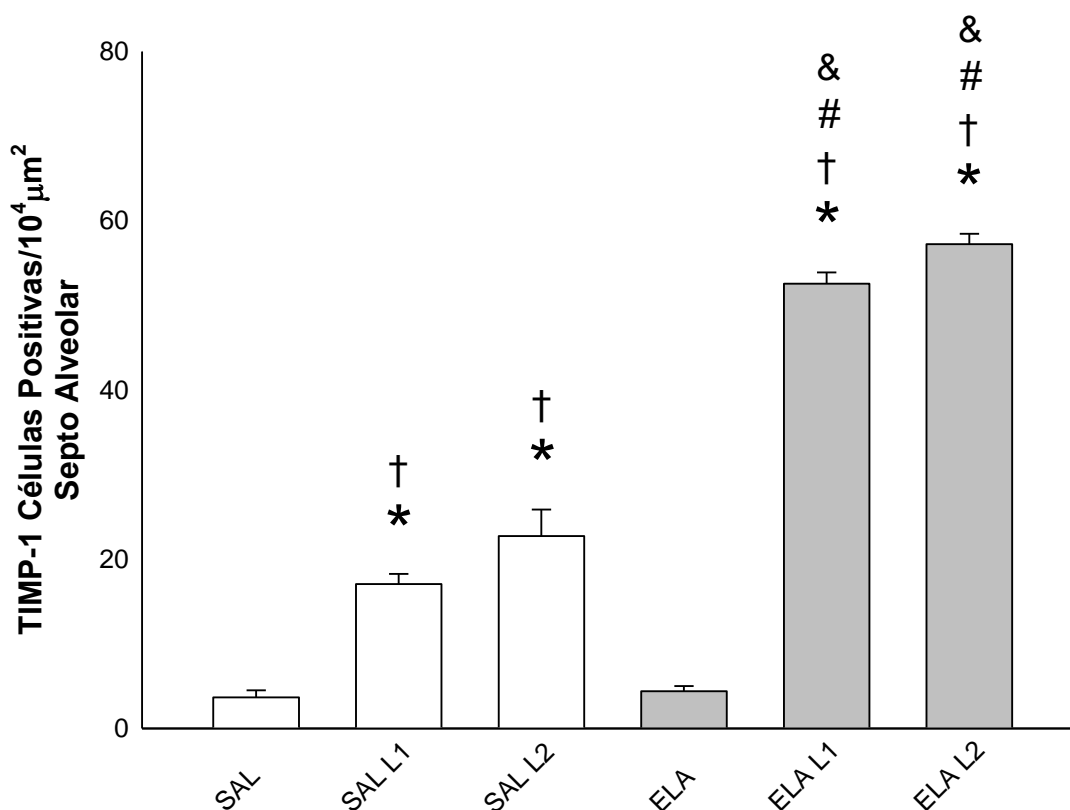


Figura 22 - Avaliação do número de células positivas para TIMP-1 nos septos alveolares no inverno.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($2,55 \pm 0,47$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL inverno ($3,66 \pm 0,85$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); SAL L1 verão ($16,46 \pm 1,06$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L1 inverno ($17,05 \pm 1,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); SAL L2 verão ($20,12 \pm 2,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); e SAL L2 inverno ($22,72 \pm 3,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA verão ($3,49 \pm 0,61$

células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA inverno ($4,40 \pm 0,60$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); ELA L1 verão ($52,94 \pm 1,85$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA L1 inverno ($52,55 \pm 1,33$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) ELA L2 verão ($57,35 \pm 1,17$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA L2 inverno ($57,22 \pm 1,23$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$).

5.4.2.2. Expressão Celular da metaloproteinase 9 (MMP-9)

A **Figura 23** demonstra o número de células positivas para MMP-9 presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve aumento da quantidade de células positivas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento da quantidade de células positivas para MMP-9 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

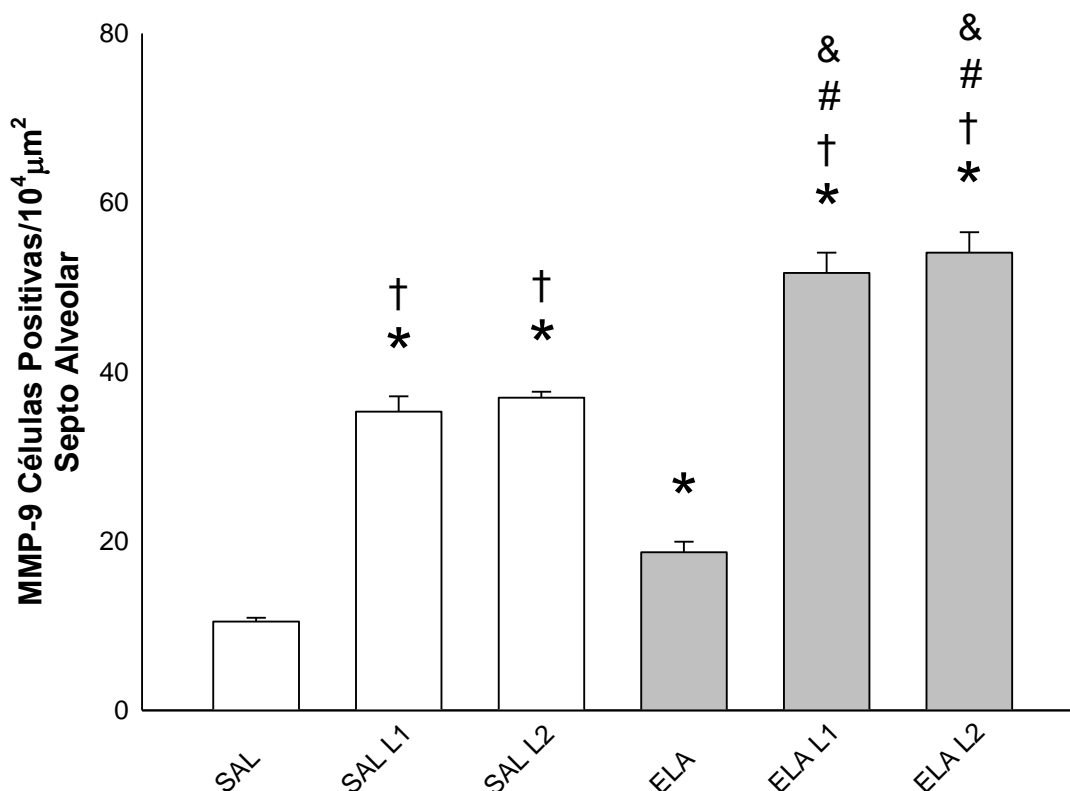


Figura 23 - Avaliação do número de células positivas para MMP-9 nos septos alveolares no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Os resultados da contagem de células positivas para MMP-9 presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 24**. Observamos aumento da quantidade de células positivas para MMP-9 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento na quantidade de células positivas para MMP-9 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

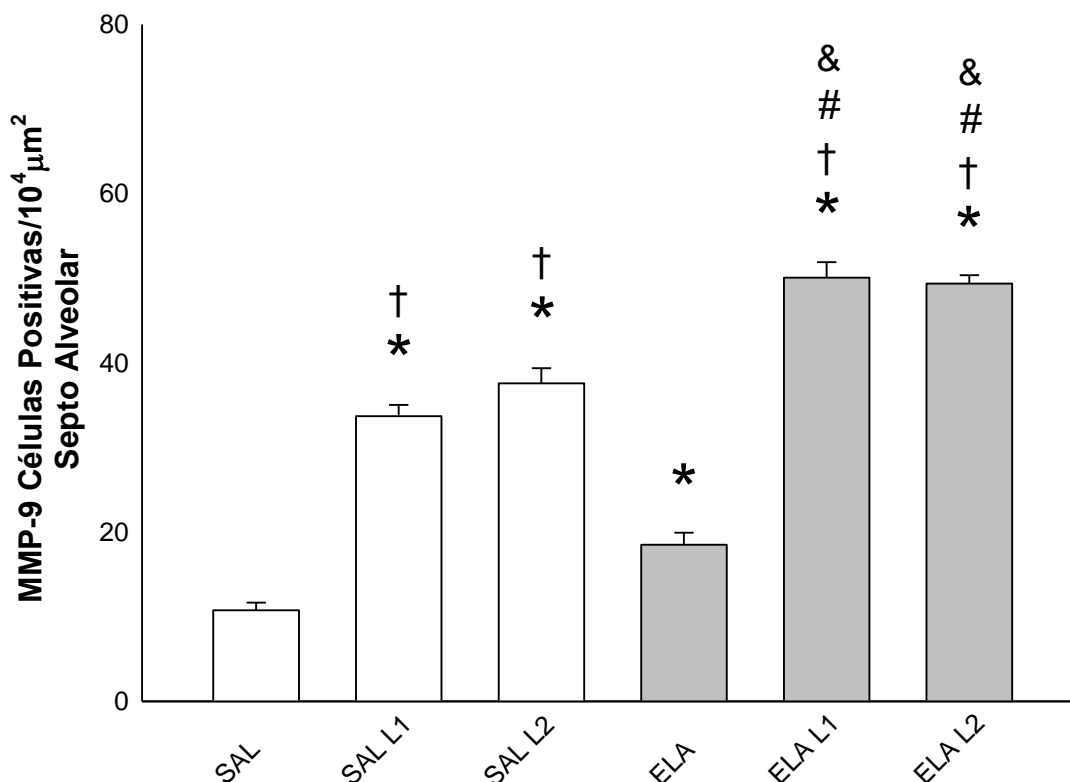


Figura 24 - Avaliação do número de células positivas para MMP-9 nos septos alveolares no inverno.

Média ± erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($2,02 \pm 0,22$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL inverno ($2,10 \pm 0,27$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); SALL1 verão ($44,39 \pm 0,60$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SALL1 inverno ($44,51 \pm 0,49$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); SALL2 verão ($44,82 \pm 0,57$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SALL2 inverno ($44,76 \pm 0,58$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA verão ($4,21 \pm 0,50$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA inverno ($4,70 \pm 0,60$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA L1 verão ($50,33 \pm 0,86$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA L1 inverno ($50,60 \pm 0,76$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA L2 verão ($50,72 \pm 0,82$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA L2 inverno ($52,13 \pm 0,61$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$).

5.4.2.3. Expressão celular da metaloproteinase 12 (MMP-12)

A **Figura 25** demonstra o número de células positivas para MMP-12 presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve aumento da quantidade de células positivas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento da quantidade de células positivas para MMP-12 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

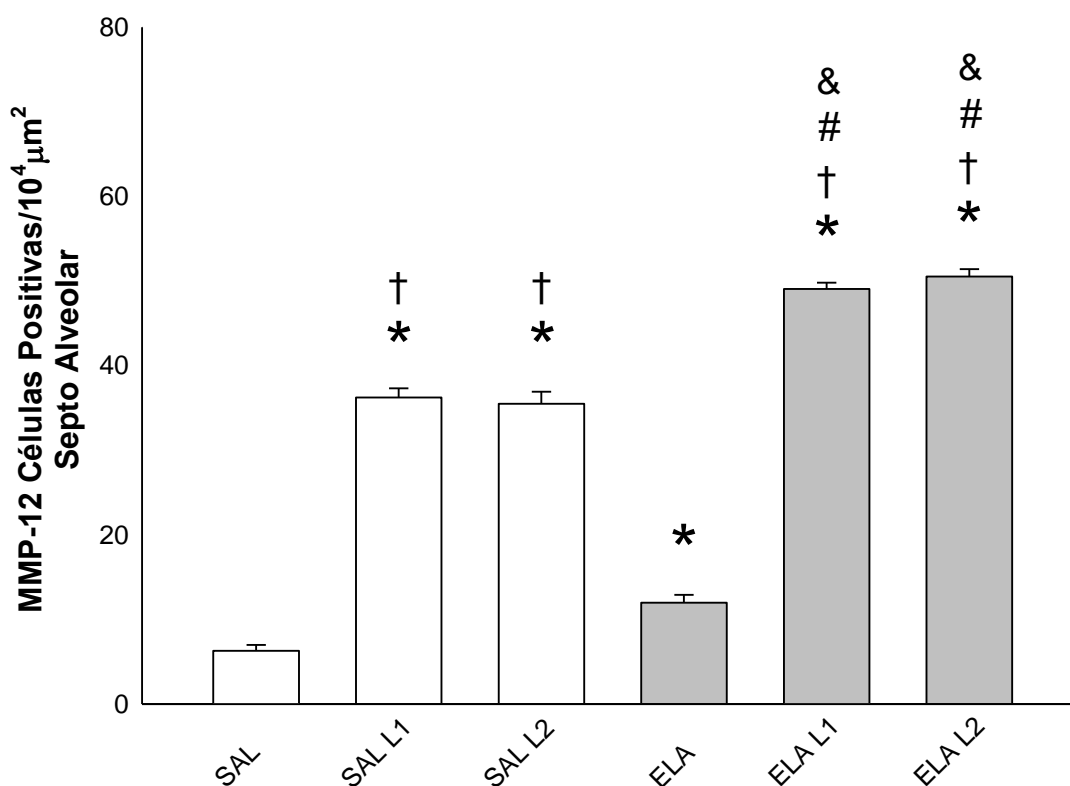


Figura 25 - Avaliação do número de células positivas para MMP-12 nos septos alveolares no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Os resultados da contagem de células positivas para MMP-12 presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 26**. Observamos aumento da quantidade de células positivas para MMP-12 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento na quantidade de células positivas para MMP-12 nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

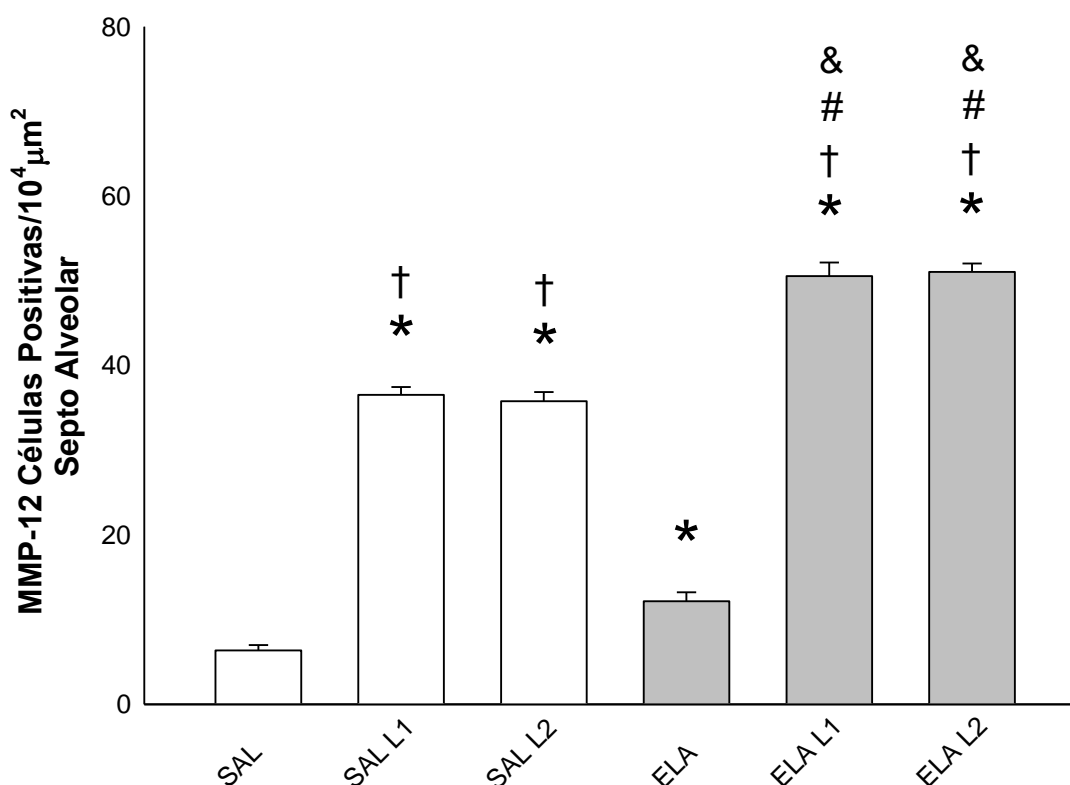


Figura 26 - Avaliação do número de células positivas para MMP-12 nos septos alveolares no inverno.

