

ELAINE CRISTINA DE CAMPOS

Efeitos da poluição ambiental na
hiperresponsividade brônquica, inflamação,
remodelamento da matriz extracelular e estresse
oxidativo em camundongos com inflamação
pulmonar alérgica crônica

SÃO PAULO

2023

ELAINE CRISTINA DE CAMPOS

Efeitos da poluição ambiental na
hiperresponsividade brônquica, inflamação,
remodelamento da matriz extracelular e estresse
oxidativo em camundongos com inflamação
pulmonar alérgica crônica

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

SÃO PAULO

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Campos, Elaine Cristina de
Efeitos da poluição ambiental na
hiperresponsividade brônquica, inflamação,
remodelamento da matriz extracelular e estresse
oxidativo em camundongos com inflamação pulmonar
alérgica crônica / Elaine Cristina de Campos. -- 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.Poluição ambiental
3.Estresse oxidativo 4.Inflamação 5.Remodelamento
das vias aéreas 6.Modelos animais

USP/FM/DBD-039/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Celso e Rosângela que me
apoiam incondicionalmente e,
As minhas sobrinhas Ana Liz, Cecília e Marina
e também os meus futuros filhinhos
espero ser exemplo de luta e perseverança para vocês,
onde o estudo e a busca por nossos sonhos
nos faz ser gigantes e como diz o vovô
“é a nossa única herança”.*

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.”

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido Deus, que nunca me abandonou nas horas de felicidade, agradecimento, aflição e desespero, nos momentos em que não haviam mais forças para prosseguir, sempre se fez luz em meu coração e me transferiu forças de onde eu nem sabia que existia, sempre me apresentando caminhos e pessoas ao longo da jornada no momento certo e na hora certa, e Ele que me ensinou sobre perseverança, me auxiliando em todos os momentos e não permitindo desistir de meu propósito, obrigada, Senhor;

Aos meus pais, Celso e Rosângela, que são minhas fortalezas e meu porto seguro, meu lugar para onde sempre corro, aqueles que me apoiam e me amam incondicionalmente, e que me chamaram para a realidade todas as vezes em que os desafios pareciam monstruosos e minhas conquistas inatingíveis, eles que sabem de todas as nossas batalhas e o quão importante é para mim e para nós a realização de mais esse sonho, obrigada meus *vêio* eu amo vocês;

Ao meu irmão Marcelo, minha metadinha, sei que a distância foi difícil para nós ao longo destes anos, foram datas especiais que eu não pude estar presente, perdi algumas coisas que sei que não conseguirei recuperar, mas saiba que o meu coração esta sempre com você dia e noite, sua alegria é a minha e as suas batalhas são as minhas também, dou a minha vida por você, e só quero que você sinta orgulho de tudo o que fizemos, o que deixamos ir, o que construímos e acima de tudo de nos mantermos unidos, fortalecidos e inabaláveis até o fim; eu te amo mano;

Ao amor da minha vida Junior, você tornou a minha jornada, chamada vida, mais leve e prazerosa, você me deu motivo e incentivo para seguir em frente, você é luz nos dias escuros e calor nos dias lindos e ensolarados, você tira de mim as melhores risadas mesmo quando tudo o que eu quero é chorar e desistir; você estava aqui do meu lado, e com seu computador também, todas as vezes que disse que não conseguiria e todas as vezes que achei que não seria capaz, você segurou a minha mão quando nem eu mesma tinha forças para continuar. Você foi a melhor pessoa

que aconteceu na minha vida, e tenho certeza absoluta que foi essencial em todos os aspectos, você me incentivou, me acolheu, me abraçou e me deu bronca quando eu precisei, e olha que não foram poucas; obrigada por todo o amor, carinho, compreensão, as milhões de doses de paciência e a parceria e incentivo de sempre, obrigada por ser motivo da minha felicidade, por fazer a minha vida mais leve e completa, obrigada por me amar e acreditar no meu potencial mais do que eu mesma, só quero que você tanto orgulho de mim, quanto eu tenho de você, eu te mais que amo infinitamente;

Às minhas sobrinhas Ana Liz, Cecília e Marina, aiaiaiaiaia meu coração, todas as vezes que penso em vocês meu coração se aquece, e uma lágrima corre em meus olhos, adormeço dias e dias vendo fotos e vídeos tentando amenizar a saudade e a falta que eu sinto de abraçar vocês, beijar essas carinhas lindas e acordar com alguma de vocês agarradinha em mim, a maioria das vezes todas ao mesmo tempo. Morar aqui tão longe sempre foi difícil demais para mim, mas depois de vocês é bem mais doloroso, mas saibam que estou aqui longe, porque eu quando tinha a idade de vocês tinha alguns sonhos, umas vontades e seus avôs me ensinaram a sempre ir atrás destes sonhos, nunca deixar para amanhã algo que se quer conquistar hoje e nunca colocar no outro uma expectativa de algo que só depende da gente, quando vocês crescerem vocês vão entender, que não se pode ter tudo e para realizarmos algumas coisas na vida é preciso abrir mão de outras, hoje abrir mão de ver e abraçar vocês a todo momento é a coisa mais difícil, mas como digo a vocês, quando tenho de voltar para cá, estou longe para trabalhar, e também para ter dinheiro para comprar brinquedos, quando vocês puderem entender isso, quero que vocês sintam orgulho desta titis e saibam que não é nada fácil estar longe, mas por enquanto é preciso, e que o meu amor por vocês é maior que o universo, e por vocês eu faço tudo e qualquer coisa, só para ouvir uma gargalhada e sentir um abraço quentinho de chamego no colinho e um beijinho molhado-babado, amo vocês daqui até a lua vai e volta.

A minha cunhada Rafa obrigada por ser essa pessoa tão especial, por cuidar tão bem das pessoas que mais amo no universo, por ser uma delas e por me ajudar a matar um pouco a saudade das minhas princesas, obrigada por ser tão compreensiva e por ser essa mãe, esposa, nora, cunhada tão especial, amo você.

A minha sogrinha Niroca, obrigada pelas palavras de carinho e incentivo, pelas marmitinhas deliciosas que me dão energia para seguir em frente e por me acolher e cuidar de mim como uma filha, amo a senhora.

A minha querida orientadora Iolanda, sempre paciente, compreensiva, com a fala que acalma e tranquiliza, obrigada por ser firme e me direcionar e orientar durante estes 4 anos, saiba que foi um presente tê-la como orientadora e agradeço demais a oportunidade de ter dividido comigo tanto conhecimento, e muito mais além;

Ao querido Renato, amigo e dupla por tantos anos, obrigada por me apresentar esse universo, obrigada por acreditar em mim e no meu potencial, por sempre me incentivar e puxar a minha orelha, você é uma pessoa iluminada, e nem todos os agradecimentos do mundo irão refletir a gratidão que sinto em meu coração por tudo, e o tanto que fez por mim durante todos estes anos;

A Tabata minha amiga, comadre e parceria, obrigada por todo o incentivo e ajuda neste e em todos os diversos trabalhos que temos, dividir a jornada com você tornou tudo mais doce e familiar;

Ao Thiago meu amigo e dupla de jornada, foram longos anos diversas tentativas de desistência, e muito apoio mútuo, mas uma certeza de que eu sempre pude contar com um ombro amigo e um incentivador, sempre compartilhando as dificuldades, e dividindo esta e outras cargas de trabalho, não foi fácil mas com um amigo sempre fica menos difícil, obrigada por tudo e por me apoiar e ajudar sempre, quando precisei você sempre estava lá;

Aos meus chefes Claudia, Edy, Rita, Igor, Wellington e André Albuquerque obrigada por todo o incentivo, apoio e compreensão;

As amigas do LIM-20 Suellen e Sara, só vocês sabem o que passaram para me auxiliar no início, e a palavra que eu tenho para vocês é gratidão, por terem paciência, por amarem o que fazem, por terem compaixão e por serem tão doces e parceiras mesmo diante de tantas dificuldades, obrigada por tanto; e obrigada por morarem lá em casa nos dias de mecânica, vocês deixavam a casa alegre e colorida;

A Edininha, sempre tão meiga, compreensiva, sempre pronta a ouvir um desabafo, com uma palavra positiva, tenho carinho gigantesco por você, obrigada por tudo;

Aos amigos Leandro e Silvia, obrigada por toda a ajuda, por toda a disponibilidade, por saírem de suas casas, para irem me ajudar e me ensinar processos e procedimentos que nem fazia idéia do que eram, vocês foram essenciais para a conclusão desta jornada;

As queridas 'meninas dos peptídeos' Juliana, Jéssica e Luana obrigada por toda a parceria e por dividirem comigo as angústias e frustrações desta jornada;

Aos colegas do LIM-20 obrigada por toda a ajuda na condução de todo o trabalho;

As professoras Dras. Fernanda, Clarice, Bia obrigada por toda a paciência e incentivo, e por todo o carinho com que me receberam no lab;

A Rosana querida, sempre disponível, solícita e carinhosa, mesmo com as milhões de demandas, obrigada por toda ajuda;

Ao querido Davi, obrigada por todo o suporte, pelos cafezinhos e por nos ajudar nos manejos dentro do lab, você é essencial para que tudo corra na mais pereita ordem.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1	Poluição Ambiental	19
1.2	Padrões de Qualidade do Ar	23
1.3	Município de Vitória.....	25
1.4	Asma.....	28
1.5	Fisiopatologia da Asma	30
1.6	Remodelamento.....	32
1.7	Hiperresponsividade das Vias Aéreas	35
1.8	Óxido nítrico, Estresse Oxidativo e Isoprostano	36
1.9	Vias Sinalizadoras NFκB.....	44
1.10	Efeitos do Material Particulado.....	46
2.	JUSTIFICATIVA	50
3.	OBJETIVOS.....	51
3.1	Objetivo Geral	51
3.2	Objetivos Específicos.....	51
4.	MATERIAIS e MÉTODOS	53
4.1	Grupos Experimentais.....	53
4.2	Protocolo de Inflamação Pulmonar Alérgica Crônica	54
4.3	Protocolo de Exposição Ambiental	55
4.4	Óxido Nítrico Exalado (NOex).....	56
4.5	Hiperresponsividade á Metacolina	57
4.6	Análise do Fluido do lavado broncoalveolar (FLBA).....	58
4.7	Histologia e Imunohistoquímica.....	59
4.8	Análise Morfométrica.....	61
4.9	Análise de Imagens.....	62
4.10	Análise Estatística.....	63
5.	RESULTADOS	64
5.1	Verão	64
5.1.1	Hiperresponsividade á Metacolina	64
5.1.2	Óxido Nítrico Exalado	68
5.1.3	Análise do Fluido do Lavado Broncoalveolar (FLBA)	69
5.1.4	Inflamação.....	71
5.1.5	Remodelamento.....	76

5.1.6	Estresse Oxidativo.....	81
5.1.7	Vias Sinalizadoras.....	84
5.1.8	Correlação.....	85
5.1.9	Análise Qualitativa.....	88
5.2	Inverno.....	90
5.2.1	Hiperresponsividade á Metacolina.....	90
5.2.2	Óxido Nítrico Exalado.....	94
5.2.3	Análise do Fluído do Lavado Broncoalveolar (FLBA).....	94
5.2.4	Inflamação.....	96
5.2.5	Remodelamento.....	101
5.2.6	Avaliação do Número de Células Positivas de TGF- β na Parede Brônquica.....	104
5.2.7	Estresse Oxidativo.....	106
5.2.8	Vias Sinalizadoras.....	109
5.2.9	Correlação.....	110
5.2.10	Análise Qualitativa.....	113
5.3	Resultados Parciais do Material Particulado.....	114
6.	DISCUSSÃO.....	116
7.	CONCLUSÕES.....	127
8.	REFERÊNCIAS.....	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das vias áreas onde o material particulado é depositado de acordo com seu tamanho.....	20
Figura 2 – Fisiopatologia da Asma	31
Figura 3 - Grau de Estresse Oxidativo	42
Figura 4 - Esquema da via do estresse oxidativo e a participação do isoprostano ...	44
Figura 5 - Ativação do NFκB e sua ligação no estresse oxidativo.....	46
Figura 6 - Adaptado de LI, et al. 2018.....	49
Figura 7 - Locais de exposição ambiental.....	55
Figura 8 - Protocolo de exposição ambiental no modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica.....	56
Figura 9 - Diluição dos marcadores, anticorpo primário e especificações.....	61
Figura 10 - Contagem de células positivas.....	62
Figura 11 – Porcentagem de aumento da Rrs.....	64
Figura 12 – Porcentagem de aumento da Ers.....	65
Figura 13 - Porcentagem de aumento da Raw.....	66
Figura 14 - Porcentagem de aumento da Gtis.....	67
Figura 15 - Porcentagem de aumento da Htis.....	68
Figura 16 – Óxido Nítrico Exalado (ppb)	69
Figura 17 - Número de células positivas para IL-4 nas vias aéreas	72
Figura 18 - Número de células positivas para IL-5 nas vias aéreas	73
Figura 19 - Número de células positivas para IL-10 nas vias aéreas	74
Figura 20 - Número de células positivas para IL-13 nas vias aéreas	75
Figura 21 - Número de células positivas para IL-17 nas vias aéreas	76
Figura 22 - Número de células positivas para TIMP1 nas vias aéreas.....	77
Figura 23 - Número de células positivas para MMP9 nas vias aéreas.....	78
Figura 24 - Número de células positivas para MMP12 nas vias aéreas.....	79
Figura 25 - Número de células positivas para TGF-β nas vias aéreas.....	80
Figura 26 - Porcentagem de fibras colágenas nas vias aéreas.....	81
Figura 27 - Número de células positivas para iNOS nas vias aéreas.....	82
Figura 28 - Porcentagem de isoprostano nas vias aéreas	83
Figura 29 - Número de células positivas para GP91phox nas vias aéreas	84
Figura 30 - Número de células positivas para NFκB nas vias aéreas	85
Figura 31 - Correlação entre hiperresponsividade brônquica e parâmetros inflamatórios e de remodelamento.....	87
Figura 32 - Fotomicrografias representativas ilustram os processos inflamatórios, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo nas vias aéreas.....	89
Figura 33 - Porcentagem de aumento da Rrs	90
Figura 34 - Porcentagem de aumento da Ers.....	91
Figura 35 - Porcentagem de aumento da Raw.....	92
Figura 36 - Porcentagem de aumento de Gtis.....	93
Figura 37 - Porcentagem de aumento de Htis.....	94
Figura 38 - Número de células positivas para IL-4 nas vias aéreas	97

Figura 39 - Número de células positivas para IL-5 nas vias aéreas	98
Figura 40 - Número de células positivas para IL-10 nas vias aéreas	99
Figura 41 - Número de células positivas para IL-13 nas vias aéreas	100
Figura 42 - Número de células positivas para IL-17 nas vias aéreas	101
Figura 43 - Número de células positivas para TIMP1 nas vias aéreas.....	102
Figura 44 - Número de células positivas para MMP12 nas vias aéreas	103
Figura 45 - Número de células positivas para MMP12 nas vias aéreas	104
Figura 46 - Número de células positivas para TGF- β nas vias aéreas.....	105
Figura 47 - Porcentagem de fibras colágenas nas vias aéreas.....	106
Figura 48 - Número de células positivas para iNOS nas vias aéreas.....	107
Figura 49 - Porcentagem de isoprostano nas vias aéreas	108
Figura 50 - Número de células positivas para GP91phox nas vias aéreas	109
Figura 51- Número de células positivas para NF κ B nas vias aéreas	110
Figura 52 - Correlação entre hiperresponsividade brônquica e parâmetros inflamatórios e de remodelamento.	112
Figura 53 - Fotomicrografias representativas ilustram os processos inflamatórios, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo nas vias aéreas.....	114
Figura 54 - Análise do material particulado.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Índice de Qualidade do Ar	24
Tabela 2 - Qualidade do Ar e Efeitos á Saúde	25
Tabela 3 – Flúido do Lavado Broncoalveolar – Células totais e diferenciais Verão	70
Tabela 4 - Flúido do Lavado Broncoalveolar – Células totais e diferenciais Inverno	95

LISTA DE ABREVIATURAS

Al – Alumínio
 Al[OH]₃ – Hidróxido de Alumínio
 Ca – Cálcio
 Ca²⁺ - Cálcio Ionizado
 CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
 Cl – Cloro
 CLM – Cadeia Leve de Miosina
 CO – Monóxido de Carbono
 CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente
 Cr – Crômio
 DNA – Acido desoxirribonucléico
 DPOC – Doença pulmonar obstrutiva Crônica
 eNOS – Óxido Nítrico Sintases Derivada do endotélio
 Ers – Elastância do sistema respiratório
 Fe – Ferro
 FGF – Fator de Crescimento Fibroblástico
 FLBA – Flúido do Lavado Broncoalveolar
 FOXP₃ – Forkhead box 3 - Proteína Fox3
 GINA – Global Initiative National of Asthma
 Gtis – Resistência de vias aéreas menores ou tecido pulmonar
 H₂O₂ – Peroxido de Hidrogênio
 HO – Hidroxila
 HRVA- Hiperresponsividade das Vias Aéreas
 Htis – Elastância de tecidos pulmonares
 Ig – Imunoglobulina
 IL - interleucina
 iNOS - Oxido Nítrico Sintases Induzida
 iNOS – óxido Nítrico Sintase Induzida
 IQAR – Índice de qualidade do Ar
 MEC – Matriz extracelular
 Mg – Magnésio
 MMP12 – Metaloprotease 12
 MMP9 – Metaloprotease 9
 Mn – Manganês
 MP – Material Particulado
 MP_{0,1} – Material Particulado <0,1 µm
 MP₁₀ – Material Particulado 10 µm
 MP_{2,5} – Material Particulado 2,5 µm
 mRNA – Ácido Ribonucléico mensageiro
 Na -Sódio
 NaCl 0,9% - Solução Salina
 NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
 NFκB – Fator Nuclear de Transcrição κB
 Ni – Níquel
 NIH – National Institute of Health

nNOS - Óxido Nítrico Sintases Derivada dos Neurônios
NO – Óxido Nítrico
NO₂ – Dióxido de Nitrogênio
NOex – Óxido Nítrico exalado
NOS – Óxido Nítrico Sintases
NOX – NADPH Oxidases
Nrf₂ – Fator Nuclear tipo 2
O₂⁻ – Superóxido
O₂ – Oxigênio
O₃ – Ozônio
OMS – Organização Mundial de Saúde
ONOO⁻ - Peroxinitrito
OVA – Grupo ovoalbumina Controle
OVA L1 – grupo Ovoalbumina exposto ao local1
OVA L2 – Grupo Ovoalbumina exposto ao local 2
pH – Peroxido Orgânico
PI – Partículas Inaláveis
PIB – Produto Interno Bruto
PTS – Partículas Totais em Suspensão
RAGE – Produtos finais de glicação avançada
Raw – Resistência de vias aéreas maiores
RHD – Rel Homology Domain
RMGV – Região Metropolitana da Grande Vitória
RO₂⁻ - Peroxil
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
Rrs – Resistência do Sistema Respiratório
SAL – Grupo Salina Controle
SAL L1 – Grupo Salina exposto ao Local 1
SAL L2 – Grupo Salina exposto ao Local 2
Si - Silício
SLN – Sinal de Localização Nuclear
SO₂ – Enxofre
TGF-β – Fator de Transformação de Crescimento Beta
Th₁ – Célula de Perfil T helper1
Th₁₇ – Célula de perfil T helper17
Th₂ – Célula de Perfil T helper2
TIMP1 – Inibidor da Metalopeptidase 1
TLR's – Receptores Toll-like
TNFα – Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg – Células T reguladoras
Zn – Zinco

RESUMO

Campos, EC. Efeitos da poluição ambiental na hiperresponsividade brônquica, inflamação, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica. 2023. 141f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Introdução: A exposição ambiental à poeira mineral crescente na maioria das cidades industrializadas pode exercer efeitos nocivos em indivíduos saudáveis e exacerbar doenças alérgicas crônicas durante o inverno e o verão. **Objetivo:** Avaliar o impacto da exposição ambiental ao pó de metal na resposta de hiperresponsividade, inflamação, remodelamento e estresse oxidativo em modelos de asma e controles, em dois diferentes locais próximos a um centro de mineração na cidade de Vitória, Espírito Santo – Brasil. **Materiais e métodos:** Setenta e dois camundongos machos BALB/c foram divididos em seis grupos: SAL (grupo controle, não exposto); OVA (não exposto à ovoalbumina); SAL-L1 e OVA-L1 (expostos a poeira mineral de mineradora que pelletiza minério de ferro no centro de mineração local 1); e SAL-L2 e OVA-L2 (expostos a poeira mineral que fica a aproximadamente três milhas do primeiro local; local 2) por duas semanas. No trigésimo terceiro dia do protocolo, foram avaliadas hiperresponsividade, óxido nítrico exalado (NOex), lavado broncoalveolar (FLBA), inflamação, remodelamento da matriz extracelular e respostas ao estresse oxidativo. **Resultados:** os grupos SAL-L1 e SAL-L2 tiveram um aumento na hiperresponsividade após o desafio com metacolina; no número de células positivas para citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-5) e Th17 (IL-17); no número de células positivas para avaliação do remodelamento (TIMP1, MMP9, MMP12 e TGF- β) e avaliação do estresse oxidativo (iNOS e GP91phox); assim como nos níveis de isoprostano e NOex em relação ao SAL ($p \leq 0,05$) durante as estações de verão e inverno. Os níveis de NF κ B aumentaram em SAL-L1 e SAL-L2 durante o inverno em comparação com SAL. Os grupos OVA-L1 e OVA-L2 apresentaram maior resistência do sistema respiratório e das vias aéreas em relação ao grupo OVA; uma exacerbação da resposta inflamatória Th2, durante ambas as estações, e uma exacerbação da resposta inflamatória Th17, durante o verão; aumento do número de células positivas para remodelamento (TIMP1, MMP9 e MMP12) nas duas estações; bem como um aumento na porcentagem de isoprostano durante ambas as estações em relação ao grupo OVA. O aumento do estresse oxidativo ocorreu devido ao aumento do número de células positivas para iNOS durante as duas estações nos grupos OVA-L1 e OVA-L2 em comparação ao grupo OVA. **Conclusões:** A exposição ambiental ao pó mineral induziu mudanças significativas nas respostas de hiperresponsividade, inflamação, remodelamento e estresse oxidativo em camundongos saudáveis e exacerbou essas mesmas respostas em animais asmáticos. Os mecanismos envolvidos dependem da ativação de iNOS e NF κ B.

Palavras-Chave: 1.Asma, 2.poluição ambiental, 3.estresse oxidativo, 4.inflamação, 5.remodelamento das vias aéreas, 6.modelos animais

ABSTRACT

Campos, EC. Effects of environmental pollution on bronchial hyperresponsiveness, inflammation, extracellular matrix remodeling and oxidative stress in mice with chronic allergic lung inflammation. 2023. 141f. Thesis (Doctorate in Medical Sciences) - Faculty of Medicine. University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2023.

Introduction: Environmental exposure to mineral dust growing in most industrialized cities can exert harmful effects on healthy individuals and exacerbate chronic allergic diseases during winter and summer. Objective: To evaluate the impact of environmental exposure to metal dust on hyperresponsiveness, inflammation, remodeling and oxidative stress in asthma models and controls, in two different locations near a mining center in the city of Vitória, Espírito Santo - Brazil. **Materials and methods:** Seventy-two male BALB/c mice were divided into six groups: SAL (control group, unexposed); OVA (not exposed to ovalbumin); SAL-L1 and OVA-L1 (exposed to mineral dust from a mining company that pellets iron ore in mining center place 1); and SAL-L2 and OVA-L2 (exposed to mineral dust which is approximately three miles from the first place, place 2) for two weeks. On the thirty-third day of the protocol, hyperresponsiveness, exhaled nitric oxide (NO_{ex}), bronchoalveolar lavage (BALF), inflammation, extracellular matrix remodeling and responses to oxidative stress were evaluated. **Results:** SAL-L1 and SAL-L2 groups had an increase in hyperresponsiveness after methacholine challenge; in the number of cells positive for Th2 (IL-4 and IL-5) and Th17 (IL-17) cytokines; the number of positive cells for evaluation of remodeling (TIMP1, MMP9, MMP12 and TGF- β) and assessment of oxidative stress (iNOS and GP91phox); as well as isoprostane and NO_{ex} levels in relation to SALT ($p \leq 0.05$) during the summer and winter seasons. NF κ B levels increased in SAL-L1 and SAL-L2 during winter compared to SAL. The OVA-L1 and OVA-L2 groups showed greater respiratory system and airway resistance compared to the OVA group; an exacerbation of the Th2 inflammatory response, during both seasons, and an exacerbation of the Th17 inflammatory response, during the summer; increase in the number of positive cells for remodeling (TIMP1, MMP9 and MMP12) in both seasons; as well as an increase in the percentage of isoprostane during both seasons in relation to the OVA group. The increase in oxidative stress was due to the increase in the number of iNOS-positive cells during the two seasons in the OVA-L1 and OVA-L2 groups compared to the OVA group. **Conclusions:** Environmental exposure to mineral dust induced significant changes in hyperresponsiveness, inflammation, remodeling and oxidative stress responses in healthy mice and exacerbated these same responses in asthmatic animals. The mechanisms involved depend on iNOS and NF κ B activation.

Keywords: 1.Asthma, 2.environmental pollution, 3.oxidative stress, 4.inflammation, 5.airway remodeling, 6.animal models

1. INTRODUÇÃO

1.1 Poluição Ambiental

A poluição ambiental é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) (2022) como um dos principais fatores responsáveis pelo aumento do número de mortes, desenvolvimento de doenças e geração de incapacidades em diversos países do mundo. Esta organização atribui cerca de 7 milhões de mortes a cada ano à poluição mundialmente (OMS/WHO, 2022).

O material particulado (MP) é um termo genérico usado para designar partículas de diferentes estruturas químicas e diâmetros, variando de grosso, fino e ultrafino; essas partículas são divididas em: ultrafinas com partículas menores que 0,1 μm ($\text{MP}_{0,1}$), finas com diâmetro menor que 2,5 μm ($\text{MP}_{2,5}$) e grossas com diâmetro entre 10 μm e 2,5 μm (MP_{10}) (CHEN et al., 2007).

As partículas finas são as que têm o maior impacto na saúde humana gerando maiores prejuízos (OMS/WHO, 2014). Os efeitos prejudiciais à saúde variam de inflamação pulmonar crônica, redução da função pulmonar e exacerbações de asma até a risco elevado para o desenvolvimento de doença cardiovascular e (CURTIS et al., 2006).

O MP_{10} quando em suspensão no ar, ao ser inalado geralmente é depositado no trato respiratório superior e está associado ao desencadeamento de diversas doenças, além dos danos respiratórios em principal a asma (SAYGIN et al., 2017), podem levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DASTOORPOOR et

al., 2020; MOMTAZAM et al., 2019), vários tipos de cânceres (CHU et al., 2019; LI e GAO, 2014), tuberculose (SARKAR et al., 2019).

Um grande estudo epidemiológico, de coorte, que incluiu cerca de 39.054 participantes demonstrou que o aumento de $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ na concentração de MP_{10} está associado ao aumento de 3,4% a 6% da mortalidade por câncer de pulmão (CHEN et al., 2016).

A poluição por MP é um problema de saúde ambiental e que afeta milhares de pessoas no mundo todo, contudo países de baixa e média renda sofrem demasiada e desproporcionalmente com tal consequência (OMS/WHO, 2014).

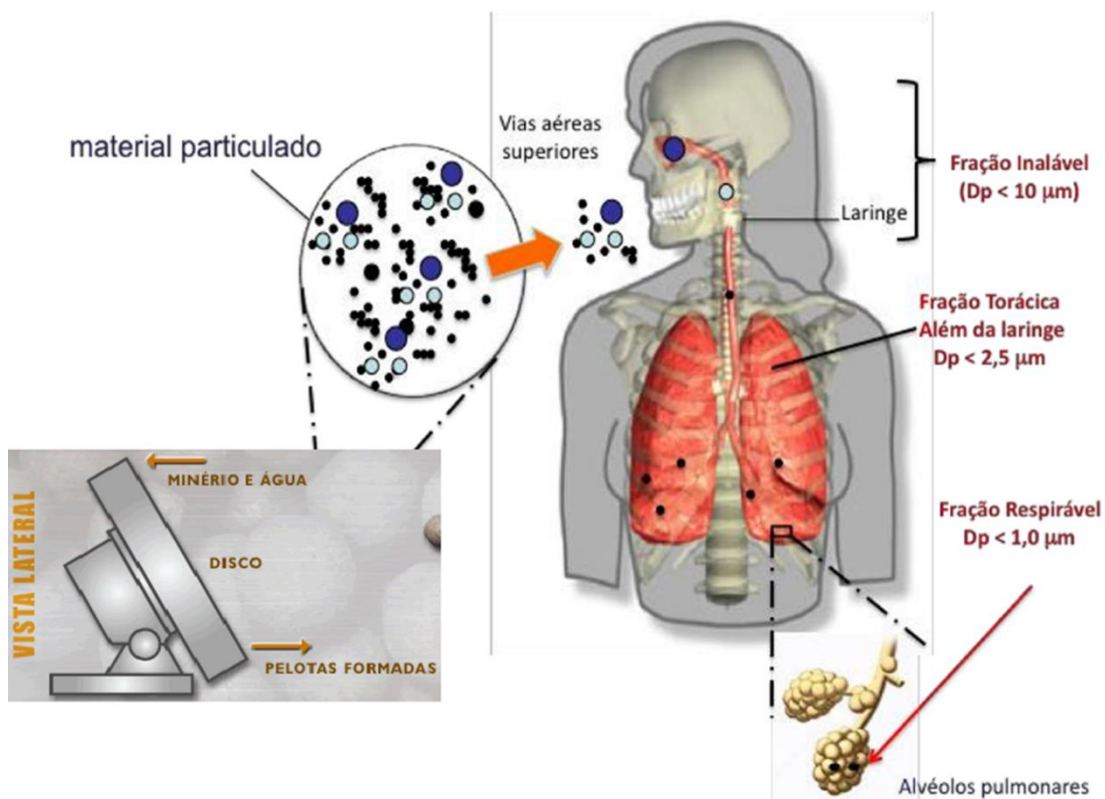


Figura 1 - Representação das vias áreas onde o material particulado é depositado de acordo com seu tamanho.

Adaptado de Guarieiro et al., 2013.

Globalmente, estima-se que a poluição do ar ambiente seja a causa de 26%

das mortes por infecções respiratórias, 16% das mortes por câncer de pulmão, 25% das mortes por doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), 17% das doenças isquêmicas do coração e acidente vascular cerebral (OMS/WHO, 2022).

