

Tabata Maruyama dos Santos

Efeitos da exposição a poluição ambiental advinda da pelletização do minério de ferro na inflamação pulmonar alérgica crônica: possível participação do sistema colinérgico na mecânica pulmonar, inflamação, remodelamento da matriz extracelular e no estresse oxidativo em camundongos geneticamente modificados

São Paulo

2023

Tabata Maruyama dos Santos

Efeitos da exposição a poluição ambiental advinda da pelletização do minério de ferro na inflamação pulmonar alérgica crônica: possível participação do sistema colinérgico na mecânica pulmonar, inflamação, remodelamento da matriz extracelular e no estresse oxidativo em camundongos geneticamente modificados

Versão Corrigida

(A versão original encontra-se na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo)

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

Programa: 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

Santos, Tabata Maruyama dos

Efeitos da exposição a poluição ambiental advinda da pelletização do minério de ferro na inflamação pulmonar alérgica crônica : possível participação do sistema colinérgico na mecânica pulmonar, inflamação, remodelamento da matriz extracelular e no estresse oxidativo em camundongos geneticamente modificados / Tabata Maruyama dos Santos. -- 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.Asma 2.Acetilcolina 3.Material particulado 4.Poluição do ar 5.Inflamação 6.Proteínas vesiculares transportadoras de acetilcolina.

USP/FM/DBD-257/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Agradecimentos

Inicialmente agradeço a Deus por ter tido saúde, suporte e oportunidades para concluir este desafio.

À minha família por ter me proporcionado momentos de lazer, acolhimento e risadas. Aos meus pais por terem me dado força quando eu não tinha, pelos abraços, conselhos e pelos dias que ficaram com a Laura e cuidaram dela como filha. Agradeço meus avós, tios, primos e sogros por me incentivarem.

Ao meu esposo Pedro, agradeço primeiramente por ter me incentivado a iniciar o doutorado, por ter sido um companheiro incrível nesta jornada desde o mestrado, por ter concluído o seu doutorado enquanto era pai e esposo de uma doutoranda, por todos os dias que chegava com meus medos, desafios e angústias e você me esperava de braços abertos, por ter feito a minha caminhada leve e de paz.

À minha irmã pelos dias em que mesmo com a distância física se fez presente.

À minha orientadora Dra. Iolanda, que além de ser uma profissional e professora incrível é uma pessoa muito especial, que eu tive o prazer de conhecer, Dra. Iolanda é inspiradora e traz sempre amor no que faz.

À professora Edna pelas conversas e ensinamentos, professora Beatriz pelos conselhos e fotografias, professora Fernanda e Carla pelo aprendizado que tive com vocês, e a toda as professoras do LIM-20 que contribuíram neste caminho.

À Rosana, que é uma pessoa muito especial a quem eu tenho um carinho imenso e que me ajudou tanto nesta tese.

Ao Davi, Sandrinha e Esmeralda, vocês facilitaram esse caminho que é tão intenso, sou só gratidão. Agradeço a Rose e a Angelica por tirarem todas as minhas dúvidas sempre com prontidão e sempre solícitas. Minha gratidão a Suellen e Sara pelo auxílio nas mecânicas.

Ao Renato que além de um amigo, foi uma pessoa que teve papel muito importante no meu estímulo e foi inspiração o tempo todo. Você gera movimento no meu aprendizado. Obrigada por todos os ensinamentos, questionamentos e suporte, pelas palavras e todo apoio, por toda conversa e carinho, além de todo apoio no projeto, transportes e processos.

À Silvia muito obrigada por toda ajuda no meu trabalho, pelas imunoss e especialmente na época da pandemia por ter me ajudado, sem você eu não teria conseguido. À Elaine meu agradecimento por toda parceria, por muitos momentos principalmente na pandemia esteve presente me ajudando em várias etapas. Ao Thiago pela ajuda nas mecânicas e processos do trabalho. Ao Leandro meu amigo eterno, que nunca me negou apoio e auxílio, por me ensinar, aquele que sei que posso contar e além de tudo torna a jornada leve com animação e empolgação, você foi muitas vezes minha energia, que eu consiga sempre ter um pouco de você nos meus projetos futuros. A todos do LIM-20 por me acolherem sempre de braços abertos.

Aos meus coordenadores e liderança da área da fisioterapia do Hospital Sírio libanês (Maria Rita, Edy, Igor, Wellington e Ana Lígia) por estarem presentes nesta trajetória. Aos meus amigos do HSL, do grupo SER e grupos de mentores do HSL por todas as oportunidades de aprendizado em pesquisa.

Por fim, gostaria de agradecer a Laura, minha filha, que veio ao mundo no meio da pandemia e no início do meu doutorado, e fez com que estes desafios fossem intensos e difíceis, mas também risonhos. Obrigada pelo primeiro abraço que me deu e por cada abraço nos dias mais difíceis, por cada palavra nova dita e por me amar de forma pura e sincera.

E assim, agradeço a minha jornada. Muitas vezes me perguntam: como você dá conta de tudo? E a minha resposta é: não dou, sempre que alguém me vê em algum lugar tendo sucesso em alguma parte da minha vida aquilo quase sempre significa que eu estou falhando em outra parte, se eu estiver indo bem no hospital e participando de reuniões frequentes eu provavelmente estou perdendo o banho e a janta com minha filha e esposo, se eu estou em casa lendo um livro e brincando com a Laura provavelmente estou faltando em um atendimento particular, se eu estou no laboratório lendo todas as laminas do doutorado, provavelmente estou deixando de curtir meus pais, se eu estou com minhas amigas em um final de semana de festa, provavelmente estou deixando de estudar sobre algo que preciso. Mas no fim, quero dizer no meio, não dar conta é recompensador. Quero que minha filha e família me vejam como uma mulher que trabalha, que minha filha tenha o exemplo de dedicação, cuidado e amor em tudo que ela se propõe a realizar e que acima de tudo ela viva o hoje, o caminho e não o fim.

RESUMO

Santos TM. Efeitos da exposição a poluição ambiental advinda da pelotização do minério de ferro na inflamação pulmonar alérgica crônica: possível participação do sistema colinérgico na mecânica pulmonar, inflamação, remodelamento da matriz extracelular e no estresse oxidativo em camundongos geneticamente modificados [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: A exposição ao pó de minério em períodos curtos, sazonais ou prolongados pode produzir efeitos nocivos à saúde de indivíduos com doenças alérgicas crônicas, como a asma. Pouco se sabe sobre os efeitos da via anti-inflamatória colinérgica na modulação dos efeitos da poluição em animais com inflamação alérgica crônica. **Objetivo:** Estudar os efeitos do pó de ferro e da poluição em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica e com modificação do receptor VACHT, avaliando a hiperresponsividade, remodelamento inflamatório e as respostas ao estresse oxidativo durante as estações de verão e inverno em dois locais de uma cidade do Brasil. **Métodos:** Foram utilizados um total de 108 animais, divididos em dezoito grupos (n = 6): WT (tipo selvagem), WT-Local1 (tipo selvagem exposto a pó metálico devido à pelotização de ferro em uma mineradora), WT-Local2 (tipo selvagem exposto a pó de metal 3,21mi em uma empresa de mineração), VACHT KD (animais geneticamente modificados com diminuição de VACHT); VACHT KD Local1 (exposto a pó de ferro devido da pelotização de minério de ferro em uma mineradora); VACHT KD-Local2 (exposto ao pó de ferro a 5 Km de uma mineradora), VACHT KDA (animais geneticamente modificados com diminuição de VACHT e sensibilizados com ovalbumina); VACHT KDA-Local1 (animais geneticamente modificados com diminuição de VACHT sensibilizados com ovalbumina e expostos ao Local1); VACHT KDA-Local2 (animais geneticamente modificados com diminuição de VACHT sensibilizados com ovalbumina e expostos ao Local2). Os animais foram expostos aos locais por 2 semanas durante as estações de verão e inverno. No 30º dia do protocolo, avaliamos hiperresponsividade, inflamação, remodelação, respostas ao estresse oxidativo e sistema colinérgico. **Resultados:** Quando analisamos os animais WT, os animais expostos ao Local 1 apresentaram aumento de %Rrs e %Raw em relação aos animais do grupo biotério, também houve aumento de %Rrs e células positivas para IL-17 no WT -Local2 animais em comparação com os animais WT. No verão, animais WT expostos ao Local 1 apresentaram aumento de %Rrs, Raw e IL-5 em relação aos animais expostos ao Local 2, e no inverno, animais expostos ao local 2 apresentaram aumento de células IL-17 positivas em relação aos animais expostos ao Local 1. Ao comparar animais VACHT KD com animais WT, houve aumento de %Rrs, NFkappaB, IL-5 e IL-13 e diminuição de α -7 em animais VACHT KD. Os animais VACHT KDA apresentaram aumento da hiperresponsividade (%Rrs, %Raw, %Ers), de todos os marcadores

inflamatórios avaliados, de remodelamento (MMP-9, TIMP-1, TGF- β , conteúdo de fibras de colágeno), de iNOS e de conteúdo de isoprostano em comparação aos animais do grupo VACHT KD. Animais VACHT KDA expostos ao Local 1 apresentaram aumento de %Rrs, %Htis, iNOS, eosinófilos, NF-Kappa B, IL-5 e IL-13 em relação aos animais que permaneceram no biotério. Os animais VACHT KDA expostos ao Local 2 apresentaram aumento de eosinófilos, IL-4, IL-5, IL-13, MMP-9, fibras colágenas e teor de isoprostano em relação aos animais que permaneceram no biotério. **Conclusão:** A redução da sinalização colinérgica aumenta a inflamação pulmonar em um modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica e quando associada à poluição pode exacerbar algumas respostas relacionadas à inflamação, estresse oxidativo e remodelação

Palavras-chave: Asma. Acetilcolina. Material particulado. Poluição do ar. Inflamação. Proteínas vesiculares transportadoras de acetilcolina.

ABSTRACT

Santos TM. Effects of exposure to environmental pollution from pelletizing of iron ore in chronic allergic lung inflammation: possible participation of the cholinergic system in lung mechanics, inflammation, extracellular matrix remodeling and oxidative stress in genetically modified mice [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Background: Exposure to ore dust in short periods, seasonally or in the long term, can produce harmful effects on the health of individuals with chronic allergic diseases, such as asthma. Little is known about the effects of the cholinergic anti-inflammatory pathway on the modulation of pollution effects in animals with chronic allergic inflammation. **Objective:** To study the effects of iron dust and pollution in mice with chronic allergic lung inflammation and with the modification of VACHT receptor by evaluating hyperresponsiveness, inflammatory remodeling and oxidative stress responses during the summer and winter stations in two locals in a city in Brazil. **Methods:** A total of one hundred and eight animals were used, were divided into eighteen groups ($n = 6$): WT (wild type), WT-Local1 (wild type exposed to metal powder due to pelletizing iron at a mining company), WT-Local2 (wild type exposed to metal powder 3.21mi at a mining company), KD VACHT (genetically modified animals with reduced VACHT); KD VACHT-Local1 (exposed to metal powder due to pelletizing iron ore at a mining company); KD VACHT-Local2 (exposed to metal powder 3.21mi at a mining company), KDA VACHT (genetically modified animals with reduced VACHT sensitized with ovalbumin); KDA VACHT-Local1 (genetically modified animals with reduced VACHT sensitized with ovalbumin and exposed to Local1); KDA VACHT-Local2 (genetically modified animals with reduced VACHT sensitized with ovalbumin and exposed to Local2). The animals were exposed to the locals for 2 weeks during the summer and winter stations. On 30th day of the protocol, we evaluated hyperresponsiveness, inflammation, remodeling, oxidative stress responses and cholinergic system. **Results:** When we analyzed the WT animals, the animals exposed to Local 1 showed an increase in %Rrs and %Raw compared to the animals in the vivarium group, there was also an increase in %Rrs and IL-17 positive cells in the WT-Local2 animals compared to the WT animals. In summer, WT animals exposed to Local 1 showed an increase in %Rrs, Raw and IL-5 compared to animals exposed to Local 2, and in winter, animals exposed to local 2 showed an increase in IL-17 positive cells compared to animals exposed to Local 1. When comparing VACHT KD animals with WT animals, there was an increase in %Rrs, NFkappaB, IL-5 and IL-13 and a decrease in alpha-7 in VACHT KD animals. VACHT KDA animals showed increased hyperresponsiveness (%Rrs, %Raw, %Ers), of all inflammatory markers evaluated, of remodeling (MMP-9, TIMP-1, TGF-B, collagen fiber content), of iNOS and of isoprostane content compared to animals in the VACHT KD group. Animals VACHT KDA exposed to Local 1 showed an increase in %Rrs, %Htis, iNOS, eosinophils,

NFKappa B, IL-5 and IL-13 compared to animals that remained in the vivarium. Animals VAcHT KDA exposed to Local 2 showed an increase in eosinophils, IL-4, IL-5, IL-13, MMP-9, collagen fibers and isoprostane content compared to animals that remained in the vivarium. **Conclusion:** Reduced cholinergic signaling increases lung inflammation in a model of chronic allergic lung inflammation and that when associated with pollution it can exacerbate some responses related to inflammation, oxidative stress and remodeling

Keywords: Asthma. Acetylcholine. Particulate matter. Air pollution. Inflammation. Vesicular acetylcholine transport proteins.

LISTA DE SIGLAS

ACh	Acetilcolina
Al	Alumínio
ASAS	Alta Subtropical do Atlântico Sul
Ca	Cálcio
Cl	Cloro
CLM	Cadeia Leve de Miosina
CO	Monóxido de Carbono
Cr	Crômio
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ECP	Proteína catiônica eosinófila
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilos
EPO	Peroxidase de eosinófilos
Ers	Elastância do Sistema Respiratório
Fe	Ferro
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FLBA	Fluído do Lavado Broncoalveolar
Gtis	Resistência do Tecido Pulmonar
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCIO	Ácido hipocloroso
HRVA	Hiperresponsividade das vias aéreas
Htis	Elastância dos Tecidos Pulmonares
IEMA	Instituto de Meio Ambiente e Recursos Hídricos
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IQAR	Índice de Qualidade do Ar
mAChR	Receptores Muscarínicos
MMP	Metaloproteinases
Mn	Manganês
MBP	Proteína básica principal
nAChR	Receptores Nicotínicos
NANC	Sistema nervoso não adrenérgico não colinérgico
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B

Ni	Níquel
NO	Óxido Nítrico
NO ₂	Dióxido de Nitrogênio
O ₃	Ozônio
OVA	Ovoalbumina
PI	Partículas Inaláveis
PIB	Produto Interno Bruto
PM	Material Particulado
PNS	Pesquisam Nacional de Saúde
PTS	Partículas totais em suspensão
Raw	Resistência das Vias Aéreas
RMGV	Região Metropolitana da Grande Vitória
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Rrs	Resistência do Sistema Respiratório
Si	Silício
SO ₂	Dióxido de Enxofre
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
Th	T helper
VAcHT	Transportador Vesicular de Acetilcolina
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Poluição atmosférica.....	11
1.1.1. Padrões de Qualidade do Ar.....	14
1.2. Município de Vitória.....	15
1.2.1. Clima Local.....	16
1.2.2. Aspectos Socioeconômicos.....	18
1.2.3. Poluição em Vitória.....	18
1.3. Asma.....	23
1.3.1. Fisiopatogenia.....	24
1.3.2. Remodelamento.....	26
1.3.3. Hiperresponsividade.....	28
1.3.4. Estresse oxidativo.....	30
1.4. Modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica.....	33
1.5. Sistema colinérgico.....	34
1.5.1. O papel da acetilcolina na fisiopatogenia da asma.....	34
1.5.2. Hipersecreção de muco.....	39
1.5.3. Papel do sistema colinérgico na inflamação das vias aéreas.....	39
1.5.4. Influência do Sistema Colinérgico no Remodelamento das Vias Aéreas	40
2. JUSTIFICATIVA.....	42
3. OBJETIVOS.....	43
3.1. Objetivo Geral.....	43
3.2. Objetivos Específicos.....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1. Locais de exposição ambiental.....	44
4.2. Animais.....	44
4.2.1. Experimento 1.....	45
4.2.2. Experimento 2.....	46
4.3. Mensuração do óxido nítrico exalado.....	48
4.4. Avaliação da mecânica respiratória.....	48
4.5. Avaliação da histopatologia e imunohistoquímica.....	49
4.6. Análise morfométrica.....	51
4.7. Análise de imagens.....	51

4.8.	Análise do particulado	52
4.9.	Análise Estatística	52
5.	RESULTADOS	53
5.1.	Experimento 1. Animais selvagens (WT) X Knockdown (KD)	53
5.2.	Experimento 2. Knockdown (KD) X Knockdown + inflamação crônica pulmonar (KDA)	54
5.2.1.	Hiperresponsividade a metacolina	55
5.2.2.	Inflamação	60
5.2.3.	Estresse Oxidativo	70
5.2.4.	Remodelamento	74
5.2.5.	Avaliação da expressão de $\alpha 7$ nAChR nas paredes brônquica	81
5.2.7.	Fotomiografias	82
5.3.	Resultados parciais do material particulado	86
6.	DISCUSSÃO	87
7.	CONCLUSÃO	96
8.	REFERÊNCIAS	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. Poluição atmosférica

A poluição é um problema das grandes cidades do mundo e de polos industriais. Existem padrões internacionais estabelecidos para a emissão de poluentes. No entanto, de acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (2008), mesmo em locais que atendem a esses padrões, as mudanças nos níveis de poluição a curto e longo prazo podem ter efeitos nocivos à saúde, como alergias, doenças respiratórias, cardíacas e câncer. Segundo as Nações Unidas (2020), a poluição do ar é responsável por 7 milhões de mortes prematuras todos os anos, principalmente em países de baixa e média renda.

A mistura complexa de partículas de poluentes (material sólido) e gotículas de líquido na atmosfera, é denominada material particulado (PM) com diâmetros que variam de grossos (diâmetro entre 2,5 μ m a 10 μ m), finos (diâmetro menor que 2,5 μ m) e ultrafinos (diâmetro de 0,1 μ m). Partículas finas e ultrafinas podem ser inaláveis (1).

O material particulado contém uma extensa variedade de substâncias tóxicas derivadas de produtos industriais e emissões veiculares, combustões de carvão, sal marinho e poeiras (2). Dependendo da cidade onde o poluente é coletado, o PM pode conter quantidades variáveis de restos de combustão de combustível fóssil, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, sulfatos, nitratos, material microbiano, e elementos químicos, como ferro (Fe), zinco (Zn), sílica, sódio e alumínio (Al). Além disso, esses PMs podem permanecer na atmosfera por um longo período, por grandes distâncias e facilmente desencadeiam doenças pulmonares (4).

Quanto menor o tamanho da partícula, maior o dano a PM causa nos pulmões (5). O material particulado fino, induz maior resistência pulmonar e respostas inflamatórias alérgicas em comparação com maiores quando testado em uma dose de massa igual (6,7). Partículas com diâmetros menores que 2,5 μ m podem penetrar nos bronquíolos e alvéolos sendo considerado a partícula mais prejudicial para os pulmões, pois permanecem por mais tempo em suspensão na atmosfera, aumentando a probabilidade de inalação e a taxa com

que a composição do ar é alterada, Figura 1 (8). Alguns dos efeitos cardiorrespiratórios gerados a saúde são: aumento do risco de doenças cardiovasculares, inflamações crônicas pulmonares, redução da função pulmonar e aumento de crises de asma (9). Além da área de PM, a composição química também é um importante determinante da resposta inflamatória (10).

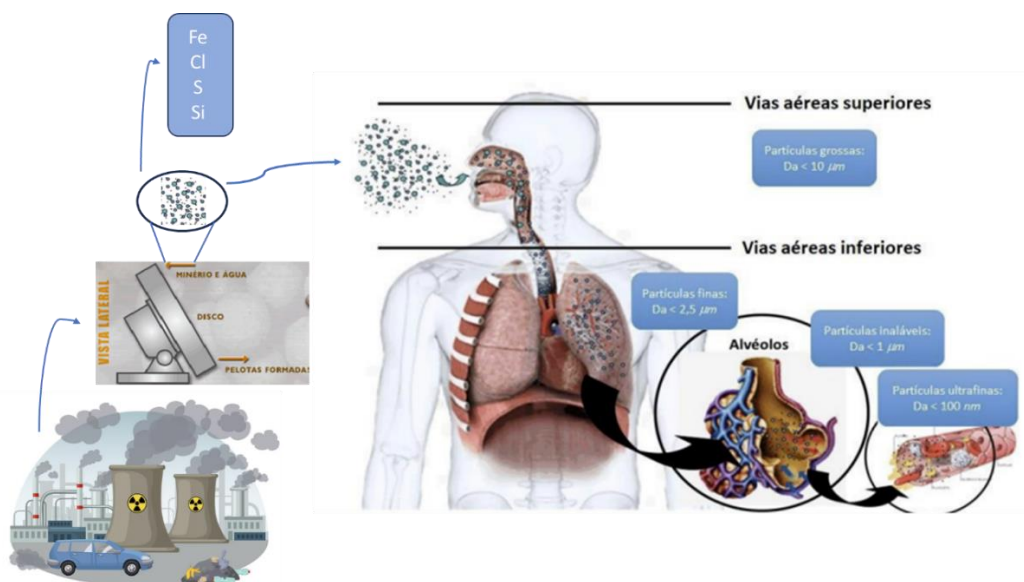


Figura 1 - Representação do material particulado gerado pela poluição advinda de pó de minérios e áreas pulmonares de deposição de acordo com seu tamanho. Adaptado de Guarieiro et al., 2013 (3).

Estudos mostraram resultados inconsistentes em respostas T helper-1 (Th1) ou T helper-2 (Th2) associadas a PM 2,5µm. Alguns estudos mostraram que a exposição ao PM 2,5µm leva a uma resposta imune tendenciosa Th1 em modelos animais ou humanos (11). Outros mostraram que a resposta imune Th2 é dominante, sendo que em camundongos sensibilizados com ovoalbumina (OVA) e expostos a PM 2,5µm os linfócitos, neutrófilos e IL-4 contribuem para a inflamação das vias aéreas, e esta inflamação é agravada pelo PM (12).

O PM 2,5µm está correlacionado com a exacerbação da asma na Europa, Américas, Coréia, Japão e China (13–18). A morbidade da asma também está positivamente associada aos níveis ambientais diários de PM2,5µm (10).

Poluentes como o ozônio (O₃) estão ligados ao aumento de crise asmática, bronquite e doenças pulmonares obstrutivas crônicas, bem como à

redução das funções pulmonares em crianças. Este poluente está presente nas camadas mais baixas da atmosfera e é produzido por uma série de reações fotoquímicas complexas que envolvem dióxido de nitrogênio (NO_2) e compostos orgânicos voláteis, que migram de suas fontes originais por muitos quilômetros. Sua produção depende da insolação e seus picos ocorrem no verão e nas horas próximas ao meio-dia (19).

O precursor do ozônio é a queima de combustível fóssil, que é a principal fonte de monóxido e NO_2 . O monóxido é convertido em dióxido de nitrogênio por oxidação. Este poluente pode ser convertido em ácido nítrico e está associado a efeitos e desfechos adversos à saúde, principalmente em doenças respiratórias como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)(19).

Outro poluente é o enxofre, que vem de diversas fontes, como o petróleo e metais em estado bruto. O dióxido de enxofre (SO_2) é emitido e formado pela oxidação do elemento e sua presença na atmosfera pode levar à formação de ácidos (H_2SO_3 e H_2SO_4) e provocar alterações climáticas. Este poluente está relacionado a vários efeitos e desfechos danosos a saúde, principalmente na exacerbação da asma e da pneumonia (19).

Além de terem efeitos perigosos para a saúde, os metais são frequentemente usados como combustíveis aditivados. Houve diminuição da poluição causada pelos metais desde que houve a proibição do uso de tetraetil de chumbo como aditivo (19).

A manipulação de materiais com ferro e aço podem liberar para a atmosfera grandes quantidades de metais, incluindo o manganês (Mn), o níquel (Ni), o zinco (Zn), o cromo (Cr) e o ferro (Fe). A duração da exposição ocupacional está associada a uma diminuição das medidas da função pulmonar (20). Estudos relatam aumento dos sintomas respiratórios e asma ocupacional em trabalhadores expostos a vapores de soldagem (21,22).

Estas emissões podem ser uma fonte importante de exposição ambiental para populações em comunidades residenciais próximas. Por exemplo, um estudo de indivíduos saudáveis em Ontário, no Canadá, descobriu

que as medidas da função pulmonar eram significativamente mais baixas depois que os indivíduos passaram cinco dias consecutivos em um bairro adjacente a uma usina siderúrgica quando comparado a cinco dias passados em um campus universitário mais distante. Além disso, mesmo após a cessação da produção, essas populações podem continuar a ser expostas através da inalação de partículas ressuspendidas (23).

Zheng et al., 2013 demonstraram que crianças que vivem em Guiyu, na China, uma cidade de processamento de lixo eletrônico que sabe-se que tem alta concentração de Mn, Ni e Cr, apresentaram medidas de função pulmonar significativamente menores do que as crianças de uma cidade sem história de processamento de lixo eletrônico (24).

Pesquisadores relatam que em municípios dos Estados Unidos que tinham níveis mais elevados de Ni, as internações por doenças cardiovasculares e respiratórias foram maiores (25). A presença de Ni em PM foi associada com maior chance de broncoconstrição em crianças com 24 meses (26). Níveis de Zinco no ambiente também foram associados com aumentos de idas ao pronto socorro e hospitalizações por asma em crianças (27). Também existe associação significativa entre exposição ao SO_4 em $PM_{2,5}$ e hospitalizações e idas ao pronto-socorro em crianças asmáticas (28). Há um risco aumentado de morbidade respiratória com concentrações crescentes de metais no PM ambiental (29).

O chumbo, o material particulado (PM_{10} ou $PM_{2,5}$), o SO_2 , o NO_2 , o monóxido de carbono (CO) e o O_3 são os agentes mais perigosos para a saúde listados em critérios de qualidade do ar (30). Os riscos potenciais de agentes como compostos orgânicos voláteis, sulfatos, cloretos, metais e dioxinas, que ainda não são avaliados ou monitorados adequadamente no ambiente, constituem uma preocupação. Liu *et al.* (2013), consideraram que em relação a saúde, o ozônio e o material particulado são os contaminantes atmosféricos que mais trazem prejuízos (31).

1.1.1. 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, seu objetivo é fornecer um instrumento de gestão da qualidade do ar, ajudar na medição de poluentes presentes e introduzir como cada condição do ar afeta a saúde humana (Resolução nº491, de novembro de 2018).

Com o Índice de Qualidade do Ar (IQAR), avalia-se os efeitos dos poluentes na população. Uma fórmula matemática é utilizada através de resultados de concentração obtidos, e com isso classifica-se a qualidade do ar em Boa, Moderada, Ruim, Muito ruim ou Péssima. Os dados são então colocados em uma tabela e identificados com cores de acordo com a sua classificação, conforme apresentado na Tabela 1. É divulgado o resultado mais grave após o cálculo dos poluentes monitorados.

Por meio do amostrador de grandes volumes que é utilizado durante 24 horas é realizada a medição do nível de partículas totais em suspensão (PTS).

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

Fonte: Cetesb, 2019

1.2. Município de Vitória

A Região Metropolitana da Grande Vitória (RMGV) abrange um território de 2.316,49 km² com área urbana de 672,57 km² (32) e é um dos principais polos de desenvolvimento urbano e industrial do Estado do Espírito Santo, comportando uma população de aproximadamente 2 milhões de habitantes (IBGE, 2020) (33), o que equivale a cerca de 50% da população do Estado, embora ocupe apenas 5% do território capixaba (IJSN, 2008) (34), conforme

ilustrado na Figura 2. Os municípios de Serra, Cariacica, Vitória, Viana e Vila Velha fazem parte da RMGV.

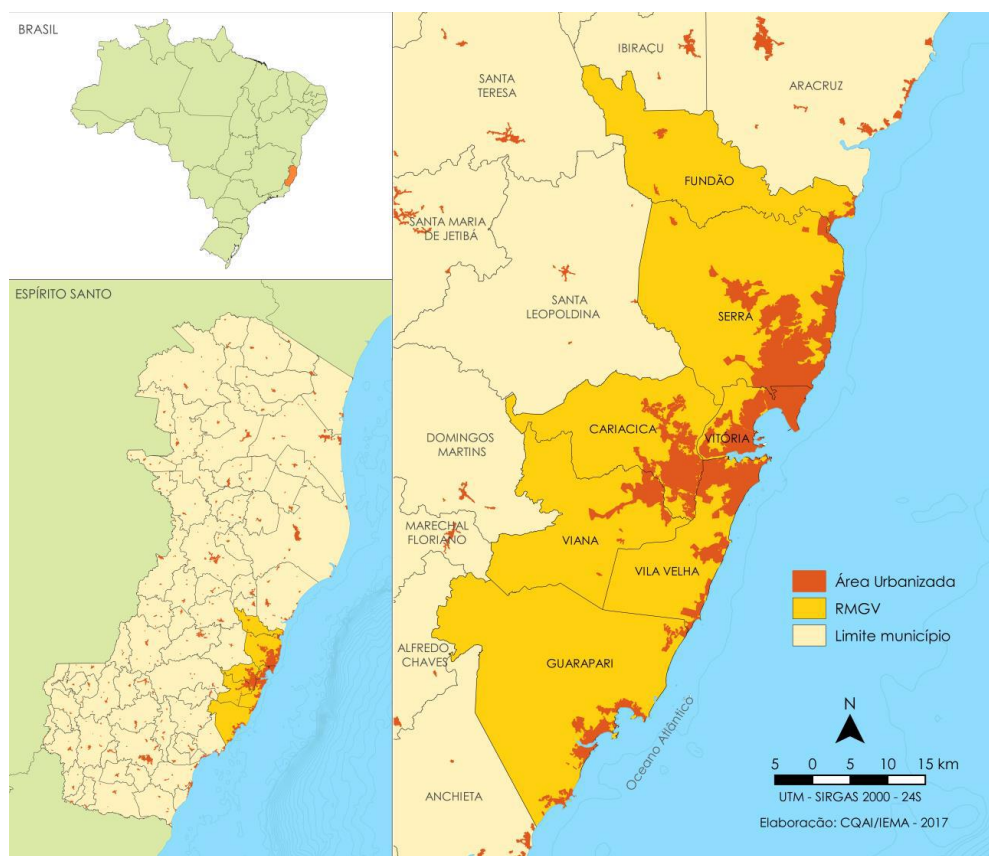


Figura 2. Localização da Região Metropolitana da Grande Vitória (Relatório Anual de Qualidade do ar, 2019).

1.2.1. Clima Local

As condições climáticas e meteorológicas são fortemente influenciadas pela localização geográfica (latitude) e pelo relevo (35). A RMGV abrange uma área com relevo que varia desde colinas até planícies litorâneas. Possuindo uma variedade de áreas de solo, variando de extensas áreas de cobertura vegetal até grandes áreas pavimentadas nas cidades. A topografia e a proximidade com o oceano regulam o clima, o que favorece a dispersão de alguns poluentes na região (35).

As condições meteorológicas influenciam na dispersão ou acumulação de poluentes (36). Fatores como temperatura, umidade relativa, velocidade e direção do vento estão frequentemente associados à qualidade do ar (37,38).

Autores sugerem que a baixa umidade relativa e a baixa velocidade do vento elevam a quantidade de poluentes (39). Além disso, a precipitação pluviométrica ajuda a dispersar e diluir os poluentes o que resulta em uma redução da concentração destes (40).

A RMGV está localizada na zona tropical, tendo o inverno com uma estação seca e no verão uma estação chuvosa (35). Detalhadamente a menor quantidade de precipitação ocorre em agosto (49,6 mm). A Alta Subtropical do Atlântico Sul (ASAS) é significativa para o clima da América do Sul e afeta o clima do Brasil. A ASAS concentra os poluentes nas camadas mais próximas à superfície dos centros urbanos das regiões sul e sudeste durante o inverno, impedindo a entrada de frentes e promovendo a formação de inversão térmica (41).

Segundo dados do município de Vitória no ano em que foi realizado este estudo, em relação à precipitação, notou-se que o inverno foi o período mais seco, e o verão o período mais chuvoso. Porém, em 2019, ocorreram períodos atípicos, especialmente em janeiro, que ocorreu escassez de chuvas. Ao longo de 2019, as médias mensais de temperatura do ar não apresentaram grandes variações e a umidade relativa do ar manteve-se alta durante todo o ano (42).

Houve forte influência dos ventos do quadrante nordeste (NE) em praticamente todos os meses do ano, sendo mais acentuada nos meses de verão. Julho teve os dias mais desfavoráveis à dispersão de poluentes, este mês é considerado seco, com menor teor de umidade no solo e, portanto, menor taxa de evaporação, gera influência na formação de nuvens convectivas, reduzindo assim os movimentos turbulentos e a altura da camada limite. Isso resulta em uma pior qualidade do ar porque os poluentes não são dispersos ou diluídos. (42).