*Média ± erro padrão: *p≤0,05 quando comparado ao grupo SAL; †p≤0,05 quando comparado ao grupo ELA; #p≤0,05 quando comparado ao grupo SAL L1 &p≤0,05 quando comparado ao grupo SAL L2.*

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($6,29 \pm 0,69$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e SAL inverno ($6,36 \pm 0,61$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); SAL L1 verão ($36,23 \pm 1,07$ células/ 10^4 células/mL) e SAL L1 inverno ($36,52 \pm 0,93$ células/ 10^4 células/mL); SAL L2 verão ($35,48 \pm 1,42$ células/ 10^4 células/mL) e SAL L2 inverno ($35,79 \pm 1,07$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); ELA verão ($11,97 \pm 0,93$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA inverno ($12,16 \pm 1,05$ células/ 10^4 células/mL); ELA L1 verão ($49,06 \pm 0,74$ células/ 10^4 células/mL) e ELA L1 inverno ($50,54 \pm 1,61$ células/ 10^4 células/mL); ELA L2 verão ($50,53 \pm 0,86$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA L2 inverno ($51,04 \pm 1,00$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$).

5.4.2.4. Expressão celular do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β)

A **Figura 27** demonstra o número de células positivas para TGF- β presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve aumento da quantidade de células positivas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento da quantidade de células positivas para TGF- β nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

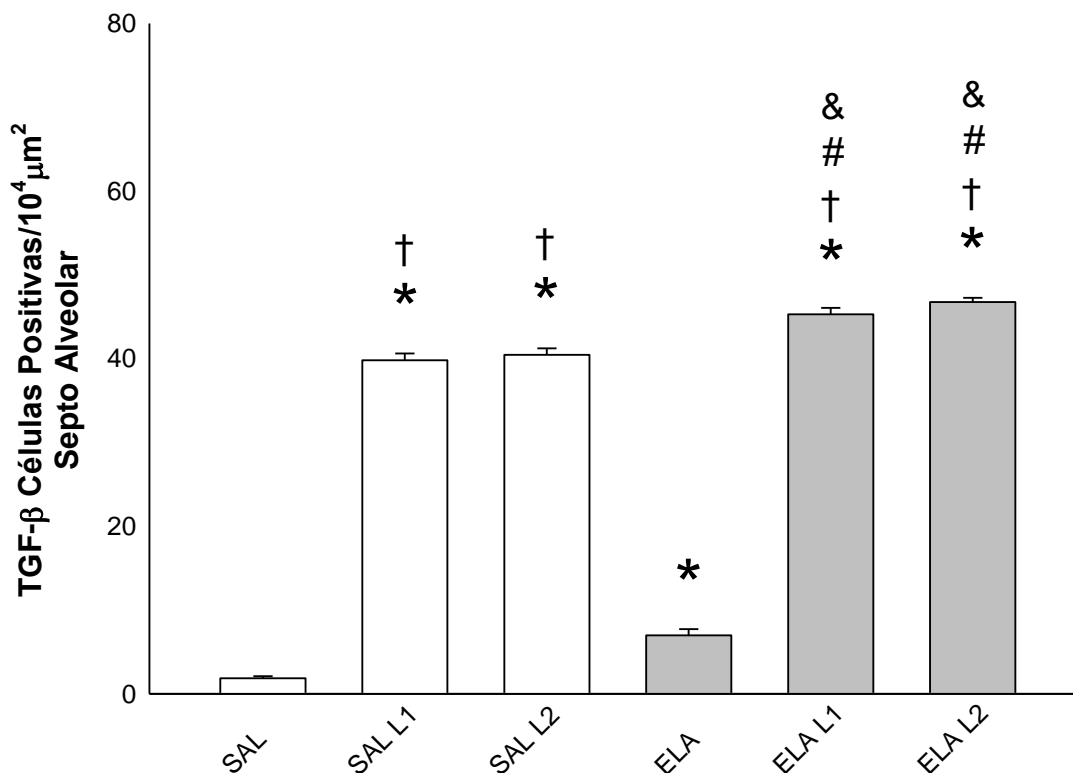


Figura 27 - Avaliação do número de células positivas para TGF- β nos septos alveolares no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Os resultados da contagem de células positivas para TGF- β presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 28**. Observamos aumento da quantidade de células positivas para TGF- β nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento na quantidade de células positivas para TGF- β nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

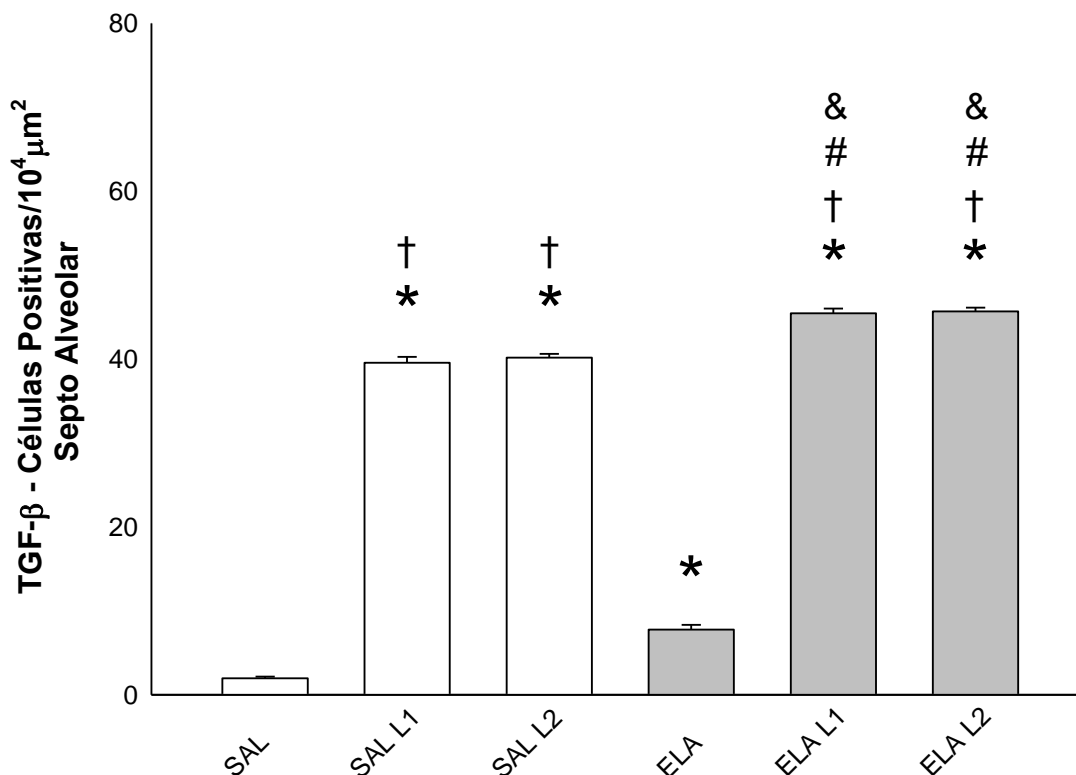


Figura 28 - Avaliação do número de células positivas para TGF- β nos septos alveolares no inverno.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($1,85 \pm 0,25$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL inverno ($1,95 \pm 0,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); SAL L1 verão ($39,80 \pm 0,82$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L1 inverno ($39,54 \pm 0,71$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); SAL L2 verão ($40,46 \pm 0,75$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 inverno ($40,16 \pm 0,44$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA verão ($6,97 \pm 0,74$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA inverno ($7,76 \pm 0,57$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA L1 verão ($45,28 \pm 0,77$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA L1 inverno ($45,43 \pm 0,58$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA L2 verão ($46,76 \pm 0,50$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA L2 inverno ($45,67 \pm 0,46$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$).

5.4.2.5. Fibras colágenas

A **Figura 29** demonstra o conteúdo de fibras colágenas presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve aumento da quantidade de células positivas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento no conteúdo de fibras colágenas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento no conteúdo de fibras colágenas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

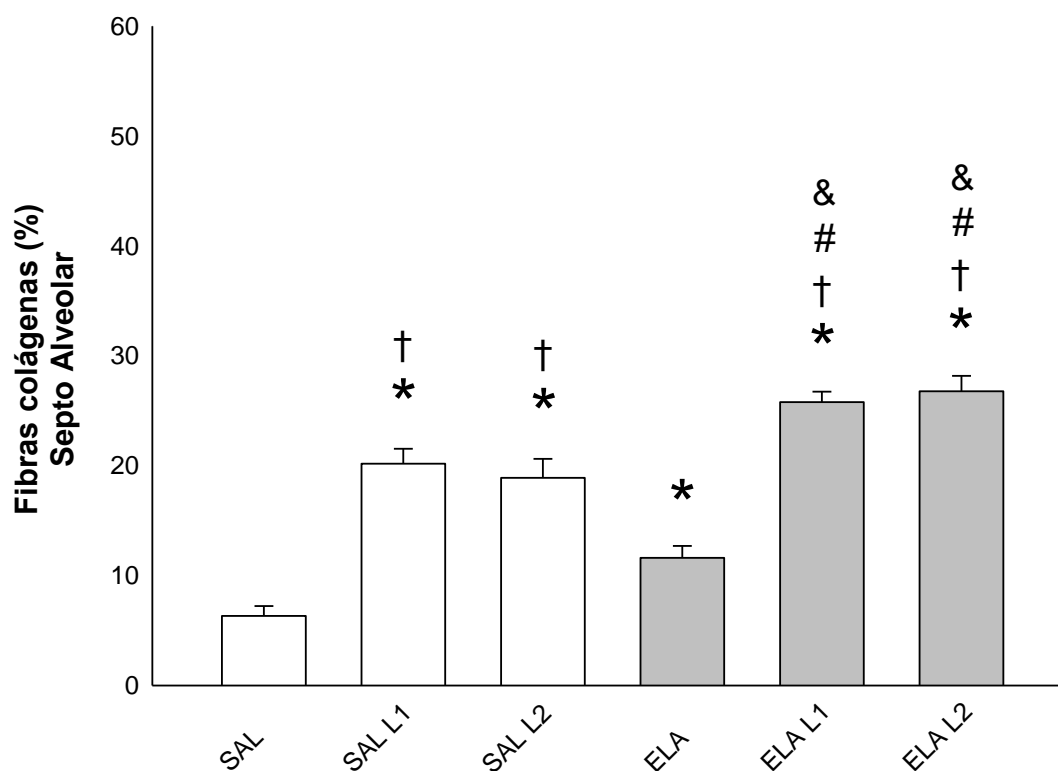


Figura 29 - Avaliação do número de células positivas para fibras colágenas nos septos alveolares no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Os resultados do conteúdo de fibras colágenas presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 30**. Observamos aumento no conteúdo de fibras colágenas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento no conteúdo de fibras colágenas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento no conteúdo de fibras colágenas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

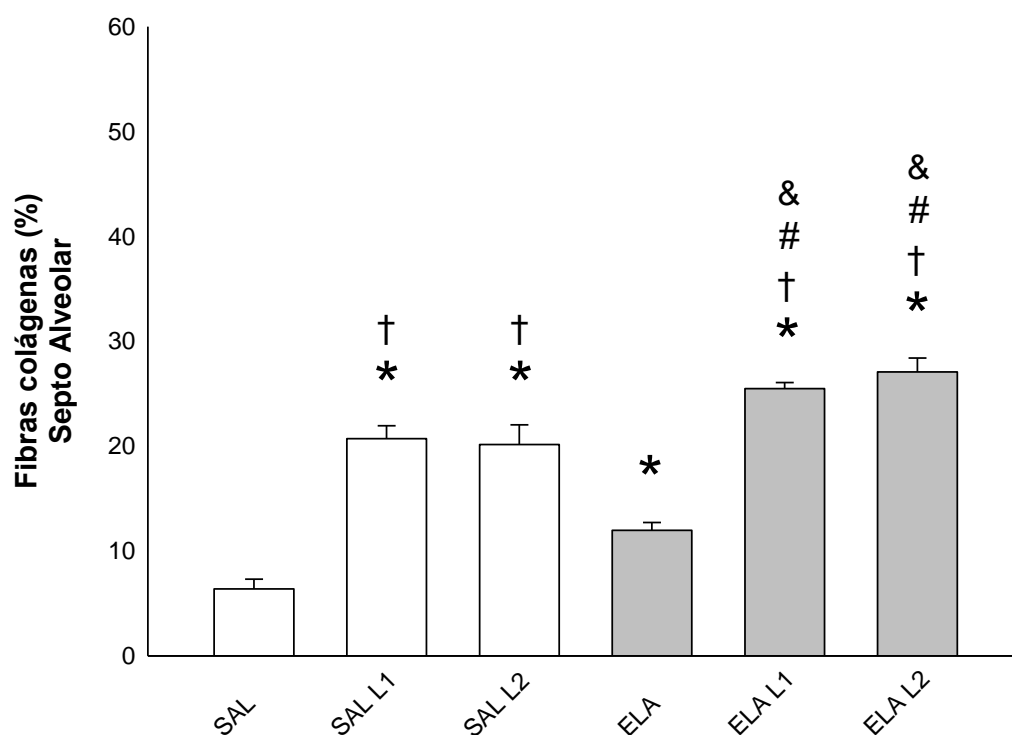


Figura 30 - Avaliação do número de células positivas para fibras colágenas nos septos alveolares no inverno.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($6,32 \pm 0,90$ %) e SAL inverno ($6,37 \pm 0,92$ %); SAL L1 verão ($20,18 \pm 1,35$ %) e SAL L1 inverno ($20,71 \pm 1,23$ %); SAL L2 verão ($18,88 \pm 1,73$ %) e SAL L2 inverno ($20,15 \pm 1,87$ %); ELA verão ($11,61 \pm 1,09$ %) e ELA inverno ($11,97 \pm 0,73$ %); ELA L1 verão ($25,79 \pm 0,95$ %) e ELA L1 inverno ($25,49 \pm 0,56$ %); ELA L2 verão ($26,77 \pm 1,40$ %) e ELA L2 inverno ($27,07 \pm 1,32$ %).