Nas grandes cidades do mundo também conhecidas com grandes polos industriais, diversos estudos tem sido realizados, eles vem mostrando que, em sua maioria as emissões de poluentes estão sim, em conformidade com os padrões estabelecidos internacionalmente; porém as elevações crescentes nos níveis de poluição dentro de curtos períodos de tempo, e que já estão presentes em grandes cidades por longos períodos desde a revolução industrial, são capazes de promover efeitos deletérios á saúde das populações expostas (OPAS. OMS, 2008).

O manejo de materiais que metálicos podem propagar na atmosfera grandes quantidades destes metais, incluindo o ferro (Fe), níquel (Ni), manganês (Mn), zinco (Zn) e crômio (Cr) (PARCHAMI et al. 2022).

Um estudo longitudinal realizado na Áustria evidenciou redução na função pulmonar em trabalhadores que possuíam exposição ocupacional a algum tipo de metal pesado (HALUZA et al., 2014). Outros estudos relataram que a exposição a vapores de soldagem gerou aumento de sintomas respiratórios e aumentou a incidência de asma ocupacional nos trabalhadores expostos (WITTCZAK et al., 2012; HEDMER et al., 2014).

Pesquisas ambientais em geral caracterizam o monóxido de carbono (CO) como sendo um dos principais compostos poluentes presentes na atmosfera; ele é gerado principalmente por veículos automotores durante a queima incompleta de carbono em reações de combustão, este possui efeitos comprovados na exacerbação da asma e DPOC (CURTIS et al., 2006).

O monóxido (NO) e dióxido de nitrogênio (NO₂) precursores do ozônio (O₃),

criado a partir de uma série complexa de reações fotoquímicas envolvendo compostos orgânicos voláteis tendo a queima de combustível fóssil como sua principal fonte, são poluentes presente nas camadas mais baixas da atmosfera; por sua formação depender da interação com o sol, os períodos de pico de concentração deste poluente no ambiente pe evidenciado nos meses de verão e próximo ao meio dia; ele está associado ao aumento de casos de DPOC, número de crises de asma, bronquite e, tosse crônica em crianças e idosos (CURTIS et al., 2006).

Chenguang et al. (2017) caracterizaram que a exposição ao MP (MP_{2.5}/MP₁₀) foi determinante para o aumento de internações hospitalares pediátricas por pneumonia, particularmente durante a estação quente.

Evidências associam a exposição ambiental a metais á alterações respiratórios adversas (ROSA et al. 2016). Estudo recente evidenciou medidas de função pulmonar menores em crianças na China que vivem em uma cidade referência em processamento de lixo eletrônico com alta concentração de Mn, Ni e Cr (ZHENG et al., 2013).

Nos Estados Unidos, houve maior risco de internações por doenças cardiovasculares e respiratórias nos municípios com níveis mais elevados de Ni (BELL et al., 2010). Na cidade de Nova York, as medidas ambientais locais do Ni foram associadas com maior probabilidade de sibilância em crianças com 2 anos (PATEL et al., 2009). Os níveis de Zn estão correlacionados ao aumento nas visitas ao departamento de emergência, e hospitalizações por asma em uma população pediátrica em Baltimore (HIRSHON et al., 2008).

Níveis ambientais aumentados de Fe e Zn foram associados com internações hospitalares respiratórias entre crianças na Califórnia (OSTRO et al., 2009). Uma revisão da literatura relatou que a maioria dos estudos analisados houve aumento do

risco morbidade respiratória com as crescentes concentrações desses metais no MP ambiental (GRAY et al., 2015).

1.2 Padrões de Qualidade do Ar

A qualidade do ar é responsável diretamente pelo clima na Terra e influência diretamente todos os ecossistemas do planeta. Muitos dos poluentes presentes no ar também são fontes de emissões de gases que geram o efeito estufa; portanto políticas para reduzir a poluição do ar são essenciais estratégias tanto para preservação do clima e quanto manutenção da saúde mundial, minimizando desta forma a quantidade de doenças decorrentes da poluição do ar, além de contribuir para a mitigação de das mudanças climáticas (OMS/WHO, 2022).

No Brasil o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) é responsável por estabelecer os padrões de qualidade do ar, este órgão gere a qualidade do ar através da medição de poluentes e avalia seus efeitos sobre a saúde humana (RESOLUÇÃO Nº 491, DE 19 DE NOVEMBRO DE 2018) (CETESB, 2019).

O Índice de Qualidade do Ar (IQAR) é um indicador capaz de avaliar os efeitos dos poluentes que são monitorados e suas consequências para a população, este indicador é obtido por meio do uso de uma fórmula matemática aplicada aos resultados de concentração de poluentes obtidos; o ar recebe uma qualificação, que consiste em uma nota para a qualidade do ar, além de uma cor, conforme apresentado na Erro! Autoreferência de indicador não válida., tornando-se possível classificar a qualidade do ar em boa, moderada, ruim, muito ruim ou péssima, a depender do índice obtido (CETESB, 2019).

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

O nível de partículas inaláveis (PI) ou MP₁₀ é medido por meio da separação inercial/filtração, em 24 horas, num padrão primário de 150 µg/m³. O nível de partículas totais em suspensão (PTS) é medido por meio do amostrador de grandes volumes, em 24 horas, num padrão primário de 240 µg/m³ (CETESB, 2019).

Estudo da OMS/WHO (2022) demonstrou aumento de 6% na quantidade de MP₁₀ em São Paulo do ano de 2018 para o ano de 2019; onde em 2018 a quantidade de MP₁₀ era de 27,28 µg/m³ e em 2019 elevou-se para MP₁₀ 29,01 µg/m³.

A **tabela 2** demonstra os possíveis efeitos segundo a OMS/WHO (2022) e CETESB (2019) da classificação da qualidade do ar na saúde dos indivíduos.

Tabela 2 - Qualidade do Ar e Efeitos à Saúde

Qualidade do ar e efeitos à saúde		
Qualidade	Índice	Significado
N1 – Boa	0 – 40	
N2 – Moderada	41 – 80	Pessoas de grupos sensíveis (crianças, idosos e pessoas com doenças respiratórias e cardíacas) podem apresentar sintomas como tosse seca e cansaço. A população, em geral, não é afetada.
N3 – Ruim	81 – 120	Toda a população pode apresentar sintomas como tosse seca, cansaço, ardor nos olhos, nariz e garganta. Pessoas de grupos sensíveis (crianças, idosos e pessoas com doenças respiratórias e cardíacas) podem apresentar efeitos mais sérios na saúde.
N4 – Muito Ruim	121 – 200	Toda a população pode apresentar agravamento dos sintomas como tosse seca, cansaço, ardor nos olhos, nariz e garganta e ainda falta de ar e respiração ofegante. Efeitos ainda mais graves à saúde de grupos sensíveis (crianças, idosos e pessoas com doenças respiratórias e cardíacas).
N5 – Péssima	>200	Toda a população pode apresentar sérios riscos de manifestações de doenças respiratórias e cardiovasculares. Aumento de mortes prematuras em pessoas de grupos sensíveis.

Fonte: Cetesb, 2019.

1.3 Município de Vitória

A Região Metropolitana da Grande Vitória (RMGV) é um dos principais pólos econômicos de desenvolvimento urbano e industrial do Estado do Espírito Santo, ela abrange uma área de 1.461 km², e possui população equivalente a 2 milhões de habitantes (IBGE, 2021), cerca de 50% da população de todo o Estado (IEMA, 2021). A RMGV engloba os 5 municípios: Serra, Cariacica, Vitória, Viana e Vila Velha. A área desta região é sabidamente formada por topografia complexa, onde seu relevo varia

desde uma planície litorânea às colinas; bem como sua ocupação do solo varia, desde extensas áreas com cobertura vegetal, até a grande presença de pavimentação nas cidades e alguns entornos. A sua proximidade com o oceano, bem como a sua topografia controlam as condições meteorológicas, o que favorece a dispersão de poluentes na região (IEMA, 2021).

A economia do Estado do Espírito Santo, onde se encontra a RMGV, foco deste estudo, vem crescendo exponencialmente nos últimos anos, especialmente, a partir de 2003, com incrementos das taxas de crescimento do Produto Interno Bruto (PIB) superiores à média nacional; todo esse desenvolvimento deveu-se principalmente à instalação e ampliação de diversas indústrias e empresas nesta região, fato que como ônus a todo esse crescimento houve a elevação nos níveis de poluição atmosférica local, a despeito de diversas regulamentações impostas pelos órgãos de controle ambiental a essas indústrias e empresas (IEMA, 2021).

O crescimento industrial trás consigo crescimento populacional e contudo acréscimo considerável da frota de veículos, e além de maior consumo de energia, a associação destes fatores contribuem para o aumento da emissão de poluentes na região (ZAMBON MONTE et al., 2016). Em particular, na RMGV a qualidade do ar deteriorou-se devido à atividade de industrialização e urbanização (PEDRUZZI et al., 2019).

Diversos estudos têm realizado a análise da dinâmica dos processos envolvidos na emissão, e formação dos aerossóis em regiões O interesse científico, em especial, por partículas na atmosfera está relacionado a seus efeitos sobre o clima, meio-ambiente, visibilidade e ao risco à saúde humana (LORIATO et al. 2018; PEDRUZZI et al. 2019).

Segundo Loriato et al. (2018) há 3 grupos de principais fontes de emissão de poluentes atmosféricos na região: veículos, indústria minerosiderúrgica e as operações de portos e aeroportos com níveis de emissão significativos de dióxido de enxofre (SO₂) e óxido nítrico (NO) (LORIATO et al., 2018).

O tráfego veicular intenso é responsável por gerar alta quantidade de ressuspensão de poeira do solo já depositadas nas ruas; tal ressuspensão representa um interessante acoplamento entre a poluição gerada por veículos automotores e outras fontes de poluição, visto que a composição das partículas presentes nas vias de Vitória apresentam componentes que estão relacionados ao solo propriamente dito, como alumínio (Al) e silício (Si) e a partículas provenientes de emissões industriais e outras fontes como aerossolização marítima; dentre os componentes não comuns ao solo pode-se destacar sódio (Na), cloro (Cl), magnésio (Mg), ferro (Fe) e cálcio (Ca), conforme identificado no estudo efetuado por Santos e Reis (2011).

Pedruzzi et al. (2019) concluíram que as emissões locais somadas as influências das emissões externas na região de Vitória foram responsáveis por causar aumento nas concentrações de MP e O₃, e potencialização destas concentrações levou ao aumento nas exposições e reclamações referentes à poluição do ar em Vitória; as autoridades locais e a Agência de Proteção Ambiental Estadual trabalham incessantemente com objetivo de desenvolver estratégias para reduzir a poluição local do ar e minimizar os impactos a população.

Santos e Reis (2011) analisaram o perfil químico de amostras da região de Vitória, e observaram que as partículas coletadas nos pontos mais próximos do distrito industrial e nos principais portos da região, apresentam quantidade considerável de Fe. Sabe-se que a principal atividade industrial regional é gerida pela indústria

siderúrgica e ao transporte de minério de ferro, pelotização do pó de minério de ferro, carvão, aço, dentre outros produtos. Os pontos de amostragem mais distantes da região industrial apresentam maior concentração de Ca, Si e Al, que são uma forte indicação de poeira do solo. Além disso, existe uma forte presença de Cl nas amostras, que podem ser relacionadas com a proximidade do mar, ou seja, com a presença de aerossóis marinhos.

Estudo da OMS/WHO (2014) constatou aumento de 15% na quantidade de MP₁₀ em Vitória do ano de 2018 para o ano de 2019 ; onde em 2018 a quantidade de MP₁₀ era de 17,44 µg/m³ e em 2019 elevou-se para MP₁₀ 20,18 µg/m³.

As condições meteorológicas são fundamentais para a dispersão ou acúmulo de poluentes (MOREIRA et al, 2008); fatores como umidade relativa, temperatura, velocidade e direção do vento, entre outros estão diretamente relacionados a poluição do ar (LIU; JOHNSON, 2002). A baixa umidade relativa e a reduzida velocidade do vento tendem a elevar os níveis de poluente. A ocorrência de precipitação pluviométrica e o aumento da velocidade do vento contribuem para a dispersão e diluição dos poluentes e, conseqüentemente, para a redução da concentração dos mesmos (MOREIRA et al, 2008; LIU; JOHNSON, 2002). Zambon Monte et al. (2016) concluíram que as diferenças entre as estações mais chuvosas e secas interferem diretamente sobre os níveis de poluição, concluindo que na estação do verão ocorrem maiores volumes de chuvas do que no inverno, por exemplo, a tendência é que para poluentes como o MP₁₀, a concentração seja menor no verão.

1.4 Asma

A asma é definida como uma doença crônica caracterizada por hiperresponsividade brônquica, inflamação pulmonar, resposta de remodelamento das vias aéreas e obstrução das vias aéreas (MEYER et al., 2014).

Considerada uma condição heterogênea, a asma cursa com episódios agudos (exacerbações) que revertem espontaneamente ou após tratamento, sobre um segundo plano de inflamação crônica e/ou mudanças estruturais que podem estar associadas a sintomas persistentes e redução da função pulmonar (GINA, 2022).

Determinada por fatores genéticos e ambientais a patogênese da asma permanece sendo elucidada e grande parte da sua definição permanece sendo descritiva. Em definição elaborada em 2022 pela *Global Initiative National of Asthma* (GINA), onde leva-se em consideração características clínicas, fisiológicas e patológicas, definiu-se que:

“A asma é uma doença heterogênea, geralmente caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas. É definida pela história de sintomas respiratórios como sibilos, falta de ar, aperto no peito e tosse que variam com o tempo e em intensidade, juntamente com limitação variável ao fluxo aéreo expiratório.” GINA, 2022.

A asma pode acometer todas as faixas etárias por tratar-se de uma doença multifatorial; há dois fatores principais que podem gerar o desenvolvimento da inflamação e a hiperresponsividade brônquica presente na crise asmática: o primeiro inclui os fatores predisponentes (genéticos) e o segundo é uma estreita relação entre os fatores ambientais e a doença, tais como: poeira, pólen, fungos, alimentos, fármacos, insetos, exercício, alterações ambientais e meteorológicas, poluentes atmosféricos, infecções, irritantes químicos, estresse e vários outros (LEMANSKE e BUSSE, 2010).

A hiperresponsividade é a principal responsável pelos recorrentes episódios de sibilos, dispnéia, tiragem intercostal e tosse (BRANNAN, 2010). De forma geral, os mecanismos que influenciam o desenvolvimento e a expressão da asma são extremamente complexos e interativos.

1.5 Fisiopatologia da Asma

Em indivíduos atópicos, o processo alérgico é desencadeado ao entrar em contato com o alérgeno. Esse processo é composto por reações imediata e tardia; inicia-se imediatamente após a ativação das células que liberam a imunoglobulina E (IgE) que é responsável pela rápida ativação de macrófagos e mastócitos das vias aéreas; estas células ativas secretam mediadores que promovem a indução da contração da musculatura lisa das vias aéreas aumentando, contudo, a secreção de muco, promovendo a vasodilatação e exsudação de plasma, que pode deteriorar a integridade epitelial. Já reação inflamatória tardia ocorre no período de 6 a 9 horas após o contato com o alérgeno, e envolve a mobilização e ativação de eosinófilos, células T CD4⁺, neutrófilos, basófilos e macrófagos, ocorrendo conseqüentemente a liberação de várias citocinas e mediadores pró-inflamatórios (ÜBEL et al. 2014).

Este momento soma-se às alterações presentes na fase imediata, bem como por aumento da hiperresponsividade brônquica (BOUSQUET et al., 2000). As células dendríticas presentes no epitélio das vias aéreas são ativadas pela presença do alérgeno, fato que transcorre em uma cascata de eventos que culmina na produção de mais citocinas que são responsáveis por recrutar mais neutrófilos, monócitos e células dendríticas para as vias aéreas, além de promover a transformação de células T CD4⁺ em células de perfil T helper-2 (Th₂) (BUC et al., 2009). A célula Th₂ libera interleucinas como interleucina-4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 13 (IL-13).

A IL-4 induz os linfócitos a produzirem IgE, a IgE se liga à superfície dos mastócitos; os mastócitos são fundamentais na iniciação da asma com liberação de mediadores de fase aguda e, quando ativados, liberam algumas substâncias, incluindo IL-4, IL-5, histamina, leucotrienos e prostaglandinas (figura 2).

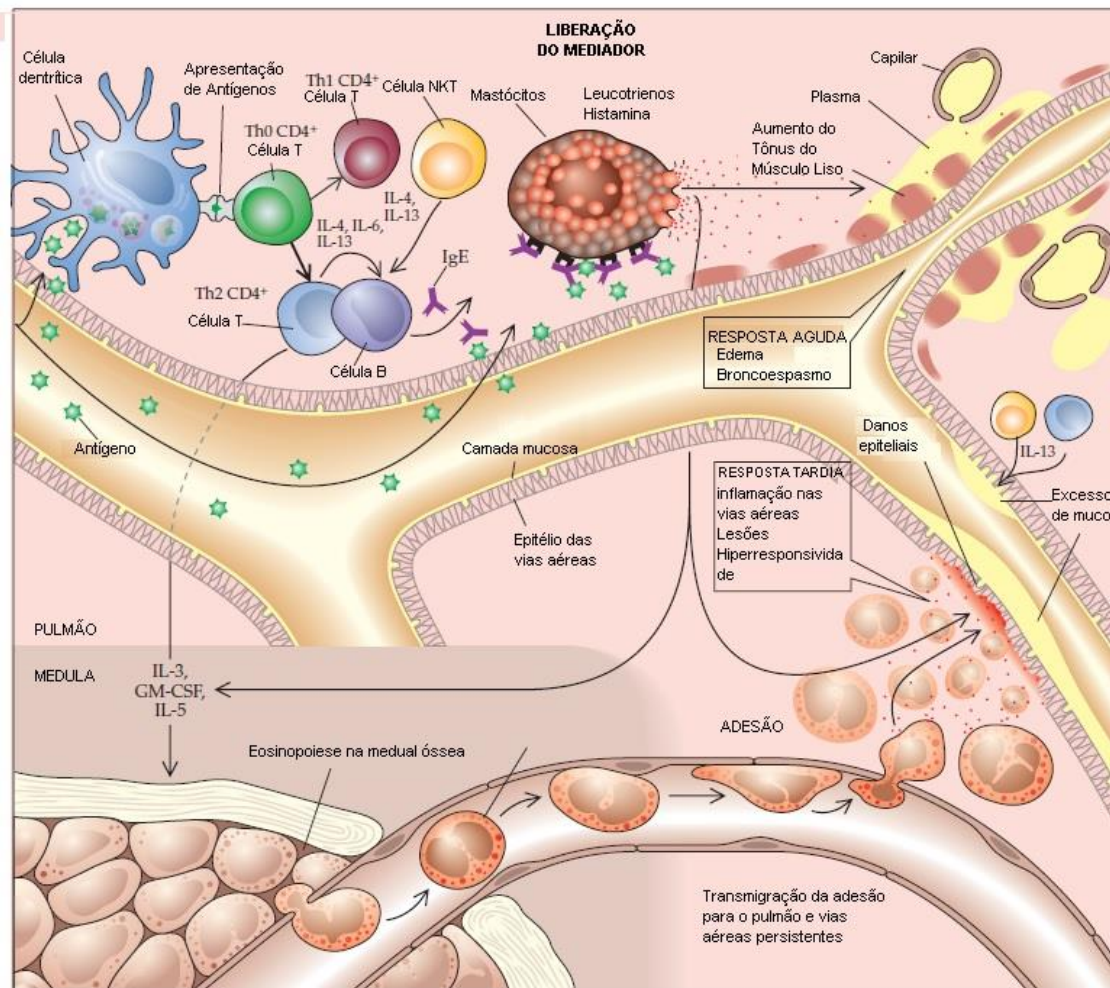


Figura 2 – Fisiopatologia da Asma

Fonte: Grayson MH, Holtzman MJ. *Asthma*. ACP Medicine. 2013.

A IL-4 secretada pelos mastócitos serve para perpetuar a produção de IgE e consequentemente, os eventos inflamatórios nas vias aéreas, enquanto a IL-5 tem como função recrutar eosinófilos para as vias aéreas (LEMANSKE e BUSSE, 2010). A presença de eosinófilos, por sua vez, são uma condição característica da inflamação alérgica; eles são responsáveis por promover a inflamação, alteração vascular,

hipersecreção de muco, desprendimento epitelial, aumento da hiperresponsividade das vias aéreas e a obstrução ao fluxo aéreo. Quando ativados, os eosinófilos liberam leucotrienos (produtos do metabolismo oxidativo) e outras substâncias, tais como fatores de crescimento e metaloproteinases, envolvidos no remodelamento das vias aéreas.

As células T são influenciadas pela ação da proteína FOX 3 (FOXP₃) que é membro da subfamília P das proteínas FOX e assim como os demais fatores de transcrição, é composto por três domínios (repressor, central e ligante de ácido desoxirribonucleico (DNA)) que por sua vez funciona como um fator de transcrição, agindo no desenvolvimento e nas funções das células T (ZHANG et al. 2007 e ZHAO et al. 2018).

A liberação destes diversos mediadores inflamatórios e estas ações celulares contribuem com o desenvolvimento dos sinais e sintomas clássicos e característicos da asma como a hiperresponsividade brônquica, secreção mucosa, obstrução das vias aéreas e vasodilatação (GINA, 2022).

1.6 Remodelamento

A matriz extracelular (MEC) pulmonar consiste de uma rede estrutural dinâmica composta por proteínas, glicosaminoglicanos e glicoproteínas (BURGSTALLER et al., 2017); este arcabouço fornece suporte estrutural durante importantes eventos mecânicos da respiração; além de ser um importante componente bioativo do microambiente celular, pois fornece pistas que regulam diferentes processos celulares (YAMADA e SIXT, 2019).

A composição molecular local, fatores de crescimento e citocinas, associadas as propriedades biomecânicas, elasticidade, rigidez e forças de compressão, da MEC podem governar a migração de células imunes (infiltrantes) (YAMADA E SIXT, 2019; MORALES et al., 2021). Além disso, fragmentos de MEC resultantes do remodelamento podem promover ou inibir a migração celular (NISSEN et al., 2018; DE CASTRO BRAS E FRANGOIANNIS, 2020).

O processo inflamatório crônico gera alterações estruturais permanentes em decorrência tanto da ativação de células inflamatórias, quanto pela falta de reparo adequado à lesão crônica, fato que possa explicar a perda parcial e irreversível da função pulmonar ao longo do tempo nos; episódios recorrentes de inflamação podem gerar remodelamento muscular brônquico ocasionado pelas repetidas agressões sofridos pelo epitélio decorrente deste processo inflamatório crônico, contribuindo para a não reversibilidade da obstrução ao fluxo de aéreo (COHN et al., 2004; JAMES, 2005). O remodelamento das vias aéreas é caracterizado por aumento do número de células caliciformes, de glândulas submucosas, do número de vasos e de células do músculo liso; além de espessamento da membrana basal com deposição de fibras colágenas e elásticas e alterações subepiteliais da matriz extracelular (GINA, 2022).

Sugere-se que o processo de remodelamento não ocorra única e exclusivamente nas vias aéreas, mas também no parênquima pulmonar; a inflamação distal tem papel crucial na hiperresponsividade, nas exacerbações e na asma noturna. Atribue-se aos eosinófilos um papel fundamental na lesão epitelial e estímulo a fibrogênese através da produção de TGF- β , citocina que regula a produção de colágeno; ademais os mastócitos podem produzir citocinas, como TNF- α , IL-4, fator de crescimento fibroblástico (FGF), que influenciam a proliferação fibroblástica e atuam na digestão da matriz extracelular (CALHOUN, 2003).

Os macrófagos produzem citocinas, elastase e metaloproteases 9 e 12 (MMP-9 e MMP-12), que podem destruir componentes da matriz extracelular, além das próprias células epiteliais, as quais liberam vários mediadores inflamatórios, intensificando a agressão tecidual e a formação do tecido cicatricial (TILLIE-LEBLOND et al., 2005). As vias aéreas distais e o parênquima pulmonar também podem produzir diversas citocinas de perfil Th₂, quimiocinas e mediadores que estão envolvidos diretamente na iniciação e na perpetuação do processo inflamatório.

Kotaru et al. (2006) em estudo de biópsias de pulmões de asmáticos descrevem achados onde fibroblastos das vias aéreas são morfologicamente distintos dos fibroblastos do parênquima pulmonar; os fibroblastos do parênquima distal são mais largos, com aspecto estrelado e com mais projeções citoplasmáticas, já os fibroblastos das vias aéreas sintetizam mais pró-colágeno tipo I após estímulo com TGF- β . Estas diferenças estruturais podem parcialmente explicar a diversidade de resposta de reparação observada em vias aéreas proximais e distais no pulmão e no parênquima de pacientes asmáticos e com outras doenças respiratórias frente a um estímulo lesivo.

Wagner et al. (1998) afirmaram haver contribuição da porção distal do pulmão na obstrução ao fluxo aéreo em pacientes asmáticos. Previamente denominava-se esta região, como “zona silenciosa”, a qual seria responsável por apenas 10% do valor total de resistência ao fluxo aéreo pulmonar. No entanto, as novas tecnologias e novos estudos possibilitaram evidenciar que há alterações estruturais e inflamatórias no parênquima pulmonar distal que são similares às observadas nas vias aéreas de indivíduos asmáticos (LANÇAS et al., 2006); portanto, é valioso considerar que o volume total e a área de superfície das vias aéreas distais são muito maiores que o volume e a área de superfície das grandes vias aéreas, sugerindo que o

desenvolvimento de qualquer alteração no pulmão distal em pacientes asmáticos tem um efeito potencializador negativo sobre a patogênese e o tratamento da doença (TULIC e HAMID, 2003).

Considerando os achados de Tulic e Hamid (2003) pode-se afirmar que as vias aéreas de calibre menor ou igual a dois milímetros de diâmetro, e o parênquima pulmonar adjacente parecem ter papel fundamental na resistência pulmonar total, levantando a hipótese de haver participação também do parênquima pulmonar na fisiopatologia da asma, o que provavelmente alteraria a terapêutica convencional da asma, visto que os esteroides inalatórios mais usados não se depositam na periferia pulmonar e sua deposição se dá principalmente nas vias aéreas.

Estudos prévios evidenciaram aumento do número de eosinófilos totais, eosinófilos ativados, células T (CD₃), além de aumento na expressão de mRNA positivo para IL-5 e IL-4 nas vias aéreas distais de pulmões ressecados de indivíduos asmáticos comparativamente aos indivíduos normais (CAMARGO et al. 2018; RIGHETTI et al. 2014; DOS SANTOS et al. 2018).

1.7 Hiperresponsividade das Vias Aéreas

A hiperresponsividade das vias aéreas (HRVA) é uma situação caracterizante da asma sendo evidenciada, “virtualmente” em todos os pacientes com a doença. Todavia, há uma variação considerável na intensidade da HRVA tanto entre os pacientes quanto entre os próprios indivíduos, sendo que graus mais elevados de HRVA são proporcionais à gravidade da asma subjacente, fato que leva ao aumento da resistência das vias aéreas ao fluxo aéreo (COCKCROFT e DAVIS, 2006).

A contração da musculatura lisa induzida por agonistas é uma das

características inerentes da asma, favorecendo a resistência ao fluxo aéreo; o tônus da musculatura lisa é inicialmente regulado pelo nível de fosforilação da cadeia leve da miosina (CLM) por mecanismos dependentes e independentes de cálcio (Ca^{2+}). O incremento na concentração intracelular de Ca^{2+} , consequente da ativação dos canais de cálcio na membrana plasmática e/ou liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, gera à formação do complexo Ca^{2+} calmodulina, resultando na ativação da miosinoquinase; esta enzima fosforila a CLM, resultando em contração da musculatura lisa ocasionada pela ligação entre a actina e a miosina (CHIBA et al., 2010). Visto que os filamentos de actina e miosina estão ancorados ao citoesqueleto e juntamente à membrana plasmática por estruturas conhecidas como corpos densos e placas densas, o miócito se contrai (SYLVESTER, 2004).

A extensão desta contração é definida pelo equilíbrio de atividade entre miosinoquinase e miosinofosfatase. Esta cascata de eventos pressupõe que o tônus da musculatura lisa deveria ser proporcional à concentração de Ca^{2+} citosólico. No entanto, quando há a presença de uma concentração fixa de Ca^{2+} , agonistas broncoconstritores também geram à fosforilação da CLM. Ademais, a inibição da miosinofosfatase, que definitivamente aumenta a fosforilação da CLM, pode ocorrer a uma concentração fixa de cálcio citoplasmático; ou seja, pode ocorrer que os níveis de Ca^{2+} nem sempre correspondem 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+} (SCHAAFSSMA et al., 2006).

1.8 Óxido nítrico, Estresse Oxidativo e Isoprostano

O óxido nítrico (NO) no trato respiratório é fabricado por diversas células, dentre

as quais destacamos: células epiteliais, células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos e mastócitos), nervos e células endoteliais vasculares. A partir de sua produção, ele se dissipa rapidamente a partir do local onde foi sintetizado, atravessando membranas celulares, e interagindo com sítios moleculares intracelulares. O NO é um gás excessivamente reativo; trata-se de radical livre que possui grande capacidade de interação e reação com demais moléculas, tais como: o oxigênio, radicais superóxido ou metais de transição (RICCIARDOLO, 2004).

As óxido nítrico sintases (NOS) são as enzimas que tem como função catalisar a formação de NO através da conversão enzimática da arginina em citrulina (CHAPMAN et al., 2001); endogenamente ele é sintetizado por uma das três isoformas de NOS, com diferentes atividades, sendo que duas são consideradas constitutivas (eNOS, derivada do endotélio; e nNOS, derivada dos neurônios) envolvidas na vasodilatação e broncodilatação, e uma NOS induzida (iNOS) (CHAPMAN et al., 2001; RODWAY et al., 2009). A iNOS é estimulada por diversas citocinas pró-inflamatórias e é expressa em alguns tipos de células inflamatórias (RICCIARDOLO et al., 2004; PRADO et al., 2005; PRADO et al., 2006).

O NO aparentemente, age sob vários mecanismos fisiopatológicos que desencadeiam alterações funcionais e histopatológicas que são evidenciadas em pacientes que possuem doenças inflamatórias pulmonares, sendo que a sua atribuição depende principalmente da enzima pela qual foi produzido (PRADO et al. 2006).

Barnes (1996) postula que o NO derivado da enzima nNOS apresenta efeito benéfico na asma, sendo responsável pelo relaxamento da musculatura lisa brônquica, sendo presente nos nervos do sistema NANC; porém o NO derivado da enzima eNOS pode ser responsável por gerar à vasodilatação nas arteríolas, e

consequentemente ocasionar extravasamento de plasma e edema. Já o NO advindo de enzimas iNOS tem efeito vasodilatador, que gera extravasamento de plasma, aumento da secreção do muco e também ativação indireta de células Th1/Th2 contribuindo para os sinais e sintomas da asma.