Liu e Johnson (2002) explicam que vários fatores, incluindo temperatura, umidade relativa, velocidade e direção do vento, estão frequentemente associados à poluição do ar (39). Sabe-se que a concentração de poluentes como o PM₁₀, é maior no inverno (40)

Nesse contexto, um estudo realizado na Região de Grande Vitória notou que elementos meteorológicos como a precipitação pluviométrica e a velocidade do vento reduzem significativamente a probabilidade de ocorrência de má qualidade do ar. Indicaram que a probabilidade de uma qualidade do ar "não boa" é maior no inverno do que em outras estações do ano (40).

1.2.2. Aspectos Socioeconômicos

À medida que a urbanização cresceu nos países em desenvolvimento houve maior atividade nos setores de transporte, energia e industrial, aumentando a poluição do ar e afetando os programas de controle da poluição do ar (43).

Nesse contexto, é importante destacar que a economia do estado do Espírito Santo, onde se localiza a RMGV, foco deste estudo, tem crescido significativamente nos últimos anos, principalmente nos últimos anos, a partir de 2003, com taxas de crescimento do Produto Interno Bruto (PIB) superiores à média nacional. Com isso, várias indústrias e empresas se instalaram ou ampliaram suas instalações no estado, principalmente na RMGV, o que resulta em um aumento do nível de poluição atmosférica, apesar de diversos regulamentos impostos pelos órgãos responsáveis pelo controle ambiental a estas indústrias e empresas. O aumento da frota de veículos, o maior consumo de energia e outros fatores também contribuem para as emissões de poluentes na área (40).

1.2.3. Poluição em Vitória

Em particular, a Região Metropolitana de Vitória, a qualidade do ar degradou-se devido à atividade de industrialização e urbanização (44).

A avaliação da qualidade do ar na RMGV consiste em: medir a concentração dos poluentes; e comparar esses valores com valores de referência que correspondem aos padrões de qualidade do ar estabelecidos pela lei ambiental estadual. Os instrumentos de medição estão dispostos em locais estratégicos da região (42).

O Instituto de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA) publica todos os dias um resumo das estações de monitoramento, o valor do IQA e o poluente responsável pelo IQA em cada estação e a classificação da qualidade do ar correspondente para informar à população sobre a qualidade do ar da RMGV.

Como relatado a poluição atmosférica causa vários problemas de saúde, portanto, a qualidade do ar é um assunto de grande importância. O estudo dos efeitos do PM no clima, no meio ambiente e na saúde humana é de interesse científico. Estudos visam melhorar a compreensão do funcionamento e das etapas dos processos de emissão e formação de aerossóis em cidades (45,46).

Autores demonstraram a relação entre poluentes comuns como as partículas inaláveis com diâmetros menores que 10 μm , CO, SO₂, óxidos de nitrogênio (NO_x) e O₃, e os problemas de saúde (47–49).

Em Vitória, três fontes principais de poluentes atmosféricos são veículos, indústria minerosiderúrgica (Figura 3) e a terceira que representa as operações de portos e aeroportos, que contribui para os níveis de SO₂ e NO_x (50).

A região é altamente industrializada com mais de uma centena de indústrias/atividades responsáveis pela emissão de 1.305,1 kg h⁻¹ de PM na atmosfera, sendo 60% emitidos como PM₁₀ (805,4 kg h⁻¹) e 40% como PM_{2,5} (515,6 kg h⁻¹), sendo que as atividades mais impactantes são as siderúrgicas e as pelletizadoras que estão localizadas no complexo industrial, sendo responsáveis por aproximadamente 70% de todas as emissões de MP da região (51). A siderúrgica tem capacidade nominal para produzir 7 milhões de toneladas de aço por ano, incluindo a produção de cerca de 3 milhões de toneladas de carvão e cerca de 5,5 milhões de toneladas de sintetização de minério de ferro (52). A pelletizadora tem capacidade para produzir cerca de 30 milhões de toneladas de pelotas de ferro por ano (52).

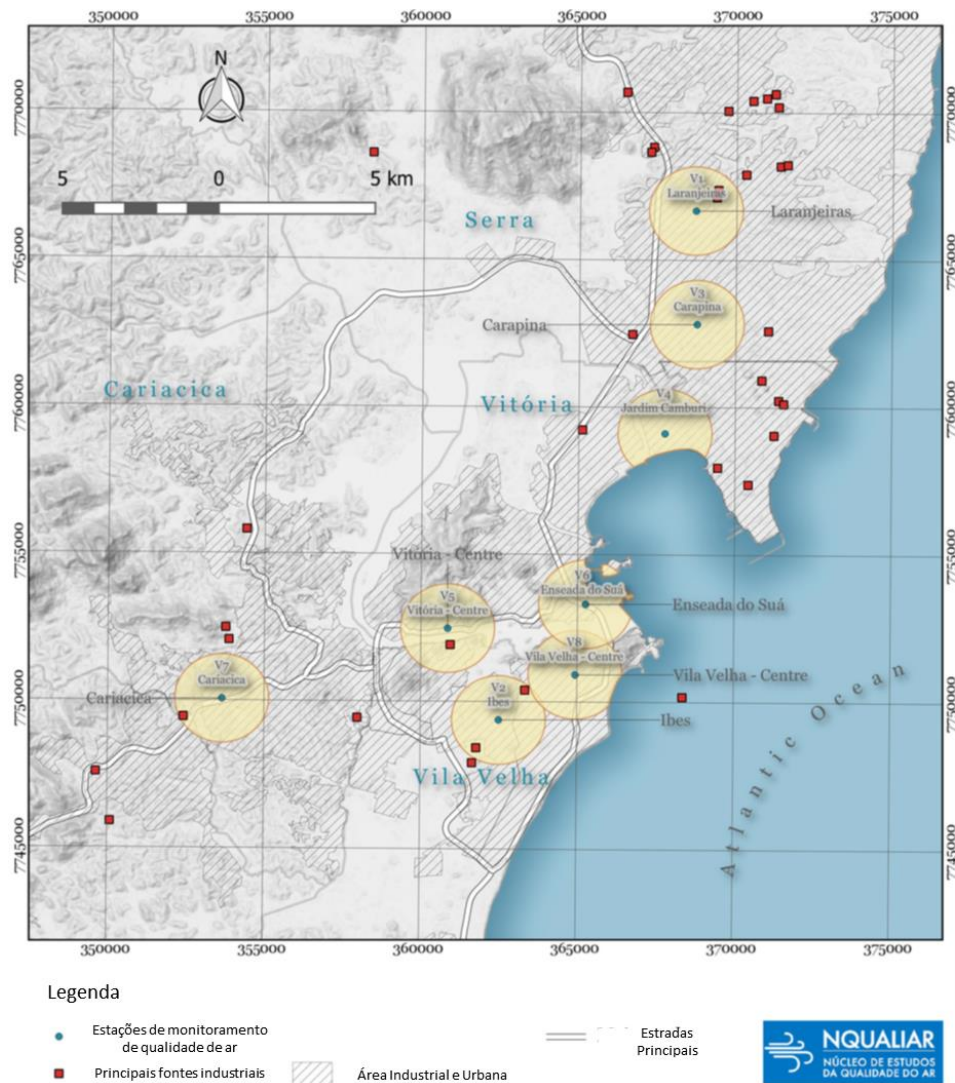


Figura 3. Mapa adaptado ilustrando as principais fontes industriais presentes no município de Vitória (Machado et al., 2020) (53)

A principal empresa mineradora da região utiliza o minério de ferro como matéria prima. O minério de ferro é extraído principalmente de depósitos a céu aberto por meio de operações de mineração e o produto bruto, “run of mine”, é submetido a processamento mineral. Assim, o material é submetido a uma série de operações de fragmentação, separação por tamanho, concentração, desidratação, entre outros, visando adequar as características químicas, físicas e metalúrgicas para atender às demandas dos processos siderúrgicos. A distribuição granulométrica do minério de ferro é um requisito muito importante a ser caracterizado após o seu processamento mineral. Materiais com distribuição granulométrica muito fina não são adequados para serem utilizados

diretamente nos reatores de redução, necessitando ser aglomerados por diferentes processos como sinterização ou pelotização (54).

Pelotas, produtos do processo da mineradora, são bolas formadas pela laminação úmida de concentrados e finos de minérios de ferro de diferentes composições mineralógicas e químicas, com adição de aditivos e ligantes, em tambor horizontal ou em disco inclinado (54).

A Figura 4 mostra um fluxograma do processo de pelotização.

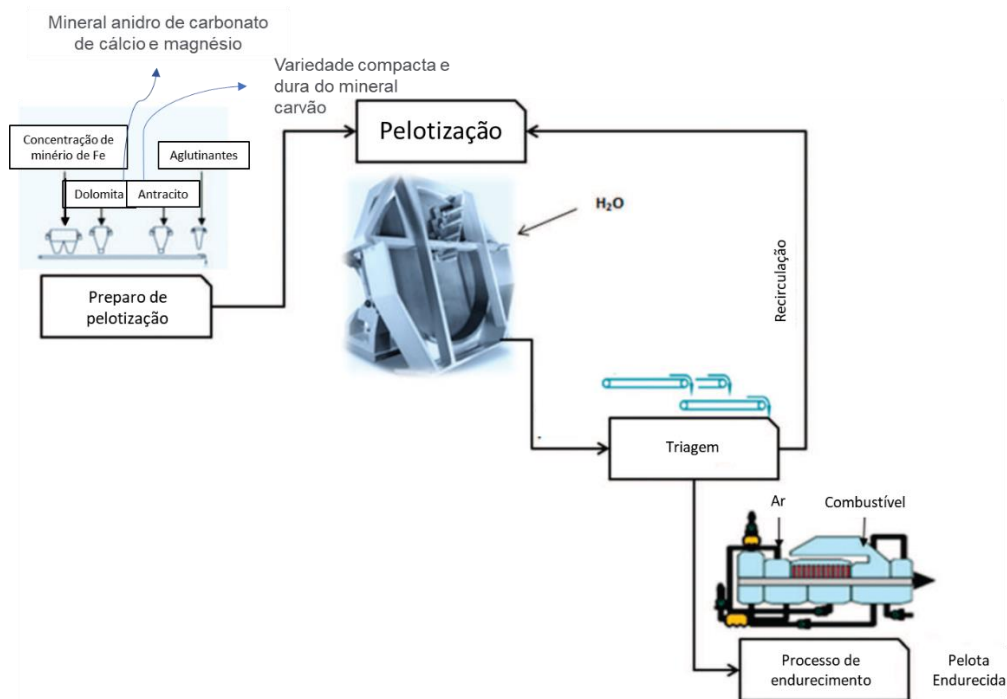


Figura 4. Fluxograma de pelotização típica, destacando a preparação de aditivos, mistura e preparação de de pelotização, a etapa de empelotamento, neste caso usando um pelotizador de disco, e a etapa de endurecimento. Durante a triagem pelotas menores que 8 mm ou maiores que 16 mm são desagregadas e o material é recirculado. Figura adaptada de Moraes et al. (2018).

Pequenas quantidades de chumbo, mercúrio, fluoretos, arsênico, cloretos e outros oligoelementos do corpo de minério podem volatilizar durante o aquecimento no processo de endurecimento (55).

Santos et al. (2011) investigaram a composição das partículas sedimentadas em Vitória, alertando que existe uma alta porcentagem da fonte de ressuspensão de poeira do solo em Vitória. Eles mostram que a ressuspensão de poeira do solo é uma fonte significativa de emissões veiculares,

e 95% das emissões veiculares são derivadas da ressuspensão de partículas já depositadas nas vias, em vez de emissão direta de gases de escapamento (56). Sua composição representa uma mistura entre a poluição gerada por veículos automotores e outras fontes de poluição, visto que apresenta componentes ligados a solos e partículas presentes em emissões industriais e outras fontes (56). As partículas associadas à ressuspensão nas vias têm níveis elevados de Al e silício (Si), que são típicos na composição do solo, mas possuem níveis mais elevados de sódio, cloro (Cl), magnésio, ferro e cálcio que as amostras de solo da região. Acredita-se que estes componentes químicos possam estar relacionados a aerossol marinho e a fontes industriais localizados na região (56).

A taxa de emissão relacionada a ressuspensão de partículas é muito alta quando comparada a outros centros urbanos como São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Recife (57), Nova Delhi (58) e Barcelona (59). Isso ocorre apesar de as partículas já depositadas nas vias estarem espaçadas em uma grande área urbana e não concentrada pontualmente.

Todas as emissões locais associadas às influências das emissões externas causam um aumento nas concentrações de partículas (PM) e ozônio. A intensificação das concentrações leva a um aumento nas exposições e reclamações de poluição do ar em Vitória. As autoridades locais e a Agência de Proteção Ambiental estadual estão trabalhando em estratégias para diminuir as emissões e a poluição do ar (60).

Santos e Reis (2010) estudaram a composição das amostras e demonstraram que as partículas coletadas nos pontos mais próximos do distrito industrial e nos principais portos da região, tinham mais ferro. Como dito anteriormente, a principal atividade industrial da região está relacionada com a indústria siderúrgica e a maior parte do seu processo e transporte está relacionada com pelotas, minério de ferro, carvão, aço e outros produtos produzidos pela indústria siderúrgica. Cálcio (Ca), Si e Al, que são fortes indicadores de poeira do solo, são mais presentes nos pontos de amostras mais distantes. Existe também uma forte presença de cloro nas amostras, os pesquisadores acreditam que podem ser relacionadas com a proximidade do mar, interligando a presença de aerossóis marinhos (61).

Zambon et al. (2016) realizaram um estudo na RMGV, verificaram que aos finais de semana, quando a produção industrial diminui, reduz-se os serviços logísticos e o fluxo de carros diminui, diminui consideravelmente a chance de ocorrer uma má qualidade do ar comparativamente aos dias de semana (62).

1.3. Asma

A asma é definida como uma doença crônica das vias aéreas caracterizada pela hiperresponsividade brônquica, inflamação pulmonar, resposta de remodelamento das vias aéreas e obstrução das vias aéreas (63). Os episódios frequentes de tosse, sibilos, dispneia e tiragem intercostal podem ser atribuídos à hiperresponsividade (64).

Existem 6,4 milhões de brasileiros acima de 18 anos, de acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) do Ministério da Saúde e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015). Em 2020 foram registradas 2.552 mortes no Brasil por asma, de acordo com o Datasus.

A asma frequentemente está associada a várias comorbidades e é responsável por altos custos diretos (como cuidados hospitalares e medicamentos) e indiretos (como perda de trabalho ou dias escolares). A maior parte destes são custos indiretos associados à asma, pois o tempo perdido no trabalho possui uma carga econômica significativa. Esse impacto na produtividade do trabalho não afeta apenas o indivíduo (em termos de pagamento por doença/horas perdidas e seu bem-estar), mas também afeta colegas, empregadores e a sociedade como um todo (65,66).

O desenvolvimento da asma é determinado por fatores que incluem fatores predisponentes (genéticos) e ambientais, tais como: poeira, alimentos, fármacos, pólen, fungos, exercício, alterações ambientais e mudanças no clima, poluentes atmosféricos, infecções, irritantes químicos, estresse, dentre outros (67).

1.3.1. Fisiopatogenia

Indivíduos asmáticos apresentam respostas alérgicas quando entram em contato com um alérgeno. Ocorre uma resposta imediata e outra tardia. A ativação das células que liberam IgE precede o início da fase imediata. Esta fase se caracteriza pela rápida ativação de mastócitos e macrófagos das vias aéreas, liberando mediadores que causam contração da musculatura lisa das vias aéreas, secreção de muco, vasodilatação e exsudação de plasma, podendo prejudicar a integridade epitelial. Entre 6 e 9 horas após a provocação com o alérgeno, ocorre a fase inflamatória tardia, que inclui o recrutamento e ativação de macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e células T CD4⁺, bem como a liberação de citocinas e vários mediadores pró-inflamatórios. Caracterizada pelo aumento da hiperresponsividade brônquica e persistência das alterações que ocorrem na fase imediata (68).

Os alérgenos estimulam células dendríticas presentes no epitélio das vias aéreas, desencadeando uma sequência de eventos que resulta na produção de citocinas que atraem neutrófilos, monócitos e células dendríticas para as vias aéreas (69).

As células T CD4⁺ se diferenciam em múltiplas linhagens de células T efetoras (70). Mais de trinta citocinas têm papel na fisiopatogenia da asma. Entre elas, estão as derivadas de células T, como as células Th1, que incluem interleucina (IL)-2, interferon (IFN)- γ e IL-12; células Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-25, IL-31 e IL-33); Th3 ou citocinas T regulatórias [IL-10 e fator de transformação de crescimento beta (TGF- β)]; e células Th17 (IL-17) (71).

A diferenciação linfocitária ocorre quando a célula Th2 é ativada gerando uma resposta de citocinas perfil Th2 e estimula a produção de anticorpos IgE, que contribuem para a lesão e inflamação encontradas na asma (72,73). Os sinais e sintomas da asma, como hiperresponsividade brônquica, obstrução das vias aéreas, secreção mucosa e vasodilatação, são desencadeados pela liberação de vários mediadores inflamatórios, incluindo histamina, espécies reativas de oxigênio e linfócitos CD4⁺ Th2 (72,73).

Quando a célula Th2 é ativada, ela libera interleucinas como IL-4, IL-5 e IL-13. Os linfócitos são estimulados pela IL-4 a produzir IgE, que se fixa à superfície dos mastócitos. Estes contribuem para a iniciação da asma com liberação de mediadores de fase imediata e, quando ativados, liberam IL-4, IL-5, histamina, leucotrienos e prostaglandinas. A IL-5 recruta eosinófilos para as vias aéreas e a IL-4 mantém a produção de IgE, que causa inflamação (67,73,74).

Os eosinófilos, por sua vez, são uma condição característica da inflamação alérgica. Sob a condição de estresse ou doença, os eosinófilos se degranulam, liberando suas proteínas citotóxicas derivadas de grânulos que estão envolvidas nas respostas inflamatórias. A degranulação de eosinófilos resulta na liberação de suas quatro proteínas tóxicas [proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinófila (ECP), peroxidase de eosinófilos (EPO) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN)] que promovem a patogênese da doença (75). A função normal dessas enzimas é produzir oxidantes reativos e espécies de radicais livres que infligem dano oxidativo aos parasitas invasores e patógenos como parte do sistema de defesa inato do hospedeiro (76).

Os eosinófilos liberam leucotrienos, que são produtos do metabolismo oxidativo, quando são ativados. Eles também liberam outras substâncias, como fatores de crescimento e metaloproteinases (MMP), que estão envolvidas no remodelamento das vias aéreas (77).

Quando um antígeno estimula a diferenciação de células T CD4⁺ *naive* em células Th2, ele também promove a diferenciação celular em Tregs. As células Tregs tem como função manter a resposta imunológica das células Th2 dentro de uma faixa normal. Quando as Tregs são disfuncionais e não conseguem suprimir com eficácia uma resposta Th2 excessiva, podem se desenvolver asma e outras doenças alérgicas. Portanto, as Tregs são o principal mecanismo regulador pelo qual o corpo mantém a tolerância imunológica a antígenos externos inofensivos e evita respostas Th2 excessivas (78).

Um número crescente de estudos tem mostrado que a diferenciação insuficiente e os defeitos funcionais das Tregs são as principais razões para o aumento da resposta Th2 e da patogênese da asma (78,79). Estudos em animais

também mostraram que a remoção de Tregs em camundongos antes da sensibilização agravou a inflamação e hiperresponsividade das vias aéreas e a retransfusão de nTregs ou iTregs de camundongos normais em ratos sensibilizados com ovoalbumina e desafiados com asma suprimiu significativamente a hiperresponsividade de vias aéreas, enquanto reduziu o número de eosinófilos, bem como os níveis de IL-5 e IL-13 no fluido do lavado broncoalveolar (FLBA) (80).

Células de perfil Th17 e suas citocinas relacionadas também estão presentes na fisiopatologia da asma alérgica (81,82) e se há aumento de níveis de expressão de IL-17 ocorrerá aumento da gravidade da asma (83,84). A citocina IL-17 promove eosinofilia nas vias aéreas através da indução de quimiocinas e fatores de crescimento (70). Esta interleucina está envolvida na fibrose e remodelamento das vias aéreas porque é responsável pelo influxo de neutrófilos nas vias aéreas (85). Demonstramos em estudos anteriores que o uso de anti-IL17 na inflamação pulmonar alérgica crônica atenuou a hiperresponsividade brônquica, marcadores de remodelamento, células inflamatórias e marcadores de estresse oxidativo (81,86). Observamos também estes mesmos efeitos no uso do anti-IL17 em animais com inflamação pulmonar alérgica crônica exacerbada por infecção (87).

Outro papel da IL-17 é sua atividade no músculo liso das vias respiratórias aumentando as respostas contráteis, via fator nuclear kappa B (NF- κ B) e subsequente indução da expressão de Rho quinase, que resulta no aumento da fosforilação da cadeia leve de miosina (88).

1.3.2. Remodelamento

O processo inflamatório crônico leva a alterações estruturais irreversíveis que podem ser induzidas tanto pela ativação de células inflamatórias quanto por uma falta de reparo correta à lesão crônica. O remodelamento de vias aéreas, contribui para a não reversibilidade na obstrução ao fluxo de ar e este processo é denominado remodelamento brônquico (89).

O aumento das células caliciformes, das glândulas submucosas, dos vasos e das células do músculo liso caracterizam o remodelamento das vias aéreas. Além disso, há alterações subepiteliais da matriz extracelular e deposição de fibras colágenas e elásticas, bem como espessamento da membrana basal (Figura 5) (90,91). Assim, alguns indivíduos com asma podem apresentar perda parcial ou irreversível da função respiratória (89).

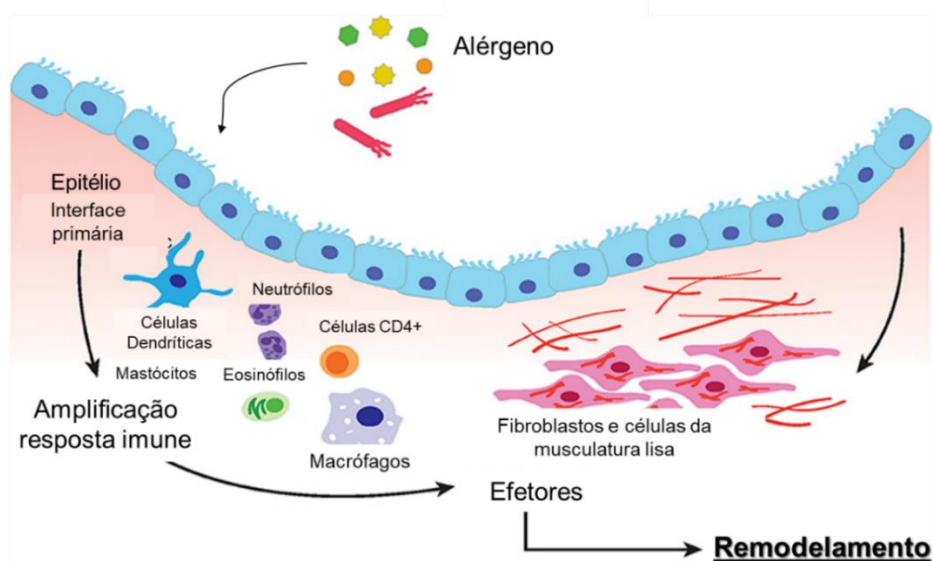


Figura 5- O epitélio das vias aéreas serve como a interface primária entre o meio ambiente e o pulmão. Quando desencadeadas por alérgenos, ácaros, poluição as células epiteliais respondem secretando fatores que recrutam e ativam as células imunológicas. A amplificação da resposta imune envolve macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos e linfócitos. Tanto o epitélio quanto as células imunes induzem a proliferação, expansão e ativação do mesênquima submucoso, que inclui células residentes do músculo liso das vias aéreas e fibroblastos (92).

A exposição ambiental à poeira, produtos químicos e fumaça de cigarro pode iniciar a cascata de respostas pró-inflamatórias que desencadeiam o remodelamento das vias aéreas por meio da sinalização parácrina e dos estímulos mecanoestimulatórios que impulsionam o remodelamento das vias aéreas (92).

De acordo com vários estudos, além das vias aéreas, o processo de remodelamento também ocorre no parênquima pulmonar. A inflamação distal tem papel crucial na hiperresponsividade, na asma noturna e exacerbações (93). Os eosinófilos lesam o epitélio e podem estimular a fibrogênese produzindo TGF- β , citocina responsável pela regulação da produção de colágeno. Os mastócitos

também podem produzir citocinas, como TNF- α , IL-4, FGF (fator de crescimento fibroblástico), que influenciam a proliferação fibroblástica atuando na digestão da matriz extracelular (94).

Os linfócitos regulam a fibrose e a inflamação. Os macrófagos produzem citocinas, elastase e metaloproteinases 9 e 12 (MMP-9 e MMP-12), que tem a capacidade de degradar componentes da matriz extracelular, bem como as próprias células epiteliais que liberam vários mediadores inflamatórios, exacerbando a agressão tecidual e a formação do tecido cicatricial (95).

As vias aéreas distais e o parênquima pulmonar podem produzir muitas citocinas de perfil Th2, quimiocinas e mediadores que podem promover o início e perpetuação da inflamação. Os fibroblastos das vias aéreas são diferentes dos fibroblastos do parênquima pulmonar (morfologicamente), de acordo com os resultados de um estudo de biopsias de pulmões de asmáticos. Os fibroblastos do parênquima distal têm a característica de serem mais largos, com aparência estrelada e com mais projeções citoplasmáticas e os fibroblastos das vias aéreas sintetizam mais pró-colágeno tipo I após estímulo com TGF- β (96). As diferentes reações de reparo nas vias aéreas proximais e distais no pulmão e no parênquima de pacientes com asma e outras doenças respiratórias são parcialmente explicadas pela diversidade das estruturas dos fibroblastos em resposta a um estímulo lesivo (96).

Sabe-se que a porção distal do pulmão contribui para a obstrução do fluxo aéreo em pacientes asmáticos (97) e que alterações estruturais e inflamatórias do parênquima são similares às encontradas nas vias aéreas de indivíduos com asma (98). Assim, a porção distal do pulmão, que é considerada como as vias aéreas de calibre menor ou igual a dois milímetros de diâmetro, tem um papel na fisiopatologia da asma e o parênquima pulmonar adjacente desempenha um papel importante na resistência pulmonar total (99).

1.3.3. Hiperresponsividade

Uma das principais características da asma é a hiperresponsividade das vias aéreas (HRVA), sua intensidade pode ser variável, sendo que intensidades

mais elevadas estão relacionadas a uma pior gravidade, asmáticos com níveis mais altos de hiperresponsividade apresentam aumento da resistência das vias aéreas ao fluxo aéreo (100).

A contração do músculo liso induzida por agonistas promove a resistência ao fluxo aéreo. O tônus da musculatura lisa é regulado pelo nível de fosforilação da cadeia leve da miosina (CLM) através de mecanismos dependentes e independentes de cálcio (Ca^{2+}). Um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , decorrente da ativação dos canais de cálcio na membrana plasmática e/ou liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, leva à formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina, resultando na ativação da miosinoquinase. Esta enzima fosforila a CLM, resultando em contração da musculatura lisa por ligação entre a actina e a miosina (101,102). Como os filamentos de actina e miosina estão ancorados ao citoesqueleto e membrana plasmática, o miócito se contrai (103).

O equilíbrio da atividade entre a miosinoquinase e a miosinofosfatase promove a extensão da contração. Esta sequência de eventos prediz que o tônus da musculatura lisa deveria ser proporcional à concentração de Ca^{2+} citosólico. Entretanto, na presença de uma concentração fixa de Ca^{2+} , agonistas broncoconstritores também podem elevar a fosforilação da CLM. Além disso, a inibição da miosinofosfatase, que efetivamente aumenta a fosforilação da CLM, pode levar a uma concentração fixa de cálcio citoplasmático. Ou seja, às vezes o nível de Ca^{2+} nem sempre corresponde ao grau de fosforilação da cadeia leve da miosina e de contração do músculo liso, sendo que o nível de contração é maior do que seria esperado para um dado nível de Ca^{2+} (104).

Os mecanismos independentes de Ca^{2+} para a fosforilação da CLM e contração do músculo liso são conhecidos como sensibilização do Ca^{2+} (105). A via RhoA/Rho quinase é uma das vias envolvidas nos mecanismos responsáveis pela sensibilização do Ca^{2+} (104,106). A Rho quinase ativada interfere com o equilíbrio entre as atividades da miosinoquinase e a miosinofosfatase, fosforilando e conseqüentemente inativando a subunidade de ligação da miosinofosfatase (104). Como a miosinofosfatase remove fosfato da CLM fosforilada para induzir o relaxamento muscular (106), a inibição de sua atividade

pela Rho quinase promove o estado fosforilado da CLM e contribui para um aumentado nível de contração (104,106).

1.3.4. Estresse oxidativo

Células inflamatórias em asmáticos resultam em um número aumentado de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a danos nos tecidos e aumento do estresse oxidativo. Numerosos mediadores pró-inflamatórios ativos levam a essa produção aumentada de ROS e óxido nítrico (NO) (107). O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a capacidade defensiva antioxidante do organismo e a produção de ROS (108).

O estresse oxidativo apresenta um papel fundamental na fisiopatologia da asma por estar relacionado a contração da musculatura lisa, indução da hiperresponsividade de vias aéreas, hipertrofia da musculatura lisa, fibrose das vias aéreas, hipersecreção brônquica, lesão epitelial e a exsudação vascular (107,109,110).

A disfunção mitocondrial também pode contribuir para a patogênese da asma, frequentemente associada ao aumento de ROS, tornando a homeostase celular crítica. As ROS mitocondriais podem favorecer a secreção de citocinas pró-inflamatórias e modular a regulação do cálcio nas células musculares do epitélio e das vias aéreas ou a produção de matriz extracelular. As células inflamatórias ativadas respondem causando dano respiratório, liberando ROS para as células adjacentes (111).

Importantes moléculas fisiológicas de ROS que são produzidas pela redução intracelular de oxigênio molecular são ânions superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (107). Durante a lesão do sistema, o superóxido (O_2^-) é ativado e liberado na célula, outros sistemas que medeiam a produção de O_2^- são dinucleotídeo fosfato de nicotina adenina [NAD (P) H] oxidase, encontrado em fagócitos e sistemas de xantina oxidase. Uma reação de dismutação, catalisada pela superóxido dismutase, resulta na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, na presença de íons haleto (Iodo $^-$, Cl $^-$, Bromo $^-$), vai reagir para formar o ácido hipocloroso (HClO). Nos eosinófilos, essa

reação é catalisada pela peroxidase eosinofílica. Nos neutrófilos, essa reação é catalisada pela mieloperoxidase. O HClO é altamente oxidativo e desempenha um papel importante na morte de patógenos nas vias aéreas. HClO também pode reagir com DNA e induzir interações de DNA de proteínas e reagir como O_2^- ou Fe^{2+} para produzir outro oxidante forte, o radical hidroxila (OH). Durante esse processo as células inflamatórias liberam altas concentrações de O_2^- , OH, HClO e H_2O_2 que podem lesar as células adjacentes, resultando em aumento da quantidade de radicais livres nas células do tecido respiratório (107).

Várias células, incluindo células epiteliais, nervos, células inflamatórias (como macrófagos, neutrófilos e mastócitos) e células endoteliais vasculares, produzem NO na via respiratória (112). Uma vez produzido, o NO difunde-se rapidamente do local de síntese, permeando membranas celulares, e interage com os sítios moleculares intracelulares (113). O óxido nítrico, um radical livre, é uma molécula de gás extremamente reativa que reage com outros tipos de moléculas, como oxigênio, radicais superóxido ou metais de transição (111).

O NO é endogenamente sintetizado por uma de três isoformas de NOS, com diferentes atividades, sendo duas constitutivas (eNOS, derivada do endotélio; e nNOS, derivada dos neurônios) e uma NOS induzida (iNOS) (114–116). Os processos de vasodilatação e broncodilatação envolvem isoformas constitutivas. A iNOS é estimulada por muitas citocinas pró-inflamatórias e é expressa em alguns tipos de células inflamatórias (117,118). Autores sugerem que o NO derivado da enzima nNOS apresenta efeito benéfico na asma, pois causa relaxamento da musculatura lisa brônquica, sendo presente nos nervos do sistema NANC (não adrenérgicos não colinérgicos). No entanto, o NO derivado da enzima eNOS pode fazer com que as arteríolas se dilatam, o que resulta extravasamento de plasma e edema (119). A grande quantidade de NO oriundo da enzima iNOS pode resultar em vasodilatação, extravasamento de plasma, aumento da secreção do muco e ativação indireta de células Th1/Th2 contribuindo para os sinais e sintomas da doença (120). NO pode ter efeitos benéficos e prejudiciais no pulmão, atuando como broncodilatador e promovendo resposta de eosinófilos e células mononucleares nas vias aéreas distais (121).