5.4.3. Expressão celular de mucina 5 AC (MUC5AC) em vias aéreas

A **Figura 31** demonstra o número de células positivas para MUC5AC presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve aumento da quantidade de células positivas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento da quantidade de células positivas para MUC5AC nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

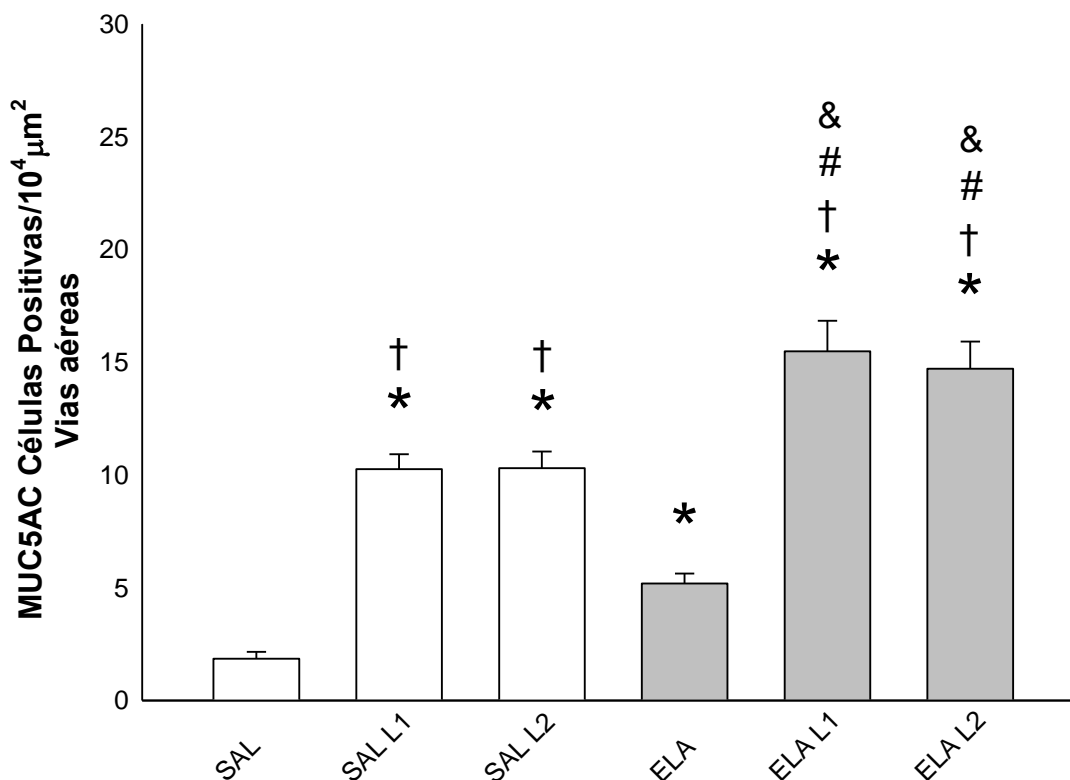


Figura 31 - Avaliação do número de células positivas para MUC5AC nas vias aéreas no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Os resultados da contagem de células positivas para MUC5AC presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 32**. Observamos aumento da quantidade de células positivas para MUC5AC nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento na quantidade de células positivas para MUC5AC nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

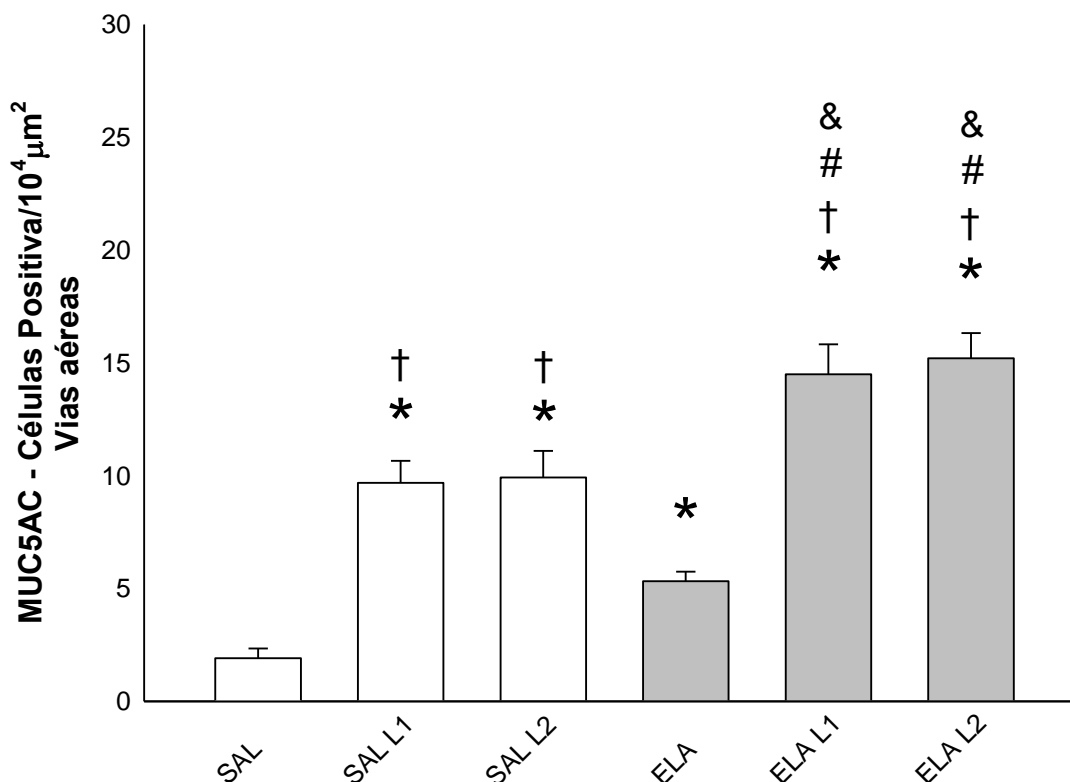


Figura 32 – Avaliação do número de células positivas para MUC5AC nas vias aéreas no inverno.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($1,85 \pm 0,30$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL inverno ($1,91 \pm 0,44$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); SAL L1 verão ($10,26 \pm 0,66$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L1 inverno ($9,68 \pm 0,97$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); SAL L2 verão ($10,30 \pm 0,74$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 inverno ($9,91 \pm 1,18$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA verão ($5,18 \pm 0,44$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA inverno ($5,32 \pm 0,42$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA L1 verão ($15,48 \pm 1,36$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA L1 inverno ($14,49 \pm 1,33$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA L2 verão ($14,71 \pm 1,20$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA L2 inverno ($15,21 \pm 1,11$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$).

5.4.4. Expressão celular de iNOS

A **Figura 33** demonstra o número de células positivas para iNOS presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1, e ELA L2 no verão houve aumento da quantidade de células positivas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1, e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento da quantidade de células positivas para iNOS nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

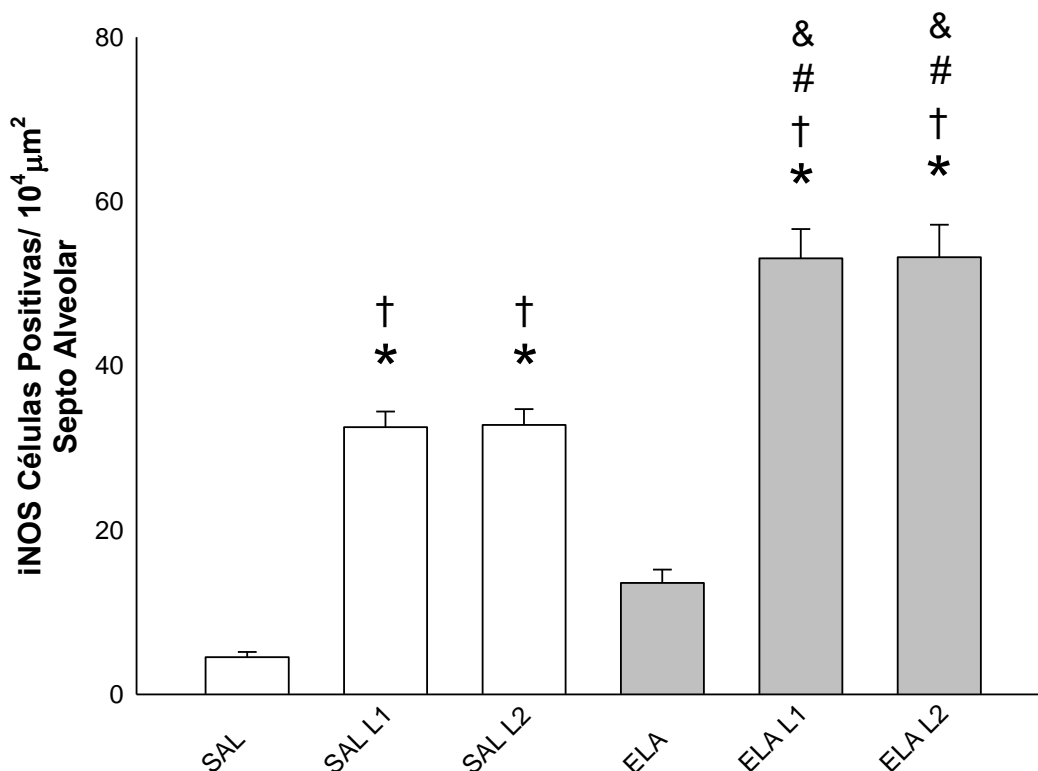


Figure 33 - Avaliação do número de células positivas para iNOS nos septos alveolares no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Os resultados da contagem de células positivas para iNOS presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L2, SAL L1, ELA, ELA L1, e ELA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 34**. Observamos aumento da quantidade de células positivas para iNOS nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1, e ELA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento na quantidade de células positivas para iNOS nos grupos SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

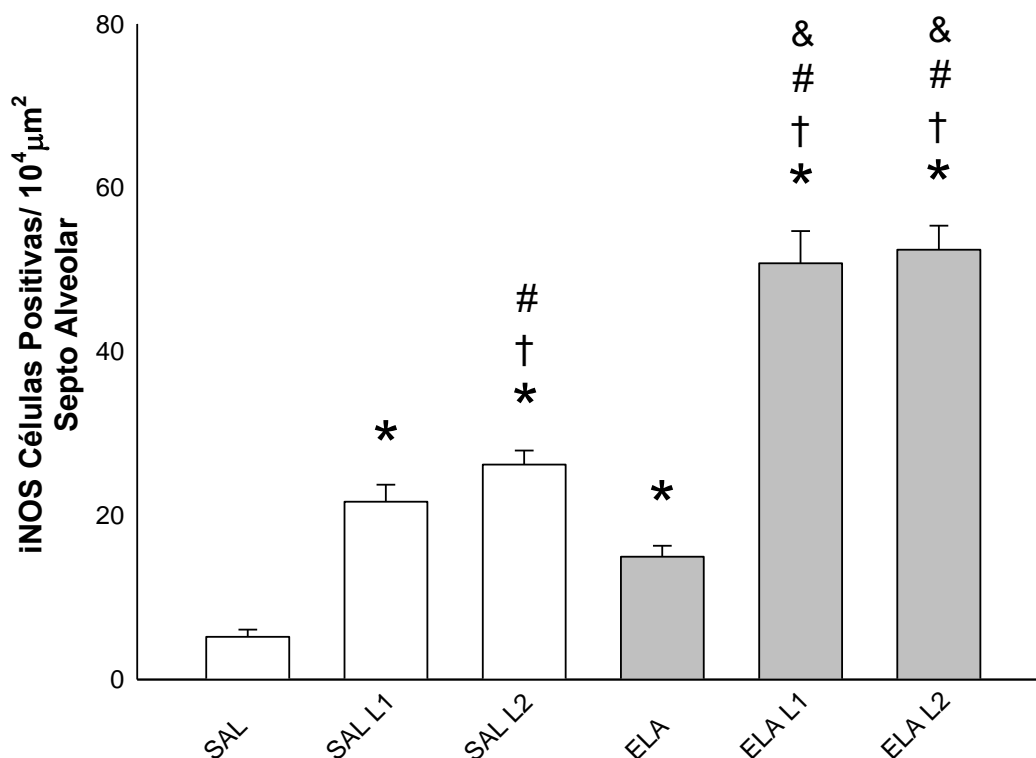


Figura 34 - Avaliação do número de células positivas para iNOS nos septos alveolares no verão.

Média \pm erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($5,04 \pm 0,73$ células/ 10^4 células/ μL) e SAL inverno ($5,27 \pm 0,66$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA verão ($14,02 \pm 1,45$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA inverno ($13,88 \pm 1,26$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA L1 verão ($53,99 \pm 3,27$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA L1 inverno ($52,45 \pm 3,50$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA L2 verão ($53,74 \pm 2,92$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA L2 inverno ($52,09 \pm 2,18$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$).

Observamos um aumento número de células positivas para iNOS nos grupos SAL L1 verão ($32,54 \pm 1,89$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 verão ($33,30 \pm$

1,40 células/10⁴μm²) em relação aos grupos SAL L1 inverno (19,15 ± 2,26 células/10⁴μm²) e SAL L2 inverno (25,02 ± 1,51 células/10⁴μm²) (p≤0,05).

5.4.5. Expressão celular de fator nuclear kappa B (NFκB)

A **Figura 35** demonstra o número de células positivas para NFκB presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no verão houve aumento da quantidade de células positivas nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparados ao grupo SAL (p≤0,05). Observamos também aumento da quantidade de células positivas para NFκB nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA (p≤0,05). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 (p≤0,05).

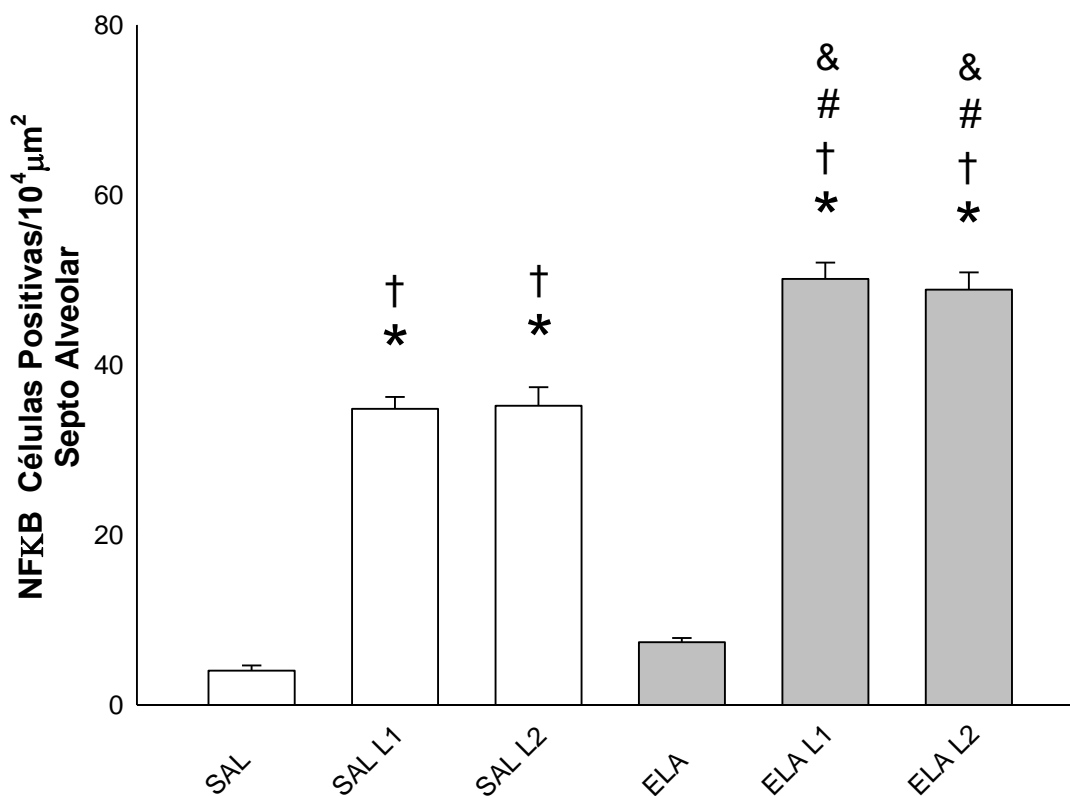


Figura 35 – Avaliação do número de células positivas para NFκB nos septos alveolares no verão.

Média ± erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Os resultados da contagem de células positivas para NFκB presentes nos septos alveolares nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, ELA, ELA L1 e ELA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 36**. Observamos aumento da quantidade de células positivas para NFκB nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento na quantidade de células positivas para NFκB nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 quando comparado ao grupo ELA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na quantidade de células positivas nos grupos ELA L1 e ELA L2 quando comparado aos grupos SAL L1 e SAL L2 ($p \leq 0,05$).