Prado et al. (2006) concluíram que há incremento da expressão de iNOS em eosinófilos e células linfomononucleares, nas vias aéreas distais de animais sensibilizados com ovoalbumina, afirmando crucial atuação do óxido nítrico em modelo de asma experimental em cobaias. Outro estudo de 2015 observou ainda que a isoforma nNOS, embora tenha característica constitutiva, esteve presente em células inflamatórias (eosinófilos e linfomononucleares) e a quantidade de células que expressam tal isoforma é significativamente maior nos animais sensibilizados com ovoalbumina (PIGATI et al. 2015).

Prado et al. (2005) observaram que a inibição crônica da produção de NO alterou em especial, os valores de resistência basal após desafio antigênico. Em contrapartida, a inibição aguda da produção de NO alterou os valores de elastância do sistema respiratório nos animais sensibilizados, fato que nos permite inferir um efeito broncodilatador do NO nas vias aéreas distais. Diversos estudos do nosso grupo de pesquisa já evidenciaram associação entre inflamação pulmonar alérgica crônica e aumento de óxido nítrico exalado e também acréscimo da expressão de iNOS (em vias aéreas e em parênquima pulmonar) no modelo de asma experimental em cobaias (RIGHETTI et al. 2014; DOS SANTOS et al. 2018; CAMARGO et al. 2018). Embora o NO por si só, não seja fundamentalmente citotóxico, ele pode agir como um agente citotóxico ou citoprotetor, a despeito das condições intracelulares evidenciadas (POSSA et al., 2012).

A associação do NO com radicais livres, como o oxigênio, é responsável por

produzir compostos reativos nitrogenados que desempenham funções fisiológicas e também são importantes na aniquilação de microorganismos (RICCIARDOLO et al., 2004; RODWAY et al., 2009). Porém, paciente asmáticos possuem células inflamatórias com capacidade exacerbada de produzir radicais livres quando comparadas á controles, os quais favorecem altas concentrações de compostos reativos nitrogenados (JARJOUR E CALHOUN, 1994), o que pode ter efeito maléfico sobre a homeostase. Ao serem expostas ao estresse oxidativo as vias aéreas produzem o peroxinitrito (ONOO^-), trata-se de um dos potentes oxidantes formados pela reação entre NO e oxigênio (O_2), sendo ele responsável por várias alterações, dentre elas estímulo à degradação de lipídeos, proteínas e carboidratos e ainda lesão ao DNA, as quais podem alterar funções celulares e fomentar respostas inflamatórias.

Wu et al. (2020) designam ao NO ainda, uma possibilidade de conversão a nitrato, que seria responsável por oxidar proteínas e favorecer ainda mais o estresse oxidativo.

O estresse oxidativo está associado a contração da musculatura lisa nas vias aéreas (RHODEN et al., 1989), sendo responsável ainda por induzir a HRVA nestas (KATSUMATA et al., 1990), promover a hipersecreção brônquica (DOELMAN et al., 1990), induzir a lesão epitelial e consequente exsudação vascular (DEL MAESTRO et al., 1981), sendo designado como protagonista na fisiopatologia da asma (DOELMAN et al., 1990).

A interação de agentes oxidantes e a membrana celular desencadeia peroxidação lipídica da membrana celular, fato que é associado a formação de diversos compostos bioativos análogos às prostaglandinas, denominados isoprostanos (MORROW, 2006).

Os isoprostanos participam de diversas e diferentes funções biológicas e são

fundamentalmente responsáveis pela mediação de alguns panoramas da lesão oxidativa (MILNE et al., 2007); eles são produzidos via peroxidação do ácido araquidônico, por meio de reação catalisada por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) (LAWSON et al., 1999).

A formação dos isoprostanos podem produzir 64 estruturas isoméricas, dentre as quais o 15F2t-isoprostano (anteriormente chamado 8-iso-PGF₂α) é o melhor caracterizado (LAWSON et al., 1999). O 15F2t-isoprostano tem ação contrátil por meio de ligação a receptores tromboxane A₂ no músculo liso das vias aéreas (JANSSEN et al., 2000). Ademais, ele é capaz de causar aumento da resistência pulmonar, indicando que o 15F2t-isoprostano pode ser um dentre tantos, os responsáveis pela limitação ao fluxo aéreo na asma, visto que há também outros mediadores sabidamente atuam nesta função (SHIRAKI et al., 2008).

O conceito de ROS foi utilizado para denominar a quimioluminescência luminol de monócitos humanos ativados em 1982 (SEIM et al. 1982) e compreendem: superóxido(O⁻²), peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), e hidroxila (HO), alguns intermediários do lipídio mediado por radicais livres de peroxidação, como radical peroxil (RO₂⁻) e oxigênio isolado (O₂) e também peróxidos orgânicos (pH) e peroxinitrito (ONOO⁻), o último produto da reação entre e O⁻² e NO (NATHAN et al. 2010).

As ROS são produzidas fisiologicamente e sob condições normais e de homeostase, através das reações endógenas de auto-oxidação enzimática e sob exposição a compostos xenobióticos. As fontes de produção podem ser localizadas em diversos sistemas subcelulares, como membrana plasmática, citosol, peroxissomos ou membranas de organelas (DAIBER et al. 2017).

As ROS são produzidas pelo metabolismo intracelular normal nas mitocôndrias e peroxissomos; são um sistema complexo de defesa antioxidante, composto por enzimas antioxidantes e redutores de baixa massa molecular o qual neutraliza e regula as ROS a níveis fisiológicos (COUTO et al. 2016). Tais enzimas antioxidantes agem de maneira coordenada e incluem diversas substâncias dentre elas: catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e peroxirredoxinas; cada um destes, composto por várias isoformas com substratos específicos e em diversas localizações celulares (RHEE et al. 2017).

O estresse oxidativo é por definição um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização redox e controle e/ou dano molecular (SIES et al. 2017). O estresse oxidativo advém de um incremento exacerbado na produção de ROS e o sistema antioxidante encontra-se sobrecarregado, os efeitos adversos advindos do aumento nos níveis de ROS ocasionam dano oxidativo as proteínas, lipídios e também ao DNA. Não obstante, a ampliação dos níveis de ROS podem levar a diferentes sinais de estresse, que por sua vez geram a ativação de vias de sinalização e tais ativações, podem somatizar efeitos deletérios ou funções potencialmente adaptativas (LIU et al. 2005).

Portanto é de vital relevância distinguir o estresse oxidativo fisiológico do estresse oxidativo citotóxico (LUSHCHAK et al. 2014). A Figura 3 mostra como a intensidade do estresse oxidativo pode ser classificada em diferentes graus em relação as respostas e resultados celulares; a intensidade da resposta ao estresse oxidativo permite que os sistemas biológicos reajam de maneira adequada a estes desafios de maneira dose-dependente (SIES et al. 2017).

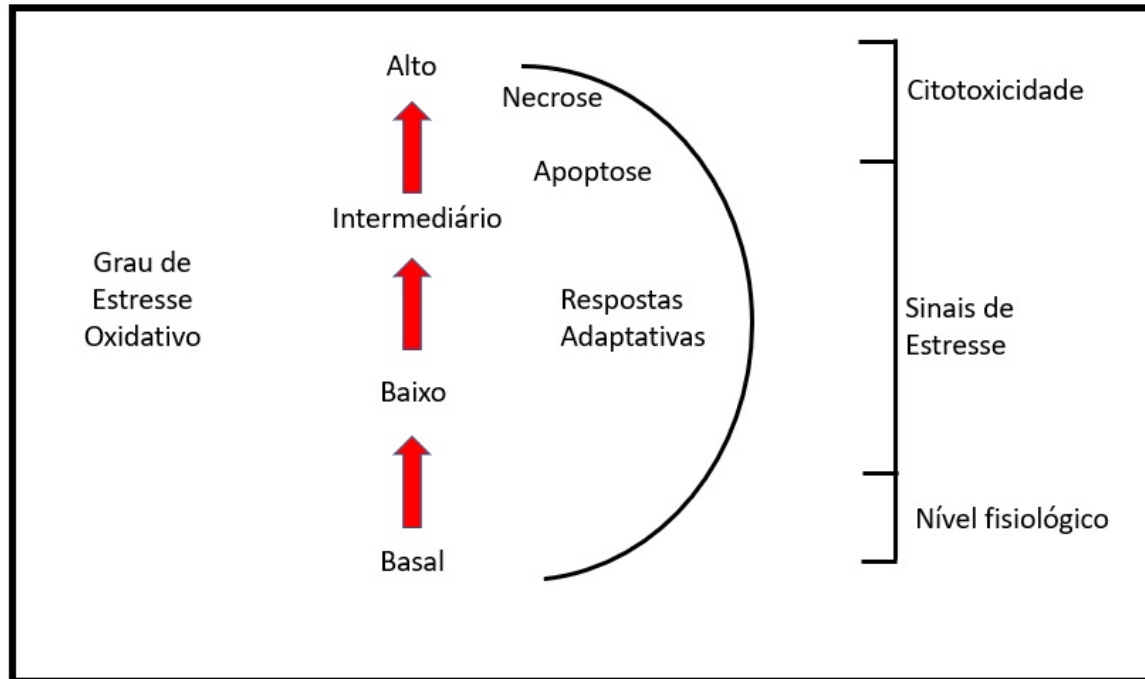


Figura 3 - Grau de Estresse Oxidativo

Adaptado de Magnani et al. 2020

As NADPH oxidases (NOX) (DAIBER et al. 2017) e a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (ZOROV et al. 2001), são designadas como as fontes de produção de ROS em diferentes situações fisiopatológicas; tal produção é uma função mitocondrial biológica, devido ao seu papel chave na sinalização celular para apoiar a integridade desta organela e respostas que controlam a homeostase (TOPF et al. 2018). As NOX são uma família de enzimas que tem como função mediar a produção celular de ROS, transferindo elétrons do NADPH, para reduzir O_2 a O_2^- , as enzimas NOX contribuem com importantes processos biológicos e fisiopatológicos; apesar de sua principal função ser a defesa contra patógenos, eles participam da resposta inflamatória, regulação do crescimento e diferenciação celular, sinalização, além de apoptose (VAN DER VLIET et al. 2018).

Em uma situação de inflamação o complexo NOX é formado e ativado para gerar ROS e degradar microrganismos ingeridos por mecanismos oxidativos (VAN

DER VLIET et al. 2018). São conhecidas sete isoformas de NOX : NOX₁, NOX₂, NOX₃, NOX₄, NOX₅ e duas de peso molecular superior chamadas oxidases duplas, DUOX₁ e DUOX₂ (ZHANG et al. 2020). Ainda que todas as estruturas de isoformas compartilhem dos mesmos domínios funcionais principais, cada NOX apresenta diferentes regulações, ativações e localizações subcelular. As isoformas NOX₁, NOX₂, NOX₄ e NOX₅ são encontradas citoplasma (PAIK et al. 2014); porém as isoformas NOX₁ e NOX₂ geram O₂⁻ (VAN DER VLIET et al. 2018), enquanto NOX₄ é responsável pela produção basal de H₂O₂ (TAKAC et al. 2011), e a NOX₅ também produz H₂O₂, porém dependente de Ca₂⁺ (GUZIK et al. 2008). A atividade aumentada de NOX que leva a um aumento produção de espécies oxidantes como O₂⁻ e consequentemente H₂O₂, tem sido amplamente associada a várias situações (VAN DER VLIET et al. 2011).

Em relação às funções de sinalização, quando as ROS são liberadas de forma regulada e deliberada das NOX, elas podem ativar a tirosina fosfatase; esta enzima está envolvida em fosforilação de numerosos fatores de transcrição, os quais são necessários durante a modulação de atividades celulares como: proliferação, diferenciação e apoptose (DIKALOV et al. 2011). Todos os membros da família NOX são proteínas multitransmembranares contendo um flavocitocromo b558 (gp91phox) que está associada a outra proteína transmembrana, a p22phox. A subunidade gp91phox contém sítios de ligação para NADPH e FAD, além de 2 grupos heme necessários para o transporte de elétrons transmembrana de NADPH para O₂, gerando O₂⁻. A ativação da enzima depende da fosforilação de 3 proteínas reguladoras citosólicas (p47phox, p67phox, p40phox) e junto com GTPase e Rac₁ eles se direcionam para os sítios transmembrana formando o NOX funcional, desta

maneira a enzima passa a estar rapidamente ativada contra diferentes estímulos celulares (VAN DER VLIET et al. 2008) (Figura 4).

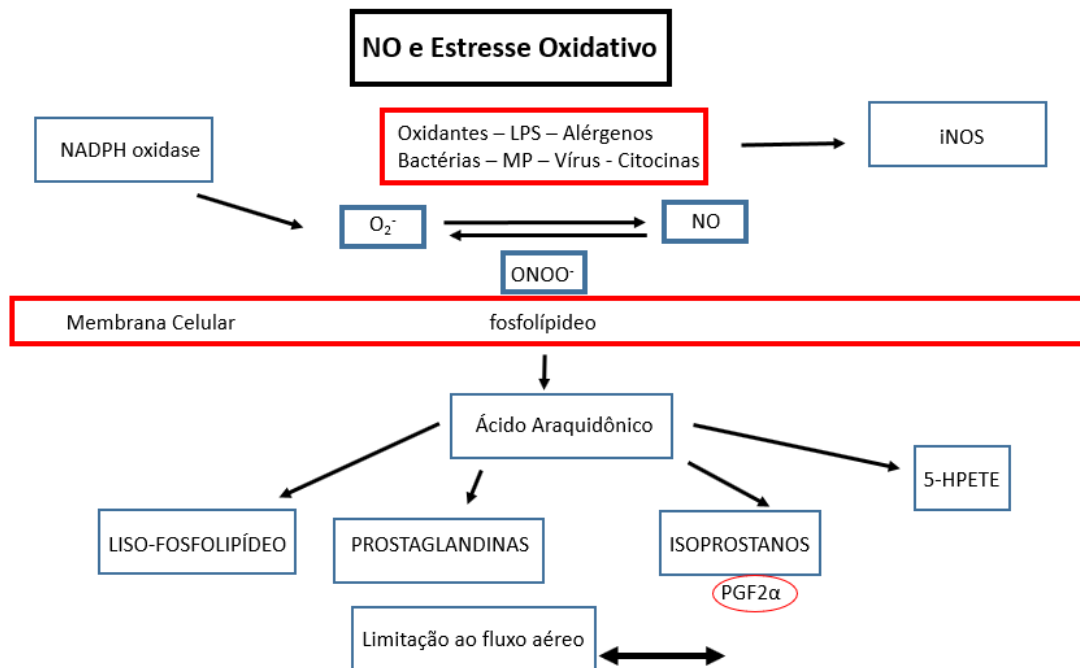


Figura 4 - Esquema da via do estresse oxidativo e a participação do isoprostano

1.9 Vias Sinalizadoras NFκB

Os fatores de transcrição favorecem a ligação entre a sinalização precoce dos eventos da membrana-proximal e as alterações na expressão gênica; o NFκB é um dos fatores de transcrição mais bem caracterizados, é encontrado em todas as células nucleadas e ativado por uma variedade de estímulos, além de regular ou cooperar com muitos outros fatores de transcrição, por exemplo, c-Fos, c-Jun, c-Myc, Elk-1 (HAYDEN et al., 2012). As citocinas pertencentes à família TNF induzem a transcrição rápida de genes que regulam a inflamação, sobrevivência celular, proliferação e diferenciação, principalmente por meio da ativação da via NF-κB (HAYDEN et al., 2014).

O NFκB executa importante papel regulatório na expressão de diversos

genes, a maioria dos quais codificam proteínas que desempenham papel importante e muitas vezes determinante em processos imunes e inflamatórios (HAYDEN et al., 2014); suas ações são consideradas superiores em relação a todos os outros fatores de transcrição já caracterizados (XIAO, 2004); tal superioridade é atribuída aos vários estímulos que o ativam como: citocinas, óxido nítrico sintase induzida, neurotransmissores, neurotrofinas, proteínas neurotóxicas, lipocorticóides, peptídeo natriurético atrial, ceramidas, vírus e bactérias (LIU et al., 2017).

A molécula de NF κ B possui 5 subunidades, caracterizada por conter uma porção N terminal bem conservada com cerca de 300 aminoácidos (RHD – *Rel homology domain*) – que se subdividem em uma região que se liga ao DNA e uma outra chamada de domínio de dimerização; nesta última, encontra-se um sinal de localização nuclear (SLN); a região C-terminal difere entre cada subunidade, sendo que as subunidades p65, c-Rel e RelB contêm um domínio de transativação, necessária para iniciar a atividade transcricional (HART et al., 1998).

A ativação do NF κ B é independente do estímulo, parece haver participação de ROS e o aumento de cálcio intracelular para que ela ocorra; sem o estímulo, o fator NF κ B permanece no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I κ B o que impede a translocação do NF κ B para o núcleo. Portanto a fosforilação e a degradação do I κ B (**Figura 5**) são necessárias para que ocorra a translocação (TRIPATHI *et al.*, 2006).

De acordo com Gagliardo et al. (2003), a ativação exacerbada do NF κ B perdura a liberação de diversos mediadores inflamatórios caracteristicamente já conhecidos na asma grave (GAGLIARDO et al. 2003).

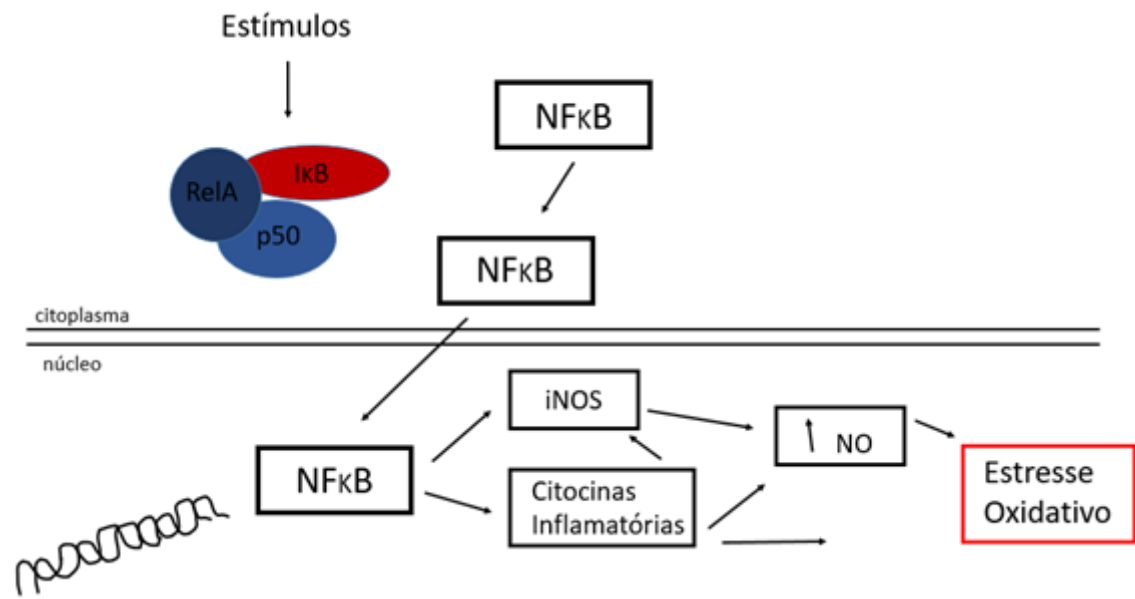


Figura 5 - Ativação do NFκB e sua ligação no estresse oxidativo.

1.10 Efeitos do Material Particulado

A inflamação é a principal causa de doenças respiratórias, e a exposição curta ou crônica a MP pode estimular a inflamação local do sistema respiratório. Estudos experimentais sugerem que a deposição de MP nas células epiteliais das vias aéreas desencadeia e ativa cascatas de sinalização inflamatória, que podem influenciar e alterar as respostas imunológicas e inflamatórias sistêmicas (HE et al. 2017). Substâncias presentes no MP são capazes de provocar e/ou exacerbar uma inflamação aguda (SHADIE et al. 2014), e promover danos oxidativos nas vias aéreas e tecidos pulmonares (RAO et al. 2018; LIU et al. 2018).

As substâncias carregadas pelo ar são compostas em geral, por um núcleo carbonáceo relativamente inerte, no qual uma variedade de hidrocarbonetos poliaromáticos, quinonas, metais e compostos orgânicos voláteis que podem ser absorvidos pelo trato respiratório (FULKERSON et al. 2005). Muitos desses

compostos são responsáveis por induzir o estresse oxidativo, em resposta ao estresse gerado às células epiteliais das vias aéreas (GUO et al. 2017). Conseqüentemente o estresse oxidativo local gera a produção de citocinas pró-inflamatórias que impulsionam a produção de citocinas associadas a Th₂, como IL-4, IL-5 e IL-13, bem como de quimiocinas que irão perpetuar a inflamação (HE, ICHINOSE et al. 2017).

A inflamação e as ROS no pulmão inicialmente são resolúvas com o objetivo de remover os estímulos prejudiciais e iniciar o reparo tecidual, porém, a persistência da agressão, inflamação pulmonar e o desequilíbrio nas ROS e na resposta antioxidante podem causar efeitos sistêmicos e crônicos (RAO et al. 2018).

O papel do estresse oxidativo pulmonar e vários padrões moleculares está associado a danos, incluindo lipoproteínas modificadas oxidativamente (oxDNA, ssRNA, dsRNA) e proteína mitocondrial, e seu impacto pela ligação a vários receptores, incluindo os receptores Toll-like (TLRs) e receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) no desencadeamento da produção de citocinas e quimiocinas sistêmicas (HE; ICHINOSE et al. 2017).

A exposição ao MP pode estimular a superexpressão de genes para fatores de transcrição e citocinas que desencadeiam a resposta inflamatória e a lesão (ZHANG et al. 2018). A exposição à suspensão de MP, às frações hidrossolúveis e insolúveis de MP resulta em aumento da morte celular, incremento de espécies reativas de oxigênio (ROS), interrupção do potencial transmembrana mitocondrial e ativação do fator nuclear NF κ B em células endoteliais humanas (WEI et al. 2011). A suspensão a frações de MP desencadeia a ativação do NF κ B, resultando em citotoxicidade por meio de um processo apoptótico. Macrófagos humanos expostos à fumaça *ex vivo* mostram produção aumentada de citocinas com IL-6 e IL-8 e diminuição da fagocitose e explosão oxidativa de maneira dose-dependente (NADEAU et al.

2010). Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos ambientais e partículas de escapamento de diesel afetam a função das células T reguladoras (Treg) (NADEAU et al. 2010). O comprometimento de Treg está associado ao aumento da metilação do DNA do fator de transcrição FOXP₃, um fator de transcrição chave na atividade de Treg (STELMASZCZYK-EMMEL et al. 2015).

O estresse oxidativo desempenha um papel essencial na fisiopatologia da doença pulmonar e está relacionado à exposição aos poluentes O₃, NO e MP (ERZURUM et al. 2016). O estresse oxidativo induzido por MP é um importante mecanismo de toxicidade mediada por MP e pode surgir da geração direta de ROS na superfície de partículas, compostos solúveis como metais de transição ou compostos orgânicos. Além disso, pode surgir de mitocôndrias alteradas ou nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e ativação de células inflamatórias capazes de gerar ROS e espécies reativas de nitrogênio (GUO et al. 2017).

O MP contém radicais livres ambientalmente persistentes, numerosos produtos químicos orgânicos revestidos em MP podem ser ativados metabolicamente e aumentar as ROS intracelulares (LI et al. 2015). A exposição aumentou significativamente a resposta inflamatória das vias aéreas através da ativação mediada por ROS e vias de sinalização NFκB (WANG et al. 2017).

O desequilíbrio oxidante/antioxidante está implicado na patogênese de doenças que afetam todos os sistemas orgânicos, incluindo o pulmão e a vasculatura pulmonar. As ROS induzidas por MP podem funcionar como moléculas de sinalização para desencadear a translocação do fator nuclear tipo 2 (Nrf2) para o núcleo,

resultando em transcrição alterada de enzimas antioxidantes (LEGAL et al. 2017) (Figura 6).

Além disso, MP induziu a expressão gênica de enzimas envolvidas na via do metabolismo xenobiótico e parâmetros de estresse oxidativo foram altamente correlacionados com expressão gênica e secreção proteica de mediadores inflamatórios (CACHOH et al. 2014).

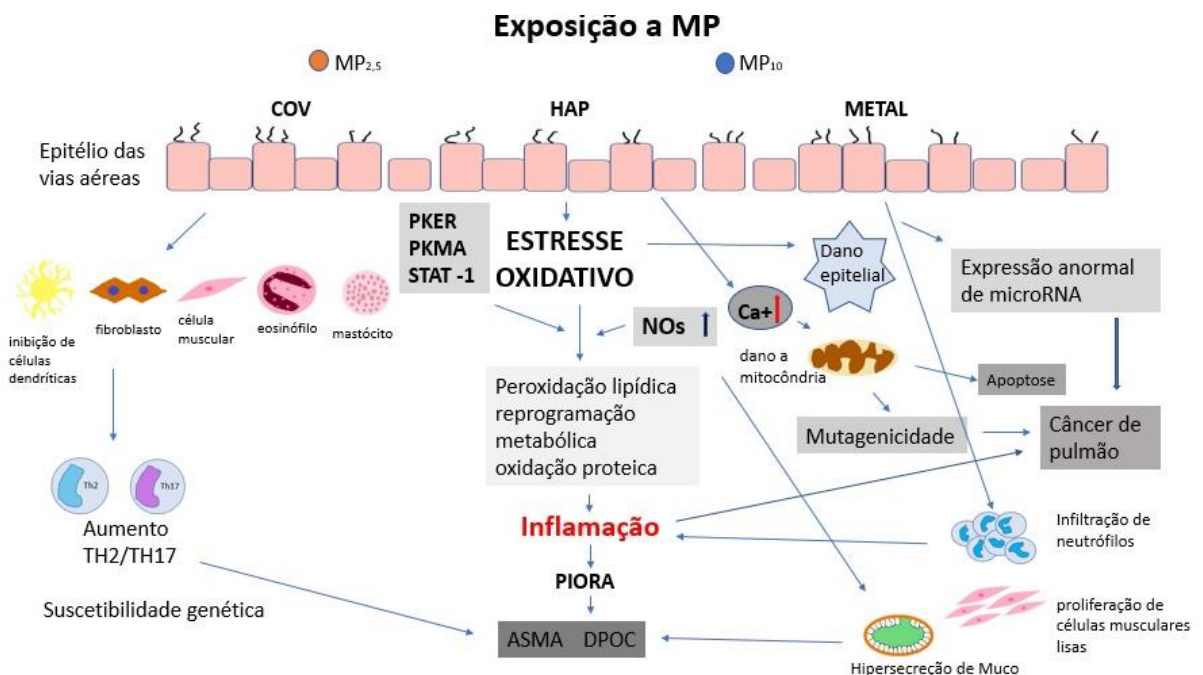


Figura 6 - Adaptado de LI, et al. 2018

1.5 Modelos Experimentais de Inflamação Pulmonar Alérgica Crônica

Com a finalidade de obter mais dados e conhecimento a respeito da fisiopatologia da asma, e também direcionar e inserir novas estratégias terapêuticas, os modelos experimentais vem sendo usados como alternativa nos estudos científicos (CAMARGO et al. 2018; DOS SANTOS et al. 2018; PIGATI et al. 2015; POSSA et al. 2012; PRADO et al 2006); sua abordagem envolve a sensibilização de camundongos

por meio da injeção intraperitoneal de alérgeno, como o objetivo de promover sensibilização ativa e sistêmica, ou exposição local, normalmente associado ao material adjuvante, como por exemplo o Hidróxido de Alumínio – Alumen ($Al[OH]_3$).

O objetivo destes modelos, é gerar resposta inflamatória eosinofílica característica da asma, que no caso, é dependente do envolvimento de citocinas de perfil Th_2 (HUSSAIN et al., 2001); seguido de um desafio pulmonar (local) com a utilização deste mesmo alérgeno, os camundongos sensibilizados são estudados quanto ao fenótipo asmático, por desenvolverem sinais característicos da doença: hiperresponsividade das vias aéreas; elevação de imunoglobulina (Ig) sérica, principalmente imunoglobulina E (IgE) e imunoglobulina G (IgG); remodelamento da MEC, que inclui espessamento da membrana basal, alterações epiteliais, aumento de massa muscular lisa, fibrose subepitelial, deposição de colágeno; além de mudanças nas estruturas vasculares. (ARANTES-COSTA et al., 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Os efeitos da poluição decorrente do processamento do pó de minério de ferro ainda não estão bem estabelecidos na literatura.

A fisiopatogenia da asma permanece sendo elucidada com diversos estudos, porém sabe-se que ela pode ser exacerbada por diversos fatores, dentre eles a poluição atmosférica.

Os efeitos da exposição ambiental ao pó de ferro sobre aspectos da mecânica do sistema respiratório, inflamação, remodelamento da matriz extracelular, estresse oxidativo ainda não foram estudados em modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica.

3. OBJETIVOS

No presente projeto, serão estudadas as repercussões funcionais da exposição ambiental ao processamento do pó de minério de ferro em Vitória – ES através de estudos de hiperresponsividade á metacolina, a resposta inflamatória, tanto celular quanto do perfil de citocinas, estudo da expressão do fator de transcrição NFκB, a resposta de ativação da via do estresse oxidativo (particularmente relacionada à avaliação da expressão de isoprostano, iNOS), o remodelamento da matriz extracelular através das fibras colágenas, além dos mecanismos controladores destas respostas, como ativação de metaloproteinases, TGF-β, TIMP-1 em duas estações do ano (verão e inverno).

3.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos do pó de ferro e de material particulado fino em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica avaliando a hiperresponsividade á metacolina, respostas inflamatórias, de remodelamento e de estresse oxidativo no verão e no inverno. Além disso, avaliar o possível mecanismo celular envolvido nestas respostas.

3.2 Objetivos Específicos

- A) Hiperresponsividade á metacolina;
- B) Quantificar o óxido nítrico exalado (NOex);
- C) Avaliar nas paredes das vias aéreas:
 - Infiltrado celular para eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e macrófagos;
 - Elementos da matriz extracelular: fibras colágenas e TGF-β;
 - Expressão celular de MMP-9, MMP-12 e TIMP-1;

- A resposta de estresse oxidativo: iNOS, 8-iso-PGF-2 e GP91phox;
- Expressão celular de citocinas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17);
- Expressão celular e atividade do NF κ B.

4. MATERIAIS e MÉTODOS

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº 918/2017).