O NO afeta uma variedade de mecanismos fisiopatológicos que causam mudanças funcionais e histopatológicas em pacientes com doenças inflamatórias pulmonares; no entanto, sua função depende principalmente da enzima pela qual foi produzido (121).

Sabe-se que animais sensibilizados expressam mais iNOS em células linfomononucleares e eosinófilos nas vias aéreas distais (121). Em animais sensibilizados com ovoalbumina a isoforma nNOS, embora constitutiva, encontra-se presente em células inflamatórias e o número de células que expressam esta isoforma é maior (121).

Níveis mais elevados de NO estão associados a maior risco de asma e gravidade da asma (122). A síntese do óxido nítrico ocorre a partir do substrato L-arginina por meio da ação das isoformas das óxido nítrico sintase (NOS). Quando um grupo molecular guanidino do aminoácido L-arginina é quebrado, por oxidação enzimática, a L-arginina é convertida em NO + L-citrulina. Essa reação é estereoespecífica, ou seja, apenas a L-arginina é metabolizada, catalisada por óxido nítrico sintase (NOS) e alguns outros cofatores (123).

A óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a arginase-2 (ARG2) compartilham o mesmo substrato, a arginina. A expressão mais elevada de iNOS e NO exalado está associada à inflamação das vias aéreas em pacientes. A inflamação eosinofílica pode ser regulada pelo metabolismo da arginina. Além disso, o ARG2 é um regulador da resposta Th2 e o metabolismo do ARG2 da arginina suprime a inflamação, enquanto o metabolismo iNOS promove a inflamação das vias aéreas, desempenhando um papel central no controle metabólico da inflamação da arginina. O funcionamento da arginina contribui para a manutenção da homeostase no sistema respiratório, e os desequilíbrios são prejudiciais contribuindo na fisiopatologia da asma (124).

Estudos de modelo de asma experimental utilizando cobaias reforçam a associação entre inflamação pulmonar alérgica crônica e aumento de óxido nítrico exalado e da expressão de iNOS (em vias aéreas e parênquima pulmonar) (125).

Compostos reativos nitrogenados são produzidos pela reação do NO com radicais livres, como o oxigênio. Esses compostos desempenham funções fisiológicas e desempenham um papel importante na destruição de microorganismos (118,126). No entanto, as células inflamatórias dos asmáticos produzem radicais livres mais do que pessoas saudáveis. Isso leva a altas concentrações de compostos reativos nitrogenados, o que pode causar efeitos nocivos (127). O peroxinitrito (ONOO⁻), um potente oxidante produzido pela reação entre NO e oxigênio, é produzido quando as vias aéreas são expostas a estresse oxidativo. Essas alterações incluem danos ao DNA e estimulação da degradação de lipídeos, proteínas e carboidratos, o que pode alterar as funções celulares e aumentar as respostas inflamatórias (128).

O NO pode também se transformar em nitrato, que tem a capacidade de oxidar proteínas e ajudar no estresse oxidativo (129). O contato de agentes oxidantes com a membrana celular leva a peroxidação lipídica da membrana celular, responsável pela formação de uma série de compostos bioativos análogos às prostaglandinas, conhecidos como isoprostanos (130).

Os isoprostanos são produzidos pela peroxidação do ácido araquidônico, uma reação catalisada por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (131). Os isoprostanos e iNOS são considerados biomarcadores de estresse oxidativo (132).

A via de formação dos isoprostanos pode criar 64 estruturas isoméricas. O 15F2t-isoprostano (anteriormente conhecido como 8-iso-PGF₂) é o mais bem caracterizado (133). O 15F2t-isoprostano é um isômero de PGF₂ α com efeitos contráteis através de ligação a receptores tromboxane A₂ no músculo liso das vias aéreas (134). Além disso, este agente aumenta a resistência pulmonar, o que sugere que o 15F2t-isoprostano, pode ser um dos mediadores da limitação ao fluxo aéreo na asma por meio do estresse oxidativo (135).

1.4. Modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica

Os modelos experimentais permitem informações importantes a respeito da fisiopatologia da asma e mecanismos envolvidos. A sensibilização dos

camundongos por meio de injeção de alérgeno intraperitoneal (sensibilização ativa e sistêmica) ou exposição local é o método mais comumente utilizado. Este método geralmente é usado em conjunto com um material adjuvante, como o hidróxido de alumínio, $Al(OH)_3$. Estes modelos mostram uma resposta inflamatória eosinofílica distinta que depende da participação de citocinas de perfil Th2 (136).

Estes camundongos sensibilizados são estudados para o fenótipo asmático após um desafio local (pulmonar) com alérgeno. Eles mostram hiperresponsividade das vias aéreas; elevação de imunoglobulina (Ig) sérica, principalmente IgE e IgG; remodelamento, como espessamento da membrana basal, mudanças epiteliais, fibrose subepitelial, aumento de massa muscular lisa, deposição de colágeno e mudanças vasculares (137–140).

1.5. Sistema colinérgico

O principal neurotransmissor parassimpático nas vias aéreas pulmonares é a acetilcolina (ACh), atua como principal mediador do sistema colinérgico anti-inflamatório. A ACh é sintetizada a partir de colina e acetil-CoA mediada pela enzima acetiltransferase ChAT (141). O transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) é necessário para que ocorra a liberação da ACh na fenda sináptica, portanto o conteúdo de acetilcolina liberado na fenda está diretamente proporcional a quantidade de VACHT (142).

1.5.1. O papel da acetilcolina na fisiopatogenia da asma

O arco reflexo da inflamação consiste em uma via neural aferente sensorial que detecta os produtos moleculares da lesão, infecção e inflamação, e um arco neural motor eferente que transmite os sinais para modular as respostas imunes.

A acetilcolina é o neurotransmissor parassimpático predominante nas vias aéreas (143) e desempenha um papel fundamental na fisiopatologia das doenças obstrutivas das vias aéreas, como a asma, por meio da contração do músculo liso brônquico e secreção de muco (144).

A atividade neuronal parassimpática, por meio da sinalização da acetilcolina, está aumentada na fisiopatologia da asma (145,146). A acetilcolina é liberada dos neurônios das vias aéreas e de células não neuronais, como as células epiteliais das vias aéreas (147). Outras fontes não neuronais incluem células inflamatórias (145).

O NO pode modular a liberação de acetilcolina, esse efeito se deve ao aumento da ChAT que aumenta o conteúdo de ACh na fenda sináptica. Pesquisadores mostraram em camundongos com expressão diminuída de VChT, que a diminuição de VChT está correlacionada à redução do tônus colinérgico endógeno (148), sugerindo que o sistema colinérgico é necessário para manter a homeostase pulmonar e conter a inflamação.

Muitas células inflamatórias, assim como o epitélio das vias aéreas, geram, secretam e respondem à ACh (149). Uma vez liberada, a ACh estimula receptores muscarínicos (mAChR) e nicotínicos (nAChR) tanto periféricos como centrais. A presença desses receptores foi demonstrada em tecidos que não estão ligados às estruturas neuronais, como células epiteliais e endoteliais. Diversos estudos têm discutido o papel da acetilcolina não neuronal no controle da resposta inflamatória (150,151).

Em pacientes asmáticos, a ativação do mAChR parece estar envolvida com inflamação e remodelamento das vias aéreas (152,153). Em nítido contraste com o efeito pró-inflamatório do mAChR, os receptores nicotínicos (nAChR) parecem ter uma forte função anti-inflamatória (154,155) e está envolvido nos efeitos do anti-inflamatórios em vários modelos de inflamação (156,157). Poucos estudos citam sobre o papel da deficiência endógena de ACh em modelos de inflamação alérgica crônica das vias aéreas.

A neurotransmissão ganglionar pela ACh portanto é mediada por receptores nicotínicos, enquanto os efeitos funcionais em órgãos-alvo são mediados por receptores muscarínicos, particularmente receptores M3 (145).

A acetilcolina se liga aos receptores muscarínicos das vias aéreas para desencadear a contração do músculo liso e a secreção de muco (146,158).

Existem cinco receptores muscarínicos identificados que pertencem à família de receptores acoplados à proteína G; entretanto, apenas os receptores M1, M2 e M3 demonstraram desempenhar papéis importantes na fisiologia das vias aéreas e em doenças como asma e DPOC (159).

Os receptores M1 são expressos por células epiteliais e nos gânglios; regulam a secreção de eletrólitos e água e auxiliam na neurotransmissão parassimpática, respectivamente (160). Os receptores M2 são expressos no músculo liso das vias aéreas e em neurônios parassimpáticos; eles têm um papel muito limitado na contração do músculo liso das vias aéreas (161). No entanto, os receptores M2 atuam como autoreceptores nos neurônios parassimpáticos para limitar a liberação de acetilcolina, limitando assim a broncoconstrição induzida pelo reflexo vagal e a secreção de muco (161). Os receptores M3 são o subtipo primário de receptores para a contração do músculo liso brônquico e são encontrados no músculo liso das vias aéreas e nas glândulas submucosas (162).

Vários mecanismos são responsáveis pelo aumento da atividade neural nas vias aéreas asmáticas. Os mecanismos estabelecidos incluem a perda da função de barreira epitelial devido a um microambiente de tecido local inflamatório, que expõe os neurônios ao lúmen das vias aéreas (161). Mediadores inflamatórios e até mesmo o contato direto dos nervos das vias aéreas com eosinófilos podem então ativar os neurônios expostos para desencadear a broncoconstrição mediada por reflexo vagal. Essa broncoconstrição é agravada pela disfunção dos autorreceptores M2; isso resulta em aumento da liberação de acetilcolina, levando à hiper-reatividade das vias aéreas (162). A disfunção do receptor M2 foi demonstrada em estudos de modelos animais de doenças das vias aéreas após exposição a alérgenos, ozônio e infecções virais (161).

Como mecanismo neural para controle da inflamação por inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , a ACh é liberada pelo nervo vago e interage especificamente com os receptores nicotínicos $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) que são expressos em macrófagos e outras células não neuronais (163).

Tanto a ACh neuronal quanto não neuronal podem induzir efeitos anti-inflamatórios via $\alpha 7$ nAChR em modelos de inflamação (164). A estimulação de $\alpha 7$ nAChR induz a expressão da proteína SOCS3 que leva à regulação negativa da via JAK-2 / STAT-3 (165) com uma diminuição subsequente na produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α (166,167). Autores sugerem um papel anti-inflamatório notável na periferia (164,168).

Os efeitos da ACh nas doenças pulmonares ainda são discutíveis, visto que esta parece perpetuar ou suprimir a resposta inflamatória dependendo do receptor colinérgico que atue no pulmão. Recentemente, estudos demonstraram que a redução de VAChT induziu aumento de células inflamatórias no pulmão, aumento de citocinas pró-inflamatórias, ativação de vias de sinalização de regulam a inflamação como NF- κ B e redução na ativação da via JAK2-STAT3-SOCS3. Ainda, observaram que animais com lesão pulmonar aguda melhoram consideravelmente da lesão pulmonar quando tratado com agonista do receptor nicotínico alfa-7, sugerindo que o sistema colinérgico anti-inflamatório atua no controle da resposta inflamação no pulmão em diversas situações de lesão (169,170).

As fibras eferentes incluem nervos parassimpáticos, simpáticos e não adrenérgicos não colinérgicos (NANC). Os nervos parassimpáticos derivam principalmente do núcleo do tronco encefálico ambíguo (171).

Os nervos pré-ganglionares fazem sinapse com neurônios intrínsecos das vias aéreas ou gânglios parassimpáticos localizados diretamente próximos à árvore brônquica (172). Neurônios pós-ganglionares parassimpáticos (motores) têm células de Schwann não mielinizantes, usam ACh como neurotransmissor e inervam a musculatura lisa de vias aéreas, músculo liso vascular e glândulas mucosas em toda a árvore brônquica (Figura 6) (173). Os nervos colinérgicos parassimpáticos são os principais reguladores do tônus da musculatura lisa de vias aéreas (174).

A inervação de NANC pós-ganglionar envolve as vias inibitórias (iNANC) e excitatórias (eNANC). Esses nervos usam uma variedade de mediadores, incluindo NO e peptídeos, como peptídeo intestinal vasoativo (VIP). Ambos

iNANC NO e VIP induzem broncodilatação e são sugeridos para atuar como um freio contra broncoconstrição colinérgica. É muito provável que NANC se originem de uma população distinta de nervos pré-ganglionares (174). No entanto, é improvável que regulem aspectos distintos da fisiologia das vias aéreas; em vez disso, o sistema NANC regula as atividades do sistema nervoso colinérgico. A regulação da fisiologia das vias aéreas é um equilíbrio entre a entrada aferente, sensorial e a saída motora eferente (146).

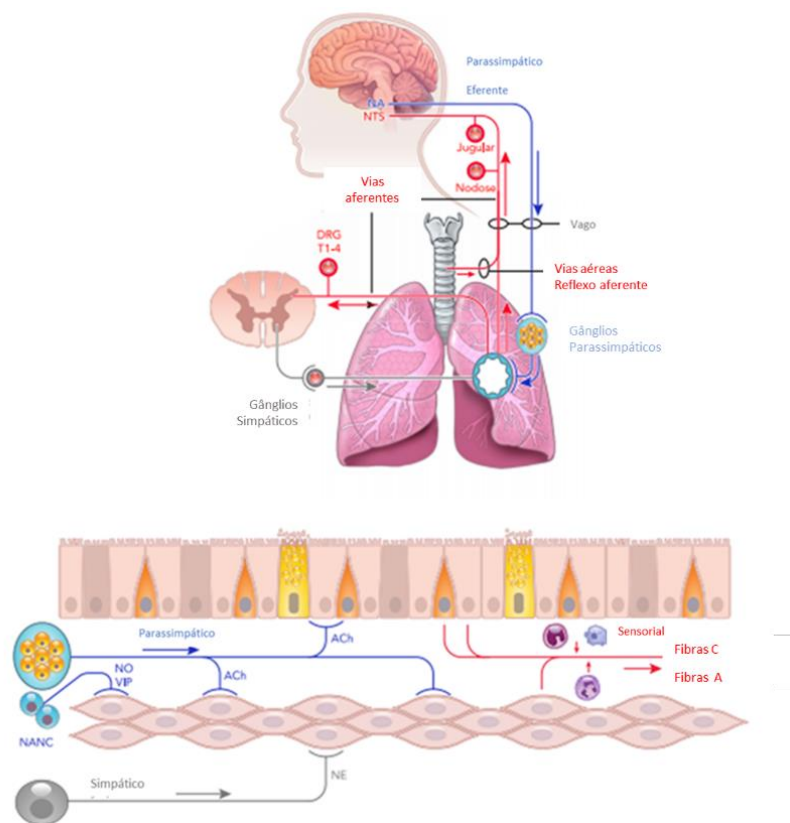


Figura 6 – Inervação da via aérea. As vias aferentes que detectam forças mecânicas, irritantes inalados e mediadores inflamatórios endógenos conduzem ao sistema nervoso central através do nervo vago (com alguma entrada adicional de aferentes laríngeos e esofágicos). Os gânglios nodosos e jugulares são os principais tratos. As vias parassimpáticas eferentes do sistema nervoso central (SNC) viajam através do nervo vago para os neurônios pós-ganglionares localizados dentro da parede das vias aéreas que então inervam o músculo liso das vias aéreas e as glândulas submucosas para induzir a contração e a secreção de muco, respectivamente. As vias não adrenérgicas e não colinérgicas (NANC) estão particularmente envolvidas na broncodilatação via peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e óxido nítrico (NO). Além disso, existe inervação simpática dos segmentos torácicos. Azul: fibras nervosas eferentes; vermelho: fibras nervosas aferentes (146).

Um desenvolvimento novo e empolgante nesta área de pesquisa é a plasticidade e remodelamento neuronal, que podem sustentar mudanças persistentes na sinalização colinérgica na asma. Os neurônios das vias aéreas

têm recebido pouca atenção em estudos sobre os mecanismos de remodelamento tecidual na asma, mas parecem mudar para um isótipo colinérgico e ramificar-se mais excessivamente em resposta a insultos inflamatórios, incluindo alérgenos e inflamação eosinofílica (175).

1.5.2. Hipersecreção de muco

A secreção de muco induzida pela acetilcolina também é uma característica importante. As glândulas de muco são inervadas por nervos parassimpáticos e liberam muco em resposta à estimulação do campo elétrico. As células caliciformes expressam receptores muscarínicos, mas requerem concentrações relativamente altas de agonista muscarínico para promover a atividade secretora. Um novo achado interessante é que, independentemente de quaisquer efeitos sobre a inflamação das vias aéreas, os receptores muscarínicos também podem controlar a diferenciação das células caliciformes. Desafios repetidos de metacolina promovem a presença de células mucopositivas no epitélio das vias aéreas de pacientes com asma leve (161).

Dados *in vivo* mostraram que, quando camundongos com deficiência do receptor M3 sensibilizados foram expostos ao desafio de alérgeno, tiveram um aumento 30% menor nas células caliciformes em comparação com camundongos do tipo selvagem. Também mostraram um menor aumento no gene produtor de muco MUC5AC em comparação com camundongos do tipo selvagem (35%) (176).

1.5.3. Papel do sistema colinérgico na inflamação das vias aéreas

Além de broncoconstrição e secreção de muco, a acetilcolina também contribui para a inflamação das vias aéreas, embora no momento isso só tenha sido relatado em modelos pré-clínicos e ainda não tenha sido confirmado em indivíduos asmáticos. Eosinófilos se acumulam ao redor dos nervos nas vias aéreas de porquinhos-da-índia sensibilizados e humanos que faleceram por asma (161).

Estudo de Pinheiro et al. (2015) mostraram a primeira evidência de que a deficiência colinérgica prejudica a função pulmonar e produz inflamação local. Propondo que o sistema colinérgico modula a inflamação das vias aéreas pela modulação da via JAK2 e NF-kB. Demonstraram que animais geneticamente modificados com redução (Knockdown) da proteína transportadora vesicular de acetilcolina (VAChT) tiveram um aumento na resistência do sistema respiratório em relação a animais do tipo selvagem (WT). Os valores de IL-6, IL-13 e IL-10 foram semelhantes entre WT e os knockdown. Já valores de NF-kB, TNF- α e IL-4 foram maiores nos animais knockdown em comparação com o controle WT (177).

Outros dados sugerem que a sinalização da acetilcolina polariza as células dendríticas em direção a um perfil de célula Th2 (178). A incubação de células dendríticas com acetilcolina estimulou a produção de duas quimiocinas que recrutam células Th2 para locais de inflamação alérgica (quimiocinas derivadas de macrófagos e timo e quimiocinas reguladas por ativação) (179).

Os nervos colinérgicos podem liberar a neuromedina U, que participa da inflamação do tipo Th2 ativando diretamente os eosinófilos e potencialmente as células linfoides inatas tipo 2 (180).

1.5.4. Influência do Sistema Colinérgico no Remodelamento das Vias Aéreas

O remodelamento das vias aéreas envolve mudanças estruturais nas vias aéreas, como metaplasia de células caliciformes, espessamento da musculatura lisa das vias aéreas e deposição de matriz extracelular (181). Várias vias contribuem para o remodelamento das vias aéreas na asma, uma delas é o sistema colinérgico (182).

Estudos *in vitro* e em modelos animais indicam que essas mudanças são mediadas principalmente pelos receptores M3, que por sua vez são ativados pela acetilcolina. Isso sugere um possível mecanismo para o acúmulo de músculo liso no remodelamento das vias aéreas (161). Receptores muscarínicos controlam o acúmulo de proteínas contráteis em combinação com o TGF- β (183), a regulação

cooperativa da produção de proteína da matriz extracelular (calponina e α -actina) por receptores muscarínicos e TGF- β parece envolver receptores M2 (184).

Kistemaker et al (2014) demonstraram em dados *in vivo* que os camundongos do tipo selvagem tiveram um aumento de 1,7 vezes na coloração para α -actina de músculo liso após desafio com alérgeno; esse aumento estava completamente ausente em camundongos com deficiência de receptores M3 (185). Este estudo não encontrou nenhum papel estimulador para os receptores M3 na inflamação alérgica, sugerindo que o remodelamento induzido pela acetilcolina pode ser independente da inflamação (185).

Pinheiro et al. (2015) demonstraram que animais que possuem diminuição de VAcHT apresentaram aumento no conteúdo de colágeno e fibras elásticas ao redor das vias aéreas em comparação com animais controle *wild type* (177).

Pinheiro et al. (2020) verificaram que animais com diminuição de VAcHT sensibilizados com OVA apresentaram aumento do conteúdo de colágeno e níveis aumentados de MMP-9 e TIMP-1, ambos envolvidos no remodelamento pulmonar. Essas características foram revertidas após o tratamento com PNU-282987 (agonista α 7nAChR), sugerindo que a estimulação de α 7nAChR pode controlar o remodelamento pulmonar neste modelo de inflamação alérgica crônica das vias aéreas (186). Estudos anteriores demonstraram que o Dimetilfenilpiperazínio (agonista do nAChR) reduz a função dos eosinófilos *in vitro* e a liberação de MMP-9 (187).

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que muitos fatores podem contribuir para a fisiopatogenia e a exacerbação da asma, principalmente a poluição. Apesar do papel da poluição urbana e da queima de plantações estarem bem estabelecidas como fatores de piora para os asmáticos, a poluição advinda do processamento do minério de ferro ainda não está bem estabelecida na literatura. Além disso, estudos demonstram um papel tanto anti-inflamatório quanto pró inflamatório da acetilcolina. Portanto, é de fundamental importância o estudo do papel do transportador vesicular de acetilcolina na modulação dos processos de desenvolvimento da doença ou exacerbação da asma.

A população do município de Vitória tem questionado a respeito dos impactos que a poluição advinda de processos de pelletização podem causar a saúde, especialmente em casos em que o indivíduo já possui uma doença respiratória crônica.

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

É importante ressaltar que quando foi iniciada a exposição ao pó de ferro os animais submetidos ao protocolo experimental de asma já apresentavam as alterações estruturais acima descritas. Portanto, este estudo visa além de contribuir para o melhor entendimento da exposição de pó de ferro ao sistema respiratório em animais com atenuação de VAcHT também compreender a fisiopatologia da asma em animais com o sistema colinérgico atenuado e expostos a poluição advinda do pó de minério e identificar seus possíveis agentes de interação com estas doenças.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar os efeitos do pó de ferro e de material particulado em dois locais de exposição em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica e modificação para o receptor VACHT avaliando a mecânica pulmonar, respostas inflamatórias, remodelamento e estresse oxidativo nas estações verão e no inverno.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar em camundongos *wild type* e camundongos com diminuição de VACHT expostos ao pó de ferro e material particulado:

- A) Hiperresponsividade à metacolina;
- B) Mecanismos envolvidos na resposta inflamatória através da expressão celular do NF- κ B;
- C) Interleucinas (IL-5, IL-13 e IL-17);
- D) Remodelamento da matriz extracelular: TGF- β ;
- E) Expressão celular de α -7 nAChR.

Avaliar em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica e diminuição de VACHT expostos ao pó de ferro e material particulado:

- F) Hiperresponsividade à metacolina;
- G) Resposta inflamatória avaliando: eosinófilos;
- H) Mecanismos envolvidos na resposta inflamatória através da expressão celular do NF- κ B;
- I) Resposta de estresse oxidativo: iNOS, 15F2t-isoprostano
- J) TNF- α , interleucinas (IL-4, IL-5, IL-13 e IL-17);
- K) Remodelamento da matriz extracelular: fibras colágenas; MMP-9, TIMP-1 e TGF- β ;
- L) Expressão celular de α -7 nAChR.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº 1191/2018).

4.1. Locais de exposição ambiental

A Figura 7 mostra os locais onde ocorreram a exposição ambiental dos animais. Esses locais estavam localizados no município de Vitória, no estado do Espírito Santos – ES, Brasil. Local 1 localizado dentro de uma empresa mineradora e Local 2 localizado na Ilha do Boi, no terraço de um hotel a cerca de 5 km de distância da empresa mineradora. Outro local de permanência dos animais foi o biotério.

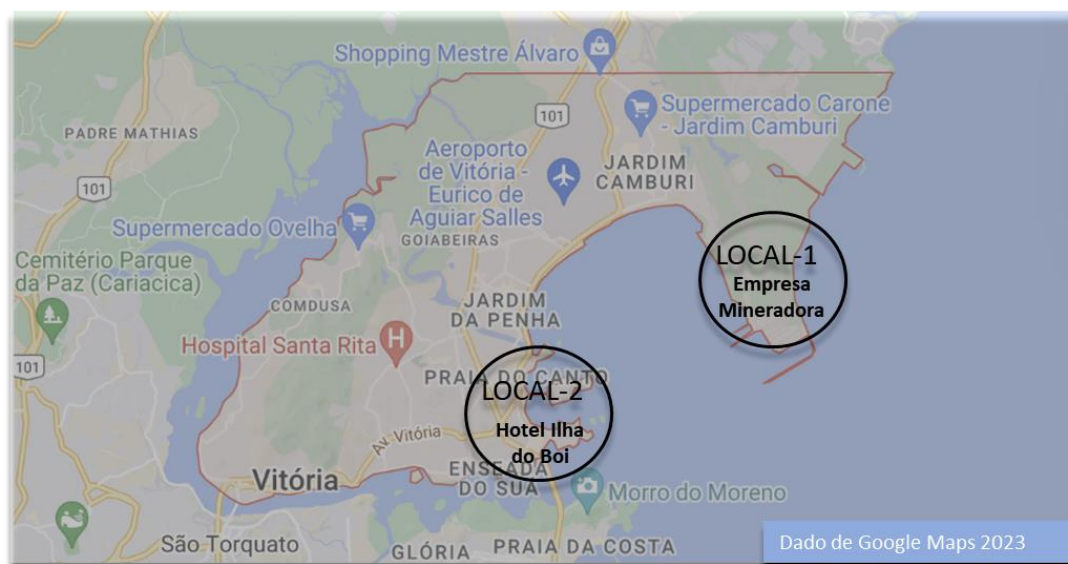


Figura 7. Locais de exposição ambiental. Local1 (empresa mineradora), local2 (Terraço de hotel localizado na Ilha do Boi). Imagem captada do google maps.

Os animais expostos aos locais foram expostos a poluição com o ar ambiente do local, permanecendo acomodados em caixas, em ambiente com temperatura controlada.

4.2. Animais

Foram utilizados animais da linhagem VACHT machos, geneticamente modificados com redução (Knockdown) da proteína transportadora vesicular de

acetilcolina (VACHT) desenvolvida pelo grupo dos Prof. Marco Antônio M. Prado na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais VACHT KD apresentam redução da proteína VACHT de aproximadamente 70%, o que leva a redução da liberação de ACh no pulmão na mesma proporção (142,177). Estes animais foram adquiridos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com peso médio de 19g, com idade aproximada de 6-8 semanas, onde são procriados atualmente sob responsabilidade da professora Carla Máximo Prado.

Neste trabalho foram utilizados 108 animais. Os animais VACHT KD e controles de tipo selvagem foram gerados através de camundongos heterozigotos inter cruzados.

Não foi realizado o “Wire Hang Test”, porém foi observada redução de massa corpórea quando comparados a animais WT. O peso médio dos animais VACHT foi de 19,2 gramas, enquanto o peso médio dos animais WT (selvagem sem redução da proteína transportadora vesicular de acetilcolina) foi de 21,6 g ($p < 0,05$).

Classificamos as análises em dois experimentos.

4.2.1. Experimento 1

No Experimento 1 foi realizada a análise dos efeitos da diminuição de VACHT e exposição a poluição do pó de minério comparando animais *wild type* (WT) com animais geneticamente modificados com diminuição de VACHT.

O experimento foi realizado no verão e no inverno. Os animais foram divididos nos grupos:

- **Grupo WT:** animais *wild type* mantidos em biotério;
- **Grupo WT Local-1:** animais *wild type* com exposição ambiental no local 1;
- **Grupo WT Local-2:** animais *wild type* com exposição ambiental no local 2;

- **Grupo VACHT KD:** animais geneticamente modificados com redução de VACHT mantidos no biotério;
- **Grupo VACHT KD Local-1:** animais geneticamente modificados com redução de VACHT e exposição ambiental no local 1 em Vitória-ES;
- **Grupo VACHT KD Local-2:** animais geneticamente modificados com redução de VACHT e exposição ambiental no local 2 em Vitória-ES.

4.2.2. Experimento 2

No experimento 2 avaliamos os efeitos da deficiência de VACHT na inflamação das vias aéreas induzida por OVA associada à poluição.

4.2.2.1. Protocolo de inflamação pulmonar alérgica crônica

Para o protocolo do modelo de inflamação pulmonar, nos dias 1 e 14 do experimento um antígeno foi administrado via parenteral para induzir uma sensibilização sistêmica e o mesmo antígeno foi realizado através de vias aéreas, o foco do processo inflamatório, por aerossol nos dias 22, 24, 26 e 28. O protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina teve a duração total de 29 dias.

Os camundongos receberam via intraperitoneal (i.p.) solução de 50 mg de ovoalbumina (Sigma - Aldrich) e 6 mg de Hidróxido de Alumínio – Alumen (Pepsamar, Sanofi-Synthelabo S.A., Rio de Janeiro, Brasil) em um volume total de 0,2 ml por via intraperitoneal (i.p.). Em relação a administração do antígeno via aerossol os animais foram colocados em uma caixa de exposição de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (US – 1000, ICEL, São Paulo, Brasil) e submetidos à inalação por 30 minutos de aerossol de OVA diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico) na concentração de 10 mg/ml (1%). Ao mesmo tempo, o grupo controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%) e hidróxido de alumínio (Alumen) (6 mg) por via intraperitoneal (i.p.) e nos dias dos desafios inalatórios foram expostos ao aerossol de solução salina 0,9% (30 minutos).

Os animais foram enviados para seus locais de exposição em Vitória após o décimo quarto dia do protocolo experimental com ovoalbumina. Lá permaneceram por duas semanas. Depois disso, no dia 29 do protocolo, foi realizada a avaliação da mecânica pulmonar e histopatologia pulmonar (188) (esquema ilustrado na Figura 8).

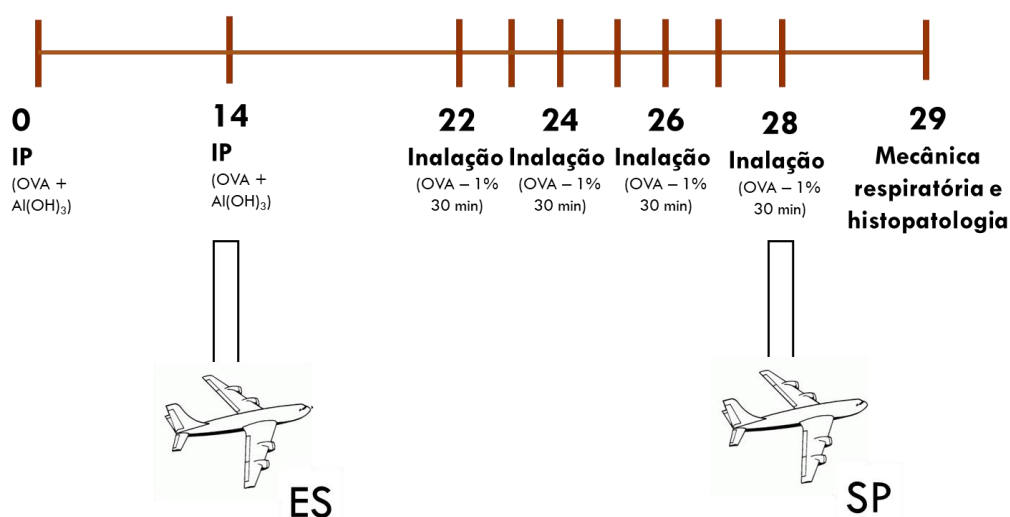


Figura 8 – Protocolo de exposição ambiental no modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica.