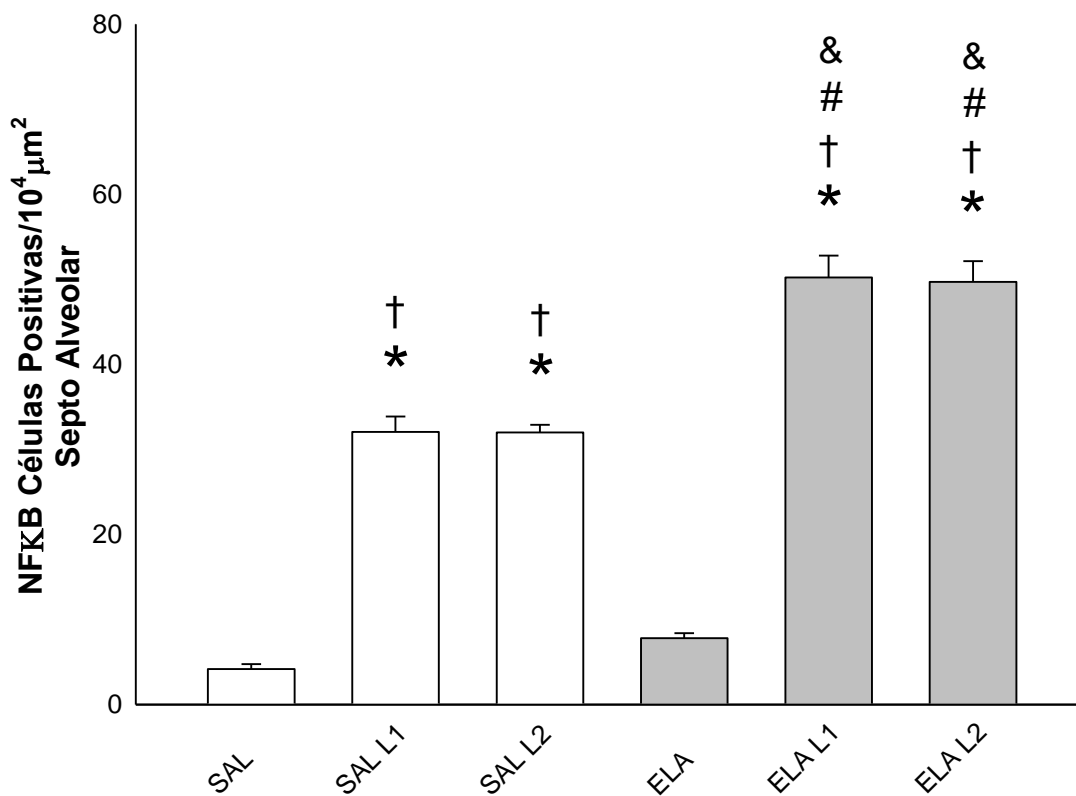


Figure 36 Avaliação do número de células positivas para NFκB nos septos alveolares no inverno.

Média ± erro padrão: * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; † $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo ELA; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1 & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L2.

Na comparação entre o verão e inverno não houve diferenças entre os grupos SAL verão ($4,03 \pm 0,61$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL inverno ($4,16 \pm 0,61$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); SAL L1 verão ($34,82 \pm 1,42$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L1 inverno ($32,05 \pm 1,81$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); SAL L2 verão ($35,20 \pm 2,17$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo SAL L2 inverno ($31,14 \pm 0,90$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ELA verão ($7,38 \pm 0,49$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA inverno ($7,81 \pm 0,58$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$); ELA L1 verão ($54,23 \pm 3,04$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA L1 inverno ($50,12 \pm 1,92$

células/ $10^4\mu\text{m}^2$); ELA L2 verão ($49,98 \pm 2,12$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ELA L2 inverno ($48,84 \pm 2,03$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$).

5.5. Correlação de Pearson

A realização da correlação de Pearson no verão com todos dados obtidos mostrou correlações baixas a moderadas da elastância e resistência do tecido pulmonar (Gtis e Htis, respectivamente) com marcadores inflamatórios: IL-1 β (R=0,465 p=0,015, R=0,447 p=0,006), IL-6 (R=0,465 p=0,004, R=0,386 p=0,023), IL-10 (R=0,484 p=0,003, R=0,435 p=0,008), IL-17 (R=0,434 p=0,008, R=0,349 p=0,037), TNF- α (R=0,500 p=0,002, R=0,386 p=0,020); marcadores de remodelamento: TIMP-1 (R=0,458 p=0,005, R=0,436 p=0,008), MMP-9 (R=0,476 p=0,003, R=0,416 p=0,01), MMP-12 (R=0,481 p=0,003, R=0,421 p=0,01), TGF- β (R=0,496 p=0,002, 0,387 p=0,020), as fibras colágenas apresentaram correlações moderadas apenas com Gtis (0,472 p=0,003); marcadores de estresse oxidativo: iNOS (R=0,402 p=0,015, R=0,396 p=0,017) e mecanismo envolvido: NF κ B (R=0,477 p=0,003, R=0,411 p=0,013).

No inverno, apenas Htis apresentou correlação com marcadores inflamatórios: IL-1 β (R=0,379 p=0,023), IL-6 (R=0,395 p=0,017), IL-10 (R=0,360 p=0,031), IL-17 (R=0,422 p=0,010), TNF- α (R=0,331 p=0,049), Neutrófilos (R=0,496 p=0,002); marcadores de remodelamento: TIMP-1 (R=0,383 p=0,021), MMP-9 (R=0,433 p=0,008), MMP-12 (R=0,407 p=0,014, 0,421 p=0,01), MUC5AC (0,408 p=0,014), TGF- β (0,394 p=0,017), fibras colágenas (R=0,422 p=0,010); marcadores de estresse oxidativo: iNOS (R=0,435 p=0,008) e mecanismo envolvido: NF κ B (R=0,381 p=0,021).

5.6. Análise Qualitativa (Fotomicrográficas)

A análise qualitativa das fotomicrográficas representativas estão apresentadas na **Figura 37** para o verão e na **Figura 38** para o inverno, ilustrando os processos inflamatórios, mecanismo envolvido, estresse oxidativo e remodelamento da matriz extracelular. Os processos inflamatórios são ilustrados por IL-17; o mecanismo envolvido por NFκB; os marcadores de estresse oxidativo por iNOS e as características de remodelamento da matriz extracelular por TIMP-1. Todas as microfotografias foram tiradas com ampliação de 400x.

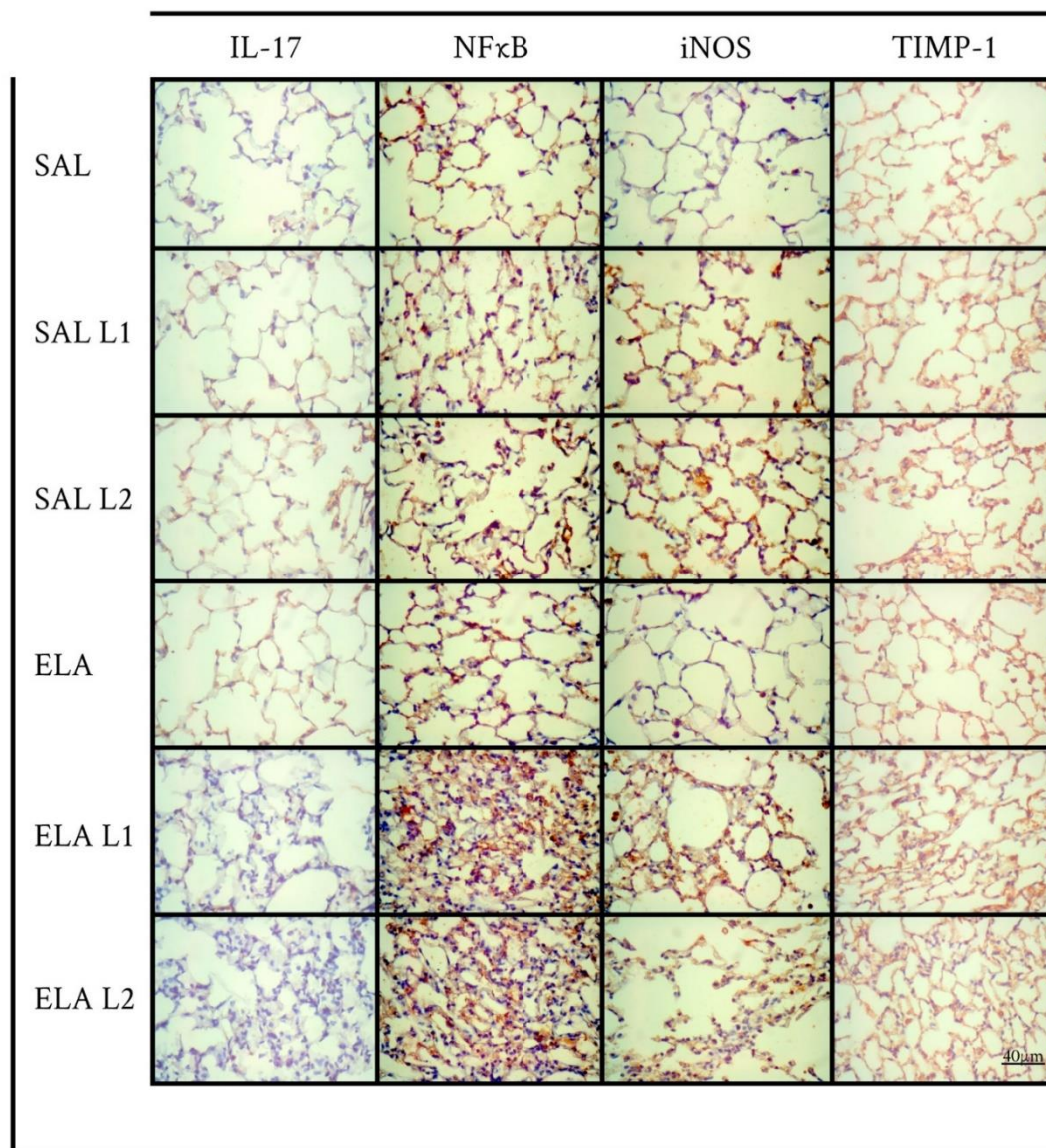


Figura 37 - Fotomicrografias representativas ilustram os processos inflamatórios, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo nos septos alveolares no verão.

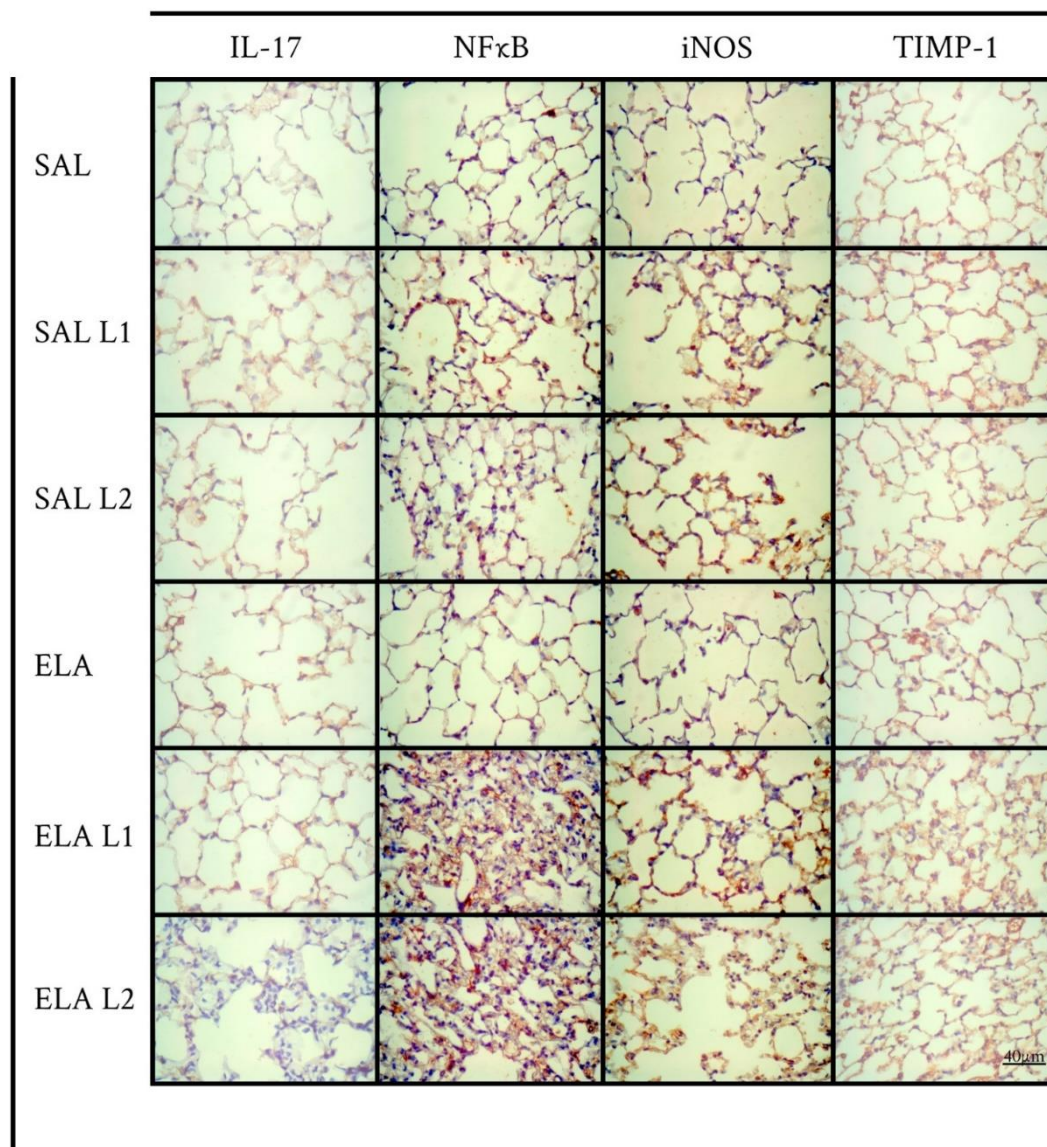


Figura 38 - Fotomicrografias representativas ilustram os processos inflamatórios, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo nos septos alveolares no inverno.

5.7. Resultados Parciais do Material Particulado

A análise e caracterização do particulado foram realizados sob responsabilidade da Professora Christine Bourotte (Cidade Universitária, São Paulo-SP).

A fração grossa apresenta cerca de 80% do MP10. As concentrações médias do MP grosso foram maiores do que MP fino para ambos os locais de coleta e para todos os períodos. Concentrações médias na empresa foram maiores do que a do Hotel no verão e no inverno.

Elementos que mais chamaram atenção na análise realizada foram cloreto (Cl), ferro (Fe) e enxofre (S). As concentrações de cloro foram mais elevadas no hotel (local2) do que na empresa (local1) tanto no material grosso quanto no fino no inverno (Figura 39).