Para o desenvolvimento do nosso estudo, fizemos uso de camundongos BALB/c do sexo masculino; estes provenientes do Biotério que está presente na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; estes animais foram mantidos sob cuidados de acordo com o “Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório”, publicado pelo *National Institute of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985). Em média, os animais deste estudo apresentaram peso corporal de aproximadamente 20-25g avaliado no momento em que iniciado este o protocolo experimental, a idade deles foi em média de 6-8 semanas.

4.1 Grupos Experimentais

Cada um dos grupos abaixo descritos dos modelos experimentais foi analisado no verão e no inverno. O período da análise dos animais do grupo verão foi de novembro de 2018 a fevereiro de 2019, e no grupo inverno de junho a setembro de 2019.

Modelo de Inflamação Pulmonar Alérgica Crônica e/ou Exposição Ambiental

- **Grupo SAL:** inalações com soro fisiológico estéril e mantidos no biotério (n=12);
- **Grupo SAL-local 1 (SAL L1):** inalações com soro fisiológico estéril e exposição ambiental no local 1 região do pólo minerador na cidade de Vitória-ES (n=12);

- **Grupo SAL-local 2 (SAL L2):** inalações com soro fisiológico estéril e exposição ambiental no local 2, no terraço de um hotel há 5km do local 1 na cidade de Vitória-ES (n=12).
- **Grupo OVA:** inalações com solução de ovoalbumina e mantidos no biotério (n=12);
- **Grupo OVA-local 1 (OVA L1):** inalações com ovoalbumina e exposição ambiental no local 1 região do pólo minerador em Vitória-ES (n=12);
- **Grupo OVA-local 2 (OVA L2):** inalações com ovoalbumina e exposição ambiental no local 2, no terraço de um hotel há 5km do local 1 na cidade de Vitória-ES (n=12);

O número total de animais de cada grupo foi de 24 animais, 12 animais em cada estação.

4.2 Protocolo de Inflamação Pulmonar Alérgica Crônica

O modelo de inflamação pulmonar, foi iniciado por meio da injeção de um antígeno, ovoalbumina (OVA), por via parenteral como objetivo de promover a indução de sensibilização sistêmica, posteriormente este mesmo antígeno, foi administrado por via inalatória para atingir os pulmões, alvo principal do estudo e o foco do processo inflamatório; este protocolo teve a duração de 29 dias, como previamente descrito (POSSA et al. 2012).

Foi injetado via intraperitoneal (i.p.) nos camundongos uma solução de 50 mg de ovoalbumina (Sigma - Aldrich) + 6 mg de Hidróxido de Alumínio – *Alumen* (*Pepsamar*, Sanofi-Synthelabo S.A., Rio de Janeiro, Brasil) totalizando um volume 0,2 ml nos dias 1 e 14 do protocolo; nos dias 22, 24, 26 e 28 do protocolo os animais foram colocados em uma caixa de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (US – 1000, ICEL, São Paulo, Brasil) e foram expostos à inalação de aerossol de OVA por 30 minutos, diluída em soro fisiológico 0,9% (NaCl)

com concentração de 10 mg/ml (1%). Já o grupo controle recebeu via i.p. solução salina (NaCl 0,9%) + hidróxido de alumínio (*Alumen*) (6 mg) e nos dias dos desafios inalatórios foram expostos a inalação de aerossol de solução salina 0,9% por 30 minutos (POSSA et al. 2012).

4.3 Protocolo de Exposição Ambiental

Nos grupos de exposição ambiental os animais do modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica foram expostos em dois pontos de Vitória no estado do Espírito Santos – ES, Brasil, conforme ilustrado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** (*Fonte: Google Maps, 2022*). Local 1 localizado dentro da empresa mineradora e local 2 localizado no terraço de um Hotel na Ilha do Boi há 5 km de distância do local 1. A corrente de ar local direciona os resíduos de pelotização em direção ao local 2 gerando formação de MP e suspensão de partículas do ambiente.



Figura 7 - Locais de exposição ambiental.

Local1 região do pólo minerador 1 , local 2 (Terraço de hotel localizado na Ilha do Boi) região do pólo minerador 2 localizado á 5 km do local 1. Imagem captada do google maps, 2022.

Os animais do modelo de inflamação, após o dia 14 do protocolo experimental com a ovoalbumina, foram enviados para a cidade de Vitória, onde permaneceram por duas semanas e retornaram para a cidade de São Paulo – SP, Brasil no dia 30 do protocolo experimental para a avaliação da mecânica pulmonar e histopatologia pulmonar. Os grupos experimentais de inflamação foram realizados nos períodos do verão de 2018 e do inverno 2019.

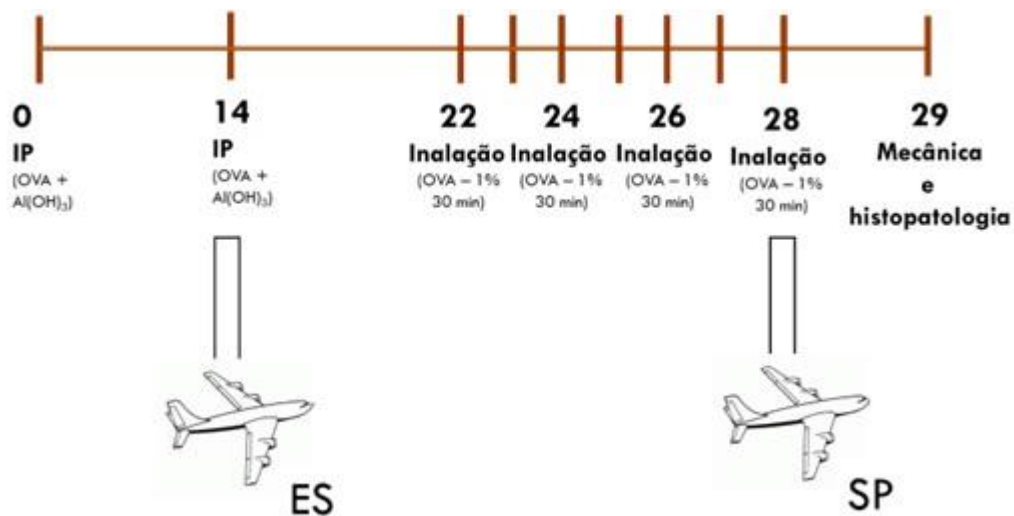


Figura 8 - Protocolo de exposição ambiental no modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica.

4.4 Óxido Nítrico Exalado (NOex)

A avaliação do NOex deu-se 24 horas após a última inalação, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, via i.p.), traqueostomizados e ventilados mecanicamente através de um ventilador para pequenos animais com frequência de 150 respirações/min com um volume corrente de 10 mL/kg (*FlexiVent, Scireq, Montreal, Canadá*). Posteriormente, foi realizada a mensuração do NOex, como previamente descrito (LEICK-MALDONADO et al., 2004; PRADO et al., 2005; PRADO et al. 2006). Resumidamente, após o animal ser estabilizado no ventilador, foi adaptado à válvula inspiratória deste ventilador, com objetivo de evitar a contaminação ambiental, um balão de coleta do NOex por um período de 10 minutos.

O NO_x foi medido por meio da técnica de quimioluminescência, onde foi utilizado analisador de resposta rápida (*Sievers Instruments, Boulder, EUA*), este analisador foi previamente calibrado com uma fonte certificada de NO de 47 partes por bilhão (ppb) (*White Martins, São Paulo, Brasil*) e um filtro de NO (*Sievers Instruments, Boulder, EUA*), com o objetivo de manter o ar inspirado completamente livre de NO anteriormente a de cada medida (POSSA et al., 2012).

4.5 Hiperresponsividade á Metacolina

As avaliações de mecânica respiratória e histopatológicos foram também, realizados 24 horas após o último desafio inalatório (ARANTES-COSTA et al., 2008). Neste dia, os animais foram anestesiados com Tiopental (50 mg/kg i.p.) e traqueostomizados; na traqueostomia foi inserida uma cânula de plástico e fixada com fio pelo orifício desta. Os animais foram então, acoplados ao aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (*FlexiVent, Scireq, Montreal, Canadá*) e mantidos sob volume corrente de 10 ml/kg, frequência respiratória de 150 ciclos/min, mantendo curva de fluxo inspiratório senoidal. Com o objetivo de abolir o esforço ventilatório, os animais receberam nova i.p. de pancurônio (0,2 mg/kg i.p.). Desta maneira, foram obtidos os valores de pressão e a impedância da 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 resistência do sistema respiratório (R_{rs}), elastância do sistema respiratório (E_{rs}), resistência de vias aéreas maiores

(Raw), resistência de vias aéreas menores ou tecido pulmonar (Gtis) e elastância de tecidos pulmonares (Htis).

Foi realizada a curva dose resposta á metacolina, contendo 3 doses da droga 3,30 e 300 mg/mL, com o objetivo de avaliar a resposta broncoconstritora das vias aéreas e parênquima pulmonar. Os resultados obtidos, foram expressos em porcentagem de aumento em relação ao basal para as variáveis captadas por meio do ventilador mecânico.

4.6 Análise do Fluido do lavado broncoalveolar (FLBA)

Posteriormente, foi realizada a coleta do fluido do lavado broncoalveolar (FLBA) através da instilação pela cânula traqueal com uso de seringa, de 0,5 ml de solução salina (NaCl 0,9%) por 3 vezes (total volume 1,5mL). O volume recuperado, cerca de 80%, foi centrifugado a 1000 rotações por minuto (rpm), a 5°C, por 10 minutos. Foi realizada a ressuspensão do botão celular em 400µL de salina. A contagem total de células foi realizada através de microscopia ótica com o hemocítômetro de *Neubauer* (400x). Para a realização da contagem diferencial, 100µL do FLBA foram citocentrifugados a 450 rpm durante 6 minutos e após seca, a lâmina foi corada pela técnica de *Diff-Quick*. A contagem diferencial das células foi realizada por meio de um microscópio ótico com objetiva de imersão (1000X) e definida a partir do achado de 300 leucócitos/lâmina e a diferenciação seguindo critérios hemocitológicos já descritos na literatura, para diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos (MARTINS-OLIVEIRA et al., 2016).

Após, os camundongos foram eutanasiados mediante injeção i.p. de Tiopental (150mg/Kg i.p), exsanguinados por punção da artéria aorta; aberta a parede torácica

anterior e os pulmões removidos em bloco junto ao coração para posterior fabricação de lâminas e realização das análises histológicas, histoquímicas e imunohistoquímicas (MARTINS-OLIVEIRA et al., 2016).

4.7 Histologia e Imunohistoquímica

Os pulmões foram fixados com objetivo de homogeneizar a distensão do parênquima pulmonar em formaldeído 4% á pressão constante de 20 cmH₂O, por 24 horas; após, mantidos em álcool 70% por até 36 horas, posteriormente cortados em seu maior eixo, e também no eixo transversal, fato que torna possível amostrar a árvore respiratória da melhor forma, para o processamento histológico rotineiro. Este material foi sujeito às técnicas histológicas com parafina, para a aquisição de cortes de 4µm de espessura, as lâminas foram coradas conforme a descrição á seguir:

- Picro- Sirius (fibras colágenas) – os cortes foram desparafinados e levados à água, corados por 1 hora no Picro-Sirius, à temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água corrente (5 minutos), após os cortes foram corados pela *Hematoxilina de Harris* (6 minutos) e posteriormente lavados em água corrente (10 minutos).

- demais amostras – seguindo sequência de recuperação antigênica, bloqueio e incubação com anticorpo primário (Tabela 1), incubação com complexo secundário, coloração e contraste, sendo descrito como: primeira desparafinação, seguida de hidratação, digestão ou recuperação do antígeno a alta temperatura na panela de vapor por 50 minutos (anti-IL4, anti-IL5, anti-IL10, anti-IL13, anti-IL17) ou panela de pressão por 1 minuto (anti-iNOS, anti-NF-kappaB, anti-TGF-β, anti-TIMP1, anti-MMP9, anti-MMP12, anti-isoprostano, anti-GP91phox) usando tampões de citrato

Ph6. Após, foi realizado o bloqueio de peroxidase usando 10 volumes de peróxido de hidrogênio (3%) durante 5 minutos e lavado 3 vezes com PBS. Os anticorpos diluídos foram pipetados no tecido e as lâminas incubadas em câmara úmida durante a noite (18 a 20 horas).

Após a incubação das lâminas, estas foram lavadas com PBS e incubadas em câmara úmida com o anticorpo secundário vetor (coelho, rato, cabra ou camundongo) por 30 minutos a 37°C, e lavadas novamente 3x3 minutos com PBS e posteriormente incubadas em câmara úmida com o Complexo Conjugador Vector AB por 30 minutos a 37°C, lavadas novamente em PBS e desenvolvidas na solução cromogênica (70mg de DAB por 110 ml de tris-HCL). As lâminas foram coradas em *Hematoxilina de Harris* e as em seguida montadas com lamínulas.

Os cortes do pulmão foram analisados usando a técnica de morfometria convencional descrita subseqüentemente.

Marcador	Diluição	Anticorpo Primário	Especificações
IL-4	1:15000	Anti-cabra	SC-53084 Mouse Monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-5	1:100	Anti-coelho	SC-395334 Mouse Monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-10	1:150	Anti-cabra	SC-1783 Goat monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-13	1:8000	Anti-cabra	SC-393365 Mouse Monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-17	1:500	Anti-coelho	SC-7927 Rabbit Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
NFK β	1:500	Anti-coelho	SC-8008 Mouse Monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
TIMP-1	1:400	Anti-coelho	LS-C299465 Mouse Polyclonal; LifeSpan BioScien, Inc, WA, USA
MMP-9	1:600	Anti-coelho	SC-393859 Mouse Monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
MMP-12	1:3000	Anti-coelho	LS Bio Rabbit;LifeSpan C295305
iNOS	1:500	Anti-coelho	SC-7271 Rabbit Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
8-iso-PGF-2 α	1:10.000	Anti-cabra	LS-250; Oxford Biomed Rescar
TGF- β	1:400	Anti-coelho	SC-130348 Mouse Monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
FOXP3	1:300	Anti-rato	SC-53876 Mouse Monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
Gp91FOX	1: 150	Anti-cabra	SC-5827 goat polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA

Figura 9 - Diluição dos marcadores, anticorpo primário e especificações.

4.8 Análise Morfométrica

A contagem de células positivas de: IL-4, IL-5, IL-10, 1L-13, IL-17, TGF- β , MMP9, MMP12, TIMP1, iNOS, NF κ B, GP91phox foi realizada por meio da técnica de contagem de pontos (WEIBEL, 1963) com uso de um retículo com área total de 10⁴ μ m² acoplado à ocular do microscópio que contém 100 pontos e 50 retas (e200MV, Nikon Corporation, Tokyo, Japan);.

Para a avaliação das vias aéreas, este retículo foi afixado na base do epitélio da via aérea (Figura 10) e analisado em três campos ao redor de três vias aéreas de cada lâmina histológica. Para quantificar as células positivas, foi usada: a razão, entre

o número de células positivas presentes na área do retículo e número de pontos que coincidiram com a área de tecido. A totalidade das análises foram realizadas com aumento de 1000x.

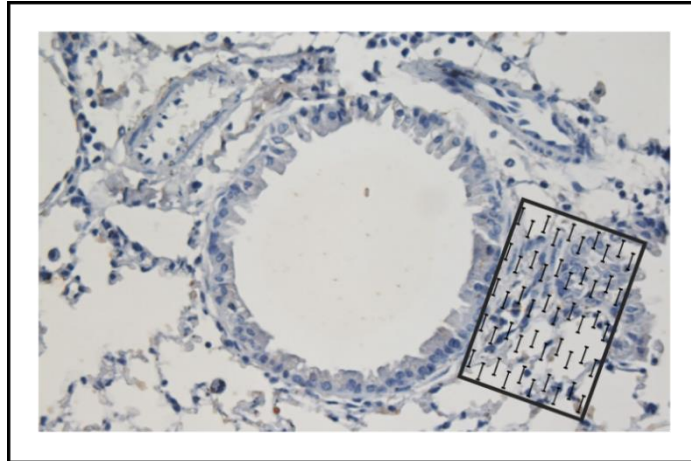


Figura 10 - Contagem de células positivas.

4.9 Análise de Imagens

Para a análise das fibras colágenas e conteúdo de isoprostanos foi utilizado o analisador de imagem (*Image-Pro-Plus*), a medida de densidade óptica foi o método empregado para tal análise. A captura da imagem foi realizada pelo sistema de imagens composto de microscópio *Leica DM2500* (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha*), com câmera de vídeo acoplada, que enviou as imagens através de uma placa digitalizadora de imagens à um computador, para a quantificação descrita foram realizadas fotos de 4 vias aéreas de cada animal, em aumento de 1000x. A análise de imagem foi realizada através do “software” *Image-Pro Plus 4.5*, este programa permite que lhe seja informado um “*threshold*” dos tons de cores que representam as áreas positivas e assim é possível quantificá-las na área pré-determinada; os resultados

foram expressos em porcentagem de área (CAMARGO et al.,2018; RIGHETTI et al., 2014).

4.10 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa *SigmaStat* (SPSS Inc, Chicago, IL). O teste *One-Way ANOVA* foi utilizado, seguido pelo método *Holm-Sidak* para comparação entre os grupos; a análise de correlação foi realizada e obtido o coeficiente de *Pearson (R)* com objetivo de avaliar as associações entre os dados de hiperresponsividade á metacolina com os marcadores de células inflamatórias, marcadores de remodelamento, estresse oxidativo e correlação com a ativação do NFκB.

Os resultados obtidos, foram expressos na forma de média e erro padrão e o gráfico na forma de barras e tabelas. Foi considerado estatisticamente significativo um $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Verão

5.1.1 Hiperresponsividade á Metacolina

5.1.1.1 Resposta Máxima de Resistência do Sistema Respiratório (%Rrs)

A **Figura 11** demonstra a avaliação da porcentagem máxima de aumento da Rrs após metacolina (%Rrs) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Observamos um aumento significativo do %Rrs após desafio com metacolina nos grupos SAL L1 ($159,5 \pm 36,4\%$) e SAL L2 ($182,2 \pm 15,9\%$) quando comparados ao grupo SAL ($3,3 \pm 1,1\%$) ($p \leq 0,05$). Também houve aumento significativo nos grupos OVA (OVA: $78,9 \pm 3,6\%$), OVA L1 ($168,2 \pm 34,6\%$), OVA L2 ($246,37 \pm 61,8\%$) quando comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve aumento significativo do %Rrs nos grupos SAL L1, SAL L2, OVA L1 e OVA L2 quando comparados ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

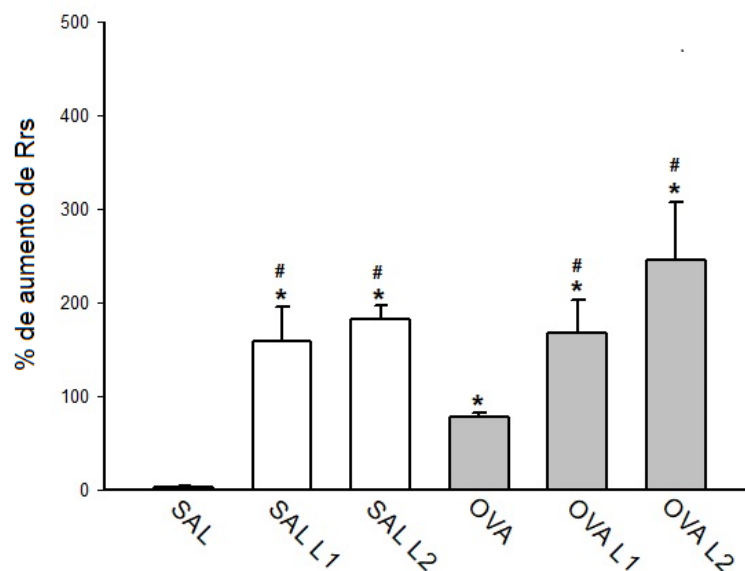


Figura 11 – Porcentagem de aumento da Rrs

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

5.1.1.2 Resposta Máxima de Elastância do Sistema Respiratório (%Ers)

A **Figura 12** demonstra a avaliação da porcentagem máxima de aumento após metacolina da Ers (%Ers) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. O %Ers teve um aumento significativo após desafio com metacolina nos grupos SAL L1 ($36,6 \pm 4,6\%$) e SAL L2 ($43,6 \pm 4,4\%$) quando comparados grupo SAL ($5,47 \pm 0,9\%$) ($p \leq 0,05$). Também houve aumento de %Ers no OVA ($38,84 \pm 3,1\%$), OVA L1 ($84,1 \pm 24,1\%$) e OVA L2 ($58,5 \pm 4,9\%$) em relação ao grupo controle SAL ($p \leq 0,05$).

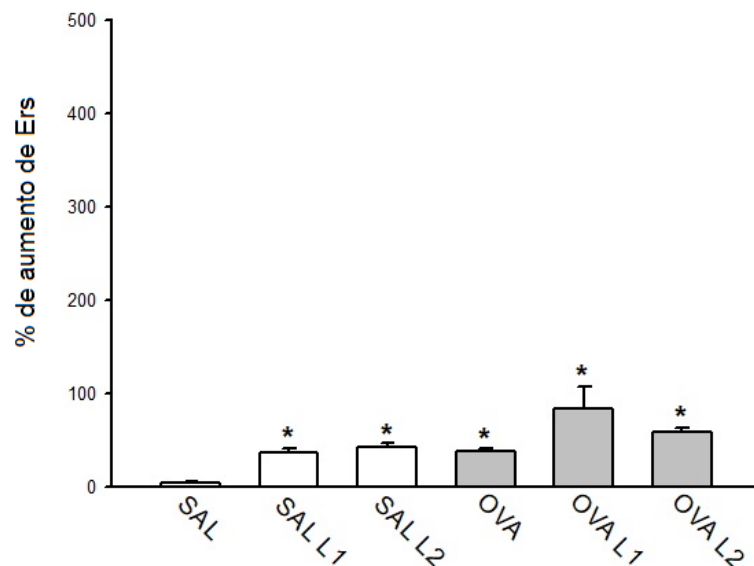


Figura 12 – Porcentagem de aumento da Ers

Média ± erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL.

5.1.1.3 Resposta Máxima de Resistência de Vias Aéreas (%Raw)

A **Figura 13** demonstra a avaliação da porcentagem máxima de aumento após metacolina da Raw (%Raw) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. O %Raw teve um aumento significativo após desafio com metacolina nos grupos SAL L1 ($306,55 \pm 53,7\%$) e SAL L2 ($314,62 \pm 40,4\%$) quando comparado ao grupo SAL ($3,26 \pm 0,8\%$) ($p \leq 0,05$). Também houve aumento de %Raw no grupo OVA

(121,18±13,2%), grupo OVA L1 (222,37±40,9%) e grupo OVA L2 (269,24±58,4%) em relação ao grupo controle SAL ($p \leq 0,05$). Houve aumento significativo do %Raw nos grupos SAL L1, SAL L2, OVA L1 e OVA L2 quando comparados ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

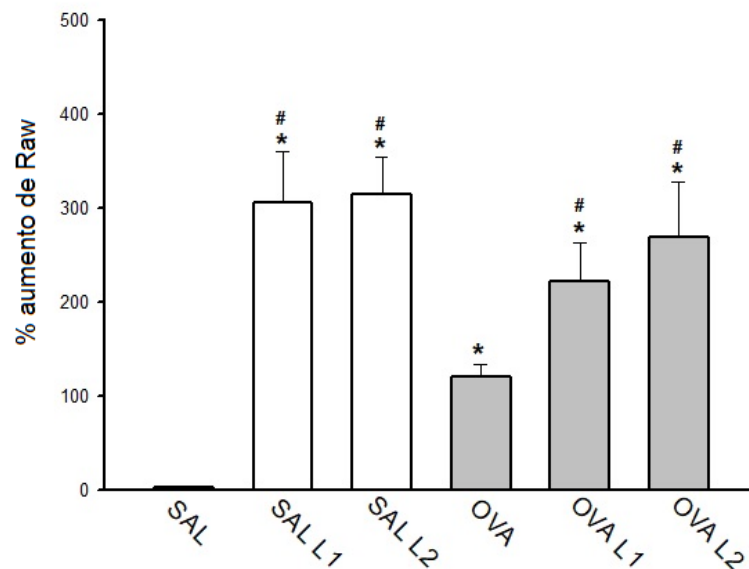


Figura 13 - Porcentagem de aumento da Raw

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

5.1.1.4 Resposta Máxima de Resistência do Tecido Pulmonar (Gtis)

A **Figura 14** demonstra a avaliação da porcentagem máxima de aumento após metacolina da Gtis (%Gtis) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. A %Gtis teve aumento significativo após desafio com metacolina nos grupos SAL L1 (102,7±25,9%) e SAL L2 (98,7±13%) quando comparado ao grupo SAL (4,35±1,4%) ($p \leq 0,05$). Também houve aumento de %Gtis no grupo OVA (96,7±10,4%), grupo OVA L1 (144,6±29,5%) e grupo OVA L2 (184,86±46,5%) em relação ao grupo controle SAL ($p \leq 0,05$).

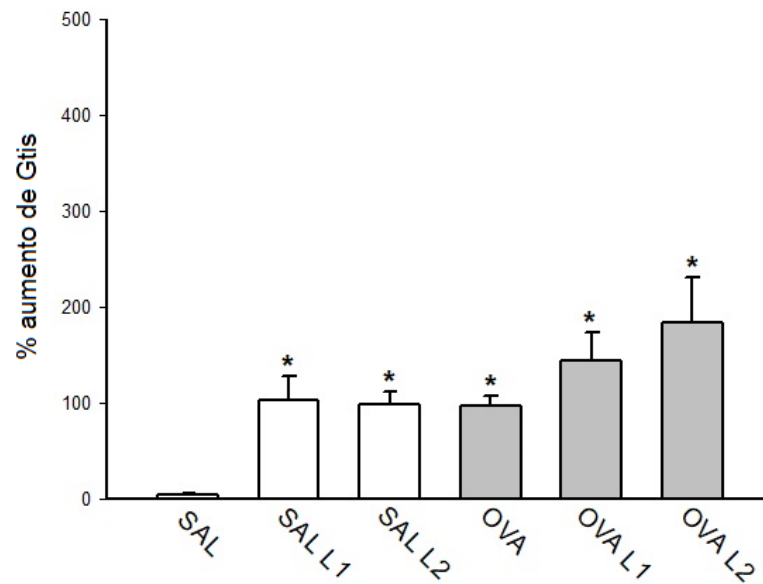


Figura 14 - Porcentagem de aumento da Gtis

Média \pm erro padrão; $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL.

5.1.1.5 Resposta Máxima de Elastância do Tecido Pulmonar (%Htis)

A **Figura 15** demonstra a avaliação da porcentagem máxima de aumento após metacolina da Htis (%Htis) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. O %Htis teve aumento significativo após desafio com metacolina nos grupos SAL L1 ($32 \pm 3,1\%$) e SAL L2 ($28,08 \pm 4,1\%$) quando comparado ao grupo SAL ($1,87 \pm 0,44\%$) ($p \leq 0,05$). Também houve aumento da %Htis no grupo OVA ($30,3 \pm 3,5\%$) e no grupo OVA L2 ($51,94 \pm 22\%$) em relação ao grupo controle SAL ($p \leq 0,05$).

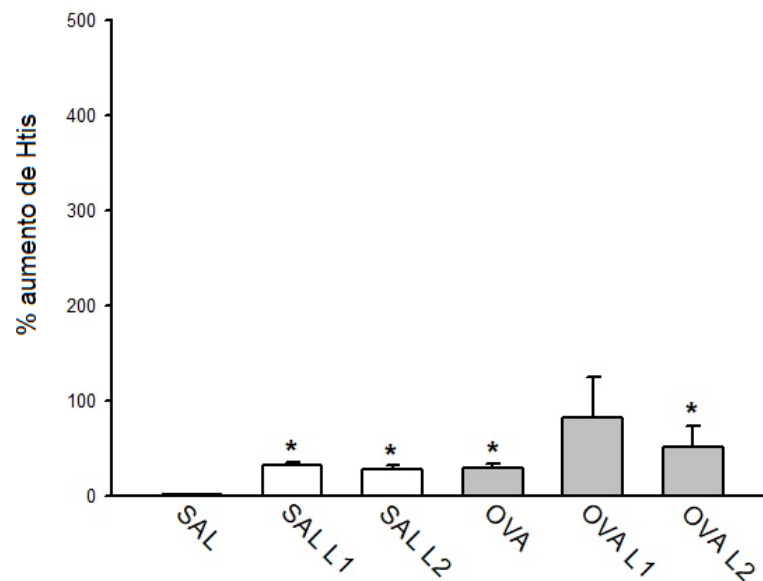


Figura 15 - Porcentagem de aumento da Htis

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL.

5.1.2 Óxido Nítrico Exalado

A **Figura 16** demonstra a avaliação da medida de óxido nítrico exalado nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Os animais dos grupos controle expostos nos locais, SAL L1 ($34,683 \pm 11,188$ ppb) e SAL L2 ($26,533 \pm 4,44$ ppb), apresentaram aumento significativo de NOex (ppb) em relação ao grupo controle SAL mantido no biotério ($7,62 \pm 0,46$ ppb) ($p \leq 0,05$). Os grupos OVA ($29,96 \pm 2,157$ ppb), OVA L1 ($42,45 \pm 5,07$ ppb) e OVA L2 ($38,28 \pm 8,87$ ppb) também apresentaram aumento significativo de NOex quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$).

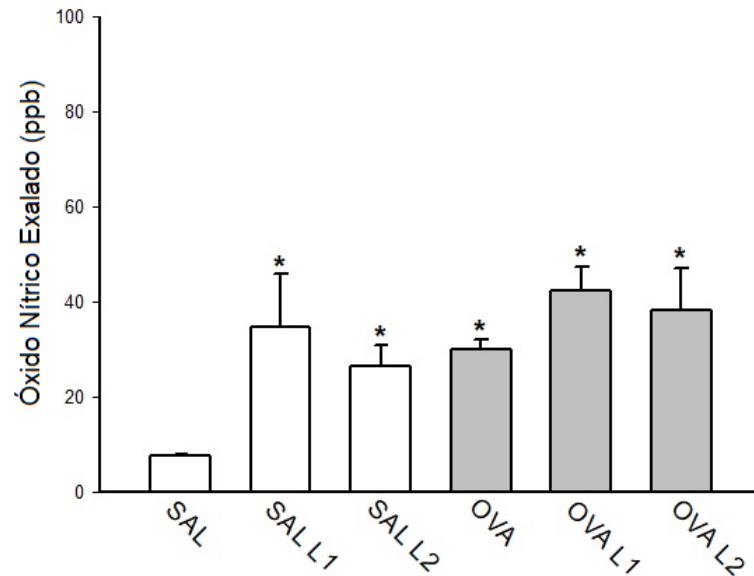


Figura 16 – Óxido Nítrico Exalado (ppb)

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL.