O experimento 2 foi realizado nas estações verão e inverno. Os grupos foram classificados:

- **Grupo VACHT KD:** animais geneticamente modificados com redução de VACHT mantidos no biotério (n=6);
- **Grupo VACHT KD Local-1:** animais geneticamente modificados com redução de VACHT e exposição ambiental no local 1 em Vitória-ES (n=6);
- **Grupo VACHT KD Local-2:** animais geneticamente modificados com redução de VACHT e exposição ambiental no local 2 em Vitória-ES (n=6);
- **Grupo VACHT KDA:** animais geneticamente modificados com redução de VACHT sensibilizados com OVA e mantidos no biotério (n=6);
- **Grupo VACHT KDA Local-1:** animais geneticamente modificados com redução de VACHT sensibilizados com OVA e expostos no local 1 em Vitória-ES (n=6);

- **Grupo VACHT KDA Local-2:** animais geneticamente modificados com redução de VACHT sensibilizados com OVA e expostos no local 2 em Vitória-ES (n=6);

4.3. Mensuração do óxido nítrico exalado

Após 24 horas do término do protocolo experimental, os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (50 mg/kg, via injeção intraperitoneal), uma cânula de plástico foi inserida e fixada com fio pelo orifício da traqueostomia e mecanicamente ventiladas a 120 respirações/min com um volume corrente de 10 mL/kg usando um ventilador para pequenos animais (FlexiVent, Scireq, Montreal, Canadá) (177). Após esta etapa, a mensuração do NO exalado foi realizada como previamente descrito (189,190). Após estabilizar o animal no ventilador, um balão de coleta foi ajustado à saída expiratória do ventilador durante dez minutos para obter o NO exalado. A técnica de quimioluminescência foi usada para medir o NO exalado (Sievers Instruments, Boulder, EUA). Uma fonte de NO certificada de 47 partes por bilhão (ppb) foi usada para calibrar o analisador (White Martins, São Paulo, Brasil). Um filtro de NO foi instalado no ramo inspiratório do ventilador para evitar contaminação ambiental (191).

4.4. Avaliação da mecânica respiratória

Um aparelho de ventilação mecânica (FlexiVent, Scireq, Montreal, Canadá, Figura 9) foi usado para ventilar pequenos animais. Os animais foram ventilados com volume corrente de 10 ml/kg, frequência respiratória de 120 ciclos/min e curva de fluxo inspiratório senoidal, conforme descrito anteriormente.

Pancurônio (0,2 mg/kg i.p.) foi administrado aos animais para diminuir o esforço ventilatório. Assim, os valores de pressão gerados foram obtidos e a impedância de via aérea (Pressão/Fluxo) foi calculada como função das diferentes frequências produzidas. Usando uma janela de sobreposição de 75% no sinal de 16 segundos, 3 blocos de 8 segundos foram usados para o cálculo dos parâmetros da mecânica oscilatória (i), segundo a equação: $Z(f) = R_{aw} + i(2\pi f)L_{aw} + [G_{tis} = iH_{tis}]/(2\pi f)\alpha$. Os parâmetros que buscamos para

descrever o modelo pulmonar são R_{aw} (resistência de vias aéreas maiores), G_{tis} (resistência de vias aéreas menores ou tecidos) e H_{tis} (elastância de tecidos pulmonares) (192). Os valores de resistência e elastância do sistema respiratório foram calculados através da equação do movimento do sistema respiratório, descrita a seguir: $P_{tr}(t) = R_{rs} \cdot V'(t) + E_{rs} \cdot V(t)$, onde t é tempo, P_{tr} é pressão traqueal, R_{rs} é resistência do sistema respiratório, E_{rs} é elastância do sistema respiratório, V' é fluxo aéreo e V é o volume pulmonar.

Foi realizado o desafio com inalação nas doses de 3,30 e 300mg/ml e obtidas as medidas de resistência e elastância do sistema respiratório, R_{aw} , G_{tis} e H_{tis} . Os resultados foram expressos em porcentagem de aumento da medida máxima em relação ao resultado basal.

Após mecânica pulmonar, os camundongos foram eutanasiados injetando pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.) e heparinizados (1000 IU) por via intravenosa imediatamente antes da secção da aorta abdominal e veia cava. A parede torácica anterior foi aberta e o coração, bem como os pulmões, foram retirados em blocos para análises morfométricas e histológicas/histoquímicas (193).



Figura 9. Imagem do Ventilador Mecânico Flexivent.

4.5. Avaliação da histopatologia e imunohistoquímica

Após a fixação, o material foi submetido às técnicas histológicas

habituais com parafina, para obtenção de cortes de 4 µm de espessura e as lâminas foram coradas conforme a descrito a seguir. Os cortes foram desparafinados e levados à água para a coloração de Picro-Sírius (fibras colágenas). Foram corados por 1 hora no Picro-Sírius à temperatura ambiente e posteriormente lavados em água corrente por 5 minutos. Após esta etapa, os cortes foram corados pela hematoxilina de *Carazzi* por 6 minutos e posteriormente lavados em água corrente por 10 minutos. Em seguida foram desidratados, diafanizados e posteriormente montados.

A imunohistoquímica foi realizada pelo método biotina-estreptavidina peroxidase e após este período, os cortes foram lavados em PBS e incubados por toda a noite com anticorpos: anti-iNOS, anti-15F2t-isoprostano, anti-NFκB, anti-IL (4,5,13,17), anti-TNF-alfa, anti-TGFβ, anti-MMP-9, anti-TIMP-1 e anti-AChRα7. Os cortes foram lavados e incubados em PBS. Após isso, os cortes foram novamente lavados e DAB foi usada como cromógeno. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de *Harris* (191). As titulações já realizadas para cada anticorpo estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Titulação Anticorpos

Marcador	Diluição	Anticorpo secundário	Especificação
TNF-alfa	1:10000	Anti-camundungo	SC 52746 - Mouse monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
NF-κB	1:500	Anti-camundungo	SC-8008 - Mouse Monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-4	1:15000	Anti-camundungo	SC-53084 - Mouse Monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-5	1:100	Anti-coelho	SC-395334 - Mouse Monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-13	1:8000	Anti-cabra	SC-393365 - Mouse Monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-17	1:3000	Anti-coelho	SC-7927 - Rabbit Polyclonal; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
TGF-β	1:700	Anti-camundungo	SC-130348 - Mouse monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
MMP-9	1:50	Anti-coelho	SC-393859 - Mouse Monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
TIMP-1	1:100	Anti-camundungo	LS - C299465 - Polyclonal Rabbit; LSBio
iNOS	1:500	Anti-camundungo	SC-7271 - Rabbit Polyclonal; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
15F2t-isoprostano	1:4000	Anti-cabra	Oxford Biomed Resear IS-20
AChRα-7	1:400	Anti-rato	SC-59607 - Rat Monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

4.6. Análise morfométrica

Para análise morfométrica foi utilizada a técnica de contagem de pontos (194) com um retículo de 100 pontos e 50 retas acoplado à ocular do microscópio (Figura 10) ou pela utilização do analisador de imagens. A área total do retículo é de $10^4\mu\text{m}^2$. O retículo foi fixado na base do epitélio para medir a quantidade de células positivas nas vias aéreas. Foi realizada a razão entre o número de células em determinada área e o número de pontos que coincidiram com a área peribrônquica para vias aéreas. Avaliamos de 3-4 vias aéreas por animal (195). As análises foram realizadas em aumento x1000 (81,87,196).

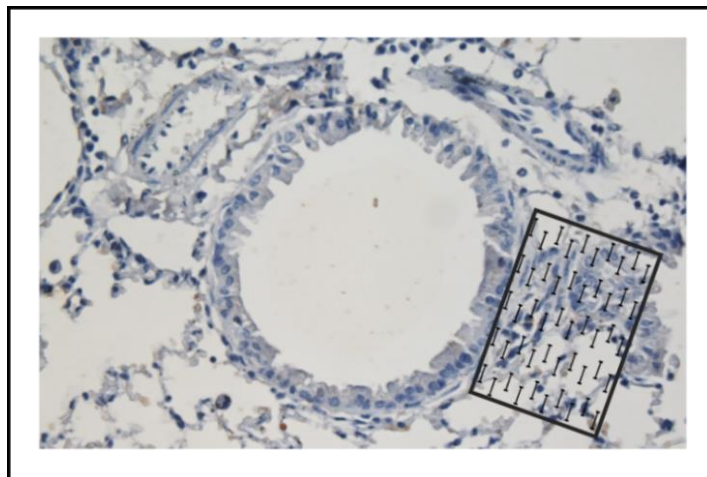


Figura 10- Contagem de células positivas na parede da via aérea (197).

4.7. Análise de imagens

O analisador de imagem Image-Pro Plus foi usado para analisar as fibras colágenas e o conteúdo de 15F2t-isoprostano, a medida de densidade óptica foi o método empregado para a análise. A captura das imagens foi realizada por meio de sistema de análise de imagens composto de microscópio *Leica DM2500* (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha*), com câmera de vídeo acoplada, que envia as imagens a um computador. As fotos foram adquiridas e processadas por meio de um "software".

Para a quantificação descrita foram feitas fotografias de vias aéreas em um aumento de 1000x. Para todas as análises foram avaliadas quatro vias aéreas em cada animal. O programa Image-Pro Plus 4.5 foi usado para analisar

as imagens, este informa um "*threshold*" dos tons de cores que representam as áreas positivas e assim quantifica estas na área determinada previamente. Os resultados foram expressos em porcentagem de área positiva (140,198).

4.8. Análise do particulado

A professora Christine Bourotte (Cidade Universitária, São Paulo-SP) foi responsável pela análise e caracterização do particulado.

A coleta simultânea de material particulado atmosférico foi realizada usando equipamentos de amostragem do tipo dicotômico, que permitem coletar dois grupos de tamanho de partículas (fração fina $d < 2,5\mu\text{m}$ – $\text{MP}_{2,5}$ e fração grossa $2,5 < d < 10\mu\text{m}$ – $\text{MP}_{2,5-10}$) em filtros de policarbonato de 47 mm de diâmetro e $8,0\mu\text{m}$ e $0,4\mu\text{m}$ de diâmetro de poro, respectivamente. A amostragem foi realizada simultaneamente durante intervalos de 24 horas, nos dois locais de amostragem (empresa mineradora e ilha do Bói), sendo coletado na janela dos locais onde os animais ficavam.

Outra matriz particulada coletada foi a poeira de rua acumulada nas vias por ser receptora de material particulado atmosférico que se deposita por via seca e úmida bem como fonte de particulado atmosférico por ressuspensão de material depositado. A coleta de poeira de rua consiste em varrer uma área de 3m^2 com pincel e escova. O material foi coletado e acondicionado em sacos de plásticos que foram devidamente identificados.

4.9. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *SigmaStat 11.0* (SPSS Inc, Chicago, IL). Foi utilizado o teste *One-Way ANOVA* seguido pelo método *Holm-Sidak* para comparação entre os grupos. Na análise comparativa entre os grupos pares foi realizado o *Rank Sum Test*. Os resultados foram apresentados na forma de média e erro padrão e o gráfico apresentado na forma de barras. Foi considerado estatisticamente significativo um $p < 0,05$ para todas as análises.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1. Animais selvagens (WT) X Knockdown (KD)

Demonstramos na Tabela 3 os resultados referentes as análises da mecânica respiratória.

Observamos que no verão os animais WT-Local1 apresentaram aumento da %Rrs e da %Raw comparativamente aos animais WT que permaneceram no biotério ($p < 0,05$), no inverno houve também aumento da %Rrs nos animais WT expostos ao local 2 comparativamente aos animais WT ($p < 0,05$).

Houve aumento da %Rrs nos animais geneticamente modificados com diminuição de VACHT comparativamente aos animais *wild type* ($p < 0,05$).

Tabela 3. Análise da Hiperresponsividade (Experimento 1)

Hiperresponsividade						
Verão	WT	WT-Local 1	WT-Local 2	VACHT KD	VACHT KD-Local1	VACHT KD-Local2
%Rrs	35,9±8,7	109,5±15,5 ^{€Y}	73,4±10,06	70,5±12,5 [€]	125,2±33,2 [#]	50,3±12,0
%Ers	30,8±7,4	68,7±13,6	41,1±8,2	17,2±3,7	39,4±4	46,2±7,3 [*]
%Raw	80,3±10,6	169,9±32,8 ^{€Y}	81,1±16,09	102,9±20,0	177,2±55,7	94,6±29,1
%Gtis	35,2±6,5	48,2±9,3	25,1±5,7	44,1±10,6	68,8±21,5	23,1±3,7
%Htis	26,7±6,9	45,05±9,1	45,3±11,3	22,4±4,4	34,2±11,4	58,4±9,3 [*]
Inverno	WT	WT-Local 1	WT-Local 2	VACHT KD	VACHT KD-Local1	VACHT KD-Local2
%Rrs	29,0±6,4	70,5±12,5	114,6±19,6 [€]	70,6±12,6	79,0±26,4	90,2±31,2
%Ers	25,1±5,9	45,9±6,04	40,5±4,8	21,5±7,6	38,9±3,9	24,8±5,6
%Raw	72,9±9,2	69,7±32,3	133,1±24,6	102,8±24,6	81,7±16,0	145,1±51,5
%Gtis	30,8±5,8	57,2±16,9	35,4±6,9	43,0±11,2	24,6±7,8	33,2±13,4
%Htis	21,6±5,8	30,7±2,4	28,6±5,5	20,4±4,8	35,3±6,3	17,3±6,0

Legenda: *diferente comparado ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$), #diferente comparado ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$), €diferente comparado ao grupo WT ($p < 0,05$), [†]diferente comparado ao grupo WT Local-1 ($p < 0,05$), ^Ydiferente comparado ao grupo WT Local-2 ($p < 0,05$).

Demonstramos na Tabela 4 os resultados referentes as análises do Experimento 1 na avaliação de: AChR α -7, NF-Kappa B, IL-5, IL-13, IL-17 e células positivas para TGF- β .

Tabela 4. Análise de AChR α -7, marcadores inflamatórios e remodelamento (Experimento 1).

Verão		WT	WT Local-1	WT Local-2	VACHT KD	VACHT KD Local-1	VACHT KD Local-2
	AChR α -7 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	3,9 \pm 0,8*	3,6 \pm 0,9**	2,1 \pm 0,5	1,5 \pm 0,3	1,1 \pm 0,3	1,0 \pm 0,3
Inflamação	NFkappaB (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0,9 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	1,1 \pm 0,2	9,5 \pm 0,9[€]	6,4 \pm 0,8^h	7,4 \pm 1,1^Y
	IL-5 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	2,8 \pm 0,5	4,7 \pm 0,7^Y	2,0 \pm 0,4	3,2 \pm 3,8[€]	6,3 \pm 0,8^{h,k}	4,03 \pm 0,4^Y
	IL-13 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	1,8 \pm 0,5	2,5 \pm 0,4	2,8 \pm 0,5	2,9 \pm 0,3[€]	3,4 \pm 0,4^h	3,3 \pm 0,4^Y
	IL-17 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	2,2 \pm 0,3	2,5 \pm 0,2	4,5 \pm 0,5^{€h}	3,2 \pm 0,4[€]	2,0 \pm 0,5	5,2 \pm 0,8^{h,k}
Remodelamento	TGF- β (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	3,8 \pm 0,7	3,5 \pm 0,6	3,0 \pm 0,6	4,5 \pm 0,9	5,6 \pm 1,0	5,8 \pm 0,9^Y
Inverno		WT	WT Local-1	WT Local-2	VACHT KD	VACHT KD Local-1	VACHT KD Local-2
	AChR α -7 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	4,7 \pm 1,0*	9,4 \pm 1,9	8,1 \pm 1,2[#]	1,4 \pm 0,4	6,4 \pm 1,1[#]	3,5 \pm 0,8
Inflamação	NFkappaB (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0,8 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,9 \pm 0,2	8,9 \pm 1,0[€]	16,3 \pm 1,7^{h,k}	8,9 \pm 1,2^Y
	IL-5 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	2,6 \pm 0,6	3,0 \pm 0,6	2,7 \pm 0,4	3,2 \pm 0,3[€]	5,9 \pm 5,7^{h,k}	3,2 \pm 3,9^Y
	IL-13 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	1,9 \pm 0,5	3,4 \pm 0,6	2,4 \pm 0,4	2,6 \pm 0,3[€]	3,7 \pm 0,4^h	2,7 \pm 0,4
	IL-17 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	2,3 \pm 0,3	4,1 \pm 0,4[€]	3,1 \pm 0,3	3,1 \pm 0,5	4,2 \pm 0,7	3,6 \pm 0,7
Remodelamento	TGF- β (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	3,7 \pm 0,7	5,7 \pm 1,3	3,6 \pm 0,6	3,9 \pm 0,8	7,6 \pm 1,2^h	6,3 \pm 1,1

Legenda: *diferente comparado ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$), **diferente comparado ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$), #diferente comparado ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$), €diferente comparado ao grupo WT ($p < 0,05$), ^hdiferente comparado ao grupo WT Local-1 ($p < 0,05$), ^Ydiferente comparado ao grupo WT Local-2 ($p < 0,05$).

Observamos um aumento de células positivas de AChR α -7 nos animais WT em relação aos animais VACHT KD ($p < 0,05$).

Notamos aumento de células positivas de AChR α -7, NF-KappaB, IL-5 e IL-13 no grupo VACHT KD em comparação com o grupo WT ($p < 0,05$).

No verão, observamos aumento de células positivas de NF-Kappa B, IL-5 e IL-13 no grupo VACHT KD Local-1 em comparação com o grupo WT Local-1 ($p < 0,05$), também houve aumento de NF-KappaB, IL-5, IL-13 e TGF- β no grupo VACHT KD Local-2 em comparação com o grupo WT Local-2 ($p < 0,05$).

No inverno, observamos um aumento de células positivas para NF-KappaB, IL-5, IL13 e TGF- β no grupo VACHT KD Local-1 em comparação com o grupo WT Local-1 ($p < 0,05$) e um aumento de células positivas de NF-KappaB e IL-5 no grupo VACHT KD Local-2 em comparação com o grupo WT Local-2 ($p < 0,05$).

5.2. Experimento 2. Knockdown (KD) X Knockdown + inflamação crônica pulmonar (KDA)

Para melhor visualização dos resultados os gráficos serão apresentados lado a lado correspondentes as estações verão e inverno.

5.2.1. Hiperresponsividade a metacolina

5.2.1.1. Percentual de Aumento da Resistência do Sistema Respiratório (%Rrs)

A Figura 11 demonstra a percentual de aumento da resistência do sistema respiratório nas estações verão (A) e inverno (B) na análise de animais VACHT *Knockdown* (KD) comparativamente a animais VACHT *Knockdown* (KD) com inflamação pulmonar alérgica crônica (KDA) expostos ao local 1 e local 2.

Houve um aumento da resposta máxima da %Rrs no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos VACHT KDA, VACHT KDA-Local1 e VACHT KDA-Local2 nas estações verão e no inverno.

No verão houve um aumento da %Rrs no grupo VACHT KD-Local1 em relação ao grupo VACHT KD-Local2 ($p < 0,05$). O grupo VACHT KDA-Local2 apresentou aumento comparado ao grupo VACHT KD-Local2 ($p < 0,05$), conforme demonstrado na Figura 11A.

No inverno, quando comparados os grupos VACHT KD, VACHT KD-Local1 e Local2 não observamos diferenças significativas, conforme demonstrado na Figura 11B.

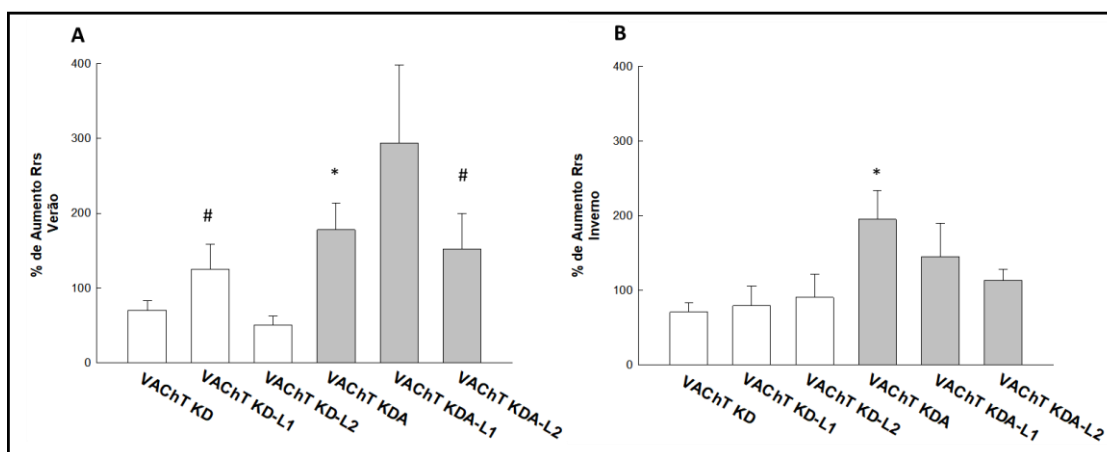


Figura 11 – Percentual de Aumento da Resistência do Sistema Respiratório (%Rrs): * diferente comparado ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); **diferente comparado ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparado ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$).

5.2.1.2. Percentual de Aumento da Elastância do Sistema Respiratório (%Ers)

A Figura 12 demonstra o percentual de aumento da elastância do sistema respiratório (%Ers). Na Figura 12A (verão) e Figura 12B (inverno) é demonstrado a análise de animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) e animais *Knockdown* + inflamação crônica pulmonar (VACHT KDA) nas estações verão e inverno.

No verão, conforme demonstrado na Figura 12A, observamos que houve aumento da %Ers no grupo VACHT KD-Local2 comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos VACHT KDA, VACHT KDA-Local1 e VACHT KDA-Local2. Não houve diferença significativa entre os pares VACHT KD-Local1/VACHT KDA-Local1 e VACHT KD-Local2/VACHT KDA-Local2 no verão.

No inverno, conforme demonstrado na Figura 12B, nota-se que o grupo VACHT KDA-Local1 apresentou aumento da %Ers comparado ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$). Observamos aumento da porcentagem de Ers no grupo VACHT KDA-Local1 comparado ao grupo VACHT KD-Local1 ($p < 0,05$), também observamos aumento %Ers no grupo VACHT KDA-Local2 comparado ao grupo VACHT KD-Local2 ($p < 0,05$).

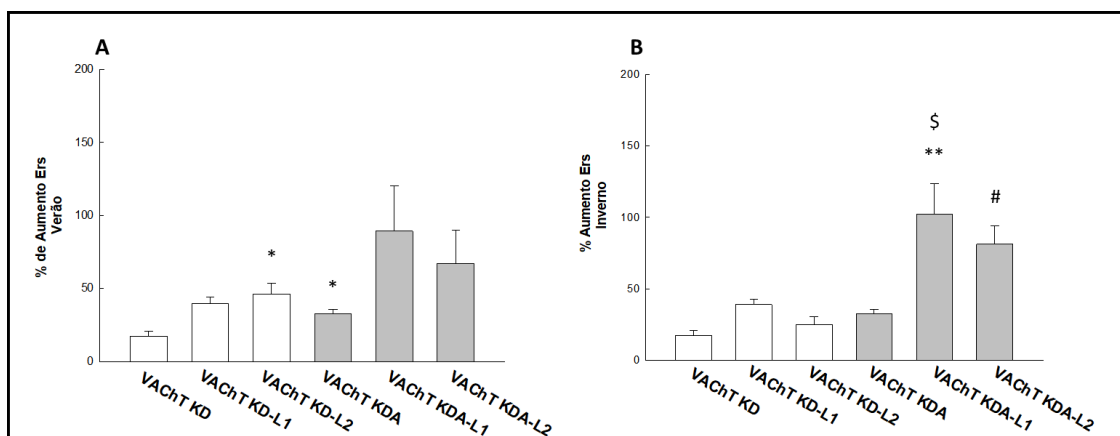


Figura 12 – Percentual de Aumento da Elastância do Sistema Respiratório (%Ers): *diferente comparado ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); **diferente comparativamente a VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$); \$diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$).

5.2.1.3. Percentual de Aumento da Resistência da Vias aéreas (%Raw)

A Figura 13 demonstra o percentual de aumento da resistência de vias aéreas (%Raw). Na Figura 13A (verão) e Figura 13B (inverno) é demonstrado a análise de animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) com animais VACHT *Knockdown* + inflamação crônica pulmonar (VACHT KDA) nas estações verão e inverno.

No verão e no inverno não houve diferença entre os grupos: VACHT KD, VACHT KD-Local1 e VACHT KD-Local2. Também não houve diferença entre os grupos: VACHT KDA, VACHT KDA-Local1 e VACHT KDA-Local2.

Observamos aumento da %Raw no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$).

No verão observamos aumento da resistência do sistema respiratório no grupo VACHT KDA-Local2 quando comparado ao grupo VACHT KD-Local2 ($p < 0,05$).

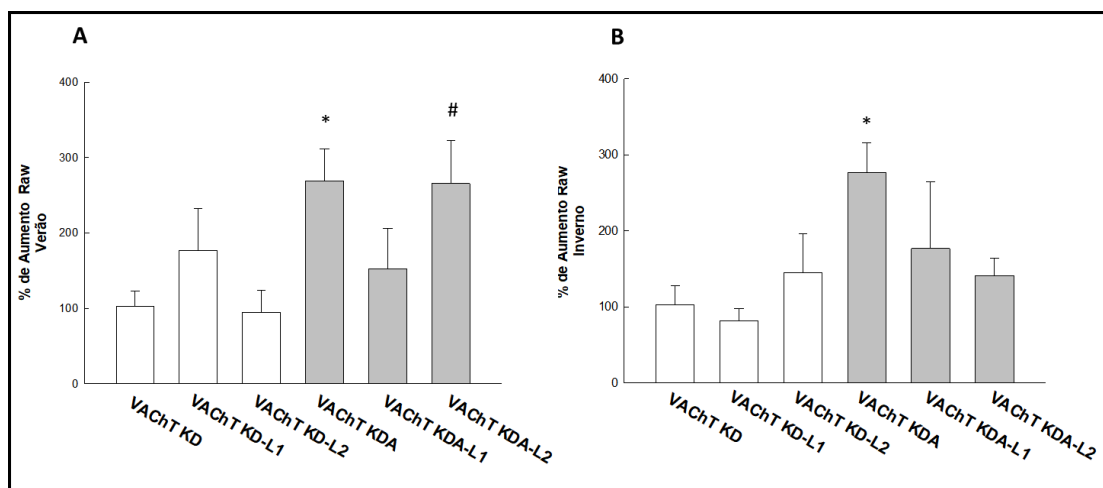


Figura 13 – Percentual de Aumento da Resistência do Sistema Respiratório (%Raw). * diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); # diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$).

5.2.1.4. Percentual de Aumento da Resistência do tecido pulmonar (%Gtis)

Na Figura 14 demonstramos a análise da resposta máxima da resistência do tecido pulmonar dos animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) comparativamente aos animais VACHT *Knockdown*+inflamação crônica pulmonar (VACHT KDA) nas estações verão e inverno.

Quando comparados os grupos VACHT KDA, VACHT KDA-Local1 e VACHT KDA-Local2 não houve diferenças significativas.

Observamos no verão (Figura 14A) aumento do percentual de aumento da Gtis no grupo VACHT KDA Local-2 quando comparado ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os pares VACHT KD/VACHT KDA e VACHT KD Local-1/VACHT KDA Local-1.

No inverno (Figura 14B) na análise dos grupos VACHT KDA, VACHT KDA-Local1 e VACHT KDA-Local2, não houve diferença entre eles. Observamos aumento da %Gtis no grupo VACHT KDA Local-1 quando comparado ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$). Na avaliação entre os pares VACHT KD/VACHT KDA e VACHT KD Local-2/VACHT KDA Local-2 não houve diferenças significativas.

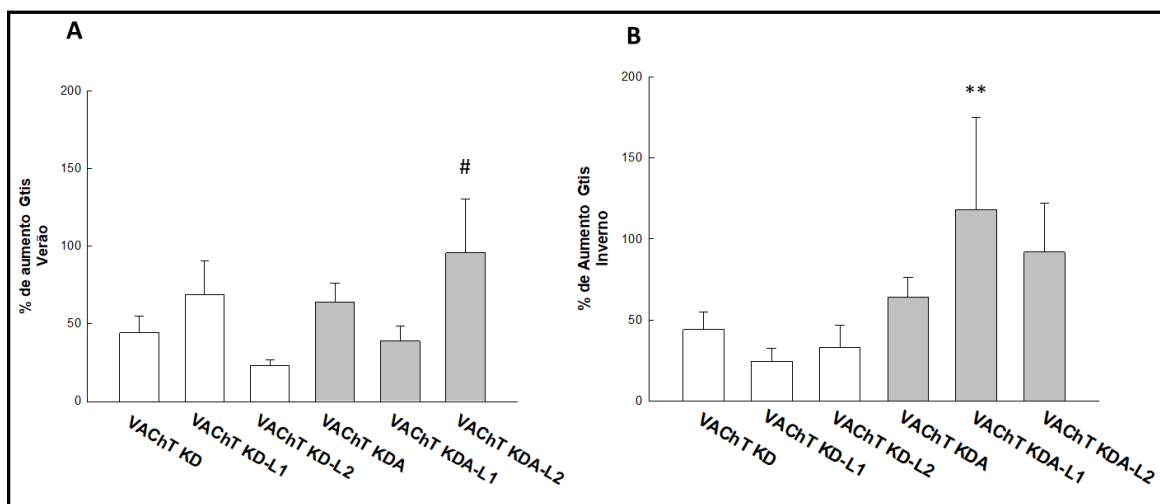


Figura 14 – Percentual de Aumento da Resistência do Tecido Pulmonar (%Gtis): #diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$); ** diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$).

5.2.1.5. Percentual de Aumento da Elastância do tecido pulmonar (%Htis)

A Figura 15 demonstra o percentual de aumento da elastância do tecido pulmonar. A Figura 15A (verão) e Figura 15B (inverno) ilustra a análise de animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) com animais VACHT *Knockdown*+inflamação crônica pulmonar (VACHT KDA).

No verão houve aumento da %Htis no grupo VACHT KD-Local 2 comparativamente ao grupo VACHT KD ($p<0,05$). Não houve diferença na comparação entre pares (VACHT KD/VACHT KDA, VACHT KD Local-1/VACHT KDA Local-1 e VACHT KD Local-2/VACHT KDA Local-2).

No inverno observamos aumento da %Htis no grupo VACHT KDA Local-1 quando comparado ao grupo VACHT KD Local-1 ($p<0,05$). Houve também aumento da Htis no grupo VACHT KDA-Local2 quando comparado ao grupo VACHT KD Local-2 no inverno ($p<0,05$). Quando comparados os grupos VACHT KDA, VACHT KDA Local-1 e VACHT KDA Local-2, houve aumento no grupo VACHT KDA Local-1 comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p<0,05$).

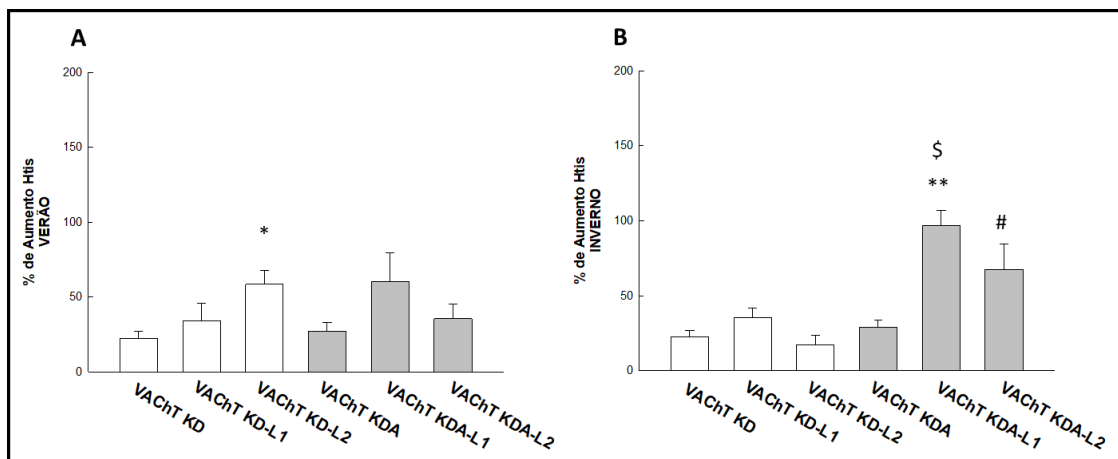


Figura 15 – Resposta Máxima da Elastância do Tecido Pulmonar (%Htis). A (verão) e B (inverno) grupos: *diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p<0,05$); **diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-LOCAL1 ($p<0,05$); #diferente comparado ao grupo VACHT KD-L2 ($p<0,05$); \$diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p<0,05$).

5.2.2. Inflamação

5.2.2.1. Avaliação do Número de Células Positivas de eosinófilos

A Figura 16 demonstra a expressão de eosinófilos nas estações verão (A) e inverno (B) na análise de animais VACHT *Knockdown* (KD) comparativamente a animais VACHT *Knockdown* com inflamação pulmonar alérgica crônica (KDA).