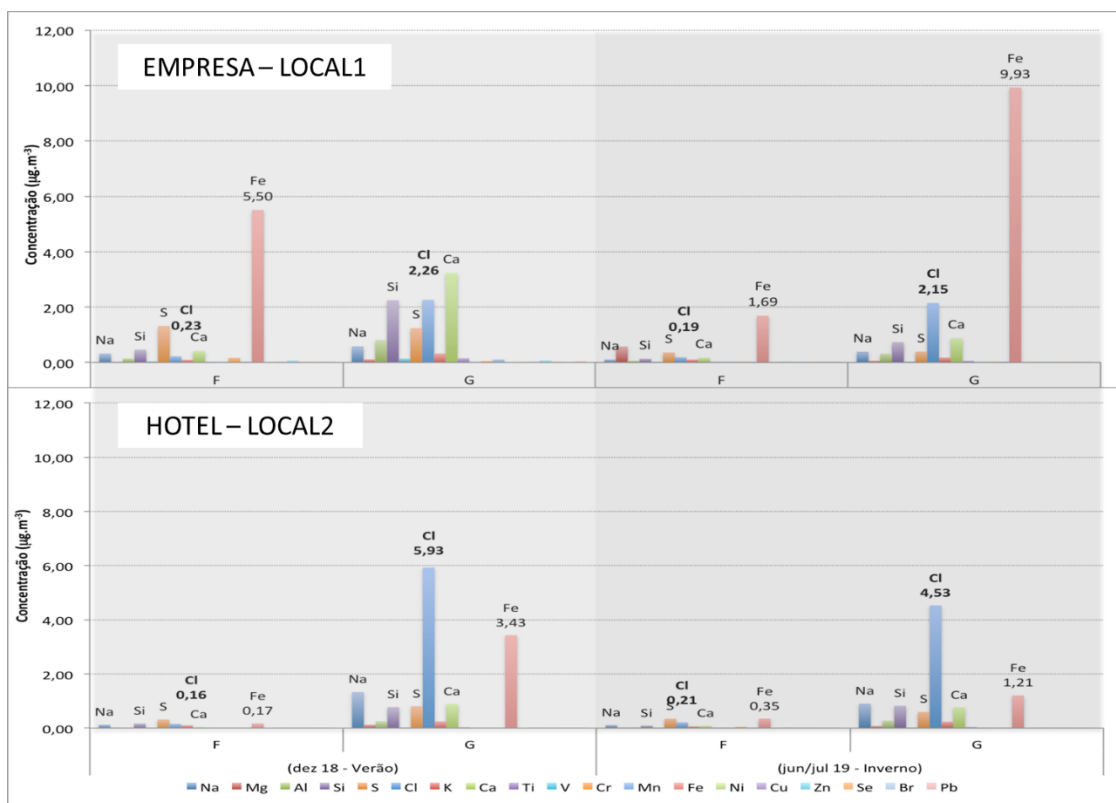


Figure 39 - Análise do material particulad., Dados parciais cedidos pela professora Christine Bourotte.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a exposição ambiental em Vitória - ES promoveu mudanças significativas nos marcadores inflamatórios, estresse oxidativo, marcadores de remodelamento e mecanismos envolvidos (NFκB) em animais saudáveis, alterações que geraram padrões de resposta nesses animais semelhantes aos de animais com enfisema induzido por elastase mantidos no biotério em São Paulo. No modelo experimental de enfisema, observamos na maioria das análises que os marcadores inflamatórios, estresse oxidativo, marcadores de remodelamento e mecanismo envolvido (expressão NFκB) foram mais elevados nos grupos expostos em comparação com os animais controle mantidos no biotério em São Paulo. Portanto, podemos inferir que a poluição local promoveu inflamação em animais saudáveis, além de agravar as alterações pré-existentes em animais com enfisema.

O aumento no número de pessoas expostas a concentrações consideradas aceitáveis pela Organização Mundial da Saúde de dióxido de enxofre (SO₂) e dióxido de nitrogênio (NO₂), e material particulado medindo menor ou igual a 10 μm de diâmetro aerodinâmico (MP10), está relacionado ao aumento da mortalidade causada por exacerbação da DPOC (FRANCK *et al.*, 2011).

A avaliação da mecânica pulmonar não mostrou diferença entre os grupos em ambas as estações. No entanto, observamos correlações baixas a moderadas entre a elastância e resistência do tecido pulmonar com indicadores de inflamação, estresse oxidativo e marcadores de remodelamento e mecanismos envolvidos. De acordo com os resultados de Hantos *et al.*, (2008), camundongos que receberam injeção intratraqueal de elastase apresentaram aumento de volume e diminuição da elastância do tecido pulmonar, mas nenhuma alteração na resistência das vias aéreas e do tecido pulmonar. Isso

leva à conclusão de que a destruição do tecido pulmonar nem sempre está associada à disfunção do sistema pulmonar (HANTOS *et al.*, 2008).

Amatullah *et al.* (2012) mostraram que amundongos expostos por 4 horas à inalação de material particulado fino (MP) mostraram um leve aumento na elastância e resistência do sistema respiratório, mas não significativo (AMATULLAH *et al.*, 2012). Quando os animais foram expostos ao MP_{2,5} em um ambiente com altas concentrações por um período de duas semanas, não houve alterações na função pulmonar, apenas ocorreram alterações na função pulmonar após 4 semanas de exposição (FENG *et al.*, 2019). Deve-se notar que, no presente estudo, os animais foram expostos ao ar ambiente nos três locais por 4 semanas, levando à hipótese de que o tempo de exposição não foi suficiente para gerar alterações na mecânica pulmonar.

Em paralelo à análise realizada com o modelo experimental, um estudo geoquímico da região foi realizado nos mesmos períodos de verão e inverno para caracterizar o material particulado presente na área gerenciada pela Professora Christine Bourotte. A fração grossa possui cerca de 80% de MP₁₀. As concentrações médias de MP grosso foram maiores do que as de MP fino para ambos os locais de coleta e ambas as estações. Além disso, as concentrações médias no local 1 foram maiores do que no local 2 no verão e inverno. Através da respiração, as partículas são levadas para o corpo humano e a exposição prolongada a elas pode agravar a inflamação pulmonar devido aos seus efeitos tóxicos diretos e à produção de estresse oxidativo (KYUNG; JEONG, 2020).

Também deve ser observado que, além da presença de MP na área, a composição química é um determinante importante da resposta inflamatória (YANG *et al.*, 2020). Durante a análise realizada pela Professora Christine Bourotte, os elementos que apresentaram maior concentração na matéria particulada foram o cloro (Cl), o ferro (Fe) e o enxofre (S). As concentrações de cloro foram maiores no local 2 do que no local 1, tanto no material grosseiro quanto no fino, no inverno.

Em seu estudo, De Genaro et al. (2021) descobriram que a exposição ao hipoclorito, tanto aguda quanto crônica, diminui a função pulmonar e causa aumento do estresse oxidativo e secreção de muco em camundongos saudáveis (DE GENARO, I S *et al.*, 2021). O cloro, quando inalado, pode ser solubilizado no fluido broncoalveolar, atravessar a membrana celular e reagir com proteínas locais, ativando a inflamação local e levando a danos epiteliais por estresse oxidativo (HAWKINS; PATTISON; DAVIES, 2003). A ativação do sinal pró-inflamatório libera espécies reativas de oxigênio (ERO) e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e Interferon gama (INF- γ), que ativam a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (CARLISLE *et al.*, 2016; WHITE; MARTIN, 2010). Essa enzima produz óxido nítrico (NO) no local da inflamação, aumentando o estresse oxidativo (ANTOSOVA *et al.*, 2017). As citocinas pró-inflamatórias podem levar à ativação da resposta Th17, produzindo IL-17 e induzindo o recrutamento de neutrófilos, a ativação do remodelamento tecidual e a produção de muco (AUJLA; ALCORN, 2011).

Em camundongos asmáticos, uma única exposição a baixas doses de hipoclorito potencializou a resposta Th2, mostrando aumento da inflamação, alteração da função pulmonar e ativação de iNOS e quinase 2 (ROCK-2), respostas semelhantes às observadas em animais saudáveis expostos a baixas concentrações de hipoclorito (DE GENARO, Isabella Santos *et al.*, 2018).

Estudos recentes revelaram que vários componentes de MP têm a capacidade de causar danos celulares, o que, por sua vez, pode ativar vias para o remodelamento da matriz extracelular (LI, Wande *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2009). O remodelamento das vias aéreas refere-se a alterações estruturais e da matriz extracelular (ECM) nas vias aéreas grandes e pequenas (HOUGH *et al.*, 2020). Estudos têm mostrado que a matriz extracelular (ECM) das vias aéreas é alterada em pacientes asmáticos, com diminuição do colágeno tipo IV e elastina, e aumento na deposição de colágeno tipo I, fibronectina, laminina, periostina, versicano, decorina e lumicano (DEKKERS *et al.*, 2021; HOUGH *et al.*, 2020). A secreção de fatores pró-inflamatórios, como citocinas e proteases,

alimenta ainda mais as respostas imunes e contribui para o remodelamento da ECM (BRIGHTLING; GREENING, 2019; NI; DONG, 2018). Várias células imunes têm um papel nesse processo, incluindo, mas não se limitando a, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos e mastócitos (HELFRICH *et al.*, 2019).

Apesar de o MP10 estar em maior concentração no ar de Vitória-ES, partículas com diâmetros inferiores a 2,5 μm podem penetrar nos bronquíolos e alvéolos e, portanto, são consideradas as partículas mais prejudiciais para os pulmões (SEATON *et al.*, 2005). Partículas nessa faixa de diâmetro permanecem suspensas na atmosfera por mais tempo, o que aumenta a probabilidade de inalação e a taxa de alteração da composição do ar. Os efeitos na saúde variam desde um maior risco de doenças cardiovasculares e inflamação pulmonar crônica, redução da função pulmonar até o aumento de ataques de asma (CURTIS *et al.*, 2006).

Chan *et al.* (2019) encontraram um aumento nos linfócitos e macrófagos, o que também foi observado quando expostos a altas doses de MP. No entanto, a exposição a 5 μg de MP10 não levou à ativação da inflamação mediada por eosinófilos ou neutrófilos. Observou-se que o aumento de IL-1 β estava relacionado à ativação do inflamassoma NLRP3, como esperado (CHAN *et al.*, 2019). Em outro estudo, a exposição diária a 50 μg de MP2,5 por um período de 3 semanas levou ao aumento dos níveis de IL-1 β e TGF- β 1 no fluido de lavagem broncoalveolar (ZHENG, Runxiao *et al.*, 2018).

O estudo de Chu *et al.* (2016) revelou que a inalação de MP2,5 pode piorar os danos aos macrófagos nos sacos aéreos de camundongos com DPOC. Eles descobriram que os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- α aumentaram no fluido de lavagem broncoalveolar, exacerbando a inflamação das vias aéreas. Os pesquisadores concluíram que o MP2,5 pode desencadear a expressão de genes que codificam o TNF- α , IL-6 e IL-1 β (CHU *et al.*, 2016).

Os animais expostos em Vitória apresentaram um aumento em todos os

marcadores de remodelamento em comparação com os animais que permaneceram no biotério. A exposição crônica de longo prazo ao MP2,5 induziu prejuízo na função pulmonar, lesões enfisematosas, inflamação das vias aéreas e remodelamento das paredes das vias aéreas. A exposição ao MP2,5 aumenta significativamente a expressão das proteínas MMP9, MMP12, fibronectina, colágeno e TGF- β 1, independentemente da concentração (HE, Fang *et al.*, 2017; ZHAO, Y X *et al.*, 2018).

Aumento da exposição ao MP2,5 pode induzir hiperplasia das células caliciformes e secreção excessiva de muco em camundongos com DPOC, aumentando os níveis de expressão de MUC5AC, MUC5B, colágeno I e colágeno III no tecido pulmonar (FENG *et al.*, 2019). Observamos um aumento de MUC5AC em ambos os locais de exposição, tanto nos grupos controle SAL L1 e SAL L2, quanto nos grupos que receberam elastase ELA L1 e ELA L2, sendo maior nos grupos ELA L1 e ELA L2 em comparação com os outros grupos.

Wang *et al.* (2020) determinaram que o MP2,5 tem um impacto significativo na exacerbação dos sintomas da DPOC. Os resultados mostraram que o MP2,5 causa aumento do estresse oxidativo, inflamação das vias aéreas e hiperplasia das células caliciformes, levando a um desequilíbrio nos níveis de proteases/antiproteases e remodelamento das vias aéreas. O MP2,5 depositado nos bronquíolos e alvéolos pulmonares ativa o estresse oxidativo, que desencadeia uma série de processos prejudiciais, incluindo a ativação de proteases e o aumento da inflamação brônquica, causando aumento na hipersecreção de muco, fibrose das vias aéreas pequenas e acúmulo de colágeno. O resultado é um estado persistente de inflamação e o desenvolvimento de enfisema pulmonar (WANG *et al.*, 2020).

Feng *et al.* (2019) mostraram que camundongos expostos a uma alta concentração de MP2,5 por um período subagudo de 4 semanas apresentaram piora na função pulmonar, hipersecreção de muco, aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e indicadores de estresse oxidativo. De acordo com os autores, 4 semanas podem ser um ponto no tempo para atingir as

alterações histológicas induzidas pela inalação de MP (FENG *et al.*, 2019).

Os animais expostos em Vitória também apresentaram um aumento de iNOS em comparação com o biotério. O estresse oxidativo pode estar diretamente relacionado à ação citogenotóxica do MP. Vários estudos determinaram a ação citogenotóxica do MP, que tem sido principalmente atribuída aos componentes metálicos ligados ou adsorvidos nas partículas, particularmente metais de transição, capazes de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ferro. Partículas de ferro estimulam a produção de radicais hidroxila por meio das reações de Haber-Weiss e Fenton, que levam ao estresse oxidativo no DNA, proteínas ou lipídios (JUNG *et al.*, 2012). Estudos revelaram que as espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser produzidas a partir da superfície das partículas devido à absorção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e nitro-PAHs. A reação de Fenton, catalisada por metais de transição como ferro, cobre, cromo e vanádio, cria o radical hidroxila altamente reativo combinando Fe^{2+} , H_2O_2 e H^+ , que tem a capacidade de causar danos oxidativos ao DNA (LODOVICI; BIGAGLI, 2011).

Seaton *et al.* (2005) demonstraram que a poeira nos metrô de Londres tinha potencial citotóxico e inflamatório em altas doses, o que é consistente com sua composição predominantemente de óxido de ferro (SEATON *et al.*, 2005). As células epiteliais das vias aéreas podem experimentar um aumento no estresse oxidativo celular devido à presença de metais solúveis em partículas inaladas, como ferro, níquel, vanádio, cobalto, cobre e cromo (ZAREMBA; SMOLEŃSKI, 2000).

É importante observar que certos radicais livres, provenientes do estresse oxidativo, têm a capacidade de ativar fatores de transcrição de proteínas específicas, como o fator nuclear KappaB (NFκB). Esse fator amplifica a expressão de genes relacionados a citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios, além de induzir apoptose e necrose em macrófagos e células epiteliais respiratórias. Esses processos comprometem a defesa

orgânica e aumentam a reatividade das vias aéreas (BROOK *et al.*, 2004; RHODEN *et al.*, 2004).

No contexto do nosso estudo, observamos um aumento na atividade do NFκB nos grupos SAL L1, SAL L2, ELA L1 e ELA L2 em comparação com os grupos SAL e ELA. Além disso, nos grupos ELA L1 e ELA L2, constatamos um aumento em relação aos grupos SAL L1 e SAL L2. É importante destacar que esses resultados são consistentes com a literatura científica disponível e reforçam a relação entre estresse oxidativo, ativação do NFκB e processos inflamatórios nas vias respiratórias.

A ativação desequilibrada do NFκB pode causar uma ativação exagerada de células T, que estão diretamente associadas a respostas autoimunes e inflamatórias (CHANG *et al.*, 2011). As células CD4⁺ ativadas passam por diferenciação para se tornarem vários tipos de células T efetoras (Th1, Th2, Th17 e células T foliculares) que emitem citocinas diversas e impactam as respostas imunes (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). As células Th1 e Th17 inflamatórias estão intimamente ligadas à secreção de IFN-γ, que atua como defensor da imunidade celular e desempenha um papel nos processos inflamatórios (OH; GHOSH, 2013). As células Th17 liberam adicionalmente IL-17, uma citocina inflamatória bem conhecida que atrai monócitos e neutrófilos para o local da inflamação (LIU *et al.*, 2018).

Avaliamos como limitação deste estudo o uso de um modelo animal experimental, devido ao fato de não podermos extrapolar diretamente os resultados deste estudo para o que é esperado em humanos, além do fator de estresse causado aos animais devido à exposição ambiental ter sido realizada em outra cidade, o que nos obrigou a fazer duas viagens de avião.

Apesar disso, nossos achados têm vantagens que destacam a importância de examinar os impactos da exposição a material particulado no tecido pulmonar. Ao analisar a inflamação, alterações na matriz extracelular, a ativação do estresse oxidativo e a via de sinalização responsável por esses mecanismos de lesão pulmonar, buscamos entender melhor esses processos.

Nossa avaliação do estresse oxidativo incluiu a expressão celular de iNOS, que consideramos um marcador apropriado, uma vez que níveis elevados desses marcadores indicam o desenvolvimento de inflamação em animais saudáveis e exacerbam em animais com enfisema.

Além disso, analisamos a presença das citocinas Th1, Th2 e Th17, e realizamos uma análise minuciosa do processo de remodelamento, que incluiu uma avaliação das fibras colágenas, TIMP-1, MMP-9, MMP-12, TGF- β e a via de sinalização NF κ B.