5.1.3 Análise do Fluido do Lavado Broncoalveolar (FLBA)

A **Tabela 3** demonstra a contagem de células totais, e diferenciais (eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos) presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento da quantidade de células totais nos grupos SAL L2 quando comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Os grupos OVA, OVA L1 e OVA L2 também apresentaram aumento do número de células totais no FLBA quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento significativo da quantidade de células totais no grupo SAL L2 quando comparado ao grupo SAL L1 ($p \leq 0,05$).

Tabela 3 – Fluido do Lavado Broncoalveolar - Células Totais e Diferenciais Verão

Fluido do Lavado Broncoalveolar	SAL	SAL L1	SAL L2	OVA	OVA L1	OVA L2
Células Totais (10 ⁴ células/mL)	0,91±0,057	0,82±0,25	1,80±0,23 ^{**}	12,26±0,64 [*]	4,73±1,011 [*]	8,75±2,02 [*]
Eosinófilos (10 ⁴ células/mL)	0,16±0,032	0,00±0,00	0,00±0,00	4,23±0,476 [*]	0,31±0,13	0,00±0,00
Neutrófilos (10 ⁴ células/mL)	0,06±0,02	0,00±0,00	0,004±0,00	1,68±0,32 [*]	0,8±0,22 [*]	0,14±0,09
Linfócitos (10 ⁴ células/mL)	0,03±0,02	0,00±0,00	0,01±0,01	1,15±0,34 [*]	0,04±0,02	0,22±0,15
Macrófagos (10 ⁴ células/mL)	0,6±0,07	0,78±0,26	1,53±0,35 [*]	5,95±0,63 [*]	6,54±1,58 [*]	7,44±2,25 [*]

*Tabela 3– Média ± erro padrão do número de células totais e diferenciais(10⁴ células/μL) no fluido do lavado broncoalveolar; *p≤0,05 quando comparado ao grupo SAL; ** p≤0,05 quando comparado ao grupo SAL L1.*

A **Tabela 3** demonstra a contagem de eosinófilos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento dos eosinófilos no grupo OVA quando comparado ao grupo SAL (p≤0,05).

A **Tabela 3** demonstra ainda, a contagem de neutrófilos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento do número de neutrófilos no grupo OVA e OVA L1 quando comparado ao grupo SAL (p≤0,05).

A **Tabela 3** demonstra também a contagem de linfócitos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento de linfócitos no grupo OVA quando comparado ao grupo SAL (p≤0,05).

A **Tabela 3** demonstra finalmente, a contagem de macrófagos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento de macrófagos no grupo SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 quando comparados ao grupo SAL (p≤0,05).

5.1.4 Inflamação

5.1.4.1 Avaliação do Número de Células Positivas de IL-4 na Parede Brônquica

A **Figura 17** demonstra o número de células positivas para IL-4 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento da quantidade de células positivas para IL-4 nos grupos SAL L1 ($5,08 \pm 0,85$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($7,17 \pm 0,92$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($0,27 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento significativo das células positivas para IL-4 nos grupos OVA ($4,38 \pm 0,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($17,04 \pm 0,45$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($19,99 \pm 0,81$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Encontramos também aumento do número de células positivas para IL-4 nos grupos SAL L2, OVA L1 e OVA L2 quando comparado ao grupo OVA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na

quantidade de células positivas para IL-4 no grupo OVA L2 quando comparado ao grupo OVA L1 ($p \leq 0,05$).

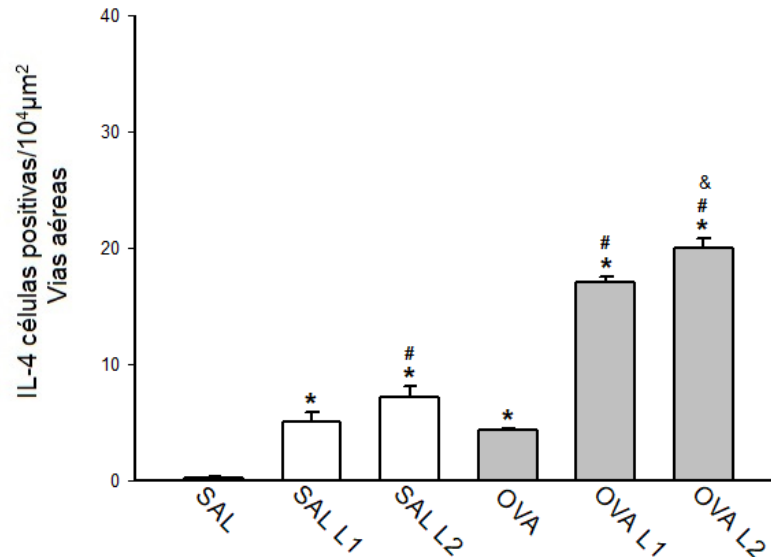


Figura 17 - Número de células positivas para IL-4 nas vias aéreas

Média \pm erro padrão ; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA; & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA L1, com aumento de 1000x.

5.1.4.2 Avaliação do Número de Células Positivas de IL-5 na Parede Brônquica

A **Figura 18** demonstra o número de células positivas para IL-5 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento da quantidade de células positivas para IL-5 nos grupos SAL L1 ($6,60 \pm 1,33$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), SAL L2 ($5,14 \pm 0,67$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), quando comparados ao grupo SAL ($0,18 \pm 0,020$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento significativo das células positivas para IL-5 nos grupos OVA ($3,80 \pm 0,14$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($13,77 \pm 1,75$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($16,27 \pm 2,18$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados aos grupos SAL ($p \leq 0,05$). Houve ainda aumento

significativo do número de células positivas para IL-5 nos grupos OVA L1 e OVA L2 quando comparado ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

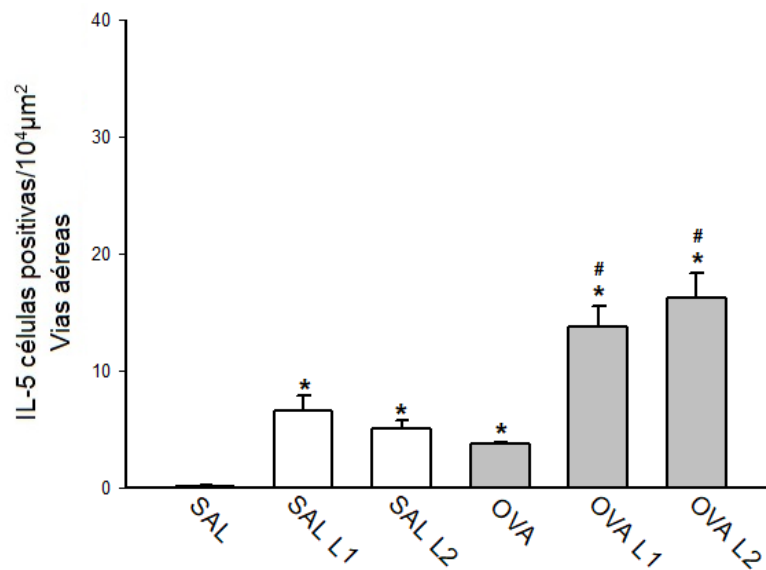


Figura 18 - Número de células positivas para IL-5 nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo, com aumento de 1000x.

5.1.4.3 Avaliação do Número de Células Positivas de IL-10 na Parede Brônquica

A **Figura 19** demonstra o número de células positivas para IL-10 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento da quantidade de IL-10 nos grupos SAL L1 ($4,22 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), SAL L2 ($3,19 \pm 0,44$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), quando comparados ao grupo SAL ($0,21 \pm 0,049$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento das células positivas para IL-10 nos grupos OVA ($3,17 \pm 0,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($3,49 \pm 0,64$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($3,91 \pm 0,61$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$).

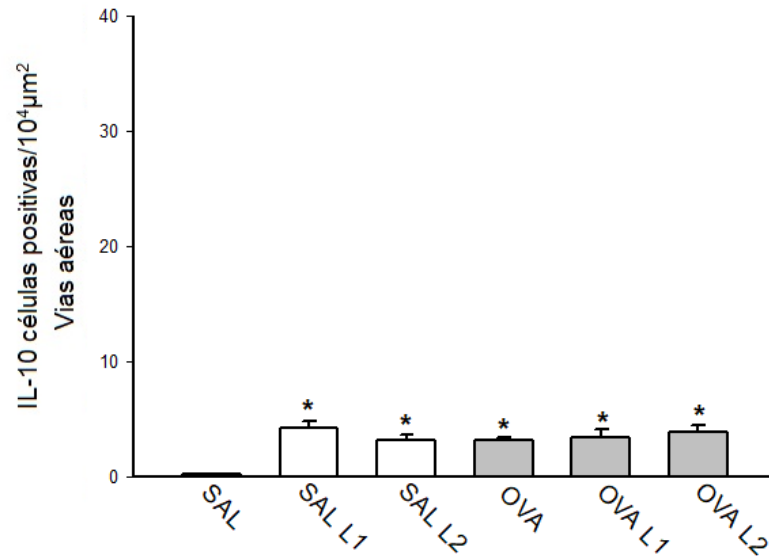


Figura 19 - Número de células positivas para IL-10 nas vias aéreas

Média ± erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL, com aumento de 1000x.

5.1.4.4 Avaliação do Número de Células Positivas de IL-13 na Parede Brônquica

A **Figura 20** demonstra o número de células positivas para IL-13 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento da quantidade de IL-13 nos grupos SAL L1 ($3,59 \pm 0,62$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), SAL L2 ($3,41 \pm 0,19$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($0,29 \pm 0,14$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento significativo das células positivas para IL-13 nos grupos OVA ($3,70 \pm 0,19$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($17,8 \pm 1,19$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($19,07 \pm 0,74$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos ainda aumento do número de células positivas para IL-13 nos grupos OVA L1 e OVA L2 quando comparado ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

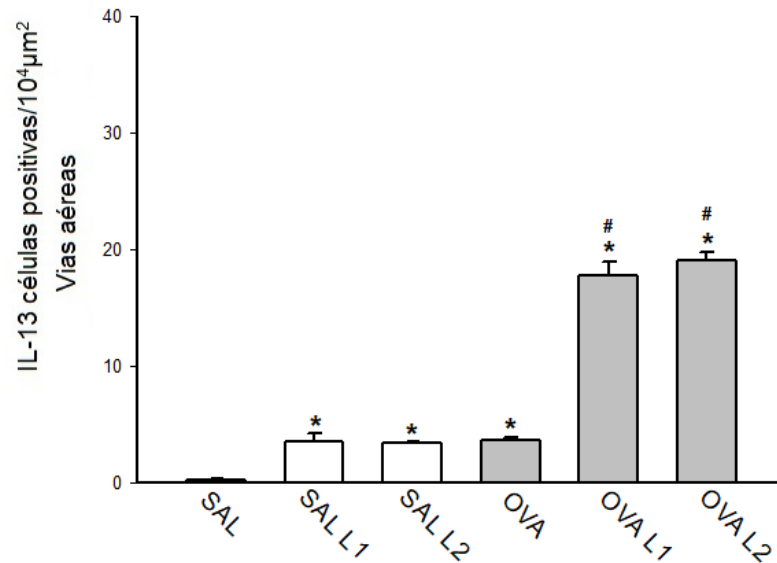


Figura 20 - Número de células positivas para IL-13 nas vias aéreas

Média ± erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA; com aumento de 1000x.

5.1.4.5 Avaliação do Número de Células Positivas de IL-17 na Parede Brônquica

A **Figura 21** demonstra o número de células positivas para IL-17 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento da quantidade de células positivas para IL-17 nos grupos SAL L1 ($6,28 \pm 1,28$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), SAL L2 ($4,93 \pm 0,99$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($0,87 \pm 0,12$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento significativo das células positivas para IL-17 nos grupos OVA ($4,99 \pm 0,25$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($11,96 \pm 1,51$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($8,45 \pm 1,32$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos ainda, aumento no número de células positivas para IL-17 nos grupos OVA L1 e OVA L2 quando comparado ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

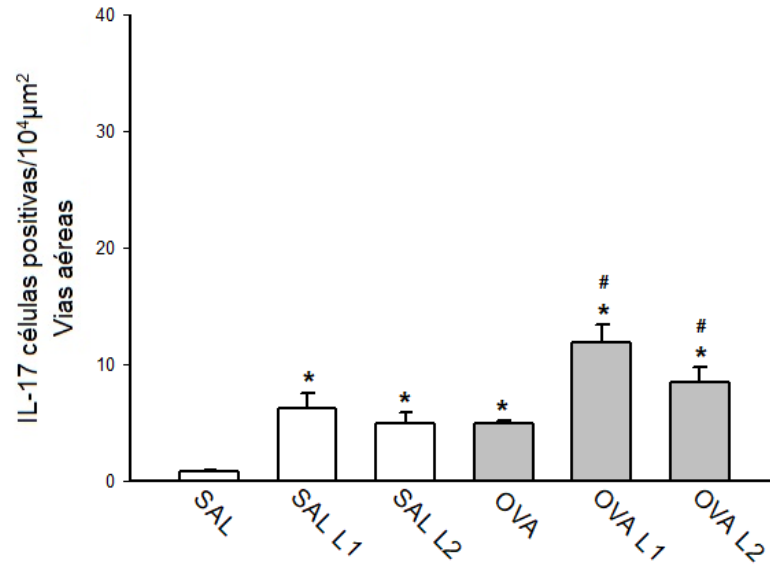


Figura 21 - Número de células positivas para IL-17 nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

5.1.5 Remodelamento

5.1.5.1 Avaliação do Número de Células Positivas de TIMP-1 na Parede Brônquica

A **Figura 22** demonstra o número de células positivas para TIMP1 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento da quantidade de células positivas para TIMP1 nos grupos SAL L1 ($8,71 \pm 0,72$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), SAL L2 ($10,07 \pm 0,62$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($0,33 \pm 0,082$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos aumento do número de células positivas para TIMP1 nos grupos OVA ($3,23 \pm 0,23$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($20,3 \pm 0,97$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($34,73 \pm 2,87$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento significativo das células positivas para TIMP1 nos grupos SAL L1, SAL L2, OVA L1 e OVA L2 quando comparado ao grupo OVA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve

aumento na quantidade de células positivas para TIMP1 no grupo OVA L2 quando comparado ao grupo OVA L1 ($p \leq 0,05$).

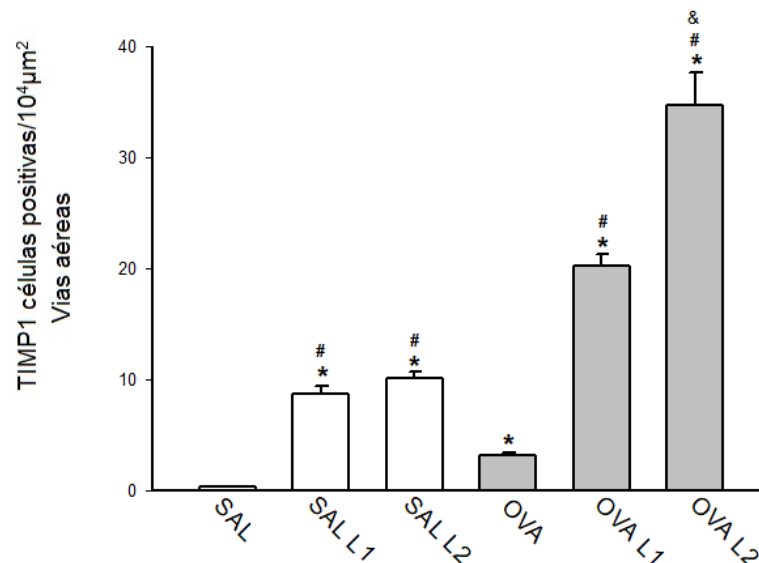


Figura 22 - Número de células positivas para TIMP1 nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA, & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA L1; com aumento de 1000x.

5.1.5.2 Avaliação do Número de Células Positivas de MMP-9 na Parede Brônquica

A **Figura 23** demonstra o número de células positivas para MMP9 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento da quantidade de MMP9 nos grupos SAL L1 ($22,49 \pm 3,46$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), SAL L2 ($28,98 \pm 4,52$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), quando comparados ao grupo SAL ($0,08 \pm 0,03$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento significativo das células positivas para MMP9 nos grupos OVA ($3,22 \pm 0,25$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($15,97 \pm 3,43$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($19,13 \pm 2,03$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos ainda aumento do número de células para MMP9 nos grupos SAL L1, SAL L2, OVA L1 e OVA L2 quando comparado ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

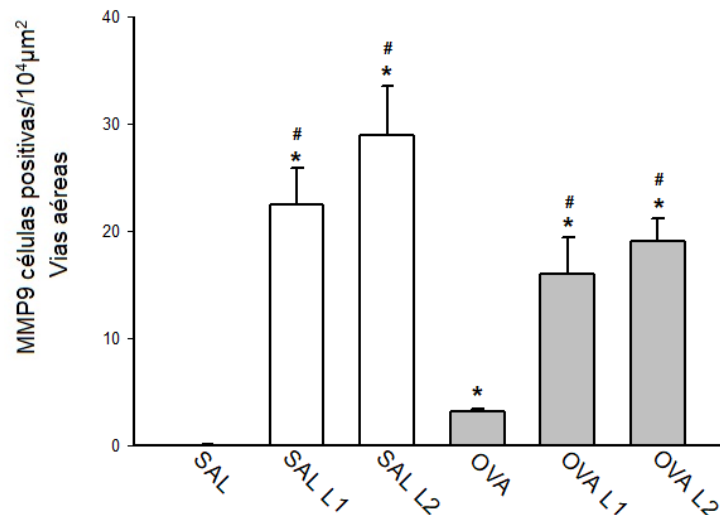


Figura 23 - Número de células positivas para MMP9 nas vias aéreas

Média ± erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

5.1.5.3 Avaliação do Número de Células Positivas de MMP-12 na Parede Brônquica

A **Figura 24** demonstra o número de células positivas para MMP12 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento da quantidade de MMP12 nos grupos SAL L1 ($21,26 \pm 2,89$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($18,51 \pm 2,91$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($0,26 \pm 0,06$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos aumento do número de células positivas para MMP12 nos grupos OVA ($3,63 \pm 0,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($23,58 \pm 3,49$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($22,65 \pm 2,73$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupos SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento significativo das células positivas para MMP12 nos grupos SAL L1, SAL L2, L1 e OVA L2 quando comparado ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

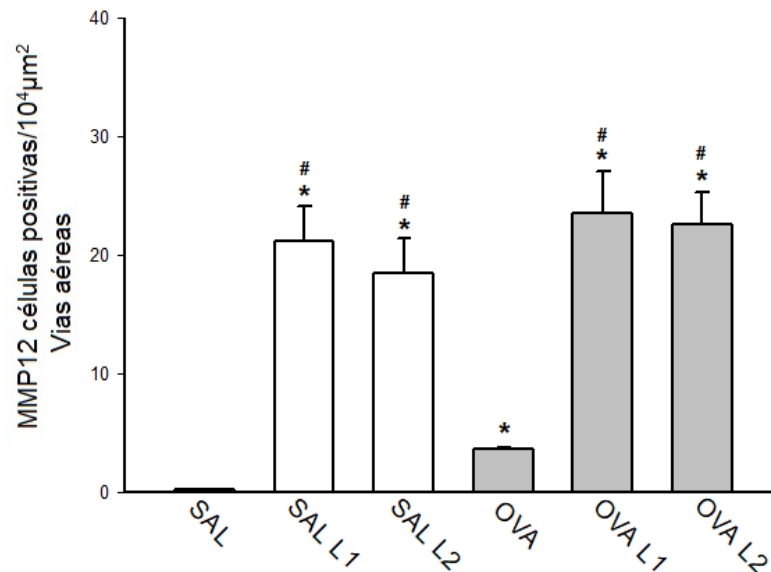


Figura 24 - Número de células positivas para MMP12 nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo, com aumento de 1000x.

5.1.5.4 Avaliação do Número de Células Positivas de TGF- β na Parede Brônquica

A **Figura 25** demonstra o número de células positivas para TGF- β presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento da quantidade de MMP12 nos grupos SAL L1 ($4,07 \pm 0,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($4,48 \pm 0,06$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($0,16 \pm 0,03$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos aumento do número de células positivas para TGF- β nos grupos OVA ($3,94 \pm 0,31$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($4,60 \pm 0,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($4,87 \pm 0,30$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento significativo das células positivas para TGF- β no grupo OVA L2 quando comparado ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

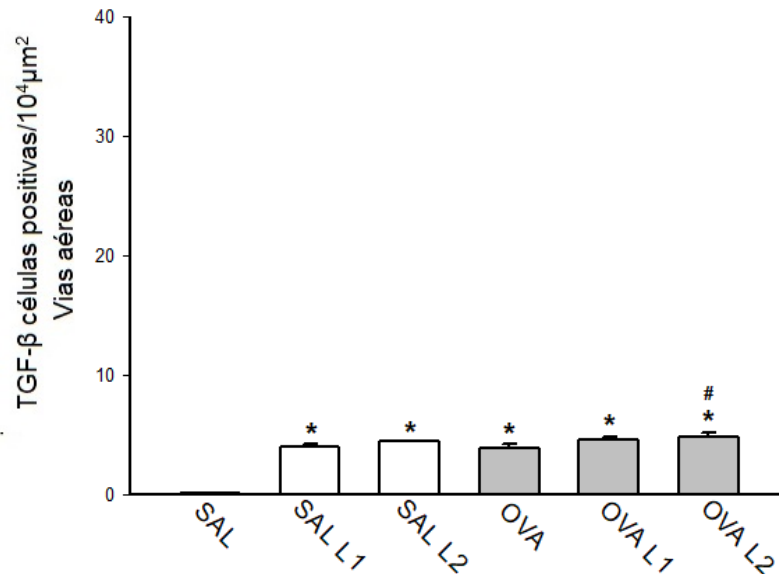


Figura 25 - Número de células positivas para TGF-β nas vias aéreas

Média ± erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA; com aumento de 1000x.

5.1.5.5 Avaliação da Conteúdo de Fibras Colágenas na Parede Brônquica

A **Figura 26** demonstra o conteúdo de fibras colágenas presentes nas vias aéreas expresso em porcentagem nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento da quantidade de fibras colágenas nos grupos SAL L1 ($10,16 \pm 0,77$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($11,61 \pm 1,64$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($6,32 \pm 0,27$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos aumento na porcentagem de fibras colágenas nos grupos OVA ($11,10 \pm 0,75$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($11,6 \pm 1,01$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($12,58 \pm 2,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$).

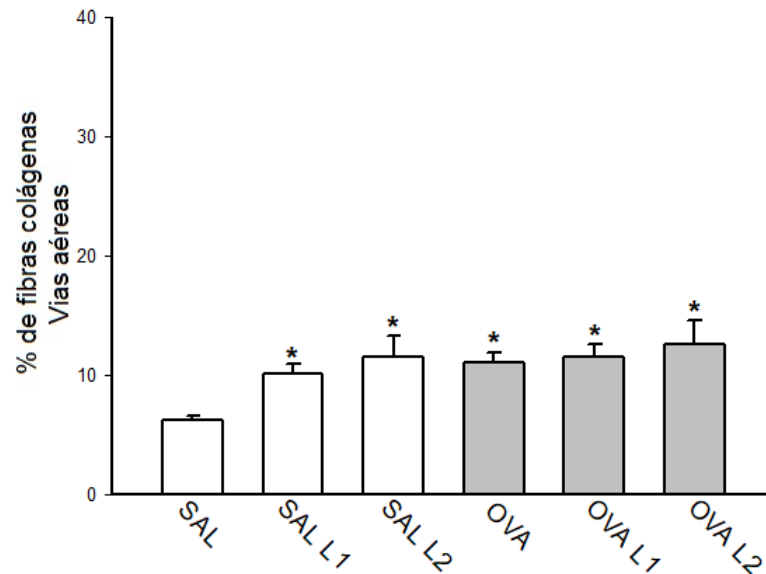


Figura 26 - Porcentagem de fibras colágenas nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; com aumento de 1000x.

5.1.6 Estresse Oxidativo.

5.1.6.1 Avaliação do Número de Células Positivas de iNOS na Parede Brônquica

A **Figura 27** demonstra o número de células positivas para iNOS presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento da quantidade de células positivas para iNOS nos grupos SAL L1 ($4,38 \pm 0,42$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($4,52 \pm 0,31$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($0,43 \pm 0,06$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos aumento do número de células positivas para iNOS nos grupos OVA ($3,34 \pm 0,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($9,11 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($10,44 \pm 1,42$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento significativo das células positivas para iNOS nos grupos SAL L1, SAL L2, OVA L1 e OVA L2 quando comparado ao grupo OVA ($p \leq 0,05$). Além disso, verificamos

aumento do número de células positivas para iNOS no grupo OVA L2 quando comparado ao grupo OVA L1 ($p \leq 0,05$).

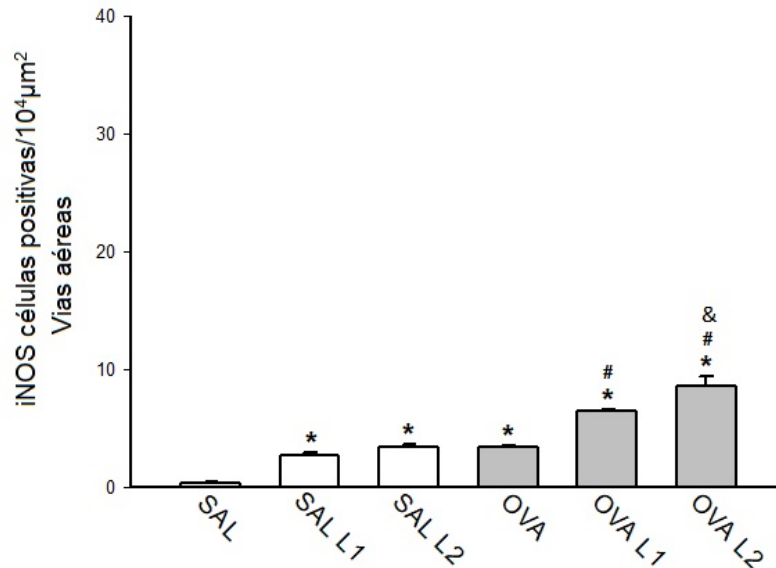


Figura 27 - Número de células positivas para iNOS nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA; & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA L1, com aumento de 1000x.

5.1.6.2 Avaliação do Conteúdo de Isoprostano na Parede Brônquica

A **Figura 28** demonstra o conteúdo de isoprostano presente nas vias aéreas expresso em porcentagem nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento da porcentagem de isoprostano nos grupos SAL L1 ($13,84 \pm 0,95\%$) e SAL L2 ($12 \pm 1,93\%$) quando comparados ao grupo SAL ($7,24 \pm 0,3\%$) ($p \leq 0,05$). Observamos aumento da porcentagem de isoprostano nos grupos OVA ($12,22 \pm 0,75\%$), OVA L1 ($14,47 \pm 0,83\%$) e OVA L2 ($19,1 \pm 1,34\%$) quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento significativo da porcentagem de isoprostano nos grupos OVA L1 e OVA L2 quando comparado ao grupo OVA ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento na porcentagem de isoprostano no grupo OVA L2 quando comparado ao grupo OVA L1 ($p \leq 0,05$).

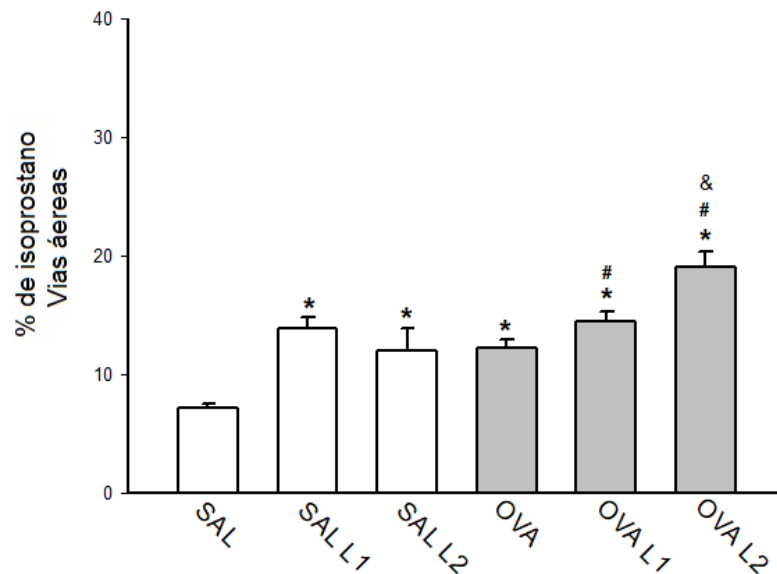


Figura 28 - Porcentagem de isoprostano nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA ; & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA L1, com aumento de 1000x.

5.1.6.3 Avaliação do Número de Células Positivas de GP91phox na Parede Brônquica

A **Figura 29** demonstra o número de células positivas para GP91phox presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento da quantidade de células positivas para GP91phox nos grupos SAL L1($1,26 \pm 0,28$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2($1,64 \pm 0,36$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL($0,29 \pm 0,25$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos aumento do número de células positivas para GP91phox nos grupos OVA($4 \pm 0,75$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1($2,73 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2($4,95 \pm 0,66$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos também aumento significativo das células positivas para GP91phox no grupo OVA L2 quando comparado ao grupo OVA L1 ($p \leq 0,05$).

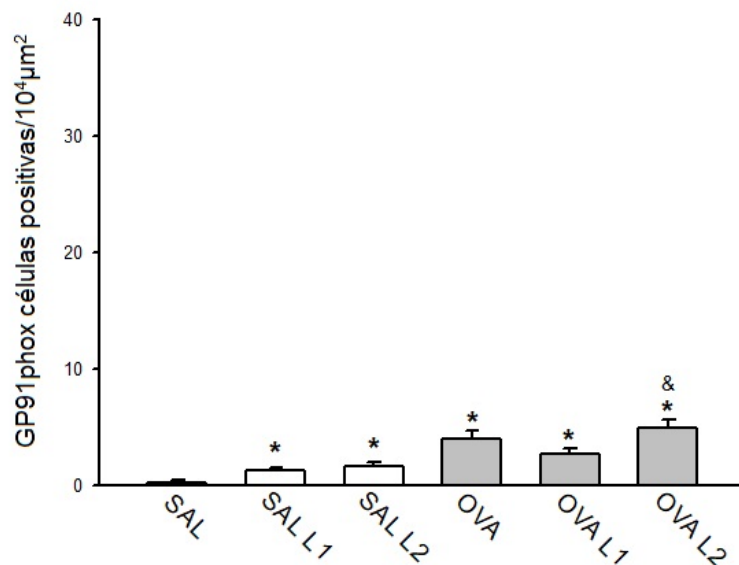


Figura 29 - Número de células positivas para GP91phox nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA L1, com aumento de 1000x.