Em ambas as estações houve aumento de eosinófilos no grupo VACHT KD Local-1 e VACHT KD Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$), houve aumento do número de eosinófilos no grupo VACHT KD Local-1 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$). Houve aumento de eosinófilos no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$), houve aumento de eosinófilo no grupo VACHT KDA Local-1 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$) e aumento de eosinófilos no grupo VACHT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KDA Local-2 ($p < 0,05$).

Em ambas as estações observamos aumento de eosinófilos no grupo VACHT KDA Local-1 e VACHT Local-2 quando comparado ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$). Houve também aumento de eosinófilos no grupo VACHT KDA-Local2 quando comparado ao grupo VACHT KDA Local-1 ($p < 0,05$).

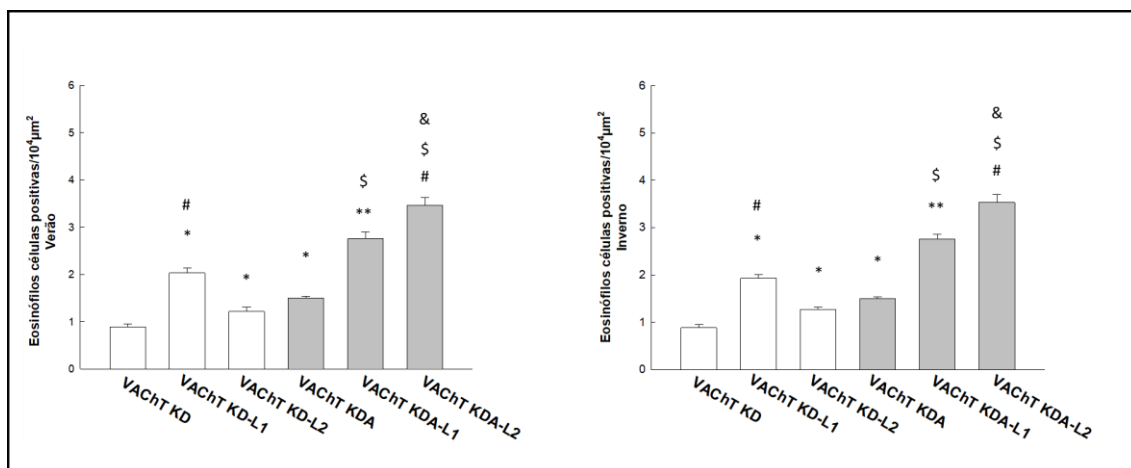


Figura 16. Eosinófilos: *Knockdown* (KD) X *Knockdown* + inflamação crônica pulmonar (KDA). *diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); ** diferente comparativamente ao

*grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); # diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$).
§diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$); &diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA Local-1 ($p < 0,05$).*

5.2.2.2. Avaliação do Número de Células de TNF- α positivas na parede brônquica

A Figura 17 demonstra a expressão de TNF- α nas estações verão (A) e inverno (B) na análise de animais VACHT *Knockdown* (KD) comparativamente a animais VACHT *Knockdown* com inflamação pulmonar alérgica crônica (KDA).

Houve aumento do número de células positivas de TNF- α no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$).

Em ambas as estações houve aumento da expressão de TNF- α no grupo VACHT KDA Local-1 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$) e aumento da expressão de TNF- α no grupo KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$).

No inverno houve aumento da expressão de TNF- α no grupo VACHT KD Local-1 comparado aos grupos VACHT KD e VACHT KD-Local 2 ($p < 0,05$).

Não houve diferenças entre os grupos VACHT KDA, VACHT KDA Local-1 e VACHT KDA Local-2 em ambas as estações.

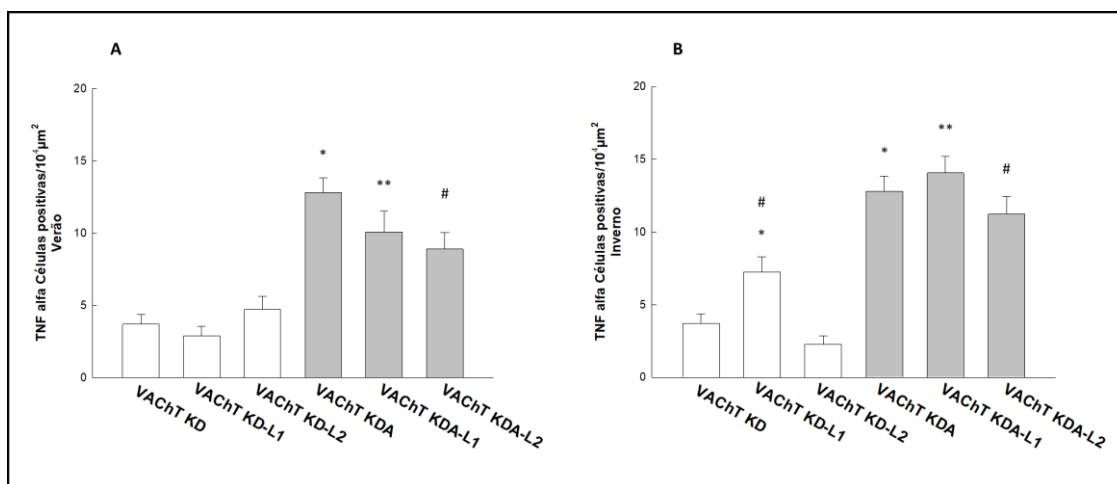


Figura 17 – TNF alfa: *Knockdown* (KD) X *Knockdown* + inflamação crônica pulmonar (KDA). *diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); ** diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$).

5.2.2.3. Avaliação do Número de Células de NF-Kappa B positivas na parede brônquica

A Figura 18 demonstra a expressão de NF-Kappa B nas estações verão (A) e inverno (B) na análise de animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) comparativamente a animais VACHT *Knockdown* com inflamação pulmonar alérgica crônica (VACHT KDA).

Houve aumento do número de células positivas de NF-Kappa B no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$).

Em ambas as estações houve aumento da expressão de NF-Kappa B no grupo KDA Local-1 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$) e aumento da expressão de NF Kappa B no grupo KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$).

No inverno houve aumento da expressão de NF-Kappa B no grupo VACHT KDA Local-1 comparado ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$) e quando comparado ao grupo VACHT KDA Local-2 ($p < 0,05$).

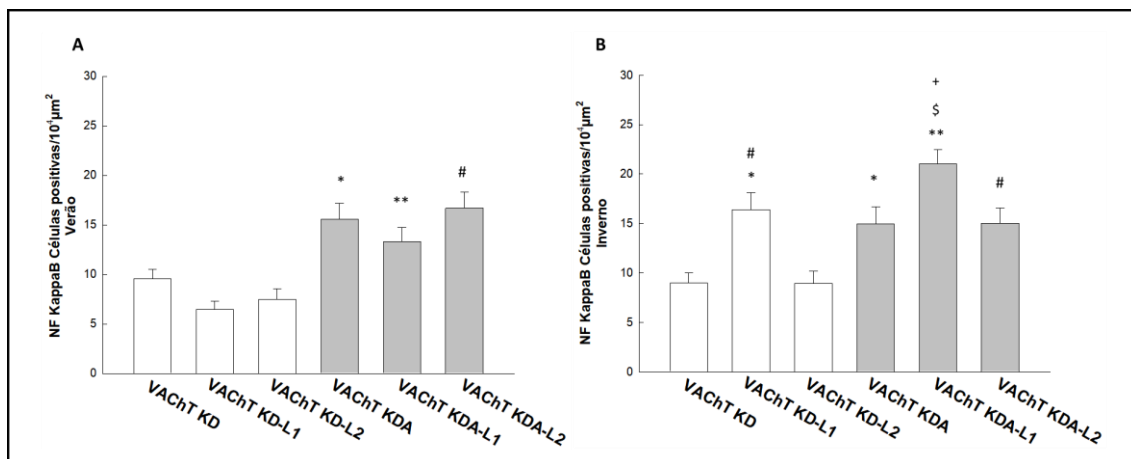


Figura 18 – NF Kappa B: Knockdown (KD) X Knockdown + inflamação crônica pulmonar (KDA). * diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); ** diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$); §diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$), +diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA-L2 ($p < 0,05$).

5.2.2.4. Avaliação do Número de Células de IL-4 positivas na parede brônquica

A Figura 19 demonstra a expressão de IL-4 nas estações verão (A) e inverno (B) na análise de animais VACHT *Knockdown* (KD) comparativamente a animais VACHT *Knockdown* com inflamação pulmonar alérgica crônica (KDA).

Houve aumento do número de células positivas de IL-4 no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$).

Em ambas as estações houve aumento da expressão de IL-4 no grupo VACHT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$).

No verão houve aumento da expressão de IL-4 no grupo VACHT KD Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$) e ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$). Houve aumento de células positivas de IL-4 no grupo VACHT KDA Local-1 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$).

No inverno houve aumento de IL-4 no grupo VACHT KD Local-1 comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$) e ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$). Houve aumento da expressão de IL-4 no grupo VACHT KDA Local-2 comparado ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$) e ao grupo VACHT KDA Local-1 ($p < 0,05$).

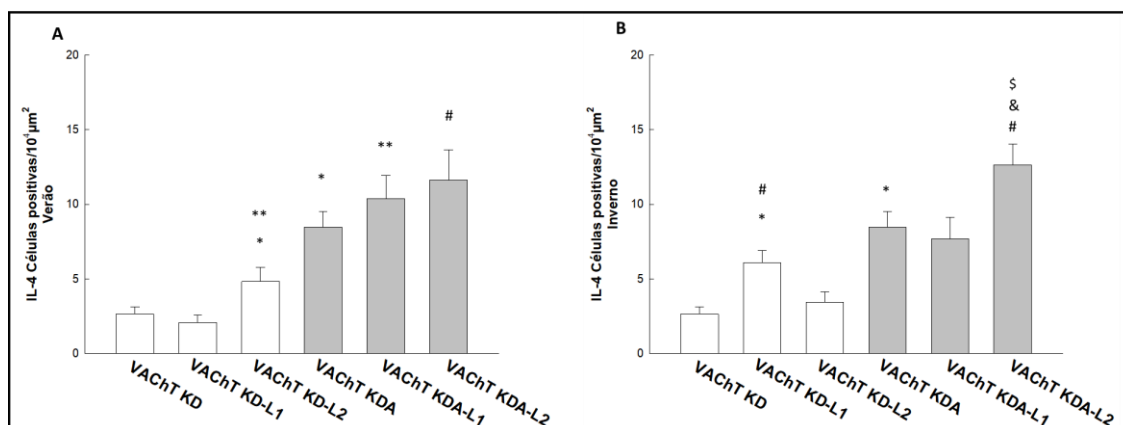


Figura 19 - IL-4: Knockdown (KD) X Knockdown + inflamação crônica pulmonar (KDA). * diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); ** diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$); §diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$), & diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA-L1 ($p < 0,05$).

5.2.2.5. Avaliação do Número de Células de IL-5 positivas na parede brônquica

A Figura 20 demonstra a expressão de IL-5 nas estações verão (A) e inverno (B) na análise de animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) comparativamente a animais VACHT *Knockdown* com inflamação pulmonar alérgica crônica (VACHT KDA).

Houve aumento do número de células positivas de IL-5 no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$).

Como demonstrado na Figura 20A e Figura 20B, no verão e inverno houve um aumento da expressão de IL-5 no grupo VACHT KDA Local-1 e VACHT KDA Local-2 comparado ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$). Houve aumento da expressão de IL-5 no grupo KDA Local-1 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$) e houve aumento da expressão de IL-5 no grupo VACHT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$).

Em ambas as estações o grupo VACHT KD Local-1 apresentou aumento comparado ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$) e ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$).

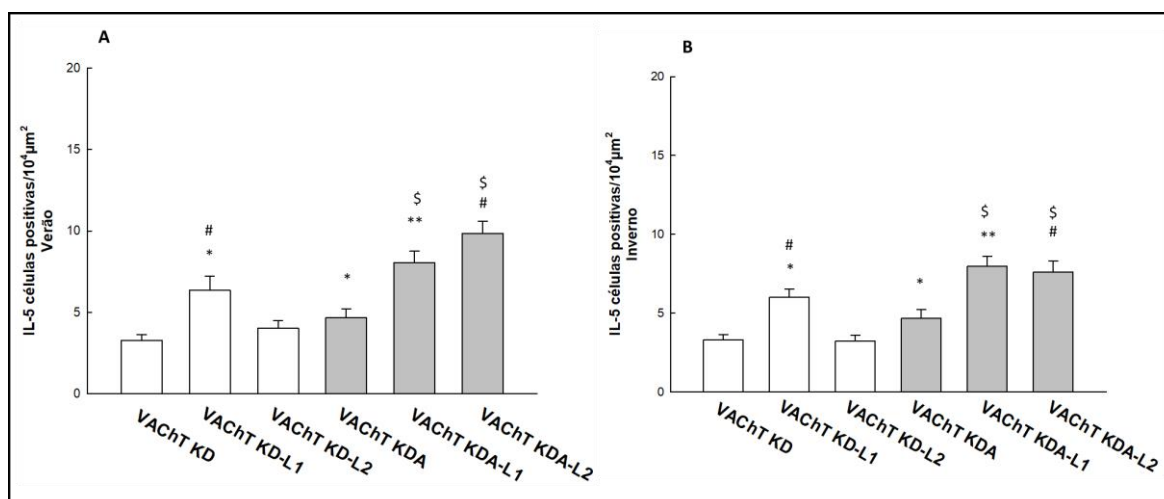


Figura 20 - IL-5: Knockdown (KD) X Knockdown + inflamação crônica pulmonar (KDA). * diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); ** diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); # diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$); \$ diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$).

5.2.2.6. Avaliação do Número de Células de IL-13 positivas na parede brônquica

A Figura 21 demonstra a expressão de IL-13 nas estações verão (A) e inverno (B) na análise de animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) comparativamente a animais VACHT *Knockdown* com inflamação pulmonar alérgica crônica (VACHT KDA).

Houve um aumento do número de células positivas de IL-13 no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$).

Como demonstrado na Figura 21, no verão e inverno houve um aumento do número de células positivas de IL-13 no grupo VACHT KDA Local-1 em relação ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$), houve também aumento do grupo VACHT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$).

No verão os grupos VACHT KDA Local-1 e VACHT KDA Local-2 apresentaram aumento comparado ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$). O grupo VACHT KDA Local-2 apresentou aumento comparado aos grupos VACHT KDA Local-1 ($p < 0,05$), conforme demonstrado na Figura 21A.

No inverno (Figura 21B), o grupo VACHT KDA Local-1 apresentou aumento comparado ao grupo VACHT KDA e VACHT KDA Local-2 ($p < 0,05$). E houve aumento no número de células positivas de IL-13 no grupo VACHT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$).

Quando comparados os grupos VACHT KD, VACHT KD Local-1 e VACHT KD Local-2 não observamos diferenças significativas entre eles, no verão e no inverno.

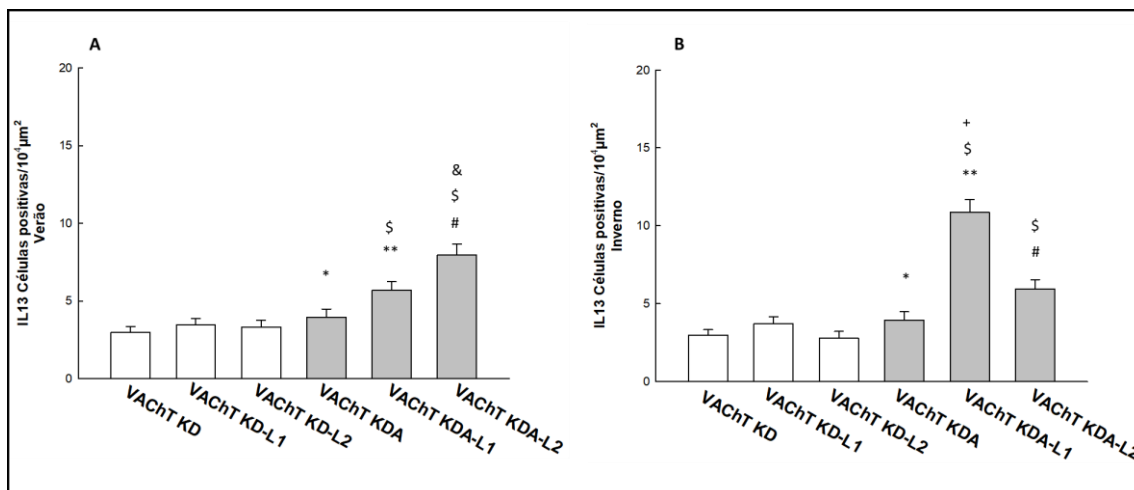


Figura 21 - IL-13: Knockdown (KD) X Knockdown + inflamação crônica pulmonar (KDA). *diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); **diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); §diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$); &diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$); +diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA-L2 ($p < 0,05$).

5.2.2.7. Avaliação do Número de Células de IL-17 positivas na parede brônquica

A Figura 22 demonstra a expressão de IL-17 nas estações verão (A) e inverno (B) na análise de animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) comparativamente a animais VACHT *Knockdown* com inflamação pulmonar alérgica crônica (VACHT KDA).

Houve um aumento do número de células positivas de IL-17 no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$).

Como demonstrado na Figura 22, no verão e inverno houve um aumento do número de células positivas de IL-17 no grupo VACHT KDA-Local1 em relação ao grupo VACHT KD-Local1 ($p < 0,05$), houve também aumento do grupo VACHT KDA-Local2 comparativamente ao grupo VACHT KD-Local2 ($p < 0,05$).

No verão o grupo VACHT KD-Local2 apresentou aumento comparado aos grupos VACHT KD e VACHT KD-Local1 ($p < 0,05$). No inverno não houve diferença entre os grupos VACHT KD, VACHT KD-Local1 e VACHT KD-Local2.

Em ambas as estações não houve diferenças entre os grupos VACHT KDA, VACHT KDA-L1 e VACHT KDA-L2.

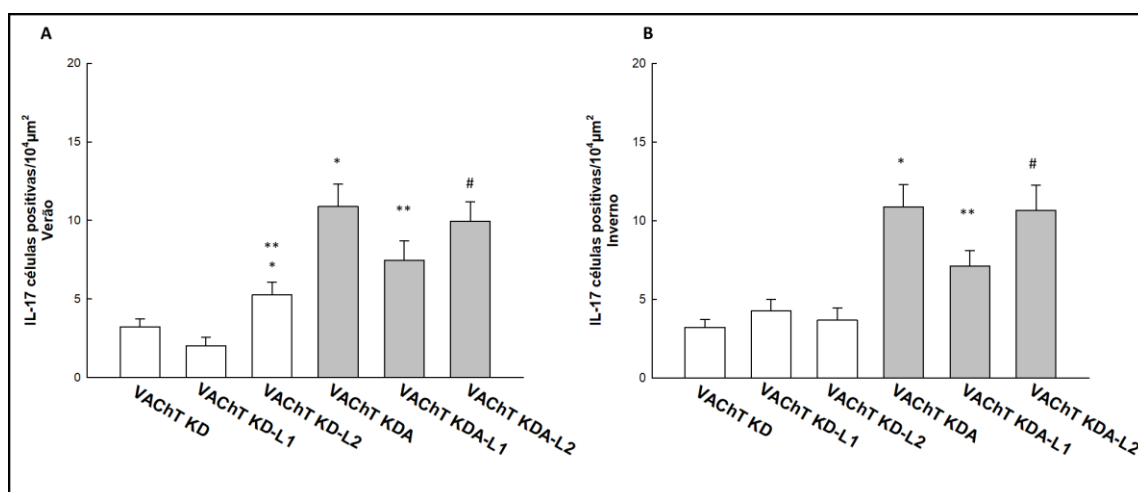


Figura 22- IL-17: Knockdown (KD) X Knockdown + inflamação crônica pulmonar (KDA). *diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); **diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$).

Demonstramos na Tabela 5 os marcadores citados anteriormente.

Tabela 5. Marcadores Inflamatórios.

Verão	VChT KD	VChTKD-L1	VChTKD-L2	VChT KDA	VChT KDA-L1	VChTKDA-L2
Eosinófilos (células/10 ⁴ µm ²)	0,8 ± 0,06	2,0 ± 0,1^{*,#}	1,2 ± 0,09[*]	1,5 ± 0,03[*]	2,7 ± 0,1^{**,§}	3,4 ± 0,1^{#,§,&}
NF-kappaB (células/10 ⁴ µm ²)	9,5 ± 0,9	6,4 ± 0,8	7,4 ± 1,1	15,5 ± 1,6[*]	13,3 ± 1,4^{**}	16,6 ± 1,6[#]
TNF-α (células/10 ⁴ µm ²)	3,7 ± 0,6	2,9 ± 0,6	4,7 ± 0,8	12,8 ± 1,0[*]	10,08 ± 1,4^{**}	8,8 ± 1,1[#]
IL-4 (células/10 ⁴ µm ²)	2,6 ± 0,4	2,0 ± 0,5	4,8 ± 0,9^{*,**}	8,4 ± 1,0[*]	10,36 ± 1,5^{**}	11,6 ± 2,0[#]
IL-5 (células/10 ⁴ µm ²)	3,2 ± 3,8	6,3 ± 0,8^{*,#}	4,03 ± 0,4	4,6 ± 5,3[*]	8,05 ± 0,7^{**,§}	9,8 ± 7,1^{#,§}
IL-13 (células/10 ⁴ µm ²)	2,9 ± 0,3	3,4 ± 0,4	3,3 ± 0,4	3,9 ± 0,5[*]	5,6 ± 0,5^{**,§}	7,9 ± 0,7^{#,§}
IL-17 (células/10 ⁴ µm ²)	3,2 ± 0,4	2,0 ± 0,5	5,2 ± 0,8^{*,**}	10,8 ± 1,4[*]	7,4 ± 1,2^{**}	9,9 ± 1,2[#]
Inverno	VChT KD	VChT KD-Local1	VChT KD-Local2	VChT KDA	VChT KDA-Local1	VChTKDA-Local2
Eosinófilos (células/10 ⁴ µm ²)	0,8 ± 0,07	1,9 ± 0,07^{*,#}	1,2 ± 0,05[*]	1,4 ± 0,03[*]	2,7 ± 0,09^{**,§}	3,5 ± 0,1^{#,§,&}
NF-kappaB (células/10 ⁴ µm ²)	8,9 ± 1,0	16,3 ± 1,7^{*,#}	8,9 ± 1,2	14,9 ± 1,7[*]	21,0 ± 1,4^{**,§,†}	15,0 ± 1,5[#]
TNF-α (células/10 ⁴ µm ²)	3,9 ± 0,7	7,2 ± 1,0^{*,#}	2,2 ± 0,5	12,3 ± 1,1[*]	14,0 ± 1,1^{**}	11,2 ± 1,2[#]
IL-4 (células/10 ⁴ µm ²)	2,6 ± 0,5	6,0 ± 0,8^{*,#}	3,4 ± 0,6	8,0 ± 1,2[*]	7,6 ± 1,4	12,6 ± 1,3^{#,§,&}
IL-5 (células/10 ⁴ µm ²)	3,2 ± 0,3	5,9 ± 5,7^{*,#}	3,2 ± 3,9	4,8 ± 0,6[*]	7,9 ± 0,6^{**,§}	7,5 ± 0,7^{#,§}
IL-13 (células/10 ⁴ µm ²)	2,6 ± 0,3	3,7 ± 0,4	2,7 ± 0,4	3,7 ± 0,5[*]	10,8 ± 0,8^{**,§,†}	5,9 ± 0,5^{§,†}
IL-17 (células/10 ⁴ µm ²)	3,1 ± 0,5	4,2 ± 0,7	3,6 ± 0,7	10,6 ± 1,3[*]	7,1 ± 0,9^{**}	10,6 ± 1,5[#]

Legenda: *diferente comparativamente ao grupo VChT KD (p<0,05); **diferente comparativamente ao grupo VChT KD-L1 (p<0,05); #diferente comparativamente ao grupo VChT KD-L2 (p<0,05); §diferente comparativamente ao grupo VChT KDA (p<0,05); &diferente comparativamente ao grupo VChT KDA-L1 (p<0,05); †diferente comparativamente ao grupo VChT KDA-L2 (p<0,05).

5.2.3. Estresse Oxidativo

5.2.3.1. Avaliação do NO Exalado (NOex)

A Figura 23 demonstra a avaliação do NO exalado. Na Figura 23A (verão) e Figura 23B (inverno) demonstra a análise de animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) com animais VACHT *Knockdown*+inflamação crônica pulmonar (VACHT KDA).

Na Figura 23A e Figura 23B, quando comparados os grupos VACHT KDA, VACHT KDA-Local1 e VACHT KDA-Local2 não apresentaram diferenças entre eles. Quando comparados entre pares VACHT KD e VACHT KDA não houve diferenças tanto no verão quanto no inverno.

No verão houve aumento no grupo VACHT KDA Local-1 quando comparado ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$). No inverno, o grupo VACHT KDA Local-1 apresentou aumento do NO exalado comparado ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$), o grupo VACHT KDA Local-2 também apresentou aumento do óxido nítrico exalado comparativamente ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$).

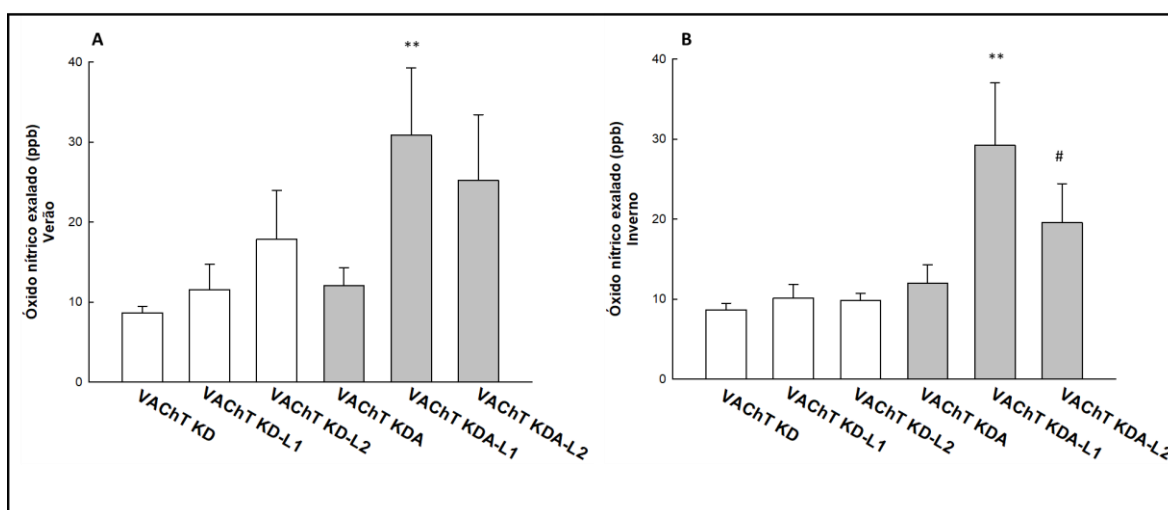


Figura 23 - Estresse Oxidativo: *Knockdown* (VACHT KD) X *Knockdown* + inflamação crônica pulmonar (VACHT KDA). **diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$).

5.2.3.2. Avaliação do Número de Células de iNOS positivas na parede brônquica

A Figura 24 demonstra a expressão de iNOS nas estações verão (A) e inverno (B) na análise de animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) comparativamente a animais VACHT *Knockdown* com inflamação pulmonar alérgica crônica (VACHT KDA).

Houve um aumento do número de células positivas de iNOS no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$).

Como demonstrado na Figura 24, em ambas as estações do ano houve um aumento do número de células positivas de iNOS no grupo VACHT KDA Local-1 em relação ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$), e aumento de iNOS no grupo VACHT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$).

No verão o grupo VACHT KDA Local-1 apresentou aumento do número de células positivas de iNOS comparado ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$).

Quando comparados os grupos VACHT KD, VACHT KD Local-1 e VACHT KD Local-2 não observamos diferenças significativas entre eles, no verão e no inverno.

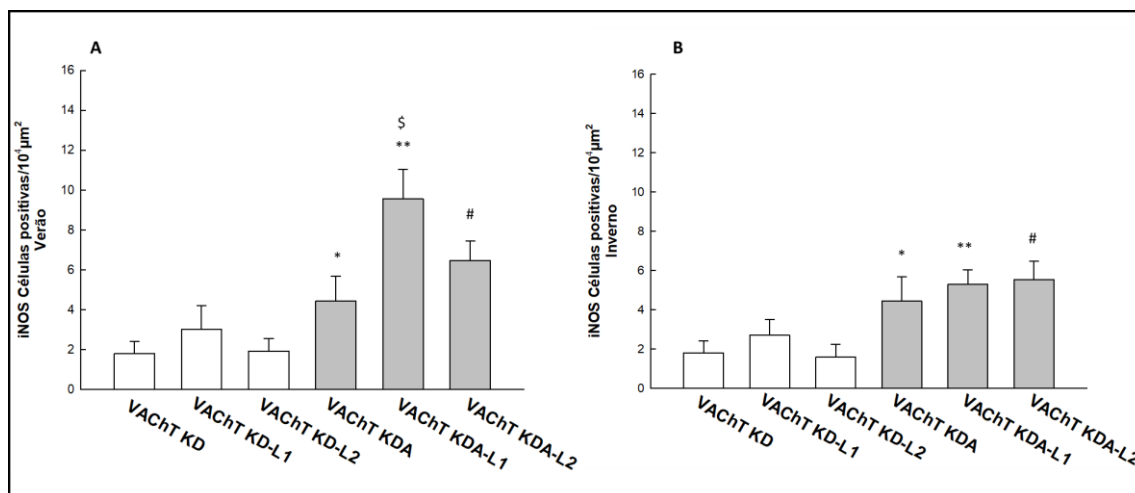


Figura 24 - Estresse Oxidativo: *Knockdown* (VACHT KD) X *Knockdown* + inflamação crônica pulmonar (VACHT KDA). *diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); **diferente

comparativamente ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$), §diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$).

5.2.3.3. Avaliação do Conteúdo de 15F2t-isoprostano na parede brônquica

A Figura 25 demonstra o conteúdo de 15F2t-isoprostano nas estações verão (A) e inverno (B) na análise de animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) comparativamente a animais VACHT *Knockdown* com inflamação pulmonar alérgica crônica (VACHT KDA).

Houve um aumento do conteúdo de 15F2t-isoprostano no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$).

No inverno houve aumento do conteúdo de 15F2t-isoprostano no grupo VACHT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$). Houve aumento do conteúdo de 15F2t-isoprostano no grupo VACHT KD Local-1 e grupo VACHT KD Local-2 em relação ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$), e aumento do conteúdo de 15F2t-isoprostano no grupos VACHT KD Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$).

No inverno houve aumento do conteúdo de 15F2t-isoprostano no grupo VACHT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KDA e VACHT KDA Local-1 ($p < 0,05$).

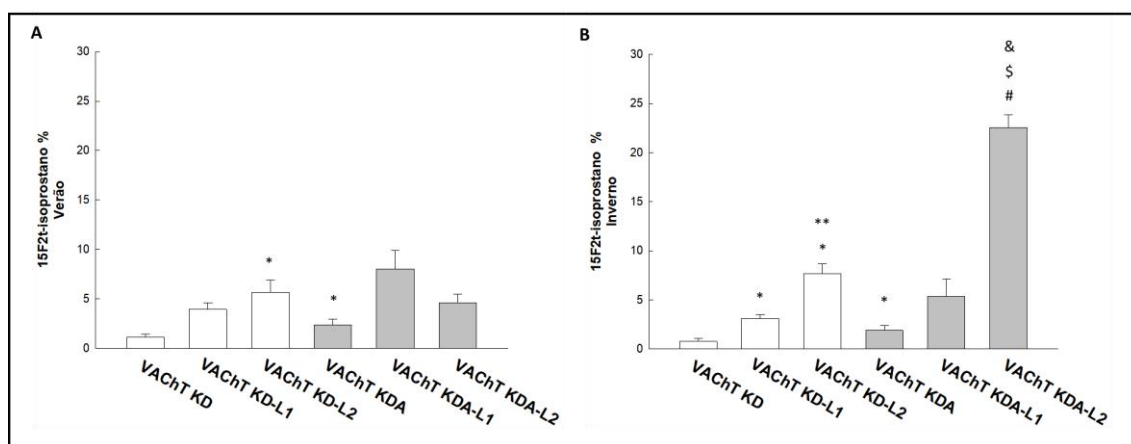


Figura 25- Conteúdo de 15F2t-isoprostano: Knockdown (VACHT KD) X Knockdown + inflamação crônica pulmonar (VACHT KDA), verão (A) e inverno (B). *diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); **diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$); \$diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$), &diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA-L1 ($p < 0,05$).