7. CONCLUSÃO

Com base nos dados analisados, podemos concluir que a exposição a material particulado (MP) e pó de ferro está associada a uma série de efeitos adversos no tecido pulmonar. Essa exposição pode levar ao aumento da resposta inflamatória, estresse oxidativo e remodelamento dos septos alveolares, resultando em danos às células pulmonares e alterações na matriz extracelular.

Podemos concluir que a exposição ambiental à poluição em Vitória - ES foi responsável pela deterioração da resposta pulmonar tanto em animais com enfisema quanto saudáveis. Além disso, o mecanismo envolvido nessas alterações parece estar associado ao aumento da expressão de NFκB e de iNOS,

Essas descobertas ressaltam a importância de entender os mecanismos subjacentes aos danos pulmonares causados pela exposição a partículas finas e pó de ferro. A compreensão desses processos pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias de controle dos poluentes em Vitória, que merecem ser posterior, avaliadas quanto a sua eficácia tendo em vista o grande potencial deletério dessa exposição.

8. REFERÊNCIAS

AGUSTI, Alvar; EDWARDS, Lisa D.; CELLI, Bartolomé; MACNEE, William; CALVERLEY, Peter M. A.; MÜLLEROVA, Hana; LOMAS, David A.; WOUTERS, Emiel; BAKKE, Per; RENNARD, Steve; CRIM, Courtney; MILLER, Bruce E.; COXSON, Harvey O.; YATES, Julie C.; TAL-SINGER, Ruth; VESTBO, Jørgen. Characteristics, stability and outcomes of the 2011 GOLD COPD groups in the ECLIPSE cohort. **European Respiratory Journal**, vol. 42, no. 3, p. 636–646, Sep. 2013. <https://doi.org/10.1183/09031936.00195212>.

ALMEIDA-REIS, R; THEODORO-JUNIOR, O A; OLIVEIRA, B T M; OLIVA, L V; TOLEDO-ARRUDA, A C; BONTURI, C R; BRITO, M V; LOPES, F D T Q S; PRADO, C M; FLORENCIO, A C; MARTINS, M A; OWEN, C A; LEICK, E A; OLIVA, M L V; TIBÉRIO, I F L C. Plant Proteinase Inhibitor BbCI Modulates Lung Inflammatory Responses and Mechanic and Remodeling Alterations Induced by Elastase in Mice. **Biomed Res Int**, vol. 2017, ed. 2017/03/30, p. 8287125, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8287125>.

AMATULLAH, H; NORTH, M L; AKHTAR, U S; RASTOGI, N; URCH, B; SILVERMAN, F S; CHOW, C W; EVANS, G J; SCOTT, J A. Comparative cardiopulmonary effects of size-fractionated airborne particulate matter. **Inhal Toxicol**, vol. 24, no. 3 ed. 2012/02/23, p. 161–171, 2012. <https://doi.org/10.3109/08958378.2011.650235>.

ANTOSOVA, M.; MOKRA, D.; PEPUCHA, L.; PLEVKOVA, J.; BUDAY, T.; STERUSKY, M.; BENCOVA, A. Physiology of nitric oxide in the respiratory system. **Physiological Research**, vol. 66, p. S159–S172, 2017. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933673>.

ANTUNES, Mariana A.; ROCCO, Patricia R.M. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 83, no. 4, p. 1385–1396, 7 Oct. 2011. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652011005000039>.

AUJLA, Shean J.; ALCORN, John F. T H17 cells in asthma and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, vol. 1810, no. 11, p. 1066–1079, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.02.002>.

BARNES, P J. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. **Clin Chest Med**, vol. 35, no. 1 ed. 2013/12/12, p. 71–86, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2013.10.004>.

BARNES, P J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **J Allergy Clin Immunol**, vol. 138, no. 1 ed. 2016/05/27, p. 16–27, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.011>.

BARNES, P J; SHAPIRO, S D; PAUWELS, R A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. **Eur Respir J**, vol. 22, no. 4, p. 672–688, 2003. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00040703>.

BELL, Michelle L; EBISU, Keita; PENG, Roger D; SAMET, Jonathan M; DOMINICI, Francesca. Hospital Admissions and Chemical Composition of Fine Particle Air Pollution. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, vol. 179, no. 12, p. 1115–1120, 2009. <https://doi.org/10.1164/rccm.200808-1240oc>.

BIASIZZO, M; KOPITAR-JERALA, N. Interplay Between NLRP3 Inflammasome and Autophagy. **Front Immunol**, vol. 11, ed. 2020/10/09, p. 591803, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.591803>.

BRIGHTLING, Christopher; GREENING, Neil. Airway inflammation in COPD: Progress to precision medicine. **European Respiratory Journal**, vol. 54, no. 2, 2019. <https://doi.org/10.1183/13993003.00651-2019>.

BROOK, R D; FRANKLIN, B; CASCIO, W; HONG, Y; HOWARD, G; LIPSETT, M; LUEPKER, R; MITTLEMAN, M; SAMET, J; SMITH, S C; TAGER, I; ASSOCIATION, Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention

Science of the American Heart Association. **Circulation**, vol. 109, no. 21, p. 2655–2671, 2004. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000128587.30041.C8>.

BRUSSELLE, Guy G; JOOS, Guy F; BRACKE, Ken R. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. **The Lancet**, vol. 378, no. 9795, p. 1015–1026, 2011. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)60988-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(11)60988-4).

CAI, Yanran; SHAO, Yumeng; WANG, Chenggang. The Association of Air Pollution With the Patients' Visits to the Department of Respiratory Diseases. **Journal of Clinical Medicine Research**, vol. 7, no. 7, p. 551–555, 2015. <https://doi.org/10.14740/jocmr2174e>.

CAMARGO, Leandro Do Nascimento; RIGHETTI, Renato Fraga; ARISTÓTELES, Luciana Ritha De Cássia Rolim Barbosa; DOS SANTOS, Tabata Maruyama; DE SOUZA, Flávia Castro Ribas; FUKUZAKI, Silvia; CRUZ, Maysa Mariana; ALONSO-VALE, Maria Isabel Cardoso; SARAIVA-ROMANHOLO, Beatriz Mangureira; PRADO, Carla Máximo; MARTINS, Milton De Arruda; LEICK, Edna Aparecida; TIBÉRIO, Iolanda De Fátima Lopes Calvo. Effects of Anti-IL-17 on Inflammation, Remodeling, and Oxidative Stress in an Experimental Model of Asthma Exacerbated by LPS. **Frontiers in Immunology**, vol. 8, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01835>.

CARLISLE, Matthew; LAM, Adam; SVENDSEN, Erik R.; AGGARWAL, Saurabh; MATALON, Sadis. Chlorine-induced cardiopulmonary injury. **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol. 1374, no. 1, p. 159–167, 2016. <https://doi.org/10.1111/nyas.13091>.

CHAN, Yik Lung; WANG, Baoming; CHEN, Hui; HO, Kin Fai; CAO, Junji; HAI, Guo; JALALUDIN, Bin; HERBERT, Cristan; THOMAS, Paul S.; SAAD, Sonia; OLIVER, Brian Gregory George. Pulmonary inflammation induced by low-dose particulate matter exposure in mice. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, vol. 317, no. 3, p. L424–L430, 2019. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00232.2019>.

CHANG, M; JIN, W; CHANG, J H; XIAO, Y; BRITAIN, G C; YU, J; ZHOU, X;

WANG, Y H; CHENG, X; LI, P; RABINOVICH, B A; HWU, P; SUN, S C. The ubiquitin ligase Peli1 negatively regulates T cell activation and prevents autoimmunity. **Nat Immunol**, Department of Immunology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA., vol. 12, no. 10 ed. 20110828, p. 1002–1009, 2011. <https://doi.org/10.1038/ni.2090>.

CHENG, S L; YU, C J; YANG, P C. Genetic polymorphisms of cytochrome p450 and matrix metalloproteinase in chronic obstructive pulmonary disease. **Biochem Genet**, vol. 47, no. 7–8 ed. 2009/06/09, p. 591–601, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10528-009-9252-4>.

CHU, X; LIU, X J; QIU, J M; ZENG, X L; BAO, H R; SHU, J. Effects of Astragalus and Codonopsis pilosula polysaccharides on alveolar macrophage phagocytosis and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease mice exposed to PM2.5. **Environ Toxicol Pharmacol**, vol. 48, ed. 2016/10/14, p. 76–84, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.006>.

CHURG, A; COSIO, M; WRIGHT, J L. Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, vol. 294, no. 4 ed. 2008/01/25, p. L612-31, 2008. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00390.2007>.

COHEN, Aaron J; BRAUER, Michael; BURNETT, Richard; ANDERSON, H Ross; FROSTAD, Joseph; ESTEP, Kara; BALAKRISHNAN, Kalpana; BRUNEKREEF, Bert; DANDONA, Lalit; DANDONA, Rakhi; FEIGIN, Valery; FREEDMAN, Greg; HUBBELL, Bryan; JOBLING, Amelia; KAN, Haidong; KNIBBS, Luke; LIU, Yang; MARTIN, Randall; MORAWSKA, Lidia; ... FOROUZANFAR, Mohammad H. Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. **The Lancet**, vol. 389, no. 10082, p. 1907–1918, May 2017. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30505-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30505-6).

CURTIS, L; REA, W; SMITH-WILLIS, P; FENYVES, E; PAN, Y. Adverse health effects of outdoor air pollutants. **Environ Int**, vol. 32, no. 6 ed. 2006/05/30, p.

815–830, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.03.012>.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Qualidade do ar: IQA – Índice de Qualidade do Ar. Disponível em: <http://www3.cetesb.sp.gov.br/qualar/qualidade-do-ar-2/indice-de-qualidade-do-ar-iqa/>

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução CONAMA nº 491, de 19 de setembro de 2018. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=734>

DAVIS, B K; WEN, H; TING, J P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. **Annu Rev Immunol**, vol. 29, p. 707–735, 2011. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101405>.

DE GENARO, I S; DE ALMEIDA, F M; DOS SANTOS LOPES, F D T Q; KUNZLER, D C H; TRIPODE, B G B; KURDEJAK, A; CORDEIRO, B N; PANDOLPHO, R; MACCHIONE, M; BRÜGGEMANN, T R; VIEIRA, R P; MARTINS, M A; DE FÁTIMA LOPES CALVO TIBÉRIO, I; SARAIVA-ROMANHOLO, B M. Low-dose chlorine exposure impairs lung function, inflammation and oxidative stress in mice. **Life Sci**, vol. 267, ed. 2020/12/15, p. 118912, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118912>.

DE GENARO, Isabella Santos; DE ALMEIDA, Francine Maria; HIZUME-KUNZLER, Deborah Camargo; MORIYA, Henrique Takachi; SILVA, Ronaldo Aparecido; CRUZ, João Carlos Gonçalves; LOPES, Renan Boeira; RIGHETTI, Renato Fraga; DE PAULA VIEIRA, Rodolfo; SAIKI, Mitiko; MARTINS, Milton Arruda; TIBÉRIO, Iolanda De Fátima Lopes Calvo; ARANTES-COSTA, Fernanda Magalhães; SARAIVA-ROMANHOLO, Beatriz Manguiera. Low dose of chlorine exposure exacerbates nasal and pulmonary allergic inflammation in mice. **Scientific Reports**, vol. 8, no. 1, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30851-6>.

DE HAAR, C; HASSING, I; BOL, M; BLEUMINK, R; PIETERS, R. Ultrafine but not fine particulate matter causes airway inflammation and allergic airway

sensitization to co-administered antigen in mice. **Clin Exp Allergy**, vol. 36, no. 11, p. 1469–1479, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02586.x>.

DEKKERS, Bart G.J.; SAAD, Shehab I.; VAN SPELDE, Leah J.; BURGESS, Janette K. Basement membranes in obstructive pulmonary diseases. **Matrix Biology Plus**, vol. 12, p. 100092, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2021.100092>.

DOS SANTOS, T M; RIGHETTI, R F; CAMARGO, L D N; SARAIVA-ROMANHOLO, B M; ARISTOTELES, L R C R B; DE SOUZA, F C R; FUKUZAKI, S; ALONSO-VALE, M I C; CRUZ, M M; PRADO, C M; LEICK, E A; MARTINS, M A; TIBÉRIO, I F L C. Effect of Anti-IL17 Antibody Treatment Alone and in Combination With Rho-Kinase Inhibitor in a Murine Model of Asthma. **Front Physiol**, vol. 9, ed. 2018/09/05, p. 1183, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01183>.

ELTOM, S; BELVISI, M G; STEVENSON, C S; MAHER, S A; DUBUIS, E; FITZGERALD, K A; BIRRELL, M A. Role of the inflammasome-caspase1/11-IL-1/18 axis in cigarette smoke driven airway inflammation: an insight into the pathogenesis of COPD. **PLoS One**, vol. 9, no. 11 ed. 2014/11/18, p. e112829, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112829>.

FARINA, F; SANCINI, G; MANTECCA, P; GALLINOTTI, D; CAMATINI, M; PALESTINI, P. The acute toxic effects of particulate matter in mouse lung are related to size and season of collection. **Toxicol Lett**, vol. 202, no. 3 ed. 2011/03/01, p. 209–217, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.01.031>.

FARSALINOS, Konstantinos; CIBELLA, Fabio; CAPONNETTO, Pasquale; CAMPAGNA, Davide; MORJARIA, Jaymin Bhagwanji; BATTAGLIA, Eliana; CARUSO, Massimo; RUSSO, Cristina; POLOSA, Riccardo. Effect of continuous smoking reduction and abstinence on blood pressure and heart rate in smokers switching to electronic cigarettes. **Internal and Emergency Medicine**, vol. 11, no. 1, p. 85–94, 9 Feb. 2016. <https://doi.org/10.1007/s11739-015-1361-y>.

FENG, S; DUAN, E; SHI, X; ZHANG, H; LI, H; ZHAO, Y; CHAO, L; ZHONG, X;

ZHANG, W; LI, R; YAN, X. Hydrogen ameliorates lung injury in a rat model of subacute exposure to concentrated ambient PM_{2.5} via Aryl hydrocarbon receptor. **Int Immunopharmacol**, vol. 77, ed. 2019/11/09, p. 105939, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105939>.

FONKEN, L K; XU, X; WEIL, Z M; CHEN, G; SUN, Q; RAJAGOPALAN, S; NELSON, R J. Air pollution impairs cognition, provokes depressive-like behaviors and alters hippocampal cytokine expression and morphology. **Molecular Psychiatry**, vol. 16, no. 10, p. 987–995, 5 Oct. 2011. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.76>.

FRANCK, U; ODEH, S; WIEDENSOHLER, A; WEHNER, B; HERBARTH, O. The effect of particle size on cardiovascular disorders--the smaller the worse. **Sci Total Environ**, vol. 409, no. 20 ed. 2011/08/10, p. 4217–4221, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.05.049>.

FRICKER, M; DEANE, A; HANSBRO, P M. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. **Expert Opin Drug Discov**, vol. 9, no. 6 ed. 2014/04/23, p. 629–645, 2014. <https://doi.org/10.1517/17460441.2014.909805>.

FRIEDMAN, P J. Imaging Studies in Emphysema. **Proceedings of the American Thoracic Society**, vol. 5, no. 4, p. 494–500, 2008. <https://doi.org/10.1513/pats.200708-128et>.

FU, Yaw-Syan; KANG, Ning; YU, Yanping; MI, Yan; GUO, Jialin; WU, Jingyi; WENG, Ching-Feng. Polyphenols, flavonoids and inflammasomes: the role of cigarette smoke in COPD. **European Respiratory Review**, vol. 31, no. 164, p. 220028, 30 Jun. 2022. <https://doi.org/10.1183/16000617.0028-2022>.