5.1.7 Vias Sinalizadoras

5.1.7.1 Avaliação do Número de Células Positivas de NF κ B na Parede Brônquica

A **Figura 30** demonstra o número de células positivas para NF κ B presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no verão. Houve aumento na quantidade de células positivas para NF κ B nos grupos SAL L1 ($2,72 \pm 0,7$ células/10⁴μm²) quando comparado ao grupo SAL ($0,85 \pm 0,16$ células/10⁴μm²) ($p < 0,05$). Observamos aumento do número de células positivas para NF κ B nos grupos OVA ($3,9 \pm 0,26$ células/10⁴μm²), OVA L1 ($3,75 \pm 0,11$ células/10⁴μm²) e OVA L2 ($2,81 \pm 0,36$ células/10⁴μm²) quando comparados ao grupo SAL ($p < 0,05$).

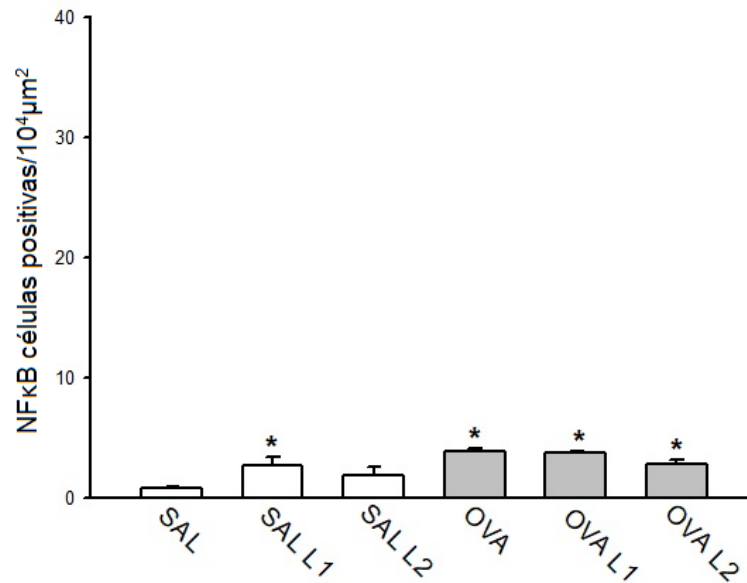


Figura 30 - Número de células positivas para NFκB nas vias aéreas

Média ± erro padrão; *p≤0,05 quando comparado ao grupo SAL , com aumento de 1000x.

5.1.8 Correlação

Observamos forte correlação (**Figura 31**) entre %Rrs com TIMP1 e MMP9; entre %Ers com IL4, IL-13, IL-17 e TIMP; e ainda correlação forte entre %Raw com MMP9 no verão.

Contudo, observamos correlação moderada entre %Rrs com IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, MMP12, TGF-β, fibras colágenas, isoprostano e iNOS; ainda observamos correlação moderada entre %Ers com macrófagos, IL-%, MMP12, fibras colágenas, isoprostano e iNOS. Houve ainda correlação moderada entre %Raw com IL-4, IL-5, IL17, TIMP1 e MMP12; encontramos ainda correlação moderada entre %Gtis com IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, TIMP1, fibras de colágeno, isoprostano e GP91phox. Houve também correlação moderada entre %Htis com IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, TIMP1, MMP12, TGF-β, fibras de colágeno e isoprostano.

Observamos ainda, correlação fraca (**Figura 31**) entre %Rrs com IL-13 e GP91phox; entre %Ers com células totais, IL-10, MMP9, TGF-β, GP91phox e NFκB;

houve ainda correlação fraca entre %Raw com IL-10, IL-13, TGF- β , fibras de colágeno, isoprostano e iNOS.

Encontramos ainda correlação fraca entre %Gtis com células totais, macrófagos, MMP9, MMP12, TGF- β , fibras colágenas, isoprostano e NF κ B; e houve ainda correlação fraca entre %Htis com macrófagos, MMP9, iNOS, GP91phox e NF κ B no verão.

VERÃO					
	% Rrs	% Ers	% Raw	% Gtis	% Htis
	Valor de p/coeficiente de correlação	Valor de p/coeficiente de correlação	Valor de p/coeficiente de correlação	Valor de p/coeficiente de correlação	Valor de p/coeficiente de correlação
Células Totais (FLBA)	0,90/0,02	0,00/0,46*	0,47/-0,12	0,05/0,33*	0,13/0,26
Eosinófilos(FLBA)	0,00/-0,61*	0,32/-0,17	0,00/-0,60*	0,14/-0,25	0,69/-0,07
Neutrófilos(FLBA)	0,02/-0,38*	0,52/0,11	0,00/-0,50*	0,93/0,01	0,46/0,13
Linfócitos(FLBA)	0,16/-0,23	0,51/0,11	0,04/-0,34*	0,57/0,09	0,75/0,05
Macrófagos(FLBA)	0,45/0,13	0,00/0,50*	0,87/-0,02	0,01/0,40*	0,03/0,35*
IL-4	0,00/0,67*	0,00/0,70*	0,00/0,55*	0,00/0,60*	0,00/0,59*
IL-5	0,00/0,65*	0,00/0,70*	0,00/0,53*	0,00/0,59*	0,00/0,63*
IL-10	0,00/0,57*	0,00/0,67*	0,00/0,46*	0,00/0,51*	0,00/0,66*
IL-13	0,00/0,47*	0,00/0,47*	0,03/0,35*	0,00/0,53*	0,00/0,56*
IL-17	0,00/0,58*	0,00/0,70*	0,00/0,53*	0,00/0,66*	0,00/0,64*
TIMP1	0,00/0,71*	0,00/0,70*	0,00/0,59*	0,00/0,64*	0,00/0,56*
MMP9	0,00/0,70*	0,01/0,72*	0,00/0,70*	0,01/0,41*	0,00/0,47*
MMP12	0,00/0,60*	0,00/0,40*	0,00/0,56*	0,00/0,44*	0,00/0,55*
TGF-β	0,00/0,53*	0,00/0,56*	0,00/0,47*	0,00/0,42*	0,00/0,57*
Fibras colágenas	0,00/0,56*	0,00/0,44*	0,00/0,44*	0,00/0,53*	0,00/0,57*
Isoprostano	0,00/0,55*	0,00/0,53*	0,00/0,46*	0,00/0,43*	0,00/0,53*
iNOS	0,00/0,61*	0,00/0,68*	0,00/0,47*	0,00/0,52*	0,00/0,49*
GP91phox	0,02/0,38*	0,00/0,47*	0,22/0,20	0,00/0,58*	0,00/0,45*
NFκB	0,23/0,20	0,01/0,40*	0,19/0,22	0,01/0,41*	0,01/0,39*

Figura 31 - Correlação entre hiperresponsividade brônquica e parâmetros inflamatórios e de remodelamento.

5.1.9 Análise Qualitativa

Fotomicrografias representativas são apresentadas na **Figura 32** e ilustram os processos inflamatórios, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo nas vias aéreas; processos inflamatórios são ilustrados por IL-17; as características de remodelamento da matriz extracelular por TIMP-1 e marcadores de estresse oxidativo por iNOS e NFκB. Todas as microfotografias foram tiradas com aumento de 400x.

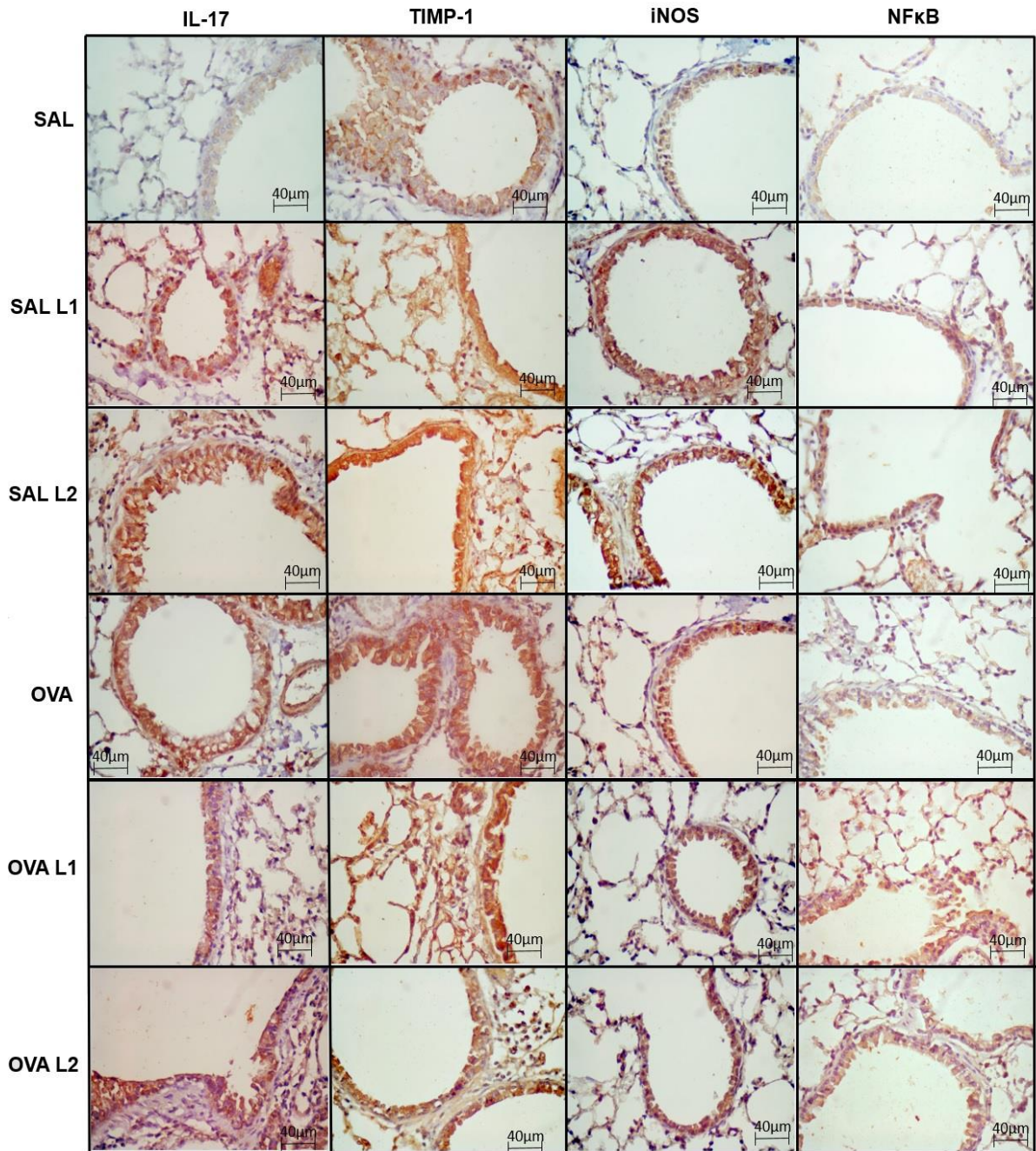


Figura 32 - Fotomicrografias representativas ilustram os processos inflamatórios, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo nas vias aéreas.

5.2 Inverno

5.2.1 Hiperresponsividade á Metacolina

5.2.1.1 Resposta Máxima de Resistência do Sistema Respiratório (%Rrs)

Os resultados da porcentagem máxima de aumento após metacolina da Rrs (%Rrs) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 33**. Observamos um aumento significativo no %Rrs após desafio com metacolina nos grupos SAL L1 ($64,14 \pm 3,8\%$) e SAL L2 ($101,29 \pm 5,7\%$) quando comparado ao grupo SAL ($3,2 \pm 1,10\%$) ($p \leq 0,05$). Também houve aumento significativo nos grupos OVA ($78,9 \pm 3,59\%$), OVA L1 ($227,74 \pm 49,9\%$), OVA L2 ($315,17 \pm 118,7\%$) quando comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve aumento significativo do %Rrs nos grupos OVA L1, SAL L2 e OVA L2 quando comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$) e aumento do %Rrs no grupo SAL L2 quando comparado ao grupo SAL L1 ($p \leq 0,05$).

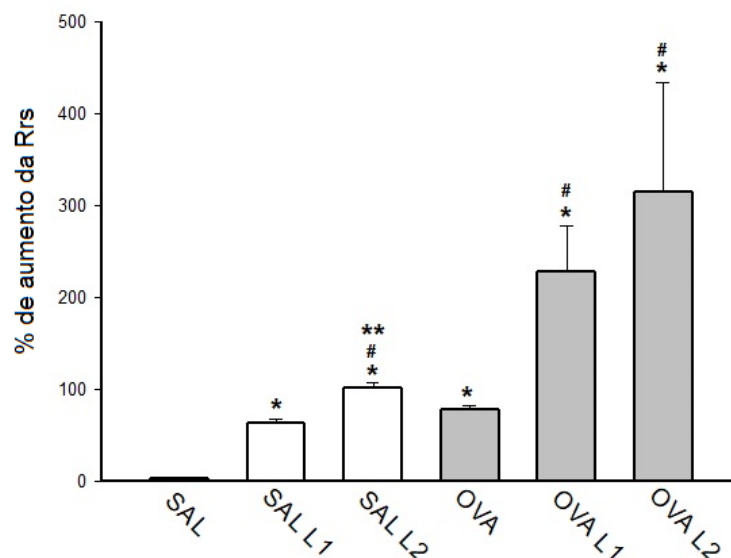


Figura 33 - Porcentagem de aumento da Rrs

Média ± erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA; **quando comparado ao grupo SAL L1

5.2.1.2 Resposta Máxima de Elastância do Sistema Respiratório (%Ers)

Os resultados da porcentagem máxima de aumento após metacolina da Ers (%Ers) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 34**. O %Ers teve um aumento significativo após desafio com metacolina nos grupos SAL L1 ($24,09 \pm 2,4\%$) e SAL L2 ($29,5 \pm 2,5\%$) quando comparados grupo SAL ($5,5 \pm 0,9\%$) ($p \leq 0,05$). Também houve aumento de %Ers no grupo OVA ($38,8 \pm 3\%$), grupo OVA L1 ($101,68 \pm 33,7\%$) e grupo OVA L2 ($248,47 \pm 159,8\%$) em relação ao grupo controle SAL ($p \leq 0,05$).

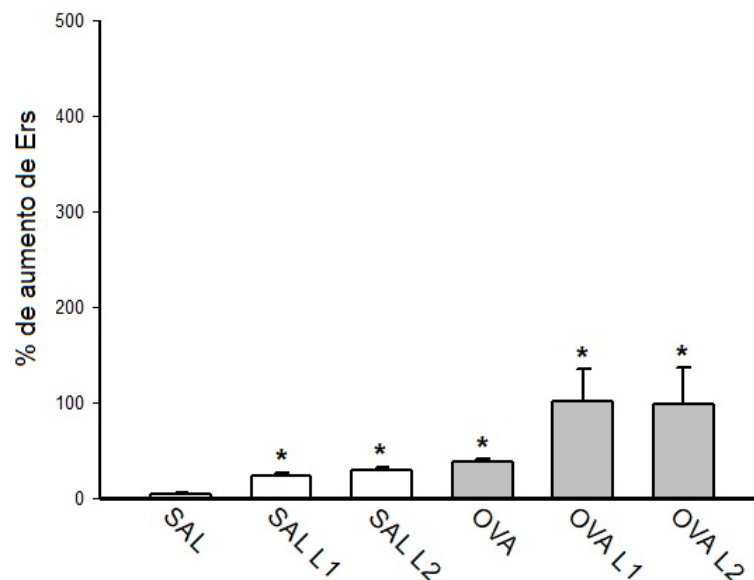


Figura 34 - Porcentagem de aumento da Ers

Média ± erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL.

5.2.1.3 Resposta Máxima de Resistência de Vias Aéreas (%Raw)

Os resultados da porcentagem máxima de aumento após metacolina da Raw (%Raw) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 35**. O %Raw teve um aumento significativo após desafio com metacolina nos grupos SAL L1 ($97,05 \pm 18,3\%$) e SAL L2 ($190,78 \pm 11,5\%$) quando

comparado ao grupo SAL ($3,27 \pm 0,84\%$) ($p \leq 0,05$). Também houve aumento de %Raw no grupo OVA ($121,2 \pm 13,23\%$), grupo OVA L1 ($202,52 \pm 20,5\%$) e grupo OVA L2 ($288,5 \pm 49,3\%$) em relação ao grupo controle SAL ($p \leq 0,05$). Houve aumento significativo do %Raw nos grupos OVA L1, SAL L2 e OVA L2 quando comparados ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

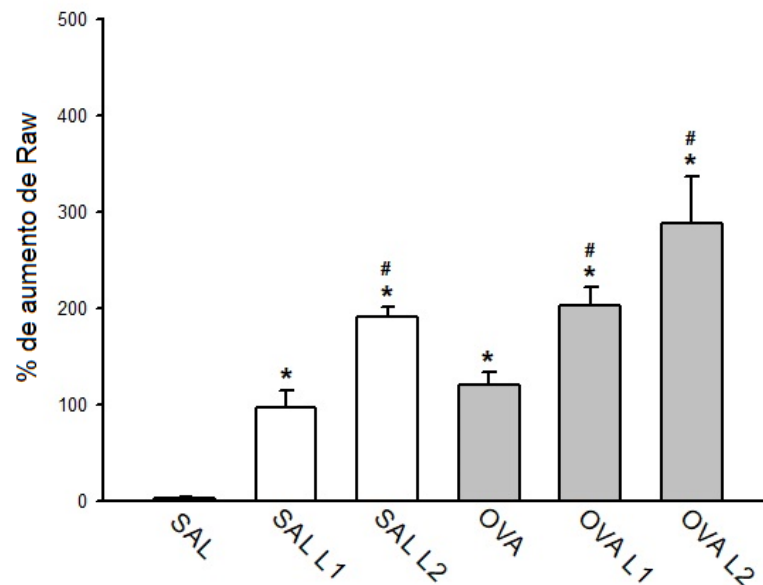


Figura 35 - Porcentagem de aumento da Raw

Média ± erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA.

5.2.1.4 Resposta Máxima de Resistência do Tecido Pulmonar (Gtis)

Os resultados da porcentagem máxima de aumento após metacolina da Gtis (%Gtis) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 36**. O %Gtis teve aumento significativo após desafio com metacolina nos grupos SAL L1 ($31,35 \pm 7,3\%$) e SAL L2 ($41,84 \pm 9,85\%$) quando comparado ao grupo SAL ($4,3 \pm 1,40\%$) ($p \leq 0,05$). Também houve aumento de %Gtis no grupo OVA ($96,743 \pm 10,43\%$), grupo OVA L1 ($158,84 \pm 47,44\%$) e grupo OVA L2 ($106,88 \pm 22,34\%$) em relação ao grupo controle SAL ($p \leq 0,05$).

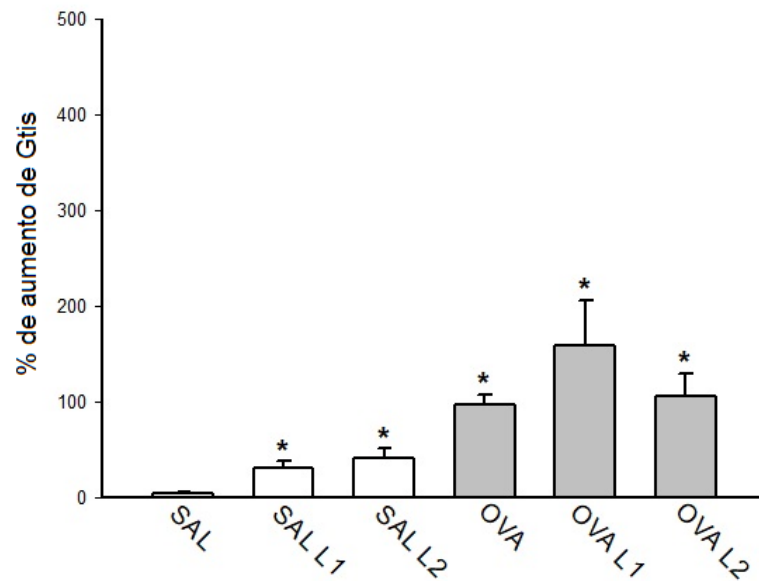


Figura 36 - Porcentagem de aumento de Gtis

Média ± erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL.

5.2.1.5 Resposta Máxima de Elastância do Tecido Pulmonar (%Htis)

Os resultados da porcentagem máxima de aumento após metacolina da Htis (%Htis) nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 37**. O %Htis teve um aumento significativo após desafio com metacolina nos grupos SAL L1 (13,95±4,6%) e SAL L2 (10,72±1,8%) quando comparado ao grupo SAL (1,8±0,43%) ($p \leq 0,05$). Também houve aumento da %Htis no grupo OVA (30,31±3,49%), grupo OVA L1 (38,87±17%) e grupo OVA L2 (45,3±12,9%) em relação ao grupo controle SAL ($p \leq 0,05$).

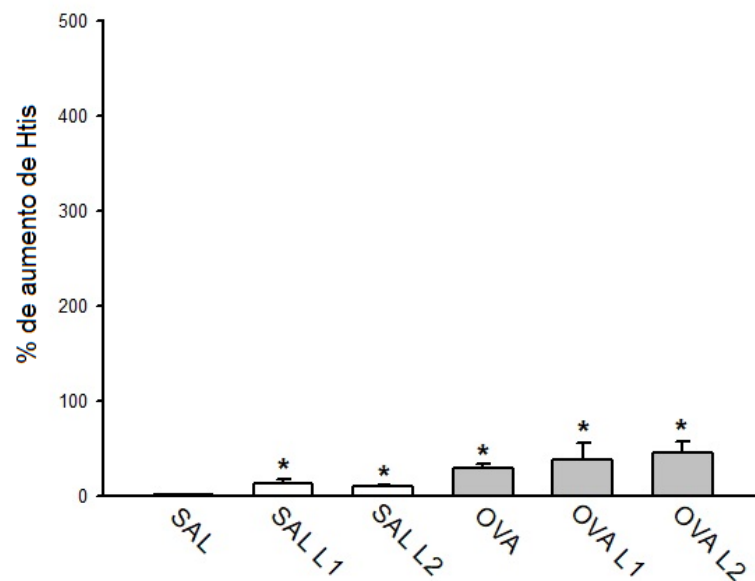


Figura 37 - Porcentagem de aumento de Htis

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL.

5.2.2 Óxido Nítrico Exalado

Foi coletado o óxido nítrico exalado nos grupos inverno. Contudo houve uma falha no aparelho de medida e não foi possível avaliar os dados.

5.2.3 Análise do Fluido do Lavado Broncoalveolar (FLBA)

Os resultados da contagem de células totais presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Tabela 4**. Observamos aumento significativo da quantidade de células totais nos grupos SAL L1, OVA, OVA L1, e OVA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$).

Tabela 4 - Fluido do Lavado Broncoalveolar células totais e diferenciais inverno

Lavado Broncoalveolar	SAL	SAL L1	SAL L2	OVA	OVA L1	OVA L2
Células Totais (10 ⁴ células/mL)	0,90±0,06	2,84±0,56*	4,80±2,15	12,26±0,64*	5,27±0,90*	4,62±1,41*
Eosinófilos (10 ⁴ células/mL)	0,23±0,07	0,00±0,00	0,00±0,00	3,48±0,2*	0,17±0,042	0,69±0,26
Neutrófilos (10 ⁴ células/mL)	0,05±0,03	0,00±0,00	0,16±0,09	1,79±0,26*	0,15±0,023	0,17±0,07
Linfócitos (10 ⁴ células/mL)	0,03±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	1,15±0,34*	0,00±0,00	0,00±0,00
Macrófagos (10 ⁴ células/mL)	0,6±0,07	2,39±0,74*	4,64±2,06	5,95±0,63*	4,94±0,89*	2,69±0,77*

*Tabela 4 – Média ± erro padrão do número de células totais e diferenciais (10⁴ células/ μ L) no fluido do lavado broncoalveolar; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; ** $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1.*

Os resultados da contagem de eosinófilos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Tabela 4**. Houve aumento dos eosinófilos no grupo OVA quando comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$).

Os resultados da contagem de neutrófilos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Tabela 4**. Observamos aumento significativo dos neutrófilos no grupo OVA comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$).

Os resultados da contagem de linfócitos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Tabela 4**. Observamos aumento significativo de linfócitos no grupo OVA comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$).

Os resultados da contagem de macrófagos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Tabela 4**. Observamos aumento significativo dos macrófagos nos grupos SAL L1, OVA, OVA L1 e OVA L2 comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$).

5.2.4 Inflamação

5.2.4.1 Avaliação do Número de Células Positivas de IL-4 na Parede Brônquica

Os resultados da contagem de células positivas para IL-4 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 38**. Observamos aumento significativo da quantidade de células positivas para IL-4 nos grupos SAL L1($6,68 \pm 0,36$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), SAL L2($8,92 \pm 0,22$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparados ao grupo SAL ($0,27 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos ainda aumento significativo da quantidade de células positivas para IL-4 nos grupos OVA ($4,38 \pm 0,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1($19,05 \pm 0,63$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2($22,61 \pm 0,96$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento significativo na quantidade de células positivas para IL-4 nos grupos SAL L1, SAL L2, OVA L1 e OVA L2 quando comparados ao grupo OVA ($p \leq 0,05$). Encontramos aumento na quantidade de células positivas para IL-4 no grupo SAL L2 quando comparado ao grupo SAL L1 ($p \leq 0,05$). Além disso, houve aumento da quantidade de células positivas para IL-4 no grupo OVA L2 quando comparado ao grupo OVA L1 ($p \leq 0,05$).

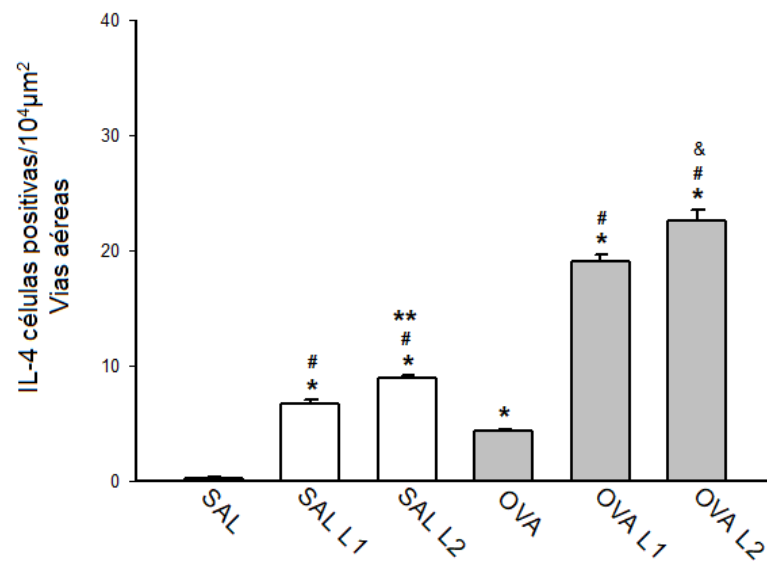


Figura 38 - Número de células positivas para IL-4 nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA; ** $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1; & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA L1, com aumen de 1000x.

5.2.4.2 Avaliação do Número de Células Positivas de IL-5 na Parede Brônquica

Os resultados da contagem de células positivas para IL-5 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 39**. Observamos aumento significativo da quantidade de células positivas para IL-5 nos grupos SAL L1 ($8,22 \pm 1,61$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($14,87 \pm 2,83$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($0,18 \pm 0,02$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos ainda aumento significativo da quantidade de células positivas para IL-5 nos grupos OVA ($3,80 \pm 0,14$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($13,72 \pm 1,75$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($16,27 \pm 2,18$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento significativo na quantidade de células positivas para IL-5 nos grupos SAL L2, OVA L1 e OVA L2 quando comparados ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

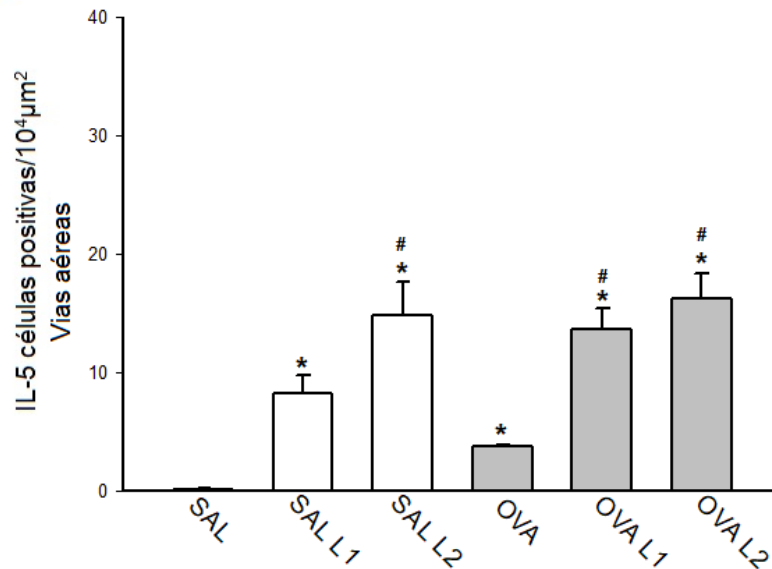


Figura 39 - Número de células positivas para IL-5 nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

5.2.4.3 Avaliação do Número de Células Positivas de IL-10 na Parede Brônquica

Os resultados da contagem de células positivas para IL-10 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 40**. Observamos aumento significativo da quantidade de células positivas para IL-10 nos grupos SAL L1 ($4,18 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($3,72 \pm 0,13$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), comparado ao grupo SAL ($0,19 \pm 0,05$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$). Observamos ainda aumento significativo da quantidade de células positivas para IL-10 nos grupos OVA ($3,16 \pm 0,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($4,15 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($3,61 \pm 0,29$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento significativo na quantidade de células positivas para IL-10 nos grupos SAL L1 e OVA L1 quando comparados ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

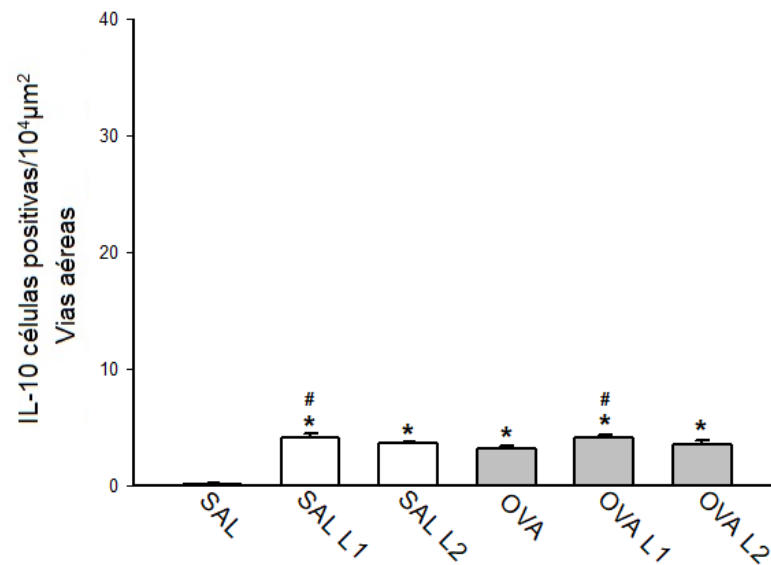


Figura 40 - Número de células positivas para IL-10 nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

5.2.4.4 Avaliação do Número de Células Positivas de IL-13 na Parede Brônquica

Os resultados da contagem de células positivas para IL-13 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 41**. Observamos aumento significativo da quantidade de células positivas para IL-13 nos grupos SAL L1 ($3,86 \pm 0,23$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($3,20 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado ao grupo SAL ($0,29 \pm 0,14$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos ainda aumento significativo da quantidade de células positivas para IL-13 nos grupos OVA ($3,70 \pm 0,19$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($16,06 \pm 0,81$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($18,43 \pm 0,48$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento significativo na quantidade de células positivas para IL-13 nos grupos OVA L1 e OVA L2 quando comparados ao grupo OVA ($p \leq 0,05$). Além disso houve aumento da quantidade de células positivas para IL-13 no grupo OVA L2 quando comparado ao grupo OVA L1 ($p \leq 0,05$).