5.2.4. Remodelamento

5.2.4.1. Avaliação do Número de Células de MMP-9 positivas na parede brônquica

A Figura 26 demonstra o número de células positivas de MMP-9 nas estações verão (A) e inverno (B) na análise de animais VChT *Knockdown* (VChT KD) comparativamente a animais VChT *Knockdown* com inflamação pulmonar alérgica crônica (VChT KDA).

Houve um aumento do número de células positivas de MMP-9 no grupo VChT KDA comparativamente ao grupo VChT KD ($p < 0,05$).

No verão houve um aumento do número de células positivas de MMP-9 no grupo VChT KDA Local-1 em relação ao grupo VChT KD Local-1 ($p < 0,05$), houve também aumento do grupo VChT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VChT KD Local-2 ($p < 0,05$). No inverno houve aumento do número de células positivas de MMP-9 no grupo VChT KDA Local-2 em relação ao grupo VChT KD Local-2 ($p < 0,05$).

No verão quando comparados os grupos VChT KD, VChT KD Local-1 e VChT KD Local-2 não observamos diferenças significativas entre eles, porém no inverno houve aumento do número de células positivas de MMP-9 no grupo VChT KD Local-1 em relação aos grupos VChT KD ($p < 0,05$) e ao grupo VChT KD Local-2 ($p < 0,05$).

No verão houve aumento do número de células positivas de MMP-9 no grupo VChT KDA e VChT KDA Local-1 comparativamente ao grupo VChT KDA Local-2 ($p < 0,05$). No inverno houve aumento do número de células positivas de MMP-9 no grupo VChT KDA Local-2 comparativamente aos grupos VChT KDA ($p < 0,05$) e ao grupo VChT KDA Local-1 ($p < 0,05$).

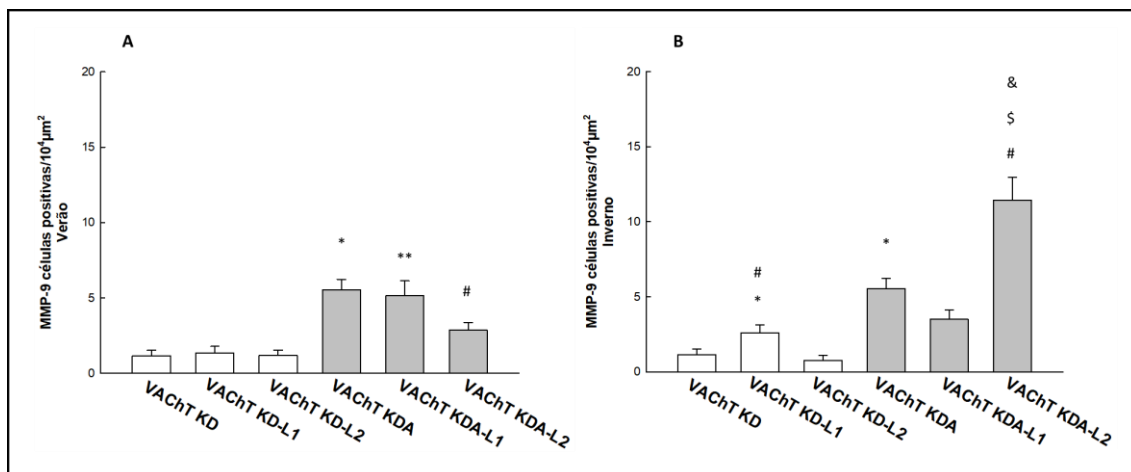


Figura 26 – MMP-9: Knockdown (VACHT KD) X Knockdown + inflamação crônica pulmonar (VACHT KDA). *diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); **diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$); \$diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$); &diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA-LOCAL2 ($p < 0,05$); +diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA-LOCAL1 ($p < 0,05$).

5.2.4.2. Avaliação do Número de Células de TIMP-1 positivas na parede brônquica

A Figura 27 demonstra o número de células positivas de TIMP-1 nas estações verão (A) e inverno (B) na análise de animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) comparativamente a animais VACHT *Knockdown* com inflamação pulmonar alérgica crônica (VACHT KDA).

Houve um aumento do número de células positivas de TIMP-1 no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$).

No verão houve um aumento do número de células positivas de TIMP-1 no grupo VACHT KDA Local-1 em relação ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$), houve também aumento do grupo VACHT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$). No inverno houve aumento do número de células positivas de TIMP-1 no grupo VACHT KDA Local-2 em relação ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$).

No verão quando comparados os grupos VACHT KD, VACHT KD Local-1 e VACHT KD Local-2 não observamos diferenças significativas entre eles, porém no inverno houve aumento do número de células positivas de TIMP-1 no grupo VACHT KD Local-1 em relação aos grupos VACHT KD e VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$).

Quando comparados os grupos VACHT KDA, VACHT KDA Local-1 e VACHT KDA Local-2 não observamos diferenças significativas entre eles, no verão e no inverno.

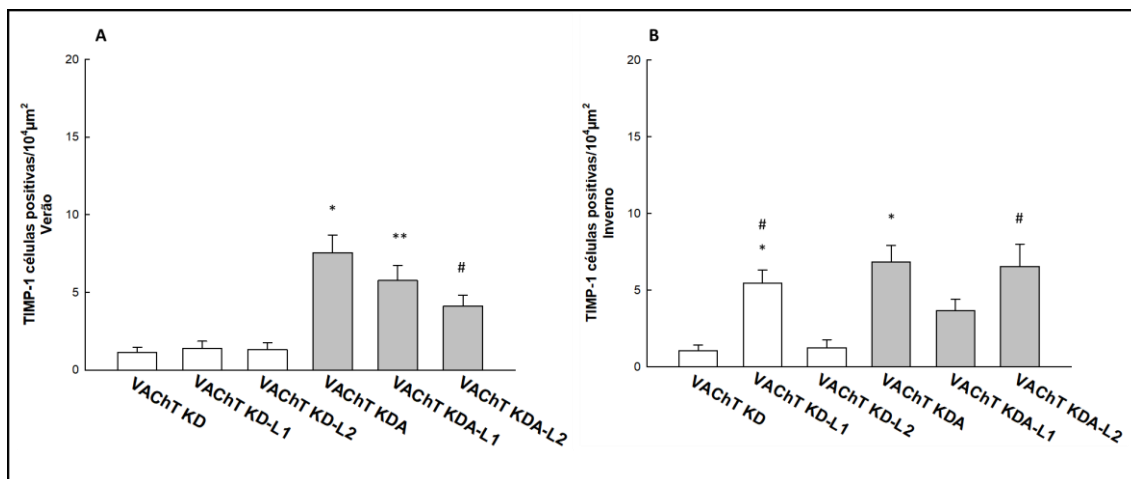


Figura 27 – TIMP-1: Knockdown (VAcHT KD) X Knockdown + inflamação crônica pulmonar (VAcHT KDA). *diferente comparativamente ao grupo VAcHT KD ($p < 0,05$); **diferente comparativamente ao grupo VAcHT KD-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VAcHT KD-L2 ($p < 0,05$).

5.2.4.3. Avaliação do Número de Células de TGF- β positivas na parede brônquica

A Figura 28 demonstra a expressão de TGF- β nas estações verão (A) e inverno (B) na análise de animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) comparativamente a animais VACHT *Knockdown* com inflamação pulmonar alérgica crônica (VACHT KDA).

Houve um aumento do número de células positivas de TGF- β no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$).

No verão e inverno houve um aumento do número de células positivas de TGF- β no grupo VACHT KDA Local-1 em relação ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$), houve também aumento do grupo VACHT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$).

Quando comparados os grupos VACHT KD, VACHT KD Local-1 e VACHT KD Local-2 não observamos diferenças significativas entre eles, no verão e no inverno.

Quando comparados os grupos VACHT KDA, VACHT KDA Local-1 e VACHT KDA Local-2 não observamos diferenças significativas entre eles, no verão e no inverno.

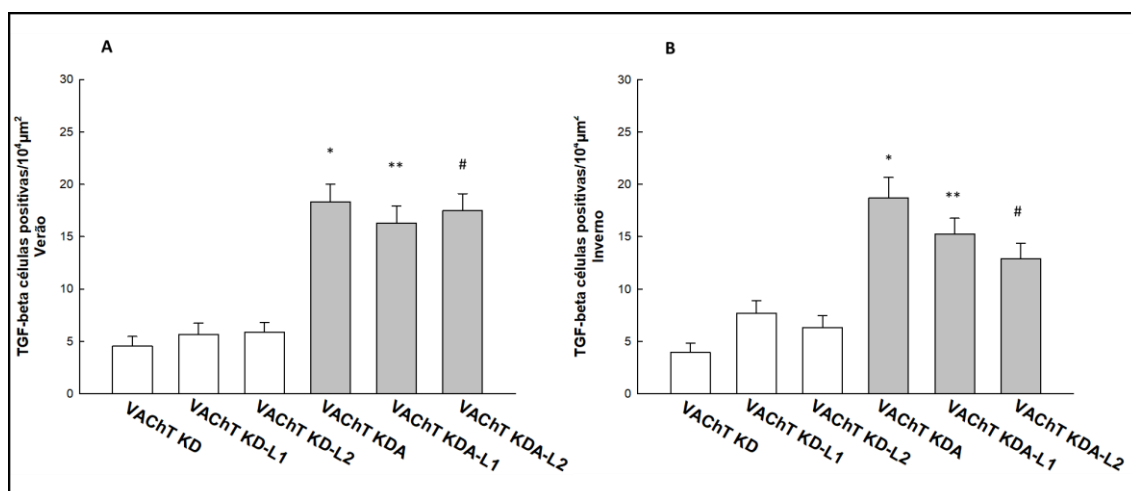


Figura 28 - TGF β : Knockdown (VACHT KD) X Knockdown + inflamação crônica pulmonar (VACHT KDA). *diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); **diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$).

5.2.4.4. Avaliação do conteúdo de fibras colágenas na parede brônquica

A Figura 29 demonstra o conteúdo de fibras colágenas nas estações verão (A) e inverno (B) na análise de animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) comparativamente a animais VACHT *Knockdown* com inflamação pulmonar alérgica crônica (VACHT KDA).

Houve um aumento do conteúdo de fibras colágenas no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$).

No verão houve um aumento do conteúdo de fibras colágenas no grupo VACHT KD Local-2 em relação ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$) e ao grupo VACHT KD Local-1 ($p < 0,05$), no inverno não houve diferenças entre os grupos VACHT KD, VACHT KD Local-1 e VACHT KD Local-2.

No verão houve aumento no conteúdo de fibras colágenas no grupo VACHT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KDA e VACHT KDA Local-1 ($p < 0,05$). No inverno houve aumento da expressão de fibras colágenas no grupo VACHT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$).

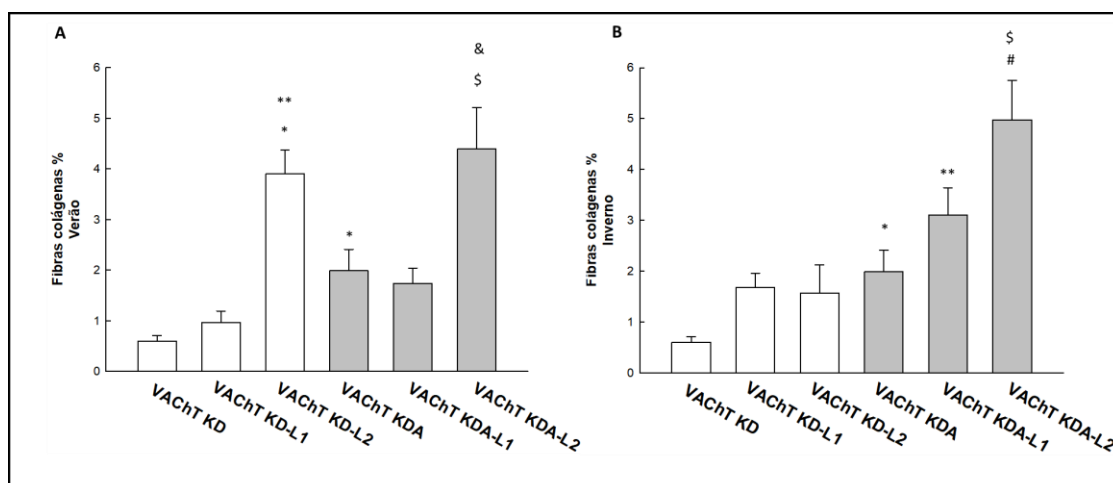


Figura 29 – Fibras colágenas: Knockdown (VACHT KD) X Knockdown + inflamação crônica pulmonar (VACHT KDA). *diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); **diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$), \$diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$), &diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA-L1 ($p < 0,05$).

A Tabela 6 demonstra os resultados das análises dos marcadores de remodelamento.

Tabela 6. Resultados das Análises dos Marcadores de Remodelamento.

Remodelamento						
Verão	VChT KD	VChTKD-L1	VChTKD-L2	VChT KDA	VChTKDA-L1	VChTKDA-L2
MMP-9 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	1,1±0,3	1,3±0,4	1,1±0,3	5,5±0,6*	5,1±0,9**	2,8±0,5 [#]
TIMP-1 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	1,1±0,3	1,3±0,4	1,3±0,4	7,5±1,1*	5,7±0,9**	4,1±0,7 [#]
TGFβ (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	4,5±0,9	5,6±1,0	5,8±0,9	18,2±1,7*	16,2±1,6**	17,4±1,6 [#]
Fibras Colágenas (%)	0,5±0,1	0,9±0,2	3,9±0,4***	1,9±0,4*	1,7±0,3**	4,3±0,8 ^{§, &}
Inverno	VChT KD	VChTKD-L1	VChTKD-L2	VChT KDA	VChTKDA-L1	VChTKDA-L2
MMP-9 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	1,0±0,3	2,6±0,5* [#]	0,7±0,3	5,4±0,7*	3,5±0,6	11,4±1,5 ^{#, §, &}
TIMP-1 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	1,0±0,3	5,4±0,8* [#]	1,2±0,5	6,8±1,0*	3,6±0,7	6,5±1,4 [#]
TGFβ (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	3,9 ± 0,8	7,6±1,2	6,3±1,1	18,6±1,9*	15,2±1,4**	12,9±1,4 [#]
Fibras Colágenas (%)	0,6±0,1	1,6±0,2	1,5±0,5	2,2±0,4*	3,1±0,5**	4,9±0,7 ^{§, #}

Legenda: *diferente comparativamente ao grupo VChT KD ($p<0,05$); **diferente comparativamente ao grupo VChT KD-L1 ($p<0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VChT KD-L2 ($p<0,05$); §diferente comparativamente ao grupo VChT KDA ($p<0,05$); &diferente comparativamente ao grupo VChT KDA-L1 ($p<0,05$); +diferente comparativamente ao grupo VChT KDA-L2 ($p<0,05$).

5.2.5. Avaliação da expressão de $\alpha 7$ nAChR nas paredes brônquica

A Figura 30 demonstra a expressão de $\alpha 7$ AChR nas estações verão e inverno na análise de animais VACHT *Knockdown* (VACHT KD) comparativamente a animais VACHT *Knockdown* com inflamação pulmonar alérgica crônica (VACHT KDA).

Houve um aumento da expressão de $\alpha 7$ AChR no grupo VACHT KDA comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$).

Em ambas as estações houve um aumento na expressão de $\alpha 7$ AChR no grupo VACHT KD Local-1 em relação ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$) e aumento na expressão de $\alpha 7$ AChR VACHT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KD Local-2 ($p < 0,05$).

No verão houve aumento da expressão de $\alpha 7$ no grupo VACHT KDA Local-1 comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$) e ao grupo VACHT KDA Local-2 ($p < 0,05$). No inverno houve aumento da expressão de $\alpha 7$ no grupo VACHT KDA Local-1 comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$). E houve aumento da expressão de $\alpha 7$ no grupo VACHT KDA Local-2 comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$).

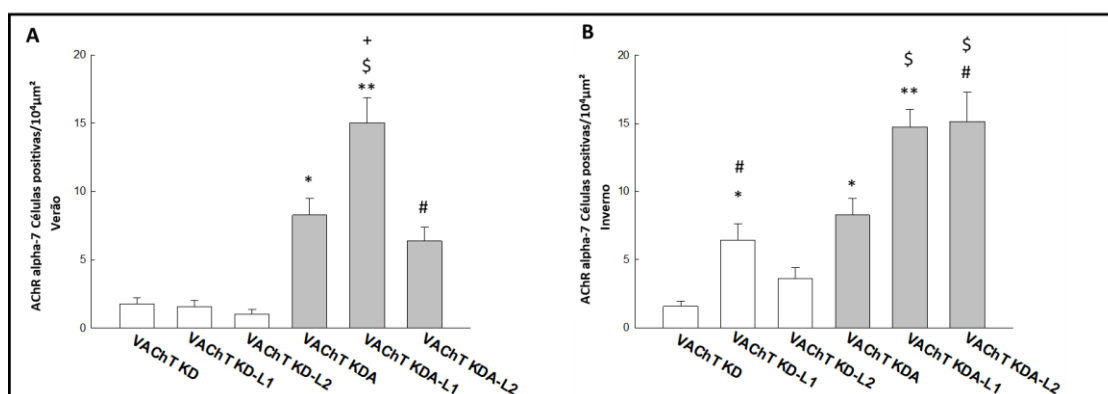


Figura 30 – Alpha7: **A (verão)-B (inverno)** Animais knockdown (VACHT KD) X Knockdown +inflamação crônica pulmonar (VACHT KDA). *diferente comparativamente ao grupo VACHT KD ($p < 0,05$); **diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L1 ($p < 0,05$); #diferente comparativamente ao grupo VACHT KD-L2 ($p < 0,05$), \$diferente comparativamente ao grupo VACHT KDA ($p < 0,05$).

5.2.7. Fotomiografias

Na página a seguir encontra-se o painel de fotomiografias com algumas vias aéreas analisadas no verão (Figura 31) e no inverno (Figura 32).

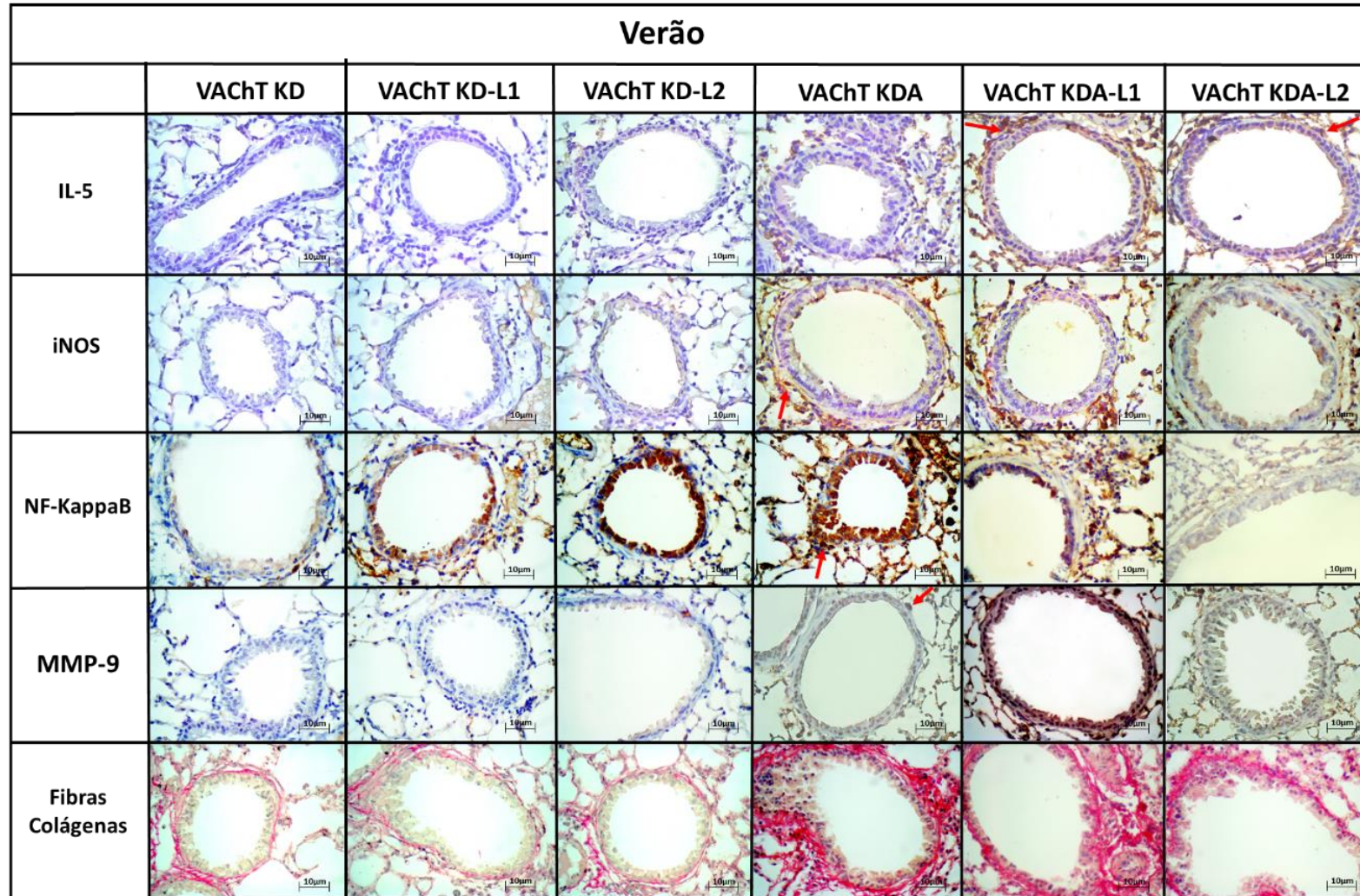


Figura 31. Fotomicrografias de vias aéreas do experimento realizado no verão. Seta vermelha exemplifica células positivas.

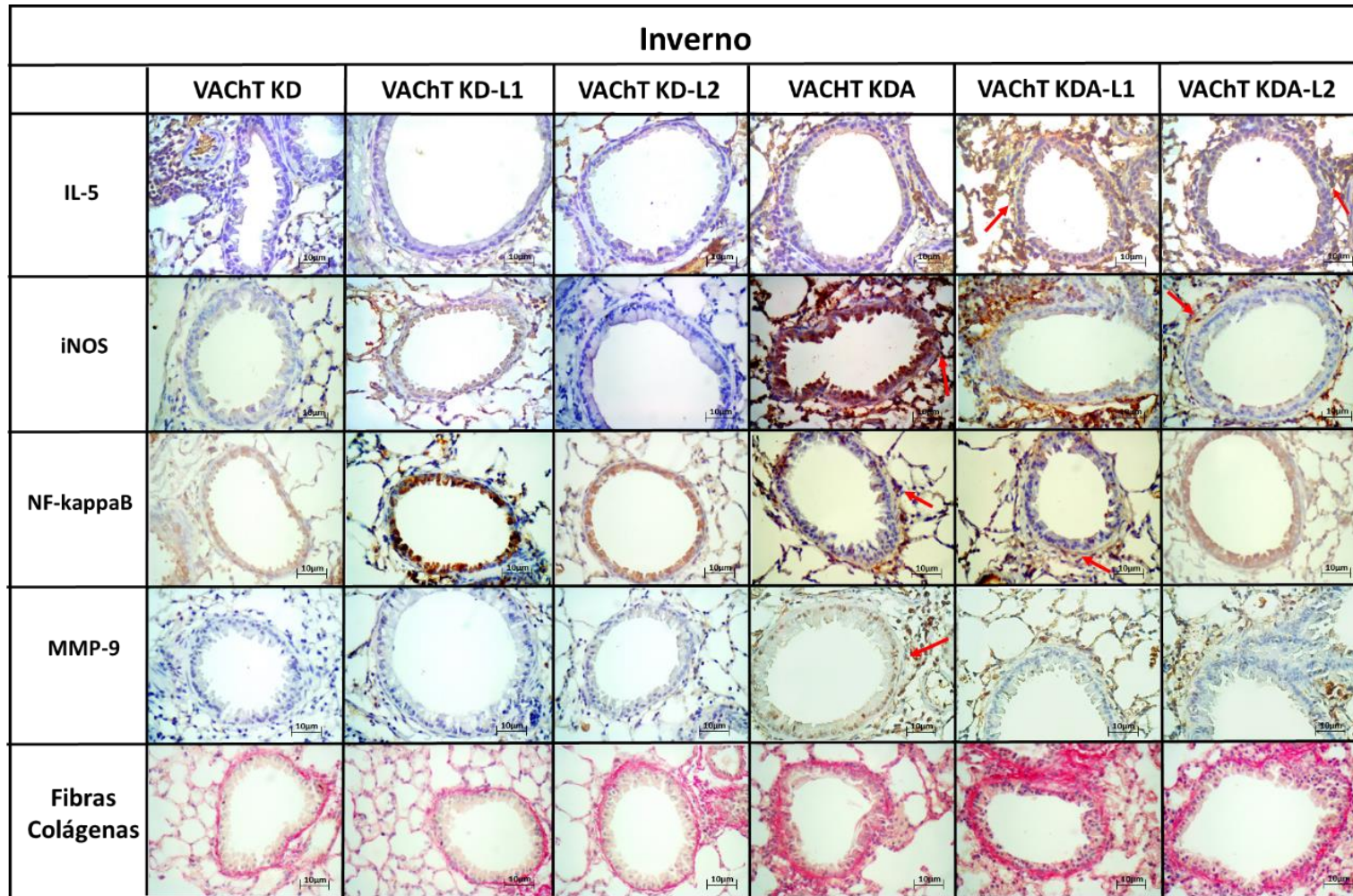


Figura 32. Fotomicrografias de vias aéreas do experimento realizado no inverno. Seta vermelha exemplifica células positivas.

A seguir, uma imagem ilustrando um resumo dos resultados encontrados neste trabalho.

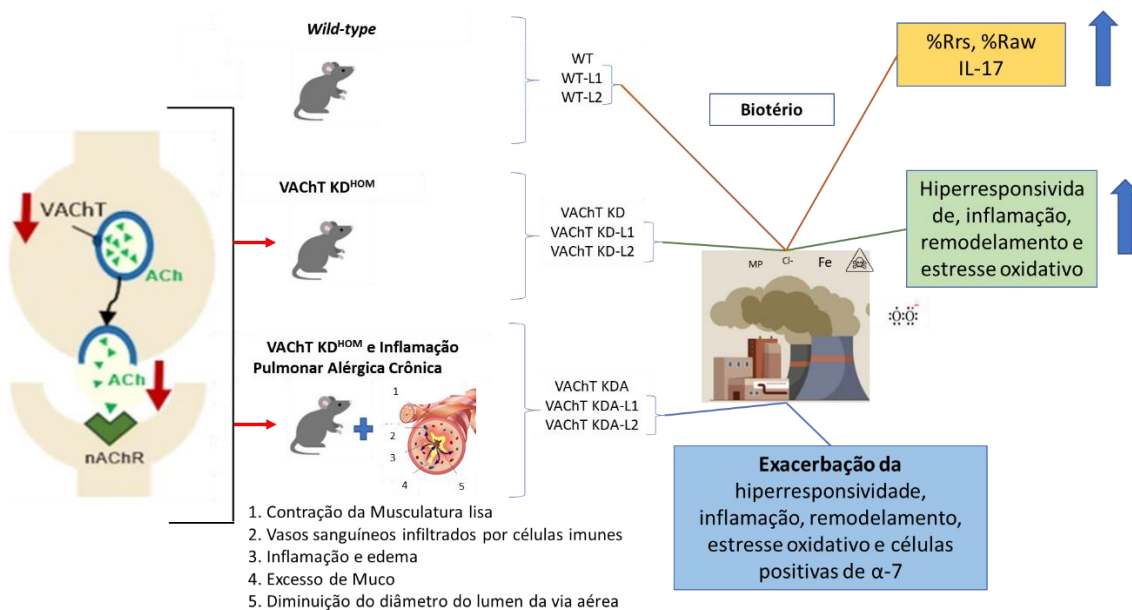


Figura 33. Resumo dos resultados encontrados. A poluição advinda do pó de ferro em animais saudáveis foi capaz de gerar piora na mecânica respiratória como %Rrs, %Raw e IL-17, em animais com diminuição de VAcHT a poluição advinda de pó de ferro gerou aumento de hiperresponsividade, marcadores inflamatórios, remodelamento e estresse oxidativo. Quando a diminuição de VAcHT foi associada a inflamação pulmonar alérgica crônica houve uma potencialização nas respostas de hiperresponsividade, inflamação, remodelamento, estresse oxidativo e células positivas de α -7.

5.3. Resultados parciais do material particulado

Segundo resultados da análise e caracterização do particulado realizados sob responsabilidade da Professora Christine Bourotte (Cidade Universitária, São Paulo - SP), a fração grossa apresenta cerca de 80% do MP₁₀. Para ambos os locais de coleta e em todos os períodos, as concentrações médias de MP grosso foram maiores do que as concentrações de MP fino. A concentração média da empresa mineradora foi maior do que a do hotel durante os meses de verão e inverno.

Na análise realizada, os elementos que mais chamaram a atenção foram cloreto (Cl), ferro e enxofre (S). No inverno, o Local 2 teve concentrações de cloro mais altas do que na empresa mineradora (Local1) tanto no material grosso quanto no fino (Figura 34).

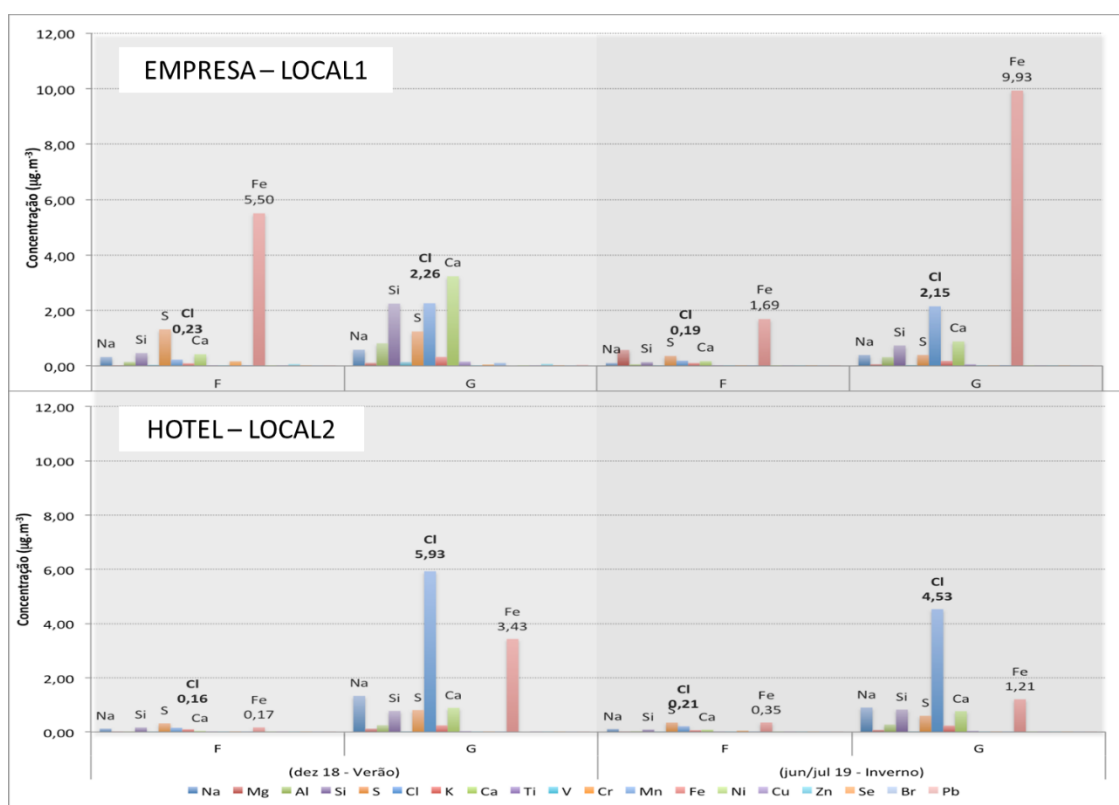


Figura 34 – Análise do material particulado. F: material particulado fino; G: material particulado grosso. Dados parciais cedidos pela professora Christine Bourotte.

6. DISCUSSÃO

Observamos no experimento 1 que houve aumento de células positivas para marcadores NF-kappaB, IL-5 e IL-13 em animais com diminuição de VAcHT em relação aos animais selvagens. Comparando animais com deficiência de VAcHT e tipo selvagem, verificamos que os animais geneticamente modificados apresentaram diminuição de α -7 em relação aos animais WT.

Estudo de Santana et al. (2019) corrobora com nossos achados em relação ao aumento de IL-13 em animais KD em comparação com animais selvagens. Pesquisadores sugerem que a deficiência colinérgica torna os animais mais vulneráveis a alterações respiratórias, camundongos VAcHT-KD apresentaram alterações pulmonares mais intensas do que animais WT (199).