GELB, Arthur F; BARNES, Peter J; GEORGE, Steven C; RICCIARDOLO, Fabio L M; DIMARIA, Giuseppe; ZAMEL, Noe. Review of exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Breath Research**, vol. 6, no. 4, p. 047101, 1 Dec. 2012. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/6/4/047101>.

GODRI POLLITT, K J; MAIKAWA, C L; WHEELER, A J; WEICHENTHAL, S;

DOBBIN, N A; LIU, L; GOLDBERG, M S. Trace metal exposure is associated with increased exhaled nitric oxide in asthmatic children. **Environ Health**, vol. 15, no. 1 ed. 2016/09/01, p. 94, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0173-5>.

GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE (GOLD). Global strategy for Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2023 REPORT. Disponível em: <<https://goldcopd.org/2023-gold-report-2/>>.

GRAY, D L; WALLACE, L A; BRINKMAN, M C; BUEHLER, S S; LA LONDE, C. Respiratory and cardiovascular effects of metals in ambient particulate matter: a critical review. **Rev Environ Contam Toxicol**, vol. 234, p. 135–203, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10638-0_3.

GUO, Zhiqiang; HONG, Zhicong; DONG, Weiyang; DENG, Congrui; ZHAO, Renwu; XU, Jian; ZHUANG, Guoshun; ZHANG, Ruxin. PM2.5-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in the Nasal Mucosa of Rats. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, vol. 14, no. 2, p. 134, 29 Jan. 2017. <https://doi.org/10.3390/ijerph14020134>.

HALUZA, D; MOSHAMMER, H; HOCHGATTERER, K. Dust is in the air. Part II: Effects of occupational exposure to welding fumes on lung function in a 9-year study. **Lung**, vol. 192, no. 1 ed. 2013/11/12, p. 111–117, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00408-013-9529-6>.

HAN WEI; DAN WEI; SHUO YI; FANG ZHANG; WENJUN DING. Oxidative stress induced by urban fine particles in cultured EA.hy926 cells. **Human & Experimental Toxicology**, vol. 30, no. 7, p. 579–590, 16 Jul. 2011. <https://doi.org/10.1177/0960327110374207>.

HANTOS, Z; ADAMICZA, A; JÁNOSI, T Z; SZABARI, M V; TOLNAI, J; SUKI, B. Lung volumes and respiratory mechanics in elastase-induced emphysema in mice. **J Appl Physiol (1985)**, vol. 105, no. 6 ed. 2008/10/09, p. 1864–1872, 2008. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.90924.2008>.

HAWKINS, C. L.; PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. **Amino Acids**, vol. 25, no. 3–4, p. 259–274, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0016-x>.

HE, Fang; LIAO, Baoling; PU, Jinding; LI, Chenglong; ZHENG, Mengning; HUANG, Lingmei; ZHOU, Yumin; ZHAO, Dongxing; LI, Bing; RAN, Pixin. Exposure to Ambient Particulate Matter Induced COPD in a Rat Model and a Description of the Underlying Mechanism. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, p. 45666, 31 Mar. 2017. <https://doi.org/10.1038/srep45666>.

HE, Miao; ICHINOSE, Takamichi; YOSHIDA, Yasuhiro; ARASHIDANI, Keiichi; YOSHIDA, Seiichi; TAKANO, Hirohisa; SUN, Guifan; SHIBAMOTO, Takayuki. Urban PM_{2.5} exacerbates allergic inflammation in the murine lung via a TLR2/TLR4/MyD88-signaling pathway. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, p. 11027, 8 Sep. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11471-y>.

HEDMER, Maria; KARLSSON, Jan-Eric; ANDERSSON, Ulla; JACOBSSON, Helene; NIELSEN, Jörn; TINNERBERG, Håkan. Exposure to respirable dust and manganese and prevalence of airways symptoms, among Swedish mild steel welders in the manufacturing industry. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, vol. 87, no. 6, p. 623–634, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00420-013-0896-3>.

HELFRICH, Sofia; MINDT, Barbara C.; FRITZ, Jörg H.; DUERR, Claudia U. Group 2 innate lymphoid cells in respiratory allergic inflammation. **Frontiers in Immunology**, vol. 10, no. JUN, p. 1–12, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00930>.

HERSH, Craig P; HOKANSON, John E; LYNCH, David A; WASHKO, George R; MAKE, Barry J; CRAPO, James D; SILVERMAN, Edwin K. Family History Is a Risk Factor for COPD. **Chest**, vol. 140, no. 2, p. 343–350, 2011. <https://doi.org/10.1378/chest.10-2761>.

HOGG, J C; TIMENS, W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. **Annu Rev Pathol**, vol. 4, p. 435–459, 2009.

<https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092145>.

HOSSEINI, A; HIROTA, J A; HACKETT, T L; MCNAGNY, K M; WILSON, S J; CARLSTEN, C. Morphometric analysis of inflammation in bronchial biopsies following exposure to inhaled diesel exhaust and allergen challenge in atopic subjects. **Part Fibre Toxicol**, vol. 13, ed. 2016/01/13, p. 2, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0114-z>.

HOUGH, Kenneth P.; CURTISS, Miranda L.; BLAIN, Trevor J.; LIU, Rui Ming; TREVOR, Jennifer; DESHANE, Jessy S.; THANNICKAL, Victor J. Airway Remodeling in Asthma. **Frontiers in Medicine**, vol. 7, no. May, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00191>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2021). Estimativas da população residente no Brasil e unidades da federação com data de referência em 1º de julho de 2021. Recuperado de <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9103-estimativas-de-populacao.html>

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (2022). Poluição atmosférica no Brasil. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/>]

Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Normais Climatológicas do Brasil. Recuperado de <https://portal.inmet.gov.br/normais>

JACQUEMIN, Bénédicte; SIROUX, Valérie; SANCHEZ, Margaux; CARSIN, Anne-Elie; SCHIKOWSKI, Tamara; ADAM, Martin; BELLISARIO, Valeria; BUSCHKA, Anna; BONO, Roberto; BRUNEKREEF, Bert; CAI, Yutong; CIRACH, Marta; CLAVEL-CHAPELON, Françoise; DECLERCQ, Christophe; DE MARCO, Roberto; DE NAZELLE, Audrey; DUCRET-STICH, Regina E; FERRETTI, Virginia Valeria; GERBASE, Margaret W; ... KAUFFMANN, Francine. Ambient Air Pollution and Adult Asthma Incidence in Six European Cohorts (ESCAPE). **Environmental Health Perspectives**, vol. 123, no. 6, p. 613–621, 2015. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408206>.

JANKOWSKI, Mateusz; KRZYSTANEK, Marek; ZEJDA, Jan Eugeniusz; MAJEK, Paulina; LUBANSKI, Jakub; LAWSON, Joshua Allan; BROZEK, Grzegorz. E-Cigarettes are More Addictive than Traditional Cigarettes-A Study in Highly Educated Young People. **International journal of environmental research and public health**, vol. 16, no. 13, 27 Jun. 2019. <https://doi.org/10.3390/ijerph16132279>.

JOSEFOWICZ, Steven Z.; LU, Li-Fan; RUDENSKY, Alexander Y. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. **Annual Review of Immunology**, vol. 30, no. 1, p. 531–564, 23 Apr. 2012. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>.

JUNG, M H; KIM, H R; PARK, Y J; PARK, D S; CHUNG, K H; OH, S M. Genotoxic effects and oxidative stress induced by organic extracts of particulate matter(PM 10)collected from a subway tunnel in Seoul, Korea. **Mutat Res**, vol. 749, no. 1–2, p. 39–47, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.08.002>.

KELLEY, N; JELTEMA, D; DUAN, Y; HE, Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. **Int J Mol Sci**, vol. 20, no. 13 ed. 2019/07/06, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>.

KUMAGAI, Y; AKIRA, S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. **J Allergy Clin Immunol**, vol. 125, no. 5 ed. 2010/04/14, p. 985–992, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.01.058>.

KYUNG, Sun Young; JEONG, Sung Hwan. Particulate-matter related respiratory diseases. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, vol. 83, no. 2, p. 116–121, 2020. <https://doi.org/10.4046/TRD.2019.0025>.

LAURELL, C B; ERIKSSON, S. The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum in α 1-antitrypsin deficiency. 1963. **COPD**, vol. 10 Suppl 1, p. 3–8, 2013. <https://doi.org/10.3109/15412555.2013.771956>.

LAWAL, Akeem O. Air particulate matter induced oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease and atherosclerosis: The role of Nrf2

and AhR-mediated pathways. **Toxicology Letters**, vol. 270, p. 88–95, Mar. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.01.017>.

LEE, E J; IN, K H; KIM, J H; LEE, S Y; SHIN, C; SHIM, J J; KANG, K H; YOO, S H; KIM, C H; KIM, H K; LEE, S H; UHM, C S. Proteomic analysis in lung tissue of smokers and COPD patients. **Chest**, vol. 135, no. 2 ed. 2008/08/27, p. 344–352, 2009. <https://doi.org/10.1378/chest.08-1583>.

LI, H; JAMAL, J; PLAZA, C; PINEDA, S H; CHREIFI, G; JING, Q; CINELLI, M A; SILVERMAN, R B; POULOS, T L. Structures of human constitutive nitric oxide synthases. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, vol. 70, no. Pt 10 ed. 2014/09/27, p. 2667–2674, 2014. <https://doi.org/10.1107/S1399004714017064>.

LI, Ruyi; ZHOU, Rui; ZHANG, Jiange. Function of PM2.5 in the pathogenesis of lung cancer and chronic airway inflammatory diseases (Review). **Oncology Letters**, 26 Mar. 2018. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8355>.

LI, Wande; ZHOU, Jing; CHEN, Lijun; LUO, Zhijun; ZHAO, Yinzhi. Lysyl oxidase, a critical intra- and extra-cellular target in the lung for cigarette smoke pathogenesis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, vol. 8, no. 1, p. 161–184, 2011. <https://doi.org/10.3390/ijerph8010161>.

LIN, Jiun-Lih; THOMAS, Paul S. Current Perspectives of Oxidative Stress and its Measurement in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, vol. 7, no. 4, p. 291–306, 30 Jul. 2010. <https://doi.org/10.3109/15412555.2010.496818>.

LIU, Chen Wei; LEE, Tzu Lin; CHEN, Yu Chen; LIANG, Chan Jung; WANG, Shu Huei; LUE, June Horng; TSAI, Jaw Shiun; LEE, Shih Wei; CHEN, Shun Hua; YANG, Yi Fan; CHUANG, Tzu Yi; CHEN, Yuh Lien. PM2.5-induced oxidative stress increases intercellular adhesion molecule-1 expression in lung epithelial cells through the IL-6/AKT/STAT3/NF-KB-dependent pathway. **Particle and Fibre Toxicology**, vol. 15, no. 1, p. 1–16, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0240-x>.

LODOVICI, M; BIGAGLI, E. Oxidative stress and air pollution exposure. **J Toxicol**, vol. 2011, ed. 2011/08/13, p. 487074, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/487074>.

LOPES, F D; PINTO, T S; ARANTES-COSTA, F M; MORIYA, H T; BISELLI, P J; FERRAZ, L F; LICHTENFELS, A J; SALDIVA, P H; MAUAD, T; MARTINS, M A. Exposure to ambient levels of particles emitted by traffic worsens emphysema in mice. **Environ Res**, vol. 109, no. 5 ed. 2009/04/10, p. 544–551, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.03.002>.

LOPES, F D T Q S; TOLEDO, A C; OLIVO, C R; PRADO, C M; LEICK, E A; MEDEIROS, M C; SANTOS, A B G; GARIPPO, A; MARTINS, M A; MAUAD, T. A comparative study of extracellular matrix remodeling in two murine models of emphysema. **Histology and histopathology**, vol. 28, no. 2, p. 269–76, Feb. 2013. <https://doi.org/10.14670/HH-28.269>.

LORIATO, Ayres Geraldo; SALVADOR, Nadir; LORIATO, Ayran Ayres Barbosa; SOKOLOV, Anton; NASCIMENTO, Antonio Paula; YNOUE, Rita Yuri; MOREIRA, Davidson Martins; REIS, Neyval Costa; ALBUQUERQUE, Taciana Toledo de Almeida. High resolution emissions inventory using WRF-SMOKE-CMAQ integrated modeling for great vitoria region. **Revista Brasileira de Meteorologia**, vol. 33, no. 3, p. 521–536, 2018. <https://doi.org/10.1590/0102-7786333011>.

MALERBA, M; RADAELI, A; OLIVINI, A; DAMIANI, G; RAGNOLI, B; MONTUSCHI, P; RICCIARDOLO, F L. Exhaled nitric oxide as a biomarker in COPD and related comorbidities. **Biomed Res Int**, vol. 2014, ed. 2014/02/27, p. 271918, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/271918>.

MANNINO, David M; BUIST, A Sonia. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. **The Lancet**, vol. 370, no. 9589, p. 765–773, 2007. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61380-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61380-4).

MARTINS-OLIVERA, B T; ALMEIDA-REIS, R; THEODORO-JÚNIOR, O A; OLIVA, L V; NETO DOS SANTOS NUNES, N; OLIVO, C R; VILELA DE BRITO,

M; PRADO, C M; LEICK, E A; MARTINS, M.e A; OLIVA, M L; RIGHETTI, R F; TIBÉRIO, I.e F. The Plant-Derived Bauhinia bauhinioides Kallikrein Proteinase Inhibitor (rBbKI) Attenuates Elastase-Induced Emphysema in Mice. **Mediators Inflamm**, vol. 2016, ed. 2016/08/01, p. 5346574, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5346574>.

MEI, M; SONG, H; CHEN, L; HU, B; BAI, R; XU, D; LIU, Y; ZHAO, Y; CHEN, C. Early-life exposure to three size-fractionated ultrafine and fine atmospheric particulates in Beijing exacerbates asthma development in mature mice. **Part Fibre Toxicol**, vol. 15, no. 1 ed. 2018/03/14, p. 13, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0249-1>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2021). Poluição do ar e saúde. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/>.

MIRZA, S; CLAY, R D; KOSLOW, M A; SCANLON, P D. COPD Guidelines: A Review of the 2018 GOLD Report. **Mayo Clin Proc**, vol. 93, no. 10, p. 1488–1502, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.05.026>.

MOLNÁR, Peter; JOHANNESSEN, Sandra; BOMAN, Johan; BARREGÅRD, Lars; SÄLLSTEN, Gerd. Personal exposures and indoor, residential outdoor, and urban background levels of fine particle trace elements in the general population. **J. Environ. Monit.**, vol. 8, no. 5, p. 543–551, 2006. <https://doi.org/10.1039/b600827e>.

MONTUSCHI, P; COLLINS, J V; CIABATTONI, G; LAZZERI, N; CORRADI, M; KHARITONOV, S A; BARNES, P J. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. **Am J Respir Crit Care Med**, vol. 162, no. 3 Pt 1, p. 1175–1177, 2000. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.3.2001063>.

MORAES-FERREIRA, Renilson; BRANDAO-RANGEL, Maysa Alves Rodrigues; GIBSON-ALVES, Thiago Gonçalves; SILVA-REIS, Anamei; SOUZA-PALMEIRA, Victor Hugo; AQUINO-SANTOS, Helida Cristina; FRISON, Claudio Ricardo; OLIVEIRA, Luis Vicente Franco; ALBERTINI, Regiane;

VIEIRA, Rodolfo P. Physical Training Reduces Chronic Airway Inflammation and Mediators of Remodeling in Asthma. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2022, p. 1–13, 20 Oct. 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5037553>.

NADEAU, Kari; MCDONALD-HYMAN, Cameron; NOTH, Elizabeth M.; PRATT, Boriana; HAMMOND, S. Katharine; BALMES, John; TAGER, Ira. Ambient air pollution impairs regulatory T-cell function in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, vol. 126, no. 4, p. 845-852.e10, Oct. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.08.008>.

NANI GUARIEIRO, Lilian Lefol; NANI GUARIEIRO, Aline Lefol. Vehicle Emissions: What Will Change with Use of Biofuel? **Biofuels - Economy, Environment and Sustainability**. [S. l.]: InTech, 2013. <https://doi.org/10.5772/52513>.