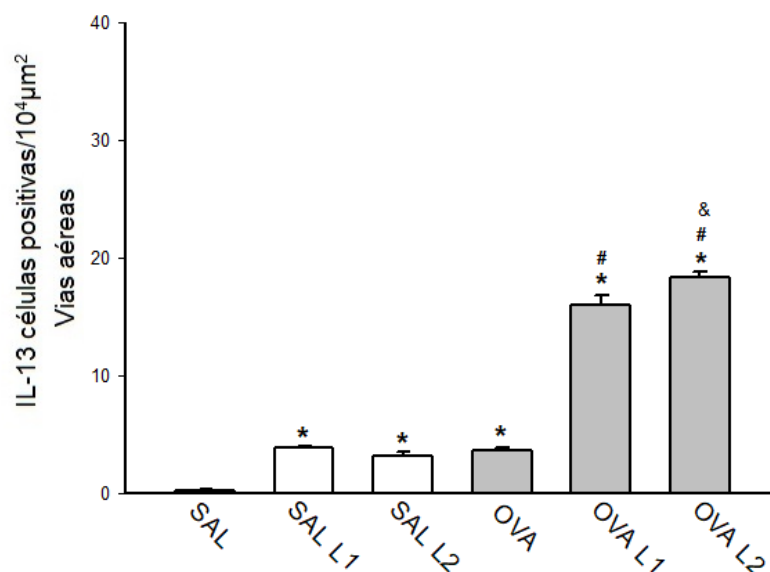


Figura 41 - Número de células positivas para IL-13 nas vias aéreas

Média ± erro padrão; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA; & quando comparado ao grupo OVA L1, com aumento de 1000x.

5.2.4.5 Avaliação do Número de Células Positivas de IL-17 na Parede Brônquica

Os resultados da contagem de células positivas para IL-17 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 42**. Observamos aumento significativo da quantidade de células positivas para IL-17 nos grupos SAL L1 ($3,13 \pm 0,46$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($4,59 \pm 0,71$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($0,87 \pm 0,12$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos ainda aumento significativo da quantidade de células positivas para IL-17 nos grupos OVA ($4,99 \pm 0,25$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($7,9 \pm 1,55$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($7,45 \pm 0,54$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento significativo na quantidade de células positivas para IL-17 nos grupos OVA L2 quando comparado ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

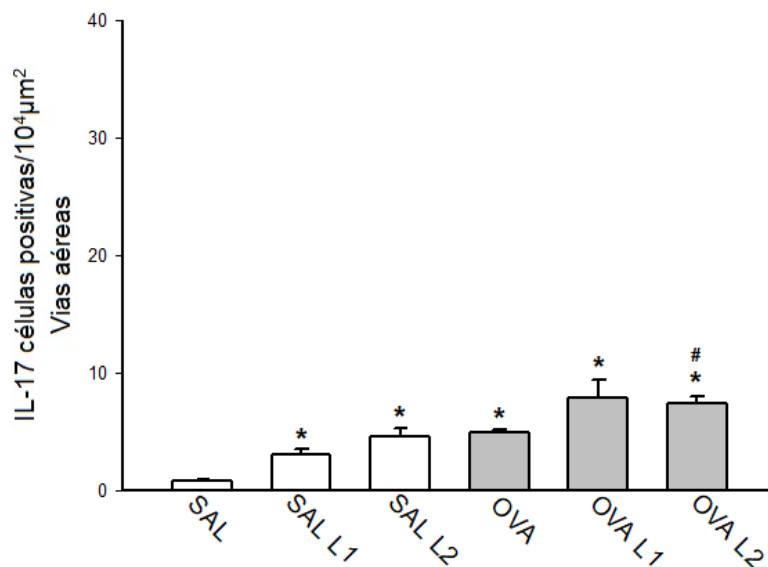


Figura 42 - Número de células positivas para IL-17 nas vias aéreas

Média ± erro padrão; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

5.2.5 Remodelamento

5.2.5.1 Avaliação do Número de Células Positivas de TIMP-1 na Parede Brônquica

Os resultados da contagem de células positivas para TIMP1 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 43**. Observamos aumento significativo da quantidade de células positivas para TIMP1 nos grupos SAL L1 ($13,82 \pm 0,06$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), SAL L2 ($17,69 \pm 1,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($0,33 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$). Observamos ainda aumento significativo da quantidade de células positivas para TIMP1 nos grupos OVA ($3,23 \pm 0,23$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($22,68 \pm 2,33$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($24,6 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento significativo na quantidade de células positivas para TIMP1 nos grupos SAL L1, SAL L2, OVA L1 e OVA L2 quando comparados ao grupo OVA ($p < 0,05$).

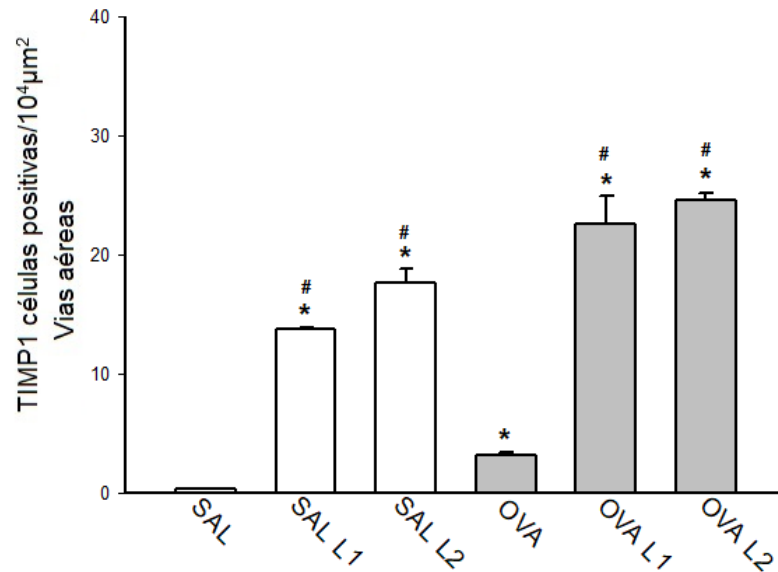


Figura 43 - Número de células positivas para TIMP1 nas vias aéreas

Média ± erro padrão; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

5.2.5.2 Avaliação do Número de Células Positivas de MMP9 na Parede Brônquica

Os resultados da contagem de células positivas para MMP9 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 44**. Observamos aumento significativo da quantidade de células positivas para MMP9 nos grupos SAL L1 ($21,6 \pm 1,72$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($15,28 \pm 3,31$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($0,08 \pm 0,03$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos ainda aumento significativo da quantidade de células positivas para MMP9 nos grupos OVA ($3,22 \pm 0,25$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($13,39 \pm 1,77$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($15,85 \pm 2,65$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento significativo na quantidade de células positivas para MMP9 nos grupos SAL L1, SAL L2, OVA L1 e OVA L2 quando comparados ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

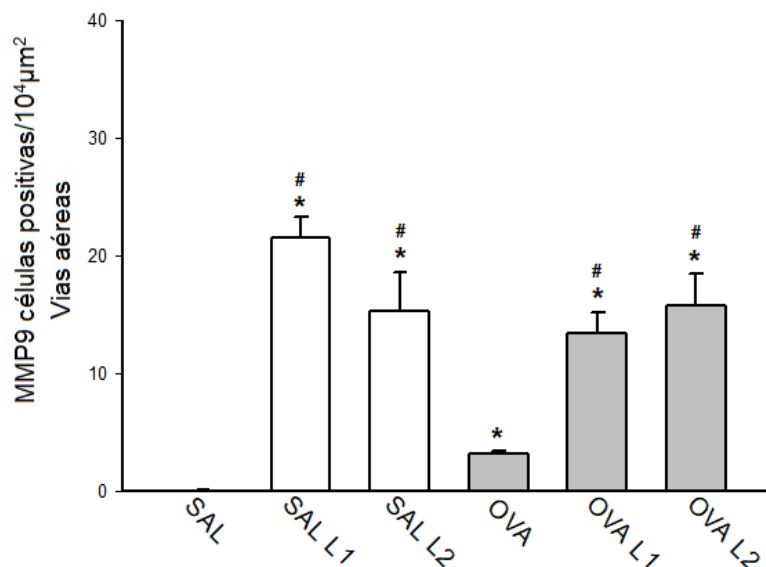


Figura 44 - Número de células positivas para MMP12 nas vias aéreas

Média ± erro padrão; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA; com aumento de 1000x.

5.2.5.3 Avaliação do Número de Células Positivas de MMP-12 na Parede Brônquica

Os resultados da contagem de células positivas para MMP12 presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 45**. Observamos aumento significativo da quantidade de células positivas para MMP12 nos grupos SAL L1 ($13,35 \pm 3,63$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($11,24 \pm 1,98$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($0,26 \pm 0,06$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos ainda aumento significativo da quantidade de células positivas para MMP12 nos grupos OVA ($3,63 \pm 0,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($14,96 \pm 3,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($13,45 \pm 2,23$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Houve também aumento significativo na quantidade de células positivas para MMP12 nos grupos SAL L1, SAL L2, OVA L1 e OVA L2 quando comparados ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

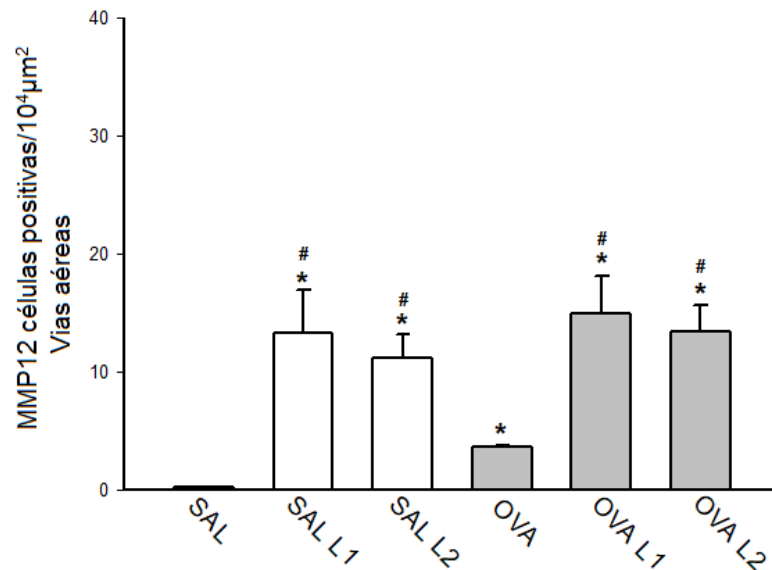


Figura 45 - Número de células positivas para MMP12 nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA; com aumento de 1000x.

5.2.6 Avaliação do Número de Células Positivas de TGF- β na Parede Brônquica

Os resultados da contagem de células positivas para TGF- β presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, OVA, SAL L1, OVA L1, SAL L2 e OVA L2 no inverno estão demonstrados na **Figura 46**. Observamos aumento significativo da quantidade de células positivas para TGF- β nos grupos SAL L1 ($4,77 \pm 0,78$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($4,87 \pm 0,25$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), comparado ao grupo SAL ($0,16 \pm 0,03$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos ainda aumento significativo da quantidade de células positivas para TGF- β nos grupos OVA ($3,94 \pm 0,31$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($5,66 \pm 0,74$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($5,39 \pm 0,26$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$).

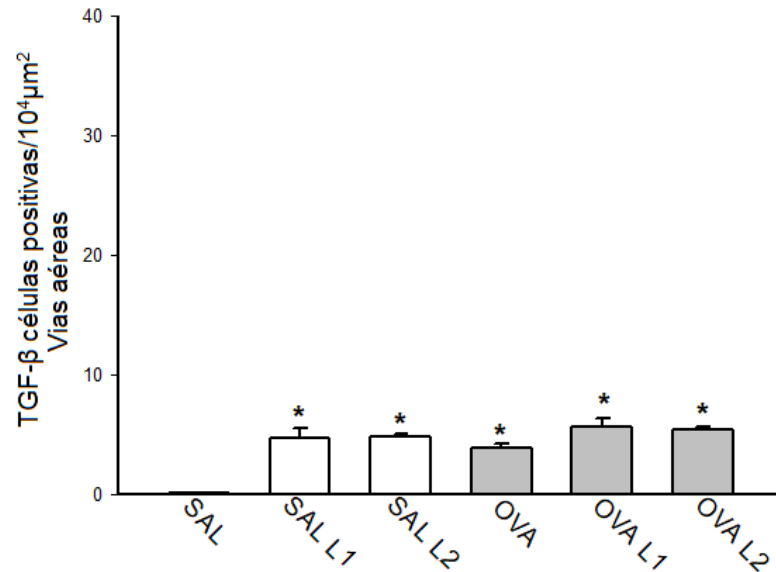


Figura 46 - Número de células positivas para TGF-β nas vias aéreas

Média ± erro padrão; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; com aumento de 1000x.

5.2.6.1 Avaliação do Conteúdo de Fibras Colágenas na Parede Brônquica

A **Figura 47** demonstra o conteúdo de fibras colágenas presentes nas vias aéreas expresso em porcentagem nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno. Houve aumento da quantidade de fibras colágenas nos grupos SAL L1 ($12,1 \pm 1,01$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($12,77 \pm 2,36$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($6,4 \pm 0,28$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Observamos ainda aumento significativo da quantidade de células positivas para fibras colágenas nos grupos OVA ($11,52 \pm 0,69$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($11,82 \pm 1,58$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($12,84 \pm 1,62$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$).

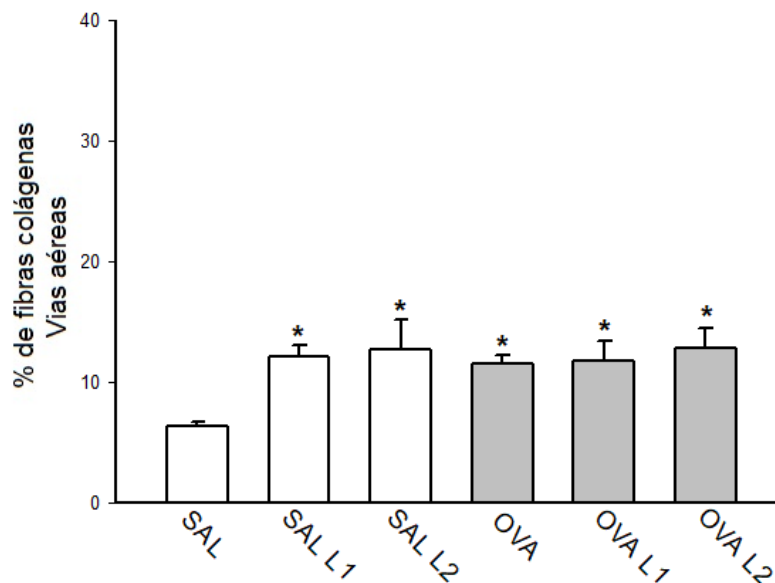


Figura 47 - Porcentagem de fibras colágenas nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; com aumento de 1000x.

5.2.7 Estresse Oxidativo

5.2.7.1 Avaliação do Número de Células Positivas de iNOS na Parede Brônquica

A **Figura 48** demonstra o número de células positivas para iNOS presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno. Houve aumento no número de células positivas para iNOS nos grupos SAL L1 ($2,77 \pm 0,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($3,38 \pm 0,29$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado ao grupo SAL ($0,43 \pm 0,06$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$); nos grupos OVA ($3,43 \pm 0,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($6,46 \pm 0,17$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($8,6 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) também houve aumento do número de células quando comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos aumento da iNOS nos grupos OVA L1 e OVA L2 quando comparados ao grupo OVA ($p \leq 0,05$). Além disso, observamos um aumento no número de células positivas no grupo OVA L2 quando comparado ao grupo OVA L1 ($p \leq 0,05$).

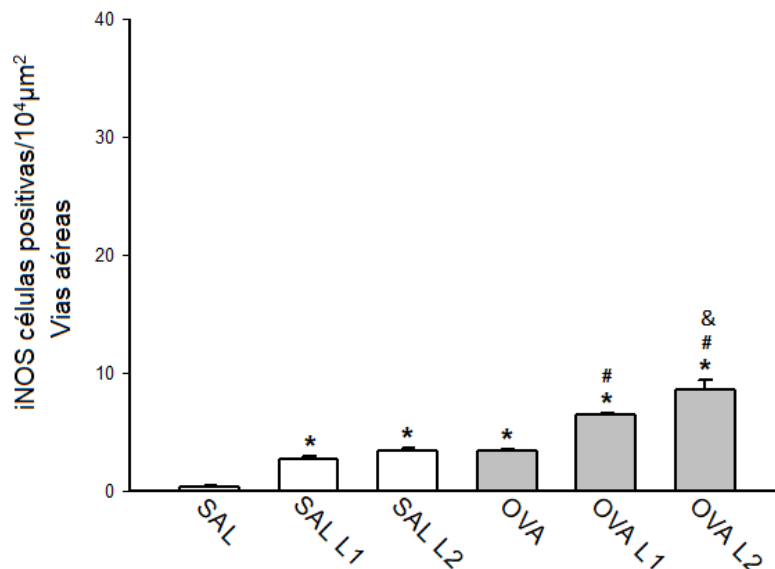


Figura 48 - Número de células positivas para iNOS nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA; & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA L1, com aumento de 1000x.

5.2.6.2 Avaliação do Conteúdo de Isoprostano na Parede Brônquica

A **Figura 49** demonstra o conteúdo de isoprostano presente nas vias aéreas expresso em porcentagem nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno. Houve aumento da porcentagem de isoprostano nos grupos SAL L1 (19,3 \pm 1,9%) e SAL L2 (35,9 \pm 2,4%) quando comparados ao grupo SAL (7,2 \pm 0,3%) ($p \leq 0,05$). Mostramos um aumento da porcentagem de isoprostano no grupo SAL L2 quando comparado ao grupo SAL L1 ($p < 0,05$); nos grupos OVA (12,7 \pm 0,6%), OVA L1 (37,7 \pm 2%) e OVA L2 (27,9 \pm 2,6%) também houve aumento do conteúdo quando comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$). Observamos aumento da porcentagem de isoprostano nos grupos OVA L1 e OVA L2 quando comparados ao grupo OVA ($p \leq 0,05$). Além disso, mostramos um aumento da porcentagem de isoprostano no grupo OVA L1 quando comparado ao grupo OVA L2 ($p \leq 0,05$).

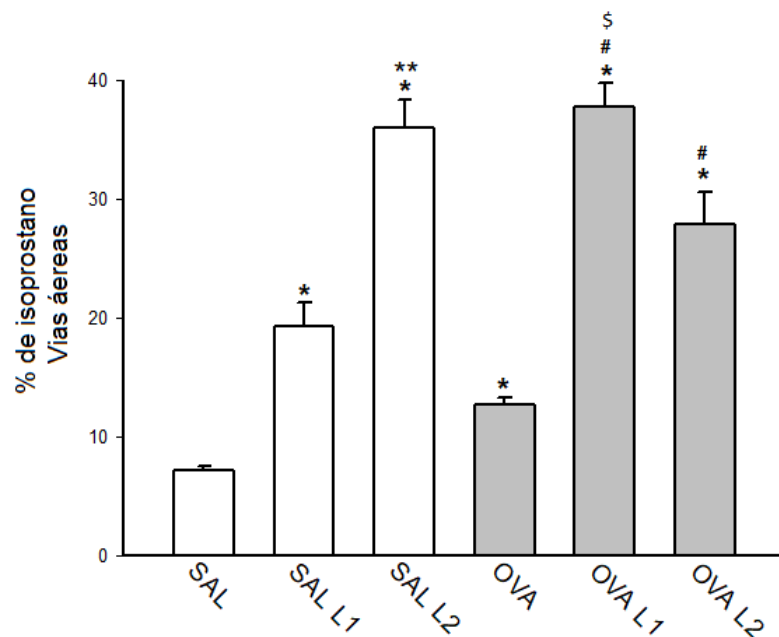


Figura 49 - Porcentagem de isoprostano nas vias aéreas

Média \pm erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA; ** $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL L1; \$ $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA L2, com aumento de 1000x.

5.2.6.3 Avaliação do Número de Células Positivas de GP91phox na Parede Brônquica

A **Figura 50** demonstra o número de células positivas para GP91phox presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno. As células positivas para GP91phox estão aumentadas nos grupos SAL L1 ($3,95 \pm 0,67$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($3,28 \pm 0,34$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado ao grupo SAL ($0,29 \pm 0,23$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Nos grupos OVA ($4,01 \pm 0,76$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($3,31 \pm 0,37$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($5,25 \pm 0,66$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) houve aumento do número de células positivas quando comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$).

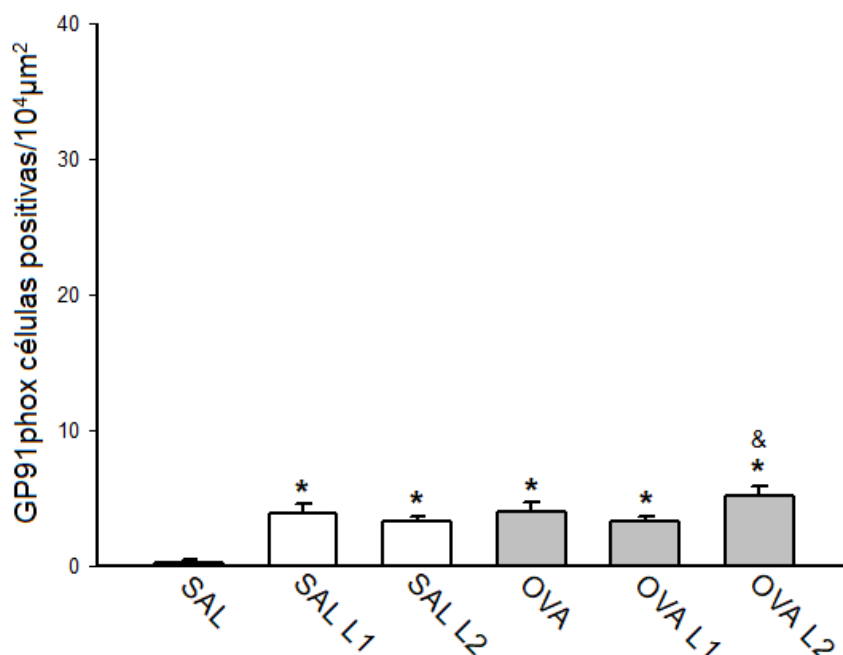


Figura 50 - Número de células positivas para GP91phox nas vias aéreas

Média ± erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA L1, com aumento de 1000x.

5.2.8 Vias Sinalizadoras

5.2.8.1 Avaliação do Número de Células Positivas de NF κ B na Parede Brônquica

A **Figura 51** demonstra o número de células positivas para NF κ B presentes nas vias aéreas nos grupos SAL, SAL L1, SAL L2, OVA, OVA L1 e OVA L2 no inverno. Houve aumento no número de células positivas para NF κ B nos grupos SAL L1 ($6,55 \pm 1,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL L2 ($3,03 \pm 0,73$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado ao grupo SAL ($0,805 \pm 0,16$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p \leq 0,05$). Nos grupos OVA ($3,9 \pm 0,26$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA L1 ($3,39 \pm 1,01$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA L2 ($5,5 \pm 0,93$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) também houve aumento no número de células quando comparado ao grupo SAL ($p \leq 0,05$). Observamos aumento do NF κ B no grupo SAL L1 quando comparado ao grupo OVA ($p \leq 0,05$).

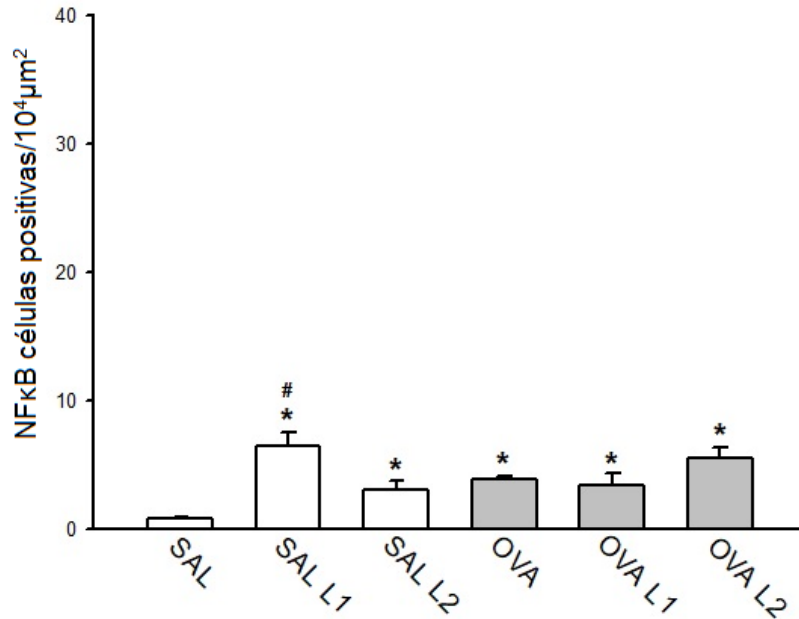


Figura 51- Número de células positivas para NFκB nas vias aéreas

Média ± erro padrão; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

5.2.9 Correlação

Observamos forte correlação (**Figura 50**) de %Rrs com IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, TIMP1, isoprostano e iNOS; entre %Ers com IL-4, IL-13, IL-17 e iNOS. Houve também correlação forte entre %Raw com IL-4, IL-5, TIMP1 e iNOS; houve ainda correlação forte entre %Gtis com IL-17 e iNOS e também de %Htis com IL-17 no inverno.

No inverno, também observamos correlação moderada (**Figura 52**) de %Rrs com células totais, MMP12, TGF-β e GP91phox no inverno; houve ainda correlação moderada entre %Ers com células totais, IL-5, TIMP1, isoprostano e GP91phox. Houve também correlação moderada entre %Raw com IL-13, IL-17, MMP12, TGF-β e isoprostano; entre %Gtis com células totais, neutrófilos, macrófagos, IL-4, IL-13, TIMP1 e GP91phox; e ainda correlação moderada entre % Htis com células totais, IL-13, iNOS e GP91phox.

Observamos correlação fraca (**Figura 52**) no inverno entre %Rrs com macrófagos, IL-10, MMP9 e NF κ B; houve ainda correlação fraca entre %Ers com neutrófilos, macrófagos, IL-10, MMP12, TGF- β , fibras de colágeno e NF κ B. Observamos ainda correlação fraca entre %Raw com células totais, macrófagos, IL-10, MMP9 e GP91phox; houve ainda correlação fraca entre %Gtys com eosinófilos, IL-5, MMP12, TGF- β , isoprostano e NF κ B; e encontramos ainda correlação fraca entre %Htis com eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, IL-4, IL-5, TIMP1, MMP12, TGF- β , Fibras de Colágeno e NF κ B.

INVERNO					
	% Rrs	% Ers	% Raw	% Gtis	% Htis
	Valor de p/coeficiente de correlação	Valor de p/coeficiente de correlação	Valor de p/coeficiente de correlação	Valor de p/coeficiente de correlação	Valor de p/coeficiente de correlação
Células Totais (FLBA)	0,00/0,54*	0,00/0,54*	0,02/0,38*	0,00/0,61*	0,00/0,61*
Eosinófilos(FLBA)	0,06/0,31	0,06/0,31	0,64/-0,08	0,00/0,43*	0,02/0,38*
Neutrófilos(FLBA)	0,06/0,32	0,00/0,46*	0,23/0,20	0,00/0,54*	0,00/0,44*
Linfócitos(FLBA)	0,00/-0,46*	0,19/-0,22	0,00/-0,50*	0,80/-0,04	0,99/-0,00
Macrófagos(FLBA)	0,01/0,41*	0,00/0,49*	0,04/0,33*	0,00/0,55*	0,00/0,45*
IL-4	0,00/0,87*	0,00/0,72*	0,00/0,82*	0,00/0,59*	0,00/0,49*
IL-5	0,00/0,72*	0,00/0,59*	0,00/0,74*	0,01/0,42*	0,02/0,39*
IL-10	0,00/0,47*	0,01/0,41*	0,00/0,46*	0,07/0,30	0,07/0,31
IL-13	0,00/0,75*	0,00/0,79*	0,00/0,66*	0,00/0,68*	0,00/0,64*
IL-17	0,00/0,75*	0,00/0,73*	0,00/0,68*	0,00/0,80*	0,00/0,75*
TIMP1	0,00/0,78*	0,00/0,65*	0,00/0,74*	0,00/0,50*	0,00/0,46*
MMP9	0,01/0,42*	0,11/0,27	0,01/0,42*	0,35/0,16	0,50/0,11
MMP12	0,00/0,59*	0,00/0,48*	0,00/0,64*	0,01/0,40*	0,05/0,33*
TGF-β	0,00/0,58*	0,00/0,50*	0,00/0,60*	0,03/0,35*	0,01/0,40*
Fibras colágenas	0,07/0,30	0,04/0,34*	0,15/0,24	0,09/0,28	0,02/0,38*
Isoprostano	0,00/0,71*	0,00/0,53*	0,00/0,64*	0,00/0,43*	0,08/0,30
iNOS	0,00/0,79*	0,00/0,80*	0,00/0,72*	0,00/0,75*	0,00/0,68*
GP91phox	0,00/0,61*	0,00/0,56*	0,00/0,45*	0,00/0,68*	0,00/0,68*
NFκB	0,04/0,34*	0,02/0,40*	0,09/0,28	0,01/0,42*	0,01/0,42*

Figura 52 - Correlação entre hiperresponsividade brônquica e parâmetros inflamatórios e de remodelamento.