Observamos no experimento 2, aumento de células positivas para alfa-7 em animais com inflamação pulmonar alérgica crônica e diminuição de VAcHT e quando expostos à poluição por pó de ferro, esse aumento foi acentuado. Pinheiro et al. (2021), investigaram mudanças nos níveis de expressão dos receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina (nAChR e mAChR) no pulmão durante lesão pulmonar aguda indicam que α 7 nAChR contribui para os efeitos anti-inflamatórios do sistema colinérgico pulmonar. O aumento de α 7 nAChR pulmonar em resposta à inflamação aguda pode resultar da regulação positiva da expressão de α 7 nAChR em células pulmonares ou pelo recrutamento de células imunes que expressam α 7 nAChR de alto nível para o pulmão. Eles sugerem que os animais com deficiência colinérgica de longo prazo não poderiam aumentar os níveis de receptores nicotínicos para neutralizar a inflamação pulmonar, como ocorreu no WT. No trabalho desses pesquisadores, o estímulo farmacológico ao receptor nicotínico pelo PNU (agonista seletivo do receptor nicotínico α 7), que reduziu a inflamação pulmonar em camundongos com deficiência colinérgica, induziu um aumento dos receptores nicotínicos α 7. A falta de ACh disponível para os receptores α 7 nAChR pode modular a inflamação pulmonar devido à inibição da via anti-inflamatória colinérgica (200).

Observamos na avaliação da mecânica respiratória que no verão os animais com atenuação VAcHT expostos ao Local 1 (dentro da mineradora)

apresentaram um aumento de %Rrs quando comparados aos animais expostos ao Local 2, enquanto os animais expostos ao Local 2 apresentaram aumento de %Ers e %Htis quando comparados aos animais que permaneceram no biotério. Com relação aos dados de mecânica respiratória, não houve diferenças entre os grupos no inverno.

Em relação aos animais geneticamente modificados com inflamação pulmonar alérgica crônica, observou-se que houve aumento de %Rrs e %Raw em relação aos animais VACHT KD. No verão não houve diferenças entre esses animais expostos ao Local 1 e Local 2 e no inverno houve aumento de %Ers e %Htis nos animais expostos ao Local1 em relação aos animais que permaneceram no biotério. O aumento da resistência pulmonar provavelmente se deve às alterações pulmonares geradas pela asma, como o remodelamento, autores observaram resultado semelhante em estudo com camundongos Balb-c com inflamação alérgica pulmonar crônica (197).

Com relação à avaliação dos marcadores inflamatórios, observamos que no verão houve aumento de células positivas de IL5 nos animais com atenuação VACHT expostos ao Local 1 em relação aos animais que permaneceram no biotério, também observamos que os animais que permaneceram no Local 2 apresentaram aumento de IL-4 e IL-17 em relação aos animais que permaneceram no biotério e dentro da mineradora. No inverno, observamos um aumento de células positivas para NFKappa-B, TNF- α , IL-4 e IL-5 nos animais expostos ao Local 1 em comparação aos animais expostos ao biotério e ao Local 2. Um estudo anterior avaliou septos alveolares de animais com expressão atenuada de VACHT submetidos à exposição a partículas de exaustão de diesel (DEP) e observou aumento de células positivas para IL-4 e IL-13 (199). A exposição ao PM pode afetar muitos tipos de células em diferentes níveis de regulação imunológica (201). Estudo sugere que poluentes inaláveis ativam a resposta imune inata com ativação aumentada de células dendríticas, inflamação pulmonar e resposta imune Th2 (202). PM pode induzir respostas inflamatórias Th1/Th2/Th17 (201). Estudos sugerem que a sinalização da acetilcolina polariza as células dendríticas em direção a um perfil de célula Th2 (201). A incubação de células dendríticas com acetilcolina estimulou a produção

de quimiocinas que recrutam células Th2 para locais de inflamação alérgica (203).

Os achados de IL-17 em relação ao Local 2 em animais WT podem ser decorrentes da presença de cloro neste local, corroborando com o estudo de Genaro et. al. (2021) (204).

Nos animais VACHT KD com inflamação pulmonar alérgica crônica observamos aumento de todos os marcadores inflamatórios avaliados neste trabalho (NFKappa-B, TNF- α , IL4, IL-5, IL-13 e IL-17) quando comparados aos animais VACHT KD. Esses resultados são semelhantes aos encontrados na literatura em animais com inflamação pulmonar alérgica crônica sem atenuação do VACHT (87,197,205).

No verão, houve aumento de IL5 e IL-13 em animais com inflamação pulmonar alérgica crônica e atenuação de VACHT expostos a ambos os locais em comparação com animais VACHT KDA sem exposição à poluição. Esse aumento foi maior de IL-13 no grupo VACHT KDA exposto ao local 2 em comparação ao exposto ao Local 1. No inverno, houve aumento de NFKappaB, IL-13 e IL-17 no grupo VACHT KDA-L1 em comparação aos animais VACHT KDA, aumento de IL-4, IL-5 e IL-13 no grupo VACHT KDA-L2 em comparação com o grupo VACHT KDA. Desses animais, houve aumento de NF-Kappa B e IL-13 no grupo exposto ao Local 1 em relação ao grupo exposto ao Local 2 e aumento de IL-4 no grupo exposto ao Local 2 em relação ao grupo exposto ao Local 1.

A potencialização da inflamação observada em alguns marcadores inflamatórios como (eosinófilos, IL-4, IL-5, IL-13) em animais geneticamente modificados com inflamação pulmonar alérgica crônica expostos ao Local 2 em comparação com animais com inflamação pulmonar alérgica crônica que permaneceram em no biotério pode ser justificada devido à alta presença de cloro neste local, corroborando com achados de Genaro et.al. (2018) (205).

A poluição do ar pode aumentar as respostas imunes adaptativas dos linfócitos Th2 e Th17, como visto na alergia e na asma (206). Sobre os efeitos

clínicos da poluição do ar, sabe-se que a poluição ambiental elevada está associada a exacerbações da asma (206).

Os constituintes da poluição estimulam as células através de uma variedade de mecanismos de detecção celular, incluindo receptores *Toll-Like* (TLRs), vias de detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e vias de detecção de hidrocarbonetos poli aromáticos (PAH). Estes, por sua vez, ativam cascatas de sinalização intracelular pró-inflamatória, como a via NFkB e MAPK(206). Autores reforçam que a composição do PM ambiental varia tanto geograficamente quanto temporalmente, sendo dependente da mistura de fontes em qualquer local em um determinado momento (206), então acreditamos que devido a alguma diferença no PM do Local 2 houve um aumento de IL-5 no verão e de IL-4 no inverno.

Há também evidências de que espécies reativas de oxigênio podem afetar diretamente os canais celulares de cálcio e, assim, perturbar a sinalização iônica intracelular(207). O Ca^{2+} intracelular é um importante sistema de sinalização de segundo mensageiro e, por exemplo, pode afetar a via NFkB, bem como a contração do músculo liso das vias aéreas. PM pode ser uma fonte de tal Ca^{2+} elevado nas vias aéreas, particularmente considerando as concentrações frequentemente altas dentro de PM (206).

Gour et al. (2018) determinaram que a inalação de PM urbano da cidade de Nova York e de Baltimore poderia estimular inflamação Th2 e Th17 nas vias aéreas de camundongos, com PM de Baltimore potencializando a inflamação das vias aéreas e hiperresponsividade(208). Essa inflamação foi concomitante com hiperresponsividade das vias aéreas, infiltrado inflamatório e liberação de citocinas (IL-5, IL-13, IFN γ e IL-17A), enquanto particulados de referência como fumo, DEP e cinzas volantes de carvão não foram capazes gerar tal inflamação resultados. Descobertas como essas enfatizam a importância de utilizar o PM urbano do mundo real ao investigar os efeitos adversos da poluição do ar à saúde, ao mesmo tempo em que demonstra que as modificações atmosféricas podem tornar o PM mais tóxico (206).

Estudos sugerem que a sinalização da acetilcolina polariza as células dendríticas em direção a um perfil de células Th2. A incubação de células dendríticas com produção estimulada por acetilcolina de quimiocinas recrutam células Th2 para locais de inflamação alérgica (203). Estudo *in vivo* mostrou que a exposição ao PM2.5 agravou os sintomas em ratos com rinite alérgica, baixou a expressão de IFN- γ , enquanto aumentou a expressão de IL-4, IL-13 e o número de eosinófilos no fluido de lavagem nasal (209).

Estudos *in vitro* e em modelos animais indicam que essas alterações são mediadas principalmente pelos receptores M3, que por sua vez são ativados pela acetilcolina. Dados *in vitro* mostraram que a sinalização a jusante dos receptores muscarínicos desencadeia a inibição do glicogênio sintase quinase (GSK)-3, que, em seu estado ativo, atua para reprimir a proliferação do músculo liso das vias aéreas. Isso sugere um possível mecanismo para o acúmulo de músculo liso no remodelamento das vias aéreas (210). A regulação cooperativa da produção de proteínas da matriz extracelular pelos receptores muscarínicos e TGF- β parece envolver os receptores M2 (211).

Observamos no verão que animais com expressão atenuada de VACHT e expostos ao Local 2 apresentaram aumento do conteúdo de fibras colágenas em relação aos animais VACHT KD expostos ao Local 1, e no inverno, animais com expressão atenuada de VACHT e expostos ao Local 1 apresentaram aumento de MMP-9 e TIMP-1 em comparação com animais VACHT KD expostos ao Local 2. Estudos demonstraram que a exposição à DEP induziu aumento de fibras colágenas nos septos alveolares em camundongos com expressão atenuada de VACHT e aumento da área de muco no epitélio das vias aéreas nestes animais, associado a um aumento das células secretoras epiteliais e redução das células epiteliais ciliadas, sugerindo que a diminuição da expressão de VACHT em animais expostos à DEP induz a remodelação epitelial pulmonar e das vias aéreas (199). Acreditamos que a exposição à poluição em animais com expressão VACHT atenuada pode gerar respostas relacionadas ao processo de remodelamento por meio de receptores nicotínicos.

Neste trabalho os animais do modelo de inflamação alérgica crônica e atenuação VACHT apresentaram aumento dos marcadores avaliados (MMP9,

Timp1, TGF β e fibras colágenas) em relação aos animais que não foram expostos à ovalbumina. Esses resultados para MMP-9, TIMP-1 e fibras colágenas são semelhantes aos encontrados por Pinheiro et. al. (2020) (212) Um modelo in vitro de fatias de pulmão de cobaias descobriu que a broncoconstrição induzida por metacolina leva à expressão de proteínas contráteis, como a miosina do músculo liso. Isso foi mediado pela liberação de TGF- β bioativo (213), considerado responsável por várias características de remodelamento das vias aéreas (214,215). A liberação de TGF- β bioativo em resposta à metacolina (216) corrobora esses achados. Evidências adicionais sugerem que são os efeitos mecânicos da broncoconstrição mediada pela acetilcolina que causam a remodelamento das vias aéreas (217,218). Estudos sugerem que os neurônios das vias aéreas não apenas participam das exacerbações agudas transitórias, mas a remodelação da arquitetura neuronal acompanha a hiperresponsividade persistente (219).

Observamos também que no grupo modelo de inflamação alérgica crônica com atenuação de VACHT exposto ao Local 2, houve aumento de MMP-9 no inverno e em ambas as estações houve aumento de MMP-9 e conteúdo de fibras colágenas nesses animais que estavam a 5 km da mineradora. Embora estudos tenham relatado que as concentrações de emissões de veículos automotores, como PM ultrafino, diminuam substancialmente dentro de 300 metros (220) e uma revisão de 2010 sugerisse que distâncias dentro de 300–500 metros de rodovias eram mais relevantes para os efeitos na saúde humana (221), observamos um efeito nos marcadores de remodelamento mesmo a 5km de distância da mineradora. Espécies reativas de oxigênio e estresse mecânico também foram implicados como fatores que induzem a proliferação de células ASM (222).

As condições meteorológicas têm um papel muito importante na dispersão ou acúmulo de poluentes (223). Liu e Johnson (2002) descrevem que a poluição do ar geralmente está associada a fatores como temperatura, umidade relativa, velocidade e direção do vento, entre outros (39). Por exemplo, a ocorrência de chuvas e o aumento da velocidade do vento dispersam e diluem os poluentes, reduzindo assim sua concentração (224). Portanto, as

concentrações de poluentes tendem a aumentar no inverno porque no verão chove mais do que no inverno.

Guarnieri et al. (2014) estudou sobre como a poluição do ar pode contribuir para o desenvolvimento e exacerbação da asma, identificando quatro mecanismos principais: stress e dano oxidativo, remodelamento das vias aéreas, vias inflamatórias e respostas imunitárias e aumento da respiração, sensibilização aos aeroalérgenos, sugere que os genes que regulam esses mecanismos podem conferir maior suscetibilidade ao desenvolvimento de asma ou exacerbações de doenças existentes com a exposição à poluição do ar (220).

Observou-se na avaliação do estresse oxidativo que os animais com atenuação VACHT expostos ao Local 1 (dentro da empresa mineradora) e Local2 (5 km longe da empresa) apresentaram aumento do conteúdo de 8-PGF-2 α quando comparados aos animais controles. Já os animais expostos ao Local 2 apresentaram aumento do conteúdo de 8-PGF-2 α quando comparados aos animais expostos ao Local1. Pesquisadores demonstraram que mesmo no pulmão saudável, o PM_{2,5} se correlacionou com o aumento dos parâmetros de estresse oxidativo e a presença de biomarcadores pró-inflamatórios (225). Acredita-se que a indução do estresse oxidativo pelo PM seja causada tanto pelos componentes de metais pesados quanto pelos compostos orgânicos do PM. Compostos orgânicos presentes no PM, ou formados pelo metabolismo celular do PM, podem doar elétrons para moléculas de O₂ para formar radicais livres superóxidos. Os metais de transição podem doar elétrons de forma semelhante para formar superóxido e peróxido de hidrogênio e podem esgotar diretamente os antioxidantes tiol endógenos (206).

Vários estudos determinam a ação citogenotóxica do PM (226,227) que, até agora, tem sido atribuída principalmente a componentes metálicos ligados ou adsorvidos em partículas, principalmente metais de transição, que são capazes de induzir a formação de ROS, como o ferro. Sabemos que os locais de exposição deste trabalho possuem grandes quantidades de ferro gerado pelo processo de peletização. Partículas de ferro estimulam a produção de hidroxorradicais por meio de reações de Haber-Weiss e Fenton, que levam ao estresse oxidativo no DNA, proteínas ou lipídios (226,228). ROS podem ser

gerados a partir da superfície de partículas onde hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) e nitro-PAH são absorvidos, exceto metais de transição (ferro, cobre, cromo e vanádio) que catalisam a reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\cdot + \text{H}_2\text{O}$) geram o radical hidroxila altamente reativo capaz de induzir danos oxidativos ao DNA (228).

Estudo de Seaton et al. (2005) demonstrou que a poeira na ferrovia subterrânea de Londres tinha potencial citotóxico e inflamatório em altas doses, consistente com sua composição em grande parte de óxido de ferro (227). Metais solúveis em partículas inaladas, como Fe, Ni, vanádio (V), cobalto (Co), Cobre (Cu) e Cr são associados ao aumento da produção de ROS, seguido por estresse oxidativo celular nas células epiteliais das vias aéreas (229–231). As exposições ao ambiente PM_{2.5} contendo metais que são marcadores de tráfego e emissões derivadas da indústria foram associadas em crianças asmáticas com uma resposta aumentada de fração exalada de óxido nítrico (FeNO) (232).

Em relação aos animais geneticamente modificados com inflamação pulmonar alérgica crônica, observou-se aumento de células positivas para iNOS e conteúdo de 8-PGF-2 α em relação aos animais controle. No verão, houve aumento de iNOS em animais com inflamação pulmonar alérgica crônica que foram expostos ao Local 1 em comparação com animais com inflamação pulmonar alérgica crônica que permaneceram no biotério, e no inverno houve aumento do conteúdo de 8-PGF-2 α nos animais expostos ao Local 2 em relação aos animais que permaneceram no biotério e aos animais expostos ao Local 1. Como a resposta observada ao isoprostano foi a mesma de animais saudáveis com inflamação alérgica crônica, acreditamos que possa haver algum componente da poluição do Local 2 que está diretamente envolvida nas vias de estresse oxidativo dependentes de isoprostano. O estresse oxidativo ativa fatores de transcrição (NF- κ B), que regulam a expressão de genes para citocinas pró-inflamatórias, enzimas e moléculas de adesão que induzem uma resposta inflamatória (233). Portanto, existe uma relação dinâmica entre o aumento dos níveis de ERO e os processos inflamatórios característicos da asma (234).

Poucos estudos avaliaram o papel do VAcT e da deficiência nicotínica na exposição à poluição e não há estudos com exposição ao pó de ferro.

A deficiência colinérgica, uma condição que ocorre em muitas doenças como Alzheimer e doença de Huntington, pressão alta e insuficiência cardíaca (235–237) pode exacerbar algumas alterações pulmonares induzidas pela exposição à poluição. Nossos dados sugerem que um sistema colinérgico intacto é necessário para proteger o pulmão contra os efeitos da poluição do ar, e pacientes com deficiência colinérgica podem ser mais vulneráveis aos efeitos nocivos da exposição à poluição do ar.

7. CONCLUSÃO

A redução da sinalização colinérgica aumenta a inflamação pulmonar em um modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica e quando associada à poluição, pode exacerbar algumas respostas relacionadas à inflamação, estresse oxidativo e remodelamento.

Vale ressaltar que utilizamos a poluição advinda do pó de ferro através da exposição desses animais ao ar ambiente de Vitória, mimetizando a exposição da população no município.

Não há estudos sobre o sistema colinérgico em animais com inflamação pulmonar alérgica crônica expostos à poluição por pó de ferro. Existem poucos estudos sobre o sistema colinérgico em relação às respostas inflamatórias de cada poluente e seu efeito pulmonar. Dada a diversidade de poluentes e suas fontes, deve-se ter cuidado ao prever que todos os poluentes agirão de maneira semelhante.

8. REFERÊNCIAS

1. Guarieiro LLN, Guarieiro ALN. Vehicle Emissions: What Will Change with Use of Biofuel? In: *Biofuels - Economy, Environment and Sustainability*. InTech; 2013.
2. Xie J, Teng J, Fan Y, Xie R, Shen A. The short-term effects of air pollutants on hospitalizations for respiratory disease in Hefei, China. *Int J Biometeorol*. 2019;63(3):315–26.
3. Nani Guarieiro LL, Nani Guarieiro AL. Vehicle Emissions: What Will Change with Use of Biofuel? In: *Biofuels - Economy, Environment and Sustainability*. InTech; 2013.
4. Yang Y, Li X, An X, Zhang L, Li X, Wang L, et al. 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*. 2020;29(7):825–32.
5. Cai Y, Shao Y, Wang C. The Association of Air Pollution With the Patients' Visits to the Department of Respiratory Diseases. *J Clin Med Res*. 2015;7(7):551–5.
6. Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, van Berlo D, Höhr D, et al. 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*. 2007;222(2):141–51.
7. 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. *Clinical and Experimental Allergy*. 2006;36(11):1469–79.
8. Zhao Q, Chen H, Yang T, Rui W, Liu F, Zhang F, et al. Direct effects of airborne PM_{2.5} exposure on macrophage polarizations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2016 Dec;1860(12):2835–43.
9. Curtis L, Rea W, Smith-Willis P, Fenyves E, Pan Y. Adverse health effects of outdoor air pollutants. *Environ Int*. 2006 Aug;32(6):815–30.
10. Yang Y, Li X, An X, Zhang L, Li X, Wang L, et al. 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*. 2020;29(7):825–32.
11. Hosseini A, Hirota JA, Hackett TL, McNagny KM, Wilson SJ, Carlsten C. Morphometric analysis of inflammation in bronchial biopsies following exposure to inhaled diesel exhaust and allergen challenge in atopic subjects. *Part Fibre Toxicol*. 2015 Dec;13(1):2.
12. Mei M, Song H, Chen L, Hu B, Bai R, Xu D, et al. Early-life exposure to three size-fractionated ultrafine and fine atmospheric particulates in Beijing exacerbates asthma development in mature mice. *Part Fibre Toxicol*. 2018;15(1):1–16.

13. Jacquemin B, Siroux V, Sanchez M, Carsin AE, Schikowski T, Adam M, et al. Ambient air pollution and adult asthma incidence in six european cohorts (Escape). *Environ Health Perspect.* 2015;123(6):613–21.
14. Baccarelli AA, Zheng Y, Zhang X, Chang D, Liu L, Wolf KR, et al. Air pollution exposure and lung function in highly exposed subjects in Beijing, China: A repeated-measure study. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11(1):1–10.
15. Hopke PK, Croft D, Zhang W, Lin S, Masiol M, Squizzato S, et al. Changes in the acute response of respiratory diseases to PM 2.5 in New York State from 2005 to 2016. *Science of the Total Environment.* 2019;677:328–39.
16. Hasunuma H, Yamazaki S, Tamura K, Hwang YH, Ono R, Amimoto Y, et al. Association between daily ambient air pollution and respiratory symptoms in children with asthma and healthy children in western Japan. *Journal of Asthma.* 2018 Jul;55(7):712–9.
17. Martins-Oliveira BT, Almeida-Reis R, Theodoro-Júnior OA, Oliva LV, Neto dos Santos Nunes N, Olivo CR, et al. The Plant-Derived Bauhinia bauhinoides Kallikrein Proteinase Inhibitor (rBbKI) Attenuates Elastase-Induced Emphysema in Mice. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:1–12.
18. Jo EJ, Lee WS, Jo HY, Kim CH, Eom JS, Mok JH, et al. Effects of particulate matter on respiratory disease and the impact of meteorological factors in Busan, Korea. *Respir Med.* 2017;124:79–87.
19. Curtis L, Rea W, Smith-Willis P, Fenyves E, Pan Y. Adverse health effects of outdoor air pollutants. *Environ Int.* 2006 Aug;32(6):815–30.
20. 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.* 2014 Feb;192(1):111–7.
21. Wittczak T, Dudek W, Walusiak-Skorupa J, Świerczyńska-Machura D, Cader W, Kowalczyk M, et al. Metal-induced asthma and chest X-ray changes in welders. *Int J Occup Med Environ Health.* 2012 Jan;25(3).
22. Hedmer M, Karlsson JE, Andersson U, Jacobsson H, Nielsen J, Tinnerberg H. Exposure to respirable dust and manganese and prevalence of airways symptoms, among Swedish mild steel welders in the manufacturing industry. *Int Arch Occup Environ Health.* 2014 Aug;87(6):623–34.
23. Dales R, Kauri LM, Cakmak S, Mahmud M, Weichenthal SA, Van Ryswyk K, et al. Acute changes in lung function associated with proximity to a steel plant: A randomized study. *Environ Int.* 2013 May;55:15–9.
24. Zheng G, Xu X, Li B, Wu K, Yekeen TA, Huo X. Association between lung function in school children and exposure to three transition metals from an e-waste recycling area. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2013;23(1):67–72.

25. Bell ML, Ebisu K, Peng RD, Samet JM, Dominici F. Hospital Admissions and Chemical Composition of Fine Particle Air Pollution. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Jun;179(12):1115–20.
26. Patel MM, Hoepner L, Garfinkel R, Chillrud S, Reyes A, Quinn JW, et al. Ambient Metals, Elemental Carbon, and Wheeze and Cough in New York City Children through 24 Months of Age. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Dec;180(11):1107–13.
27. Hirshon JM, Shardell M, Alles S, Powell JL, Squibb K, Ondov J, et al. Elevated Ambient Air Zinc Increases Pediatric Asthma Morbidity. *Environ Health Perspect*. 2008 Jun;116(6):826–31.
28. To T, Zhu J, Terebessy E, Zhang K, Fong I, Pinault L, et al. Does exposure to air pollution increase the risk of acute care in young children with asthma? An Ontario, Canada study. *Environ Res*. 2021 Aug;199:111302.
29. Gray DL, Wallace LA, Brinkman MC, Buehler SS, La Londe C. Respiratory and Cardiovascular Effects of Metals in Ambient Particulate Matter: A Critical Review. In 2015. p. 135–203.
30. Molnár P, Johannesson S, Boman J, Barregårda L, Sällstena GS. Personal exposures and indoor, residential outdoor, and urban background levels of fine particle trace elements in the general population. *Journal of Environmental Monitoring*. 2006;(5).
31. Liu PWG, Tsai JH, Lai HC, Tsai DM, Li LW. Establishing multiple regression models for ozone sensitivity analysis to temperature variation in Taiwan. *Atmos Environ*. 2013 Nov;79:225–35.
32. Mapeamento das Áreas Periurbanas do Espírito Santo. Instituto Jones dos Santos Neves (IJSN). 2011;
33. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2020;
34. Mapeamento das áreas Periurbanas do Espírito Santo. Instituto Jones dos Santos Neves (IJSN). 2008;
35. Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Relatório de Qualidade do ar na Grande Vitória. 2018.
36. Moreira DM, Tirabassi T, Moraes MR de. Meteorologia e poluição atmosférica. *Ambiente & Sociedade*. 2008 Jun;11(1):1–13.
37. Liu PWG, Johnson R. Forecasting Peak Daily Ozone Levels—I. A Regression with Time Series Errors Model Having a Principal Component Trigger to Fit 1991 Ozone Levels. *J Air Waste Manage Assoc*. 2002 Sep;52(9):1064–74.
38. Leite RCM, Guimarães EC, Lima EAP de, Barrozo MA de S, Tavares M. Utilização de regressão logística simples na verificação da qualidade do ar atmosférico de Uberlândia. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*. 2011 Jun;16(2):175–80.

39. Liu PWG, Johnson R. Forecasting Peak Daily Ozone Levels—I. A Regression with Time Series Errors Model Having a Principal Component Trigger to Fit 1991 Ozone Levels. *J Air Waste Manage Assoc.* 2002 Sep 27;52(9):1064–74.
40. Monte EZ, Albuquerque TT de A, Reisen VA. Impactos das Variáveis Meteorológicas na Qualidade do Ar da Região da Grande Vitória, Espírito Santo, Brasil. *Revista Brasileira de Meteorologia.* 2016 Dec;31(4 suppl 1):546–54.
41. Bastos CC; FNJ. Análise Climatológica da Alta Subtropical do Atlântico Sul. Congresso Brasileiro de Meteorologia. 2008;
42. Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Relatório de Qualidade do ar na Grande Vitória. 2019.
43. Jonhson TM, Guttikunda S, Wells G, Artaxo P, Bond TC, Russell AG, et al. Tools for Improving Air Quality Management. 2011;(March).
44. Pedruzzi R, Baek BH, Henderson BH, Aravanis N, Pinto JA, Araujo IB, et al. Performance evaluation of a photochemical model using different boundary conditions over the urban and industrialized metropolitan area of Vitória, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research.* 2019 Jun 10;26(16):16125–44.
45. Ying Q, Lu J, Kaduwela A, Kleeman M. Modeling air quality during the California Regional PM10/PM2.5 Air Quality Study (CPRAQS) using the UCD/CIT Source Oriented Air Quality Model – Part II. Regional source apportionment of primary airborne particulate matter. *Atmos Environ.* 2008 Dec;42(39):8967–78.
46. Qin Y, Kim E, Hopke PK. The concentrations and sources of PM2.5 in metropolitan New York City. *Atmos Environ.* 2006;40:312–32.
47. Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *The Lancet.* 2002 Oct;360(9341):1233–42.
48. Maynard R. Key airborne pollutants—the impact on health. *Science of The Total Environment.* 2004 Dec;334–335:9–13.
49. WHO. Air quality guidelines global update. 2005.
50. Loriato AG, Salvador N, Loriato AAB, Sokolov A, Nascimento AP, Ynoue RY, et al. Inventário de Emissões com Alta Resolução para a Região da Grande Vitória Utilizando o Sistema de Modelagem Integrada WRF-SMOKE-CMAQ. *Revista Brasileira de Meteorologia.* 2018 Sep;33(3):521–36.
51. Galvão ES, Santos JM, Reis Junior NC, Feroni R de C, Orlando MTD. The mineralogical composition of coarse and fine particulate material, their fate, and sources in an industrialized region of southeastern Brazil. *Environ Monit Assess.* 2022 Feb 1;194(2).
52. Inventário de Emissões Atmosféricas da Região da Grande Vitória Ano base-2015. 2015.

53. Machado M, Santos JM, Frere S, Chagnon P, Valdério &, Reisen A, et al. Deconstruction of annoyance due to air pollution by multiple correspondence analyses. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13958-8>
54. Moraes SL de, Lima JRB de, Ribeiro TR. Iron Ore Pelletizing Process: An Overview. In: Iron Ores and Iron Oxide Materials. InTech; 2018.
55. Bolen J. Modern air pollution control for iron ore induration. Vol. 31, MINERALS & METALLURGICAL PROCESSING. 2014.
56. Santos JM, Costa N, Júnior R. Relatório Técnico: Caracterização e quantificação de partículas sedimentadas na região da Grande Vitória. D. 2011.
57. Andrade M de F, de Miranda RM, Fornaro A, Kerr A, Oyama B, de Andre PA, et al. Vehicle emissions and PM_{2.5} mass concentrations in six Brazilian cities. *Air Qual Atmos Health*. 2012 Mar;5(1):79–88.
58. Guttikunda SK, Calori G. A GIS based emissions inventory at 1 km × 1 km spatial resolution for air pollution analysis in Delhi, India. *Atmos Environ*. 2013 Mar;67:101–11.
59. Amato F, Pandolfi M, Escrig A, Querol X, Alastuey A, Pey J, et al. Quantifying road dust resuspension in urban environment by Multilinear Engine: A comparison with PMF₂. *Atmos Environ*. 2009 Jun;43(17):2770–80.
60. Pedrucci R, Baek BH, Henderson BH, Aravanis N, Pinto JA, Araujo IB, et al. Performance evaluation of a photochemical model using different boundary conditions over the urban and industrialized metropolitan area of Vitória, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019;26(16):16125–44.
61. SANTOS, J.M.; REIS NC. Caracterização e Quantificação de Partículas Sedimentadas na Região da Grande Vitória. 2011.
62. Zambon Monte E, Toledo de Almeida Albuquerque T, Anselmo Reisen V, Vitória G, Santo E, Autor de correspondência A. Impactos das Variáveis Meteorológicas na Qualidade do Ar da Região da Grande Vitória, Espírito Santo, Brasil Impacts of Meteorological Variables on Air Quality in The Region of. *Revista Brasileira de Meteorologia*. 2016;4:546–54.
63. Meyer N, Dallinga JW, Nuss SJ, Moonen EJ, van Berkel JJ, Akdis C, et al. Defining adult asthma endotypes by clinical features and patterns of volatile organic compounds in exhaled air. *Respir Res*. 2014 Dec 28;15(1):136.
64. Brannan JD, Loughheed MD. Airway Hyperresponsiveness in Asthma: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. *Front Physiol*. 2012;3.
65. Gruffydd-Jones K, Thomas M, Roman-Rodríguez M, Infantino A, FitzGerald JM, Pavord I, et al. Asthma impacts on workplace productivity in employed patients who are symptomatic despite background therapy: a multinational survey. *J Asthma Allergy*. 2019 Jul;Volume 12:183–94.

66. Ehteshami-Afshar S, FitzGerald JM, Carlsten C, Tavakoli H, Rousseau R, Tan WC, et al. The impact of comorbidities on productivity loss in asthma patients. *Respir Res*. 2016 Dec 26;17(1):106.
67. Lemanske RF, Busse WW. Asthma: Clinical expression and molecular mechanisms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010 Feb;125(2):S95–102.
68. BOUSQUET J, JEFFERY PK, BUSSE WW, JOHNSON M, VIGNOLA AM. Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 May 1;161(5):1720–45.
69. Lambrecht BN, Hammad H. Allergens and the airway epithelium response: Gateway to allergic sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014 Sep;134(3):499–507.
70. Robinson KM, Manni ML, Biswas PS, Alcorn JF. Clinical Consequences of Targeting IL-17 and TH17 in Autoimmune and Allergic Disorders. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013 Dec 13;13(6):587–95.
71. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011 Mar;127(3):701-721.e70.
72. Amin K. The Role of the T lymphocytes and Remodeling in Asthma. *Inflammation*. 2016 Aug 24;39(4):1475–82.
73. Kirstein F, Nieuwenhuizen NE, Jayakumar J, Horsnell WGC, Brombacher F. Role of IL-4 receptor α -positive CD4+ T cells in chronic airway hyperresponsiveness. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016 Jun;137(6):1852-1862.e9.
74. Hendeles L, Asmus M, Chesrown S. Evaluation of cytokine modulators for asthma. *Paediatr Respir Rev*. 2004 Jan;5:S107–12.
75. Manohar M, Kandikattu HK, Upparahalli Venkateshaiah S, Yadavalli CS, Mishra A. Eosinophils in the pathogenesis of pancreatic disorders. *Semin Immunopathol*. 2021 Jun 30;43(3):411–22.
76. Wang Z, DiDonato JA, Buffa J, Comhair SA, Aronica MA, Dweik RA, et al. Eosinophil Peroxidase Catalyzed Protein Carbamylation Participates in Asthma. *Journal of Biological Chemistry*. 2016 Oct;291(42):22118–35.
77. Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2001 Feb;344(5):350–62.
78. Zhao S tao, Wang C zheng. Regulatory T cells and asthma. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 2018 Sep 8;19(9):663–73.
79. Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, Dance MP, Chen BL, Dienger KM, et al. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *Journal of Experimental Medicine*. 2005 Dec 5;202(11):1549–61.