NI, Ling; DONG, Chen. Roles of myeloid and lymphoid cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Frontiers in Immunology**, vol. 9, no. JUN, p. 1–12, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01431>.

NIEUWENHUIJSEN, Mark J.; DONAIRE-GONZALEZ, David; RIVAS, Ioar; DE CASTRO, Montserrat; CIRACH, Marta; HOEK, Gerard; SETO, Edmund; JERRETT, Michael; SUNYER, Jordi. Variability in and Agreement between Modeled and Personal Continuously Measured Black Carbon Levels Using Novel Smartphone and Sensor Technologies. **Environmental Science & Technology**, vol. 49, no. 5, p. 2977–2982, 3 Mar. 2015. <https://doi.org/10.1021/es505362x>.

OH, H; GHOSH, S. NF- κ B: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. **Immunol Rev**, Department of Microbiology and Immunology, Columbia University, New York, NY, USA., vol. 252, no. 1, p. 41–51, 2013. <https://doi.org/10.1111/imr.12033>.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), Organização Mundial da Saúde (OMS). (2008). Efeitos na Saúde da Poluição Atmosférica em Grandes Cidades. Disponível em: <https://www.paho.org/pt>

Organização Mundial da Saúde (OMS). Estatísticas mundiais de saúde 2018: Monitoramento da saúde para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). Genebra, Suíça, 2018.

OSOATA, G O; HANAZAWA, T; BRINDICCI, C; ITO, M; BARNES, P J; KHARITONOV, S; ITO, K. Peroxynitrite elevation in exhaled breath condensate of COPD and its inhibition by fudosteine. **Chest**, vol. 135, no. 6 ed. 2009/02/02, p. 1513–1520, 2009. <https://doi.org/10.1378/chest.08-2105>.

PARK, S J; LEE, Y C. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma. **Respir Res**, vol. 11, ed. 2010/06/16, p. 78, 2010. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-78>.

PATEL, M M; HOEPNER, L; GARFINKEL, R; CHILLRUD, S; REYES, A; QUINN, J W; PERERA, F; MILLER, R L. Ambient metals, elemental carbon, and wheeze and cough in New York City children through 24 months of age. **Am J Respir Crit Care Med**, vol. 180, no. 11 ed. 2009/09/10, p. 1107–1113, 2009. <https://doi.org/10.1164/rccm.200901-0122OC>.

POSSA, S S; CHARAFEDDINE, H T; RIGHETTI, R F; DA SILVA, P A; ALMEIDA-REIS, R; SARAIVA-ROMANHOLO, B M; PERINI, A; PRADO, C M; LEICK-MALDONADO, E A; MARTINS, M A; TIBÉRIO, I.e F. Rho-kinase inhibition attenuates airway responsiveness, inflammation, matrix remodeling, and oxidative stress activation induced by chronic inflammation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, vol. 303, no. 11 ed. 2012/09/21, p. L939-52, 2012. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00034.2012>.

RAO, Xiaoquan; ZHONG, Jixin; BROOK, Robert D.; RAJAGOPALAN, Sanjay. Effect of Particulate Matter Air Pollution on Cardiovascular Oxidative Stress Pathways. **Antioxidants & Redox Signaling**, vol. 28, no. 9, p. 797–818, 20 Mar. 2018. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7394>.

REN, J; LI, B. The Functional Stability of FOXP3 and ROR γ t in Treg and Th17 and Their Therapeutic Applications. **Adv Protein Chem Struct Biol**, vol. 107, ed. 2016/12/15, p. 155–189, 2017. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2016.10.002>.

RHODEN, C R; LAWRENCE, J; GODLESKI, J J; GONZÁLEZ-FLECHA, B. N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. **Toxicol Sci**, vol. 79, no. 2 ed. 2004/03/31, p. 296–303, 2004. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh122>.

RIGHETTI, R F; PIGATI, P A; POSSA, S S; HABRUM, F C; XISTO, D G; ANTUNES, M A; LEICK, E A; PRADO, C M; MARTINS, M.e A; ROCCO, P R; TIBÉRIO, I.e F. Effects of Rho-kinase inhibition in lung tissue with chronic inflammation. **Respir Physiol Neurobiol**, vol. 192, ed. 2013/12/26, p. 134–146, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.12.012>.

ROCA, M; MITU, F; ROCA, I C; MIHAESCU, T. Body composition alterations in chronic obstructive pulmonary disease. **Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi**, vol. 117, no. 1, p. 29–35, 2013. .

SAXENA, Priya; KUMAR, Ankit; MAHANTA, SS Kalikinkar; SREEKANTH, Bojjagani; PATEL, Devendra Kumar; KUMARI, Alka; KHAN, Altaf Husain; KISKU, Ganesh Chandra. Chemical characterization of PM10 and PM2.5 combusted firecracker particles during Diwali of Lucknow City, India: air-quality deterioration and health implications. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 29, no. 58, p. 88269–88287, 13 Dec. 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21906-3>.

SCHATTGEN, S A; FITZGERALD, K A. The PYHIN protein family as mediators of host defenses. **Immunol Rev**, vol. 243, no. 1, p. 109–118, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01053.x>.

SEATON, A; CHERRIE, J; DENNEKAMP, M; DONALDSON, K; HURLEY, J F; TRAN, C L. The London Underground: dust and hazards to health. **Occup Environ Med**, vol. 62, no. 6, p. 355–362, 2005.

<https://doi.org/10.1136/oem.2004.014332>.

SHADIE, A M; HERBERT, C; KUMAR, R K. Ambient particulate matter induces an exacerbation of airway inflammation in experimental asthma: role of interleukin-33. **Clinical and Experimental Immunology**, vol. 177, no. 2, p. 491–499, 9 Jul. 2014. <https://doi.org/10.1111/cei.12348>.

SHAPIRO, S D; GOLDSTEIN, N M; HOUGHTON, A M; KOBAYASHI, D K; KELLEY, D; BELAAOUAJ, A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. **Am J Pathol**, vol. 163, no. 6, p. 2329–2335, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63589-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63589-4).

SIERRA-VARGAS, Martha Patricia; MONTERO-VARGAS, Josaphat Miguel; DEBRAY-GARCÍA, Yazmín; VIZUET-DE-RUEDA, Juan Carlos; LOAEZA-ROMÁN, Alejandra; TERÁN, Luis M. Oxidative Stress and Air Pollution: Its Impact on Chronic Respiratory Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 24, no. 1, p. 853, 3 Jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24010853>.

SILVA, G K; GUTIERREZ, F R; GUEDES, P M; HORTA, C V; CUNHA, L D; MINEO, T W; SANTIAGO-SILVA, J; KOBAYASHI, K S; FLAVELL, R A; SILVA, J S; ZAMBONI, D S. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, vol. 184, no. 3 ed. 2009/12/30, p. 1148–1152, 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902254>.

SINGH, S; SHI, T; DUFFIN, R; ALBRECHT, C; VAN BERLO, D; HÖHR, D; FUBINI, B; MARTRA, G; FENOGLIO, I; BORM, P J; SCHINS, R P. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. **Toxicol Appl Pharmacol**, vol. 222, no. 2 ed. 2007/05/18, p. 141–151, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.05.001>.

STOLLER, James K; ABOUSSOUAN, Loutfi S. α 1-antitrypsin deficiency. **The Lancet**, vol. 365, no. 9478, p. 2225–2236, 2005. <https://doi.org/10.1016/s0140->

6736(05)66781-5.

TANABE, Naoya; VASILESCU, Dragoş M; KIRBY, Miranda; COXSON, Harvey O; VERLEDEN, Stijn E; VANAUDENAERDE, Bart M; KINOSE, Daisuke; NAKANO, Yasutaka; PARÉ, Peter D; HOGG, James C. Analysis of airway pathology in COPD using a combination of computed tomography, micro-computed tomography and histology. **European Respiratory Journal**, vol. 51, no. 2, p. 1701245, 2018. <https://doi.org/10.1183/13993003.01245-2017>.

TANAKA, K; TANAKA, Y; MIYAZAKI, Y; NAMBA, T; SATO, K; AOSHIBA, K; AZUMA, A; MIZUSHIMA, T. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase on pulmonary emphysema. **J Pharmacol Exp Ther**, vol. 338, no. 3 ed. 2011/06/10, p. 810–818, 2011. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.179051>.

THEODORO-JÚNIOR, O A; RIGHETTI, R F; ALMEIDA-REIS, R; MARTINS-OLIVEIRA, B T; OLIVA, L V; PRADO, C M; SARAIVA-ROMANHOLO, B M; LEICK, E A; PINHEIRO, N M; LOBO, Y A; MARTINS, M A; OLIVA, M L; TIBÉRIO, I F. A Plant Proteinase Inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* Attenuates Pulmonary Mechanics, Inflammation and Remodeling Induced by Elastase in Mice. **Int J Mol Sci**, vol. 18, no. 2 ed. 2017/02/14, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18020403>.

TO, Masako; TAKAGI, Dai; AKASHI, Kenichi; KANO, Ichino; HARUKI, Kosuke; BARNES, Peter J.; ITO, Kazuhiro. Sputum Plasminogen Activator Inhibitor-1 Elevation by Oxidative Stress-Dependent Nuclear Factor- κ B Activation in COPD. **Chest**, vol. 144, no. 2, p. 515–521, Aug. 2013. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2381>.

TRAVES, S L. Increased levels of the chemokines GRO α and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. **Thorax**, vol. 57, no. 7, p. 590–595, 2002. <https://doi.org/10.1136/thorax.57.7.590>.

VLAHOS, R; BOZINOVSKI, S. Preclinical murine models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Eur J Pharmacol**, vol. 759, ed. 2015/03/24, p. 265–271, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.029>.

WAGNER, P D. Possible mechanisms underlying the development of cachexia in COPD. **Eur Respir J**, vol. 31, no. 3, p. 492–501, 2008. <https://doi.org/10.1183/09031936.00074807>.

WANG, J; LI, Y; ZHAO, P; TIAN, Y; LIU, X; HE, H; JIA, R; OLIVER, B G; LI, J. Exposure to Air Pollution Exacerbates Inflammation in Rats with Preexisting COPD. **Mediators Inflamm**, vol. 2020, ed. 2020/05/08, p. 4260204, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4260204>.

WEIBEL, E.R.; Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organ. **Lab Invest**. v.12, p.31-55, 1963.

WHITE, Carl W.; MARTIN, James G. Chlorine gas inhalation: Human clinical evidence of toxicity and experience in animal models. **Proceedings of the American Thoracic Society**, vol. 7, no. 4, p. 257–263, 2010. <https://doi.org/10.1513/pats.201001-008SM>.

WHO. **Air pollution estimates**. [S. l.: s. n.], 2014.

WITTCZAK, T; DUDEK, W; WALUSIAK-SKORUPA, J; ŚWIERCZYŃSKA-MACHURA, D; CADER, W; KOWALCZYK, M; PAŁCZYŃSKI, C. Metal-induced asthma and chest X-ray changes in welders. **Int J Occup Med Environ Health**, vol. 25, no. 3 ed. 2012/06/22, p. 242–250, 2012. <https://doi.org/10.2478/S13382-012-0031-9>.

WRIGHT, J L; ZHOU, S; CHURG, A. Pulmonary hypertension and vascular oxidative damage in cigarette smoke exposed eNOS(-/-) mice and human smokers. **Inhal Toxicol**, vol. 24, no. 11, p. 732–740, 2012. <https://doi.org/10.3109/08958378.2012.715698>.

XIE, Zidian; OSSIP, Deborah J; RAHMAN, Irfan; LI, Dongmei. Use of Electronic Cigarettes and Self-Reported Chronic Obstructive Pulmonary Disease Diagnosis in Adults. **Nicotine & Tobacco Research**, vol. 22, no. 7, p. 1155–1161, 12 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntz234>.

YANG, Yonghui; LI, Xiaoxia; AN, Xiaoying; ZHANG, Ling; LI, Xingbin; WANG, Liang; ZHU, Guiyun. Continuous exposure of PM_{2.5} exacerbates ovalbumin-induced asthma in mouse lung via a JAK-STAT6 signaling pathway. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, vol. 29, no. 7, p. 825–832, 2020. <https://doi.org/10.17219/acem/121009>.

YOUNG, T M; HEERAMAN, D A; SIRIN, G; ASHBAUGH, L L. Resuspension of soil as a source of airborne lead near industrial facilities and highways. **Environ Sci Technol**, vol. 36, no. 11, p. 2484–2490, 2002. <https://doi.org/10.1021/es015609u>.

YU, Y; ZHAO, L; XIE, Y; XU, Y; JIAO, W; WU, J; DENG, X; FANG, G; XUE, Q; ZHENG, Y; GAO, Z. Th1/Th17 Cytokine Profiles are Associated with Disease Severity and Exacerbation Frequency in COPD Patients. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, vol. 15, ed. 2020/06/08, p. 1287–1299, 2020. <https://doi.org/10.2147/COPD.S252097>.

ZAREMBA, Leszek S.; SMOLEŃSKI, Włodzimierz H. Optimal portfolio choice under a liability constraint. **Annals of Operations Research**, vol. 97, no. 1–4, p. 131–141, 2000. <https://doi.org/10.1023/A>.

ZHANG, Jie; XU, Qiuyun; SUN, Weichen; ZHOU, Xiaorong; FU, Da; MAO, Liming. New Insights into the Role of NLRP3 Inflammasome in Pathogenesis and Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Journal of Inflammation Research**, vol. Volume 14, p. 4155–4168, Aug. 2021. <https://doi.org/10.2147/JIR.S324323>.

ZHANG, Y; GU, W; SUN, B. TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals. **Adv Exp Med Biol**, vol. 841, p. 15–44, 2014. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9487-9_2.

ZHAO, Junling; LI, Miao; WANG, Zhihua; CHEN, Jinkun; ZHAO, Jianping; XU, Yongjian; WEI, Xiang; WANG, Jianmao; XIE, Jungang. Role of PM_{2.5} in the development and progression of COPD and its mechanisms. **Respiratory Research**, vol. 20, no. 1, p. 1–13, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12931-019->

1081-3.

ZHAO, Y X; ZHANG, H R; YANG, X N; ZHANG, Y H; FENG, S; YU, F X; YAN, X X. Fine Particulate Matter-Induced Exacerbation of Allergic Asthma via Activation of T-cell Immunoglobulin and Mucin Domain 1. **Chin Med J (Engl)**, vol. 131, no. 20, p. 2461–2473, 2018. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.243551>.

ZHEN, Y; ZHANG, H. NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease. **Front Immunol**, vol. 10, ed. 2019/02/28, p. 276, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00276>.

ZHEN, Yu; ZHANG, Hu. NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease. **Frontiers in Immunology**, vol. 10, 28 Feb. 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00276>.

ZHENG, Guina; XU, Xijin; LI, Bin; WU, Kusheng; YEKEEN, Taofeek Akangbe; HUO, Xia. Association between lung function in school children and exposure to three transition metals from an e-waste recycling area. **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, vol. 23, no. 1, p. 67–72, 2013. <https://doi.org/10.1038/jes.2012.84>.

ZHENG, Runxiao; TAO, Lan; JIAN, Hui; CHANG, Yun; CHENG, Yan; FENG, Yanlin; ZHANG, Haiyuan. NLRP3 inflammasome activation and lung fibrosis caused by airborne fine particulate matter. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 163, no. May, p. 612–619, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.076>.

ZHOU, Guofei; DADA, Laura A.; WU, Minghua; KELLY, Aileen; TREJO, Humberto; ZHOU, Qiyuan; VARGA, John; SZNAJDER, Jacob I. Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, vol. 297, no. 6, p. 1120–1130, 2009. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00007.2009>.

ZHU, Jinfang; YAMANE, Hidehiro; PAUL, William E. Differentiation of effector CD4⁺ T cell populations. **Annual Review of Immunology**, vol. 28, no. 1, p. 445–489, 2010. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>.