80. Joetham A, Schedel M, O'Connor BP, Kim S, Takeda K, Abbott J, et al. Inducible and naturally occurring regulatory T cells enhance lung allergic responses through divergent transcriptional pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017 Apr;139(4):1331–42.
81. Santos TM dos, Righetti RF, Camargo L do N, Saraiva-Romanholo BM, Aristoteles LRCRB, de Souza FCR, et al. Effect of Anti-IL17 Antibody Treatment Alone and in Combination With Rho-Kinase Inhibitor in a Murine Model of Asthma. *Front Physiol*. 2018 Sep 5;9.
82. Doe C, Bafadhel M, Siddiqui S, Desai D, Mistry V, Rugman P, et al. Expression of the T Helper 17-Associated Cytokines IL-17A and IL-17F in Asthma and COPD. *Chest*. 2010 Nov;138(5):1140–7.
83. Wang YH, Wills-Karp M. The Potential Role of Interleukin-17 in Severe Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011 Oct 20;11(5):388–94.
84. Molet S, Hamid Q, Davoineb F, Nutku E, Tahaa R, Pagé N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2001 Sep;108(3):430–8.
85. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011 Sep;128(3):451–62.
86. dos Santos TM, Righetti RF, Rezende BG, Campos EC, Camargo L do N, Saraiva-Romanholo BM, et al. Effect of anti-IL17 and/or Rho-kinase inhibitor treatments on vascular remodeling induced by chronic allergic pulmonary inflammation. *Ther Adv Respir Dis*. 2020;14.
87. Camargo L, Righetti RF, Aristóteles LRCRB, Santos TM, Souza FCR, Fukuzaki S, et al. Effects of anti-IL17 on inflammation, remodeling, and oxidative stress in an experimental model of asthma exacerbated by LPS. In: *Airway Cell Biology and Immunopathology*. European Respiratory Society; 2018. p. PA983.
88. Kudo M, Melton AC, Chen C, Engler MB, Huang KE, Ren X, et al. IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nat Med*. 2012 Apr 4;18(4):547–54.
89. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Mechanisms of Disease Persistence and Progression. *Annu Rev Immunol*. 2004 Apr 1;22(1):789–815.
90. Black JL. Asthma—More Muscle Cells or More Muscular Cells? *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 May;169(9):980–1.
91. Hough KP, Curtiss ML, Blain TJ, Liu RM, Trevor J, Deshane JS, et al. Airway Remodeling in Asthma. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7(May).
92. Hough KP, Curtiss ML, Blain TJ, Liu RM, Trevor J, Deshane JS, et al. Airway Remodeling in Asthma. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7(May).
93. Calhoun WJ. Nocturnal asthma. *Chest*. 2003;123(3 SUPPL.):399S-405S.

94. Balzar S, Chu HW, Silkoff P, Cundall M, Trudeau JB, Strand M, et al. Increased TGF- β 2 in severe asthma with eosinophilia. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005 Jan;115(1):110–7.
95. Tillie-Leblond I, Gosset P, Tonnel AB. Inflammatory events in severe acute asthma. *Allergy*. 2005 Jan;60(1):23–9.
96. Kotaru C, Schoonover KJ, Trudeau JB, Huynh ML, Zhou X, Hu H, et al. Regional Fibroblast Heterogeneity in the Lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Jun;173(11):1208–15.
97. Tulic MK, Hamid Q. The Role of the Distal Lung in Asthma. *Semin Respir Crit Care Med*. 2002;23(4):347–60.
98. Lanças T, Kasahara DI, Prado CM, Tibério IFLC, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. *J Appl Physiol*. 2006 May;100(5):1610–6.
99. Tulic MK, Hamid Q. The Role of the Distal Lung in Asthma. *Semin Respir Crit Care Med*. 2002;23(4):347–60.
100. COCKCROFT D, DAVIS B. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006 Sep;118(3):551–9.
101. Schaafsma D, Bos IST, Zuidhof AB, Zaagsma J, Meurs H. Inhalation of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 reverses allergen-induced airway hyperresponsiveness after the early and late asthmatic reaction. *Respir Res*. 2006 Dec;7(1):121.
102. Chiba Y, Matsusue K, Misawa M. RhoA, a Possible Target for Treatment of Airway Hyperresponsiveness in Bronchial Asthma. *J Pharmacol Sci*. 2010;114(3):239–47.
103. Sylvester JT. The tone of pulmonary smooth muscle: ROK and Rho music? *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004 Oct;287(4):L624–30.
104. Schaafsma D, Bos IST, Zuidhof AB, Zaagsma J, Meurs H. Inhalation of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 reverses allergen-induced airway hyperresponsiveness after the early and late asthmatic reaction. *Respir Res*. 2006 Dec;7(1):121.
105. Sylvester JT. The tone of pulmonary smooth muscle: ROK and Rho music? *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004 Oct;287(4):L624–30.
106. Chiba Y, Matsusue K, Misawa M. RhoA, a Possible Target for Treatment of Airway Hyperresponsiveness in Bronchial Asthma. *J Pharmacol Sci*. 2010;114(3):239–47.
107. Sahiner UM, Birben E, Erzurum S, Sackesen C, Kalayci Ö. Oxidative stress in asthma: Part of the puzzle. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2018;29(8):789–800.
108. Ahmad A, Shameem M, Husain Q. Relation of oxidant-antioxidant imbalance with disease progression in patients with asthma. *Ann Thorac Med*. 2012;7(4):226–32.

109. Duong-Quy S. Clinical Utility Of The Exhaled Nitric Oxide (NO) Measurement With Portable Devices In The Management Of Allergic Airway Inflammation And Asthma. *J Asthma Allergy*. 2019 Oct;Volume 12:331–41.
110. Cui J, Xu F, Tang Z, Wang W, Hu L li, Yan C, et al. Bu-Shen-Yi-Qi formula ameliorates airway remodeling in murine chronic asthma by modulating airway inflammation and oxidative stress in the lung. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2019;112(February):108694.
111. Riou M, Alfatni A, Charles AL, Andrès E, Pistea C, Charloux A, et al. New Insights into the Implication of Mitochondrial Dysfunction in Tissue, Peripheral Blood Mononuclear Cells, and Platelets during Lung Diseases. *J Clin Med*. 2020;9(5):1253.
112. Ricciardolo FLM. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*. 2003 Feb;58(2):175–82.
113. Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric Oxide in Health and Disease of the Respiratory System. *Physiol Rev*. 2004 Jul;84(3):731–65.
114. Chapman JT, Choi AMK. EXHALED MONOXIDES AS A PULMONARY FUNCTION TEST. *Clin Chest Med*. 2001 Dec;22(4):817–36.
115. Rodway GW; JC, Sethi LAH and JM. Exhaled nitric oxide in the clinical management of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2009;4(6):454–9.
116. Lemanske RF, Busse WW. Asthma: Clinical expression and molecular mechanisms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2 SUPPL. 2):S95–102.
117. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Arata V, Kasahara DI, Martins MA, Tibério IFLC. Neurokinins and inflammatory cell iNOS expression in guinea pigs with chronic allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(4 32-4).
118. Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric Oxide in Health and Disease of the Respiratory System. *Physiol Rev*. 2004 Jul;84(3):731–65.
119. Barnes PJ. NO or no NO in asthma? *Thorax*. 1996 Feb 1;51(2):218–20.
120. Barnes PJ. NO or no NO in asthma? *Thorax*. 1996 Feb;51(2):218–20.
121. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Arata V, Kasahara DI, Martins MA, Tibério IFLC. Neurokinins and inflammatory cell iNOS expression in guinea pigs with chronic allergic airway inflammation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2005 Apr;288(4):L741–8.
122. Heffler E, Carpagnano GE, Favero E, Guida G, Maniscalco M, Motta A, et al. Fractional Exhaled Nitric Oxide (FENO) in the management of asthma: a position paper of the Italian Respiratory Society (SIP/IRS) and Italian Society of Allergy, Asthma and Clinical Immunology (SIAAIC). *Multidiscip Respir Med*. 2020;15.

123. Scott JA, Grasemann H. Arginine metabolism in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(4):767–75.
124. Asosingh K, Lauruschkat CD, Alemagno M, Frimel M, Wanner N, Weiss K, et al. Arginine metabolic control of airway inflammation. *JCI Insight*. 2020;5(2):1–12.
125. Possa SS, Charafeddine HT, Righetti RF, da Silva PA, Almeida-Reis R, Saraiva-Romanholo BM, et al. Rho-kinase inhibition attenuates airway responsiveness, inflammation, matrix remodeling, and oxidative stress activation induced by chronic inflammation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2012 Dec;303(11):L939–52.
126. Rodway GW; JC, Sethi LAH and JM. Exhaled nitric oxide in the clinical management of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2009;4(6):454–9.
127. Zuo L, Koozechian MS, Chen LL. Characterization of reactive nitrogen species in allergic asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2014 Jan;112(1):18–22.
128. Zuo L, Koozechian MS, Chen LL. Characterization of reactive nitrogen species in allergic asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2014 Jan;112(1):18–22.
129. Sriboonyong T, Kawamatawong T, Sriwantana T, Srihirun S, Titapiwatanakun V, Vivithanaporn P, et al. Efficacy and safety of inhaled nebulized sodium nitrite in asthmatic patients. *Pulm Pharmacol Ther*. 2021 Feb;66:101984.
130. Morrow J. The Isoprostanes - Unique Products of Arachidonate Peroxidation: Their Role as Mediators of Oxidant Stress. *Curr Pharm Des*. 2006 Mar;12(8):895–902.
131. Brussino L, Badiu I, Sciascia S, Bugiani M, Heffler E, Guida G, et al. Oxidative stress and airway inflammation after allergen challenge evaluated by exhaled breath condensate analysis. *Clinical & Experimental Allergy*. 2010 Nov;40(11):1642–7.
132. Chamitava L, Cazzoletti L, Ferrari M, Garcia-Larsen V, Jalil A, Degan P, et al. Biomarkers of oxidative stress and inflammation in chronic airway diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):1–13.
133. Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes: Formation, Analysis and Use As Indices of Lipid Peroxidation in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 Aug;274(35):24441–4.
134. Janssen LJ, Premji M, Netherton S, Catalli A, Cox G, Keshavjee S, et al. Excitatory and inhibitory actions of isoprostanes in human and canine airway smooth muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000;295(2):506–11.
135. Shiraki A, Kume H, Oguma T, Makino Y, Ito S, Shimokata K, et al. Role of Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ sensitization in 8-iso-PGF₂α-induced contraction in airway smooth muscle. *Clinical & Experimental Allergy*. 2009 Feb;39(2):236–45.

136. Hussain I, Randolph D, Brody SL, Song SK, Hsu A, Kahn AM, et al. Induction, distribution and modulation of upper airway allergic inflammation in mice. *Clinical & Experimental Allergy*. 2001 Jul;31(7):1048–59.
137. Singh B, Shinagawa K, Taube C, Gelfand EW, Pabst R. Strain-specific differences in perivascular inflammation in lungs in two murine models of allergic airway inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2005 Aug;141(2):223–9.
138. Törmänen KR, Uller L, Persson CGA, Erjefält JS. Allergen Exposure of Mouse Airways Evokes Remodeling of both Bronchi and Large Pulmonary Vessels. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jan;171(1):19–25.
139. Arantes-Costa FM, Lopes FDTQS, Toledo AC, Magliarelli-Filho PA, Moriya HT, Carvalho-Oliveira R, et al. Effects of Residual Oil Fly Ash (ROFA) in Mice with Chronic Allergic Pulmonary Inflammation. *Toxicol Pathol*. 2008 Jul;36(5):680–6.
140. dos Santos TM, Righetti RF, Camargo L do N, Saraiva-Romanholo BM, Aristoteles LRCRB, de Souza FCR, et al. Effect of anti-IL17 antibody treatment alone and in combination with Rho-kinase inhibitor in a murine model of asthma. *Front Physiol*. 2018;9(SEP):1–19.
141. Inazu M. Functional Expression of Choline Transporters in the Blood–Brain Barrier. *Nutrients*. 2019 Sep 20;11(10):2265.
142. Lima R de F, Prado VF, Prado MAM, Kushmerick C. Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter. *J Neurochem*. 2010 May;113(4):943–51.
143. Kolahian S, Gosens R. Cholinergic Regulation of Airway Inflammation and Remodelling. *J Allergy (Cairo)*. 2012 Jan;2012:1–9.
144. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res*. 2006 Dec;7(1):73.
145. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res*. 2006 Dec;7(1):73.
146. Kistemaker LEM, Gosens R. Acetylcholine beyond bronchoconstriction: roles in inflammation and remodeling. *Trends Pharmacol Sci*. 2015 Mar;36(3):164–71.
147. Scott GD, Fryer AD. Role of Parasympathetic Nerves and Muscarinic Receptors in Allergy and Asthma. In 2012. p. 48–69.
148. Pinheiro NM, Miranda CJCP, Perini A, Câmara NOS, Costa SKP, Alonso-Vale MIC, et al. Pulmonary inflammation is regulated by the levels of the vesicular acetylcholine transporter. *PLoS One*. 2015;10(3).
149. Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, et al. Polyspecific Cation Transporters Mediate Luminal Release of Acetylcholine from Bronchial Epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Jul;33(1):79–88.

150. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, et al. Expression and function of the cholinergic system in immune cells. *Front Immunol*. 2017;8(SEP):1–18.
151. Maouche K, Medjber K, Zahm JM, Delavoie F, Terryn C, Coraux C, et al. Contribution of 7 nicotinic receptor to airway epithelium dysfunction under nicotine exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 Mar;110(10):4099–104.
152. Racké K, Juergens UR, Matthiesen S. Control by cholinergic mechanisms. *Eur J Pharmacol*. 2006 Mar;533(1–3):57–68.
153. Kistemaker LEM, Gosens R. Acetylcholine beyond bronchoconstriction: roles in inflammation and remodeling. *Trends Pharmacol Sci*. 2015 Mar;36(3):164–71.
154. GALLOWITSCH-PUERTA M. Immunologic Role of the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway and the Nicotinic Acetylcholine 7 Receptor. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Dec;1062(1):209–19.
155. Pavlov VA, Tracey KJ. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Biochem Soc Trans*. 2006 Dec;34(6):1037–40.
156. Pinheiro NM, Santana FPR, Almeida RR, Guerreiro M, Martins MA, Caperuto LC, et al. Acute lung injury is reduced by the $\alpha 7nAChR$ agonist PNU-282987 through changes in the macrophage profile. *The FASEB Journal*. 2017 Jan;31(1):320–32.
157. Yamada M, Ichinose M. The Cholinergic Pathways in Inflammation: A Potential Pharmacotherapeutic Target for COPD. *Front Pharmacol*. 2018 Dec;9.
158. Gosens R, Gross N. The mode of action of anticholinergics in asthma. *European Respiratory Journal*. 2018;52(4).
159. Buels KS, Fryer AD. Muscarinic Receptor Antagonists: Effects on Pulmonary Function. In 2012. p. 317–41.
160. Quirce S, Domínguez-Ortega J, Barranco P. Anticholinergics for treatment of Asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015;25(2):84–93.
161. Gosens R, Gross N. The mode of action of anticholinergics in asthma. *European Respiratory Journal*. 2018;52(4).
162. Buels KS, Fryer AD. Muscarinic Receptor Antagonists: Effects on Pulmonary Function. In 2012. p. 317–41.
163. Bonaz B, Sinniger V, Pellissier S. Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. *Journal of Physiology*. 2016;594(20):5781–90.
164. Pinheiro NM, Santana FPR, Almeida RR, Guerreiro M, Martins MA, Caperuto LC, et al. Acute lung injury is reduced by the $\alpha 7nAChR$ agonist PNU-282987 through changes in the macrophage profile. *The FASEB Journal*. 2017 Jan;31(1):320–32.

165. de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2005 Aug;6(8):844–51.
166. Chatterjee PK, Al-Abed Y, Sherry B, Metz CN. Cholinergic agonists regulate JAK2/STAT3 signaling to suppress endothelial cell activation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2009 Nov;297(5):C1294–306.
167. Peña G, Cai B, Deitch EA, Ulloa L. JAK2 inhibition prevents innate immune responses and rescues animals from sepsis. *J Mol Med*. 2010 Aug;88(8):851–9.
168. Su X, Matthay MA, Malik AB. Requisite Role of the Cholinergic $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Pathway in Suppressing Gram-Negative Sepsis-Induced Acute Lung Inflammatory Injury. *The Journal of Immunology*. 2010 Jan;184(1):401–10.
169. Pinheiro NM, Miranda CJCP, Perini A, Câmara NOS, Costa SKP, Alonso-Vale MIC, et al. Pulmonary inflammation is regulated by the levels of the vesicular acetylcholine transporter. *PLoS One*. 2015;10(3).
170. Bonaz B, Sinniger V, Pellissier S. Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. *Journal of Physiology*. 2016;594(20):5781–90.
171. Canning BJ. Reflex regulation of airway smooth muscle tone. *J Appl Physiol*. 2006 Sep;101(3):971–85.
172. Udem BJ, Myers AC. Cholinergic and noncholinergic parasympathetic control of airway smooth muscle. *Muscarinic Receptors in Airways Diseases*. 2001;1–24.
173. Suarez-Mier GB, Buckwalter MS. Glial Fibrillary Acidic Protein-Expressing Glia in the Mouse Lung. *ASN Neuro*. 2015 Oct;7(5):175909141560163.
174. Canning BJ. Reflex regulation of airway smooth muscle tone. *J Appl Physiol*. 2006 Sep;101(3):971–85.
175. Foster EL, Simpson EL, Fredrikson LJ, Lee JJ, Lee NA, Fryer AD, et al. Eosinophils Increase Neuron Branching in Human and Murine Skin and In Vitro. Tsokos GC, editor. *PLoS One*. 2011 Jul;6(7):e22029.
176. Kistemaker LEM, Bos ST, Mudde WM, Hylkema MN, Hiemstra PS, Wess J, et al. Muscarinic M₃ Receptors Contribute to Allergen-Induced Airway Remodeling in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 Apr;50(4):690–8.
177. Pinheiro NM, Miranda CJCP, Perini A, Câmara NOS, Costa SKP, Alonso-Vale MIC, et al. Pulmonary Inflammation Is Regulated by the Levels of the Vesicular Acetylcholine Transporter. *PLoS One*. 2015 Mar 27;10(3):e0120441.
178. Gori S, Vermeulen M, Remes-Lenicov F, Jancic C, Scordo W, Ceballos A, et al. Acetylcholine polarizes dendritic cells toward a Th2-promoting profile. *Allergy*. 2017 Feb;72(2):221–31.

179. Gori S, Vermeulen M, Remes-Lenicov F, Jancic C, Scordo W, Ceballos A, et al. Acetylcholine polarizes dendritic cells toward a Th2-promoting profile. *Allergy*. 2017 Feb;72(2):221–31.
180. Wallrapp A, Riesenfeld SJ, Burkett PR, Abdulnour REE, Nyman J, Dionne D, et al. The neuropeptide NMU amplifies ILC2-driven allergic lung inflammation. *Nature*. 2017 Sep;549(7672):351–6.
181. Black JL. Asthma—More Muscle Cells or More Muscular Cells? *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 May;169(9):980–1.
182. Pinheiro NM, Miranda CJCP, Santana FR, Bittencourt-Mernak M, Arantes-Costa FM, Olivo C, et al. Effects of VAcHT reduction and $\alpha 7nAChR$ stimulation by PNU-282987 in lung inflammation in a model of chronic allergic airway inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2020;882(January).
183. Oenema TA, Smit M, Smedinga L, Racké K, Halayko AJ, Meurs H, et al. Muscarinic receptor stimulation augments TGF- β 1 -induced contractile protein expression by airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2012 Oct;303(7):L589–97.
184. Oenema TA, Mensink G, Smedinga L, Halayko AJ, Zaagsma J, Meurs H, et al. Cross-Talk between Transforming Growth Factor- β 1 and Muscarinic M 2 Receptors Augments Airway Smooth Muscle Proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 Jul;49(1):18–27.
185. Kistemaker LEM, Bos ST, Mudde WM, Hylkema MN, Hiemstra PS, Wess J, et al. Muscarinic M 3 Receptors Contribute to Allergen-Induced Airway Remodeling in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 Apr;50(4):690–8.
186. Pinheiro NM, Miranda CJCP, Santana FR, Bittencourt-Mernak M, Arantes-Costa FM, Olivo C, et al. Effects of VAcHT reduction and $\alpha 7nAChR$ stimulation by PNU-282987 in lung inflammation in a model of chronic allergic airway inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2020;882(January).
187. Blanchet MR, Langlois A, Israël-Assayag E, Beaulieu MJ, Ferland C, Laviolette M, et al. Modulation of eosinophil activation in vitro by a nicotinic receptor agonist. *J Leukoc Biol*. 2007 May;81(5):1245–51.
188. Arantes-Costa FM, Lopes FDTQS, Toledo AC, Magliarelli-Filho PA, Moriya HT, Carvalho-Oliveira R, et al. Effects of Residual Oil Fly Ash (ROFA) in Mice with Chronic Allergic Pulmonary Inflammation. *Toxicol Pathol*. 2008 Jul;36(5):680–6.
189. Leick-maldonado EA, Kay FU, Leonhardt MC, Kasahara DI, Prado CM, Fernandes FT, et al. Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in an experimental model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. *Clinical Experimental Allergy*. 2004 Jan;34(1):145–52.

190. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Arata V, Kasahara DI, Martins MA, Tibério IFLC. Neurokinins and inflammatory cell iNOS expression in guinea pigs with chronic allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(4):32-4.
191. Possa SS, Charafeddine HT, Righetti RF, da Silva PA, Almeida-Reis R, Saraiva-Romanholo BM, et al. Rho-kinase inhibition attenuates airway responsiveness, inflammation, matrix remodeling, and oxidative stress activation induced by chronic inflammation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2012 Dec;303(11):L939-52.
192. Hantos Z, Daroczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol*. 1992 Jan 1;72(1):168-78.
193. Martins-Oliveira BT, Almeida-Reis R, Theodoro-Júnior OA, Oliva LV, Neto dos Santos Nunes N, Olivo CR, et al. The Plant-Derived Bauhinia bauhinioides Kallikrein Proteinase Inhibitor (rBbKI) Attenuates Elastase-Induced Emphysema in Mice. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:1-12.
194. Mitzner W, Weibel ER. Standards for quantitative assessment of lung structure. *J Appl Physiol*. 2010 Sep;109(3):934-934.
195. Pigati PA, Righetti RF, Possa SS, Romanholo BS, Rodrigues APD, dos Santos ASA, et al. Y-27632 is associated with corticosteroid-potentiated control of pulmonary remodeling and inflammation in guinea pigs with chronic allergic inflammation. *BMC Pulm Med*. 2015 Dec 12;15(1):85.
196. Tibério IF, Turco GM, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva SO, do Patrocínio M, et al. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 May;155(5):1739-47.
197. Santos TM dos. Anti-IL17 associado ou não do inibidor da Rho-quinase em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2018.
198. Righetti RF, Pigati PA da S, Possa SS, Habrum FC, Xisto DG, Antunes MA, et al. Effects of Rho-kinase inhibition in lung tissue with chronic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol*. 2014;192(1):134-46.
199. Santana FPR, Pinheiro NM, Bittencourt-Mernak MI, Perini A, Yoshizaki K, Macchione M, et al. Vesicular acetylcholine transport deficiency potentiates some inflammatory responses induced by diesel exhaust particles. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019 Jan;167:494-504.
200. Pinheiro NM, Banzato R, Tibério I, Prado MAM, Prado VF, Hamouda AK, et al. Acute lung injury in cholinergic-deficient mice supports anti-inflammatory role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 2;22(14).

201. Huang KL, Liu SY, Chou CCK, Lee YH, Cheng TJ. The effect of size-segregated ambient particulate matter on Th1/Th2-like immune responses in mice. *PLoS One*. 2017 Feb 28;12(2):e0173158.
202. Bezemer GFG, Bauer SM, Oberdörster G, Breyse PN, Pieters RHH, Georas SN, et al. Activation of Pulmonary Dendritic Cells and Th2-Type Inflammatory Responses on Instillation of Engineered, Environmental Diesel Emission Source or Ambient Air Pollutant Particles in vivo. *J Innate Immun*. 2011;3(2):150–66.
203. Gori S, Vermeulen M, Remes-Lenicov F, Jancic C, Scordo W, Ceballos A, et al. Acetylcholine polarizes dendritic cells toward a Th2-promoting profile. *Allergy*. 2017 Feb;72(2):221–31.
204. de Genaro IS, de Almeida FM, dos Santos Lopes FDTQ, Kunzler DDCH, Tripode BGB, Kurdejak A, et al. Low-dose chlorine exposure impairs lung function, inflammation and oxidative stress in mice. *Life Sci*. 2021 Feb;267:118912.
205. de Genaro IS, de Almeida FM, Hizume-Kunzler DC, Moriya HT, Silva RA, Cruz JCG, et al. Low dose of chlorine exposure exacerbates nasal and pulmonary allergic inflammation in mice. *Sci Rep*. 2018 Aug 22;8(1):12636.
206. Glencross DA, Ho TR, Camiña N, Hawrylowicz CM, Pfeffer PE. Air pollution and its effects on the immune system. *Free Radic Biol Med*. 2020 May;151:56–68.
207. Kourie JI. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1998 Jul 1;275(1):C1–24.
208. Gour N, Sudini K, Khalil SM, Rule AM, Lees P, Gabrielson E, et al. Unique pulmonary immunotoxicological effects of urban PM are not recapitulated solely by carbon black, diesel exhaust or coal fly ash. *Environ Res*. 2018 Feb;161:304–13.
209. Guo ZQ, Dong WY, Xu J, Hong ZC, Zhao RW, Deng CR, et al. T-Helper Type 1-T-Helper Type 2 Shift and Nasal Remodeling after Fine Particulate Matter Exposure in a Rat Model of Allergic Rhinitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2017 May 1;31(3):148–55.
210. Gosens R, Dueck G, Rector E, Nunes RO, Gerthoffer WT, Unruh H, et al. Cooperative regulation of GSK-3 by muscarinic and PDGF receptors is associated with airway myocyte proliferation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2007 Nov;293(5):L1348–58.
211. Oenema TA, Mensink G, Smedinga L, Halayko AJ, Zaagsma J, Meurs H, et al. Cross-Talk between Transforming Growth Factor- β ₁ and Muscarinic M₂ Receptors Augments Airway Smooth Muscle Proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 Jul;49(1):18–27.
212. Pinheiro NM, Miranda CJCP, Santana FR, Bittencourt-Mernak M, Arantes-Costa FM, Olivo C, et al. Effects of VACHT reduction and α 7nAChR stimulation by PNU-282987 in lung inflammation in a model of chronic allergic airway inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2020 Sep 5;882.

213. Oenema TA, Maarsingh H, Smit M, Groothuis GMM, Meurs H, Gosens R. Bronchoconstriction Induces TGF- β Release and Airway Remodelling in Guinea Pig Lung Slices. *PLoS One*. 2013 Jun 26;8(6):e65580.
214. Aschner Y, Downey GP. Transforming Growth Factor- β : Master Regulator of the Respiratory System in Health and Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016 May;54(5):647–55.
215. Grainge C, Dennison P, Lau L, Davies D, Howarth P. Asthmatic and Normal Respiratory Epithelial Cells Respond Differently to Mechanical Apical Stress. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Aug 15;190(4):477–80.
216. Tatler AL, John AE, Jolly L, Habgood A, Porte J, Brightling C, et al. Integrin $\alpha\beta 5$ -Mediated TGF- β Activation by Airway Smooth Muscle Cells in Asthma. *The Journal of Immunology*. 2011 Dec 1;187(11):6094–107.
217. Gosens R, Gross N. The mode of action of anticholinergics in asthma. *European Respiratory Journal*. 2018 Oct;52(4):1701247.
218. Kistemaker LEM, Gosens R. Acetylcholine beyond bronchoconstriction: roles in inflammation and remodeling. *Trends Pharmacol Sci*. 2015 Mar;36(3):164–71.
219. Dragunas G, Woest ME, Nijboer S, Bos ST, Asselt J, Groot AP, et al. Cholinergic neuroplasticity in asthma driven by TrkB signaling. *The FASEB Journal*. 2020 Jun 11;34(6):7703–17.
220. Guarnieri M, Balmes JR. Outdoor air pollution and asthma. *The Lancet*. 2014 May;383(9928):1581–92.
221. Health Effects Institute. Traffic-related air pollution: a critical review of the literature on emissions, exposure, and health effects. . Boston;
222. Xiong D (Jun P, Martin JG, Lauzon AM. Airway smooth muscle function in asthma. *Front Physiol*. 2022 Oct 5;13.
223. Moreira DM, Tirabassi T, Moraes MR de. Meteorologia e poluição atmosférica. *Ambiente & Sociedade*. 2008 Jun;11(1):1–13.
224. Cheng Z, Jiang J, Fajardo O, Wang S, Hao J. Characteristics and health impacts of particulate matter pollution in China (2001–2011). *Atmos Environ*. 2013 Feb;65:186–94.
225. Li N, Georas S, Alexis N, Fritz P, Xia T, Williams MA, et al. A work group report on ultrafine particles (American Academy of Allergy, Asthma & Immunology): Why ambient ultrafine and engineered nanoparticles should receive special attention for possible adverse health outcomes in human subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016 Aug;138(2):386–96.
226. Jung MH, Kim HR, Park YJ, Park DS, Chung KH, Oh SM. Genotoxic effects and oxidative stress induced by organic extracts of particulate matter (PM10) collected from a

- subway tunnel in Seoul, Korea. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2012 Dec;749(1–2):39–47.
227. Seaton A. The London Underground: dust and hazards to health. *Occup Environ Med*. 2005 Jun 1;62(6):355–62.
228. Lodovici M, Bigagli E. Oxidative Stress and Air Pollution Exposure. *J Toxicol*. 2011;2011:1–9.
229. Knaapen AM, Shi T, Borm PJA, Schins RPF. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol Cell Biochem*. 2002;234/235(1):317–26.
230. Valavanidis A, Fiotakis K, Vlahogianni T, Bakeas EB, Triantafillaki S, Paraskevopoulou V, et al. Characterization of atmospheric particulates, particle-bound transition metals and polycyclic aromatic hydrocarbons of urban air in the centre of Athens (Greece). *Chemosphere*. 2006 Oct;65(5):760–8.
231. Schaumann F, Borm PJA, Herbrich A, Knoch J, Pitz M, Schins RPF, et al. Metal-rich Ambient Particles (Particulate Matter_{2.5}) Cause Airway Inflammation in Healthy Subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Oct 15;170(8):898–903.
232. Godri Pollitt KJ, Maikawa CL, Wheeler AJ, Weichenthal S, Dobbin NA, Liu L, et al. Trace metal exposure is associated with increased exhaled nitric oxide in asthmatic children. *Environmental Health*. 2016 Dec 1;15(1):94.
233. Rahman I. Regulation of nuclear factor- κ B, activator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor- α and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Biochem Pharmacol*. 2000 Oct;60(8):1041–9.
234. Vincenzo S Di, Ferrante G, Ferraro M, Cascio C, Malizia V, Licari A, et al. Oxidative Stress, Environmental Pollution, and Lifestyle as Determinants of Asthma in Children. *Biology (Basel)*. 2023 Jan 13;12(1):133.
235. Terry AV, Gearhart DA, Warner SE, Zhang G, Bartlett MG, Middlemore ML, et al. Oral haloperidol or risperidone treatment in rats: Temporal effects on nerve growth factor receptors, cholinergic neurons, and memory performance. *Neuroscience*. 2007 May;146(3):1316–32.
236. Smith R, Chung H, Rundquist S, Maat-Schieman MLC, Colgan L, Englund E, et al. Cholinergic neuronal defect without cell loss in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2006 Nov 1;15(21):3119–31.
237. Lara A, Damasceno DD, Pires R, Gros R, Gomes ER, Gavioli M, et al. Dysautonomia Due to Reduced Cholinergic Neurotransmission Causes Cardiac Remodeling and Heart Failure. *Mol Cell Biol*. 2010 Apr 1;30(7):1746–56.