5.2.10 Análise Qualitativa

Fotomicrografias representativas são apresentadas na Figura 53 e ilustram os processos inflamatórios, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo nas vias aéreas; processos inflamatórios são ilustrados por IL-17; as características de remodelamento da matriz extracelular por TIMP-1 e marcadores de estresse oxidativo por iNOS e NFκB. Todas as microfotografias foram tiradas com aumento de 400x.

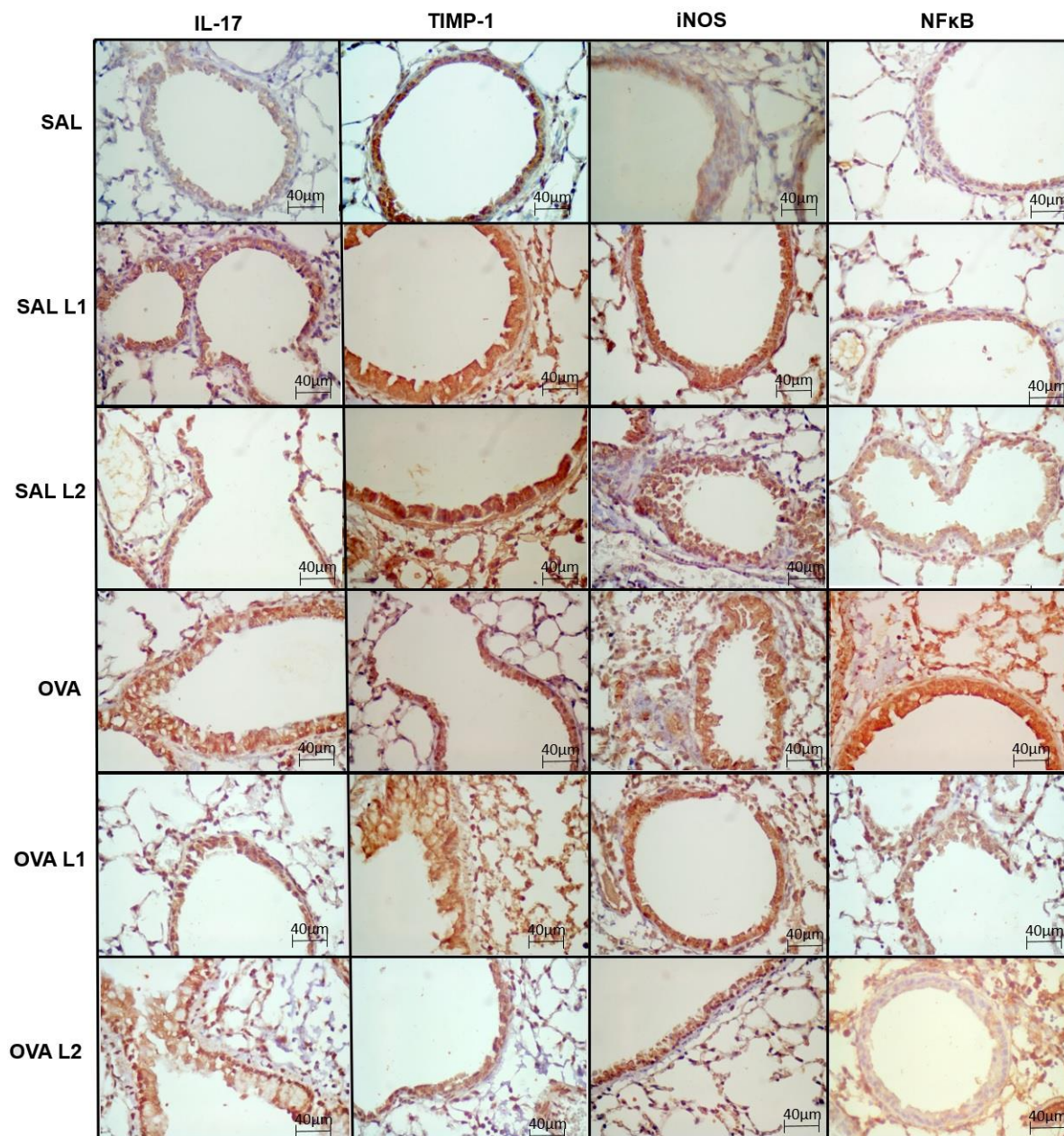


Figura 53 - Fotomicrografias representativas ilustram os processos inflamatórios, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo nas vias aéreas.

5.3 Resultados Parciais do Material Particulado

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

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

Elementos que mais chamaram atenção na análise realizada foram cloreto (Cl), ferro (Fe) e enxofre (S). As concentrações de cloro foram mais elevadas no hotel (local2) do que na empresa (local1) tanto no material particulado grosso quanto no particulado fino no inverno (Figura 54).

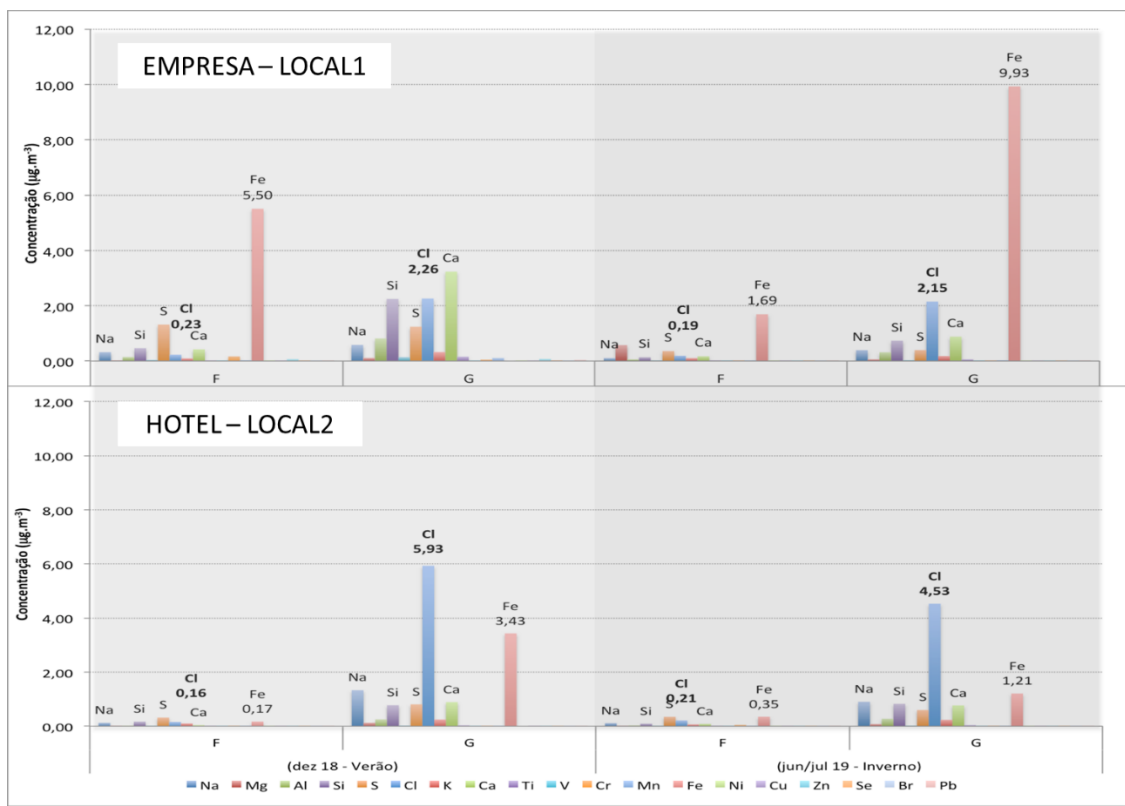


Figura 54 - Análise do material particulado.

Dados parciais cedidos pela professora Christine Bourotte

6. DISCUSSÃO

Foi evidenciado aumento da hiperresponsividade brônquica em animais sadios expostos a locais poluídos, bem como aumento de células positivas para inflamação, remodelamento e estresse oxidativo quando comparados a animais sadios tanto no verão quanto no inverno mantidos em ambiente controlado no biotério em São Paulo. Os mecanismos envolvidos com tais observações sugerem que a ativação da via de sinalização do NF κ B motivou um aumento na porcentagem de isoprostano (8-iso-PGF2 α), e um aumento na contagem de células positivas de iNOS e GP91phox.

O nosso modelo experimental de inflamação pulmonar mostrou hiperresponsividade aumentada à metacolina com aumento da resistência das vias aéreas e do parênquima pulmonar, bem como um aumento de células positivas para IL-4, IL-5 e IL-13, indicando acentuação da resposta inflamatória. Além disso, houve aumento no número de células positivas para TIMP-1, MMP9, MMP12 demonstrando aumento do remodelamento. O estresse oxidativo foi exacerbado pelo aumento na porcentagem de isoprostano e na quantidade de células iNOS-positivas em ambas as estações avaliadas.

Concomitantemente à análise realizada com o modelo experimental, foi realizado estudo geoquímico da região nos mesmos períodos de verão e inverno para caracterização do material particulado presente na área gerida pela professora Christine Bourotte. A fração grosseira tem cerca de 80% de MP₁₀. As concentrações médias de MP grosseiro foram maiores do que MP fino para ambos os locais de coleta e ambas as estações. Além disso, as concentrações médias no local 1 foram maiores do que no local 2 no verão e no inverno (dados não mostrados). Os elementos que apresentaram maior concentração no material particulado foram cloreto (Cl), ferro (Fe)

e enxofre (S). As concentrações de cloro foram maiores no local 2 do que no local 1, tanto no material grosso quanto no fino no inverno, conforme demonstrados **na figura 52** anteriormente.

Pedruzzi et al. (2019) constataram que as emissões locais juntamente com as emissões externas foram responsáveis por gerar um aumento nas concentrações de ozônio e MP, esse aumento nas concentrações de poluentes causou um aumento na exposição à poluição do ar e conseqüentemente a geração de diversas reclamações da população local na cidade de Vitória. A Agência Estadual de Proteção Ambiental em conjunto com as autoridades locais tenta desenvolver estratégias para minimizar a poluição do ar e ainda reduzir os impactos na população (IEMA, 2021)

Além disso, pode-se observar uma acentuação da hiperresponsividade brônquica nos animais que foram sensibilizados com ovoalbumina, pois já apresentavam inflamação pulmonar alérgica prévia, e também um aumento significativo da inflamação e do remodelamento nesses animais. O fato é que podemos classificar como piora do processo inflamatório e exacerbação das respostas inflamatórias após exposição ao material particulado na região de Vitória em ambas as estações. O aumento do conteúdo de isoprostano e células positivas para iNOS podem explicar o mecanismo envolvido nessa exacerbação.

Em relação à avaliação da hiperresponsividade à metacolina dos animais, observamos um aumento na resposta máxima de resistência tanto do sistema respiratório (%Rrs) quanto das vias aéreas (%Raw) e um incremento na resposta máxima de elastância também do sistema respiratório (%Ers) nos grupos SAL L1 e SAL L2 quando comparativamente ao grupo SAL posteriormente ao desafio com metacolina, sinalizando hiperresponsividade brônquica. Exacerbação da

hiperresponsividade também foi observada em animais sensibilizados quando comparados os grupos OVA L1 e OVA L2 em relação ao grupo OVA (%Rrs e %Raw).

A hiperresponsividade é reconhecida pela broncoconstrição excessiva como resultado de estímulos específicos, causando estenose das vias aéreas e consequente aumento da resistência das vias aéreas. Em indivíduos saudáveis, essa hiperresponsividade brônquica pode ser causada pelo contato da via aérea com o MP e desencadear o início de uma cascata de mecanismos pró-inflamatórios. (LU, et al.2021) e em indivíduos com doenças pulmonares prévias, tal exposição leva a uma exacerbação do quadro clínico e piora progressiva (WU, et al. 2021). Há evidências sólidas na literatura de que a exposição a MP está associada a hiperresponsividade brônquica (CHURG et al. 2003), aumento do estresse oxidativo (QU et al. 2017; CIENCEWICKI et al. 2008), desequilíbrio subsequente como uma função das células Th₁ e Th₂ (KRUG et al. 2015; EIYMO, et al. 2016) e consequentemente remodelamento da parede das vias aéreas e perpetuação da broncoconstrição. Os dados encontrados na literatura confirmam nossos achados em que observamos aumento da hiperresponsividade brônquica, aumento das células inflamatórias e aumento do remodelamento em nosso modelo de asma.

O MP é capaz de regular diferentes vias de sinalização relacionadas a mecanismos inflamatórios, como a quantidade de citocinas do perfil Th₂ no FLBA, dosagem de histamina e leucotrienos, infiltração de eosinófilos assim como perpetua a hiperresponsividade brônquica (OGINO et al. 2014). Zhao et al. (2018) esclarece que o contato com MP é capaz de promover uma resposta imune predominantemente de perfil Th₂, estimulando a liberação de interleucina 33 (IL-33).

A resposta inflamatória evidenciada em nossos achados, com aumento de citocinas pró-inflamatórias em animais saudáveis, comprova a ação inflamatória da interação do material particulado presente na região com o trato respiratório, desencadeando um processo inflamatório que pode ser inflamação pulmonar alérgica causada pela injeção intraperitoneal de ovoalbumina. Evidenciamos quantidade semelhante de células inflamatórias positivas para todas as interleucinas avaliadas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17) nos grupos SAL L1 e SAL I2 em comparação ao grupo OVA.

Tal exposição a material particulado do ambiente nos locais de exposição também induziu alterações nas vias aéreas e regiões adjacentes semelhantes a uma exacerbação da inflamação das vias aéreas induzida por alérgenos, incluindo regulação positiva da expressão de citocinas pró-inflamatórias consistente com perfil Th2. As células T auxiliares tipo 2 (Th2) aumentaram a resposta imune. Esses resultados foram análogos aos achados de Shadie et al. (2014) que observaram tal elevação nas células inflamatórias e sugeriram uma associação entre exposição a altos níveis de partículas ambientais e piora da asma, potencialmente exigindo maior uso de medicamentos e/ou hospitalização.

De Genaro et al. (2021) relataram em seu estudo que a exposição aguda ao cloro prejudica a função pulmonar, aumentando o número de células inflamatórias no FLBA e nas vias aéreas em camundongos saudáveis. Tais achados corroboram nossos resultados, reforçando a hipótese de que a exposição ao cloro promoveu inflamação e aumento da migração celular nas vias aéreas em camundongos saudáveis. Tal infiltração celular no lavado broncoalveolar é indicativa de inflamação desencadeada por estresse oxidativo (LU et al. 2021).

O estresse oxidativo evidenciado pelo aumento dos níveis de iNOS, NOex e conteúdo de isoprostano em nossos achados foi um mecanismo crítico evidenciado para o desenvolvimento de hiperresponsividade brônquica, inflamação e remodelamento em animais saudáveis e exacerbação em animais sensibilizados com ovoalbumina, corroborando achados na literatura que dão exposição ao material particulado no epitélio respiratório como responsável pela formação de radicais livres de nitrogênio e oxigênio (ARBEX, et al., 2021; ZHU et al. 2018).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são capazes de induzir estresse oxidativo nas vias aéreas (ARBEX, et al., 2021) e ativar as vias de sinalização do estresse oxidativo (FERNANDO et al. 2019), levando ao aumento da expressão de sintases de óxido nítrico e à formação de óxido nítrico pelo epitélio brônquico (ZHU et al. 2018) corroborando nossos achados, com aumento de óxido nítrico exalado (FeNO) em animais expostos nos locais 1 e 2.

O fator de crescimento transformador beta (TGF- β), um mediador chave da transformação de células epiteliais para mesenquimais, pode ser influenciado pelo estresse oxidativo/espécies reativas de oxigênio (ROS), sugerindo a ligação entre MP_{2.5} e sinalização ROS (DYSART et al. 2014). Além disso, a composição das partículas é provavelmente um importante determinante do efeito do MP na progressão da doença pulmonar (OBERDORSTER et al. 2005).

Estudos anteriores mostraram que muitos desses componentes do MP podem induzir dano celular, o que pode estimular vias de remodelamento da matriz extracelular (LI et al. 2011; ZHOU et al. 2009). O remodelamento das vias aéreas, refere-se às alterações estruturais e da matriz extracelular (MEC) nas vias aéreas de grande e pequeno calibre (HOUGH et al., 2020). O perfil da MEC é alterado nas vias

aéreas de paciente asmáticos com menor deposição de colágeno tipo IV, elastina e mais deposição de colágeno tipo I, fibronectina, laminina, periostina, versicana, decorina e lumicano (HOUGH et al., 2020; DEKKERS et al., 2021); fatores pró-inflamatórios secretados, como citocinas e proteases, perpetuam as respostas imunes e remodelam a MEC (NI e DONG, 2018; BRIGHTLINT e GREENING, 2019); papel este desempenhado por diversas células imunes, incluindo neutrófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos e mastócitos, entre outros (HELFRICH et al., 2019).

Hough, et al. (2020) demonstraram em seu estudo que macrófagos alveolares, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos foram responsáveis por degradar a MEC liberando metaloproteinase da matriz MMP9; a degradação do colágeno impulsionada pela MMP9 liberou fragmentos biologicamente ativos na asma, como a matricina pró-neutrofílica (PGP) (PATEL e SNELGROVE, 2018).

Ademais, evidências recentes indicam que trajetórias migratórias de neutrófilos quimiotáticos já se mostraram dependentes da concentração de colágeno (FRANÇOIS, et al. 2021); e o aumento do alinhamento das fibras da MEC promoveu a migração celular e a direcionamento desta migração (WANG et al. 2018).

Adicionalmente em seu estudo, Nawroth et al. (2020) observaram maior adesão de neutrófilos na superfície do endotélio microvascular, quando estimulados pela presença da IL-13, seguida de migração transendotelial de neutrófilos através de uma combinação de eventos migratórios perpetuando ainda mais a resposta inflamatória; estudos evidenciaram que a exposição a substâncias químicas adsorvidas e MP podem gerar estresse mecânico às células, resultando em alterações na integridade da membrana celular, deformação da estrutura celular e alterações na matriz extracelular circundante (SHAN et al. 2015).

Dysart et al. (2014) observaram que a exposição ao MP promoveu ativação mecânica da citocina TGF- β ocasionando subsequentemente aumento na condução de alterações no fenótipo das células epiteliais alveolares gerando assim aumento da rigidez destas células epiteliais; ademais achados deste grupo evidenciaram aumento do alongamento das células e maior coloração de actina, fato que evidencia alterações de remodelamento em reflexo á exposição ao MP.

O estresse oxidativo pode piorar a lesão pulmonar aumentando a peroxidação lipídica, a formação de isoprostano e o aumento da permeabilidade da membrana celular (QU et al. 2017), o aumento dos níveis de produtos finais do estresse oxidativo e o aumento da inflamação leva pelo menos parcialmente ao desenvolvimento de hiperresponsividade (LU et al. 2021). Jung et al. (2012) atribuíram ação citogenotóxica ao MP, principalmente relacionada aos componentes metálicos presentes nessas partículas, principalmente metais de transição como o ferro. Tal metal estimularia a produção de radicais livres por meio de reações de *Haber-Weiss* e *Fenton* que geram estresse oxidativo em DNA, proteínas e lipídios (JUNG et al., 2012).

Dentre as substâncias que compõem o MP, algumas já estão comprovadamente associadas ao aumento da produção de ERO direta ou indiretamente. Consequentes aumentos no estresse oxidativo são decorrentes da exposição ao ferro, cobre, cromo e níquel (GHIO, 2003). O estudo de Seaton et al. (2005) realizado em Londres mostrou que o óxido de ferro como resíduo de poeira ferroviária subterrânea, é um material com grande potencial citotóxico e inflamatório. Fato este que corrobora com nossos achados neste estudo, uma vez que a análise geoquímica da região mostrou uma grande quantidade de ferro e cloro no material particulado da área.

A interação do material particulado (MP) com o epitélio das vias aéreas promoveu a ativação do NF κ B, nos grupos SAL L2 no verão e SAL L1 e SAL L2 no inverno quando comparado ao grupo SAL, como via de sinalização para direcionar a transcrição de várias citocinas pró-inflamatórias (IL-4 IL-5, IL-13 e IL-17) nos grupos SAL L1 e SAL L2 quando comparados ao grupo SAL, e a exacerbação da produção dessas citocinas no OVA L1 e Grupos OVA L2 quando comparados ao grupo OVA.

A inflamação é definida como uma resposta protetora do hospedeiro a infecções e danos teciduais a fim de resolver tal agressão, caracterizada por uma sequência de reações, que incluem vasodilatação, recrutamento de células de defesa e proteínas plasmáticas para este local onde se encontra a lesão/infecção (ZHANG et al. 2018). No entanto, tais respostas inflamatórias desequilibradas e recorrentes podem causar danos teciduais excessivos e alterações duradouras que favorecem o desenvolvimento de doenças inflamatórias agudas e crônicas (LIU et al. 2018).

A inflamação alérgica promove a ativação do NF κ B e conseqüentemente o aumento da inflamação das vias aéreas, bem como a hiperplasia das células caliciformes e a hiperresponsividade das vias aéreas, corroborando nossos achados. Este autor também enfatiza que a sinalização gerada pelo NF κ B no epitélio respiratório é uma via crítica para o desenvolvimento da asma e a ocorrência de hiperresponsividade das vias aéreas (SHELLER et al. 2009).

Oeckinghaus et al. (2009) define NF κ B como um fator de transcrição induzível que regula uma grande variedade de genes que estão envolvidos em vários processos de respostas inflamatórias e imunes. Além disso, o NF κ B desempenha um papel na regulação e diferenciação das células T e além de sua função efetora (ZHU et al., 2018).

A inflamação compreende componentes imunes adaptativos, particularmente células T (Th) e auxiliares CD₄⁺ (ZHU et al., 2018). A ativação dessas células Th é desencadeada pelo contato de um antígeno com receptores de células T (TCR) que foram apresentados por células apresentadoras de antígenos, geralmente células dendríticas (TAI et al., 2018).

A ativação desequilibrada de NFκB pode causar uma ativação exagerada de células T, que estão diretamente associadas a respostas autoimunes e inflamatórias (CHANG et al. 2011). Após a ativação, as células CD₄⁺ irão se diferenciar em células T efetoras (Th₁, Th₂, Th₁₇ e células T foliculares) que secretam várias citocinas e interferem nas respostas imunes (ZHU et al. 2018).

Estudos anteriores evidenciaram que exposição de roedoras grávidas ao PM_{2.5} inalado aumentou a expressão de marcadores de estresse oxidativo em seus filhotes (DI DOMENICO et al. 2020; EMAM et al. 2020; WANG et al. 2019a); tal exposição levou ao aumento da produção intracelular de ROS e ativação de NF-κB, (WANG et al. 2019b) peroxidação lipídica, alterações de sinal na expressão e função de transporte, e ativação de metaloproteinases da matriz em sua descendência (DI DOMENICO et al. 2020; EMAM et al. 2020).

As células Th₂ e Th₁₇, conhecidas como células inflamatórias (SUN et al. 2017) estão diretamente relacionadas à liberação de IFN-γ, que é responsável pela imunidade celular e atua nos processos inflamatórios. O NFκB causa a diferenciação de células Th₁ mediando a sinalização do receptor de células T, modulando a indução de diferentes citocinas, como IL-12, que também promove a diferenciação de Th₁ (OH et al. 2013). As células Th₁₇ secretam IL-17, uma citocina inflamatória conhecida que recruta monócitos e neutrófilos para o local da inflamação (LIU et al. 2018).

A associação do estresse oxidativo com material particulado desencadeia um desequilíbrio entre as respostas Th₁/Th₂, responsáveis por manter a homeostase imunológica direcionando essa resposta para uma predominância do perfil Th₂ (HUANG et al. 2017) que está associado à ativação de receptores toll-like (TLRs), principalmente TLR₄ e TLR₂ (ZHAO et al. 2012). Guo et al. (2017) expuseram a mucosa nasal de camundongos com rinite alérgica ao MP. Essa interação induziu uma redução no interferon-gama (IFN- γ) e um aumento nos níveis de IL-4 e IL-13, conhecidas como citocinas Th₂. Estes dados corroboram com nossos achados quando mostramos níveis aumentados de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17.

A correlação relaciona o aumento de células inflamatórias com os parâmetros de hiperresponsividade brônquica, fato que nos leva a crer que a inflamação tem papel direto e fundamental no desenvolvimento e exacerbação da hiperresponsividade, fato que favorece a perpetuação da cascata inflamatória, que provoca a consequente estimulação de matrizes de remodelamento levando à instalação e exacerbação de doenças respiratórias.

Assim, a inflamação das vias aéreas é crucial no desenvolvimento da hiperresponsividade, assim como a exposição ao MP, pois tanto promovem diretamente a contração do músculo liso brônquico quanto indiretamente contribuem para o remodelamento das vias aéreas. (LU et al. 2021).

Neste estudo, realizamos a avaliação do estresse oxidativo através da expressão celular de iNOS, conteúdo de PGF-2 α isoprostano, GP91phox e NO exalado. Consideramos que esta seleção de marcadores de estresse oxidativo foi adequada, uma vez que uma alta produção desses marcadores especificamente, pode caracterizar o desenvolvimento de inflamação em animais saudáveis e

exacerbação desta inflamação em animais já sensibilizados. Para estudos futuros, consideraremos incluir mais marcadores de estresse oxidativo e um análises adicionais de citocinas anti-inflamatórias.

Avaliamos como limitação deste estudo a utilização de um modelo animal experimental, devido ao fato de não podermos extrapolar diretamente nossos achados para aqueles esperados em humanos e também o fator de estresse causado aos animais devido à exposição ambiental ter sido realizada em outra cidade, obrigando-nos a fazer duas viagens de avião.

Nosso estudo tem pontos fortes, nele consideramos a importância de avaliar vários mediadores inflamatórios para as citocinas Th₁, Th₂ e Th₁₇, também realizamos a análise detalhada do processo de remodelamento, incluindo fibras colágenas, TIMP-1, MMP-9, MMP-12, e TGF- β . Analisamos conjuntamente as vias de estresse oxidativo, bem como a via de sinalização do NF κ B.

7. CONCLUSÕES

Com nosso estudo, pudemos concluir que a exposição ambiental em Vitória - ES promoveu alterações significativas na hiperresponsividade brônquica, parâmetros inflamatórios, estresse oxidativo e remodelamento de animais saudáveis, alterações que geraram padrões de resposta nesses animais semelhantes aos de animais sensibilizados com ovoalbumina mantidos no biotério em São Paulo. No modelo experimental de asma, observamos na maioria das análises que a hiperresponsividade à metacolina (Rrs, Ers, Raw) e o remodelamento, inflamação e estresse oxidativo foram maiores nos grupos expostos em relação aos animais controles mantidos no biotério de São Paulo, para que possamos inferir que a poluição local promoveu inflamação alérgica em animais saudáveis, além de exacerbar a inflamação existente em animais previamente sensibilizados.

Portanto, tal exposição ambiental à poluição em Vitória - ES foi responsável pela deterioração da resposta pulmonar tanto em animais asmáticos quanto em animais saudáveis. Além disso, o mecanismo envolvido na ativação de marcadores inflamatórios, de remodelamento, e de estresse oxidativo que parecem estar associados à expressão de NF κ B.

8. REFERÊNCIAS

ARANTES-COSTA, F.M.; LOPES, F.D.; TOLEDO, A.C.; MAGLIARELLI-FILHO, P.A.; MORIYA, H.T.; CARVALHO-OLIVEIRA, R.; MAUAD, T.; SALDIVA, P.H.; MARTINS, M.A.; Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation. **Toxicol Pathol.** v.36, n. 5, p.680-6, 2008.

ARBEX, M.A.; SANTOS, U.P.; MARTINS L.C.; SALDIVA, P.H.N.; PEREIRA, A.A.; BRAGA, A.L.F.; Air Pollution and the respiratory system. **J Bras Pneumol.** v.38, n.5, p.643-655, 2012.

BARNES, P.J.; NO or no NO in asthma?. **Thorax.** v.51, n.2, p.218-20, 1996.

BELL, M.L.; EBISU, K.; PENG, R.D.; SAMET J.M.; DOMINICI, F.; Hospital admissions and chemical composition of fine particle air pollution. **Am J Respir Crit Care Med.** v.179, n.12, p.1115–1120, 2010.

BOUSQUET, J.; JEFFERY, P.K.; BUSSE, W.B.; JOHNSON, M.; VIGNOLA, A.M.; Asthma. from bronchoconstriction to airway remodeling. **Am J Respir Crit Care Med.** v.161, n.5, p.1720-45, 2000.

BRANNAN, J.D.; Bronchial Hyperresponsiveness in the assessment of asthma control. Airway Hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. **Chest.** v.138:11S-17S, 2010.

BRIGHTLING, C.; GREENING, N.; Airway inflammation in COPD: Progress towards precision medicine. **Europ. Resp. J.** v.54, n.2, 2019.

BUC, M.; DZURILLA, M.; VRLIK, M.; BUCOVA, M.; Immunopathogenesis of bronchial asthma. **Arch Immunol Ther Exp.** v. 57, p.331-344, 2009.

BURGSTALLER, G.; OEHRLE, B.; GERCKENS, M.; WHITE, E.S.; SCHILLER, H.B.; EICKELBERG, O.; The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and changes in chronic lung disease. **Eur. Respirat. Journal.** v.50, n.1, 2017.

CACHON, B.F.; FIRMIN, S.; VERDIN, A.; Pro-inflammatory effects and oxidative stress in human bronchial epithelial cells exposed to atmospheric particles (PM(2.5) and PM(>2.5)) collected in Cotonou, Benin. **Environment pollution.** v.185, p.340-351, 2014.

CALHOUN, W.J.; Nocturnal asthma. **Chest.** v.123, suplement.3, p.399S-405S, 2003.

CAMARGO, L. N.; et al. Effects of Anti-IL-17 on Inflammation, Remodeling, and Oxidative Stress in an Experimental Model of Asthma Exacerbated by LPS. **Frontiers in Immunology**, [S. I.], v. 8, n. January, 2018.

CETESB – Qualidade do ar no estado de São Paulo – 2019 [recurso eletrônico]. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/ar/publicacoes-relatorios/>>ISBN 978-65-5577-007-0.

CHANG M.; et al. The ubiquitin ligase Peli1 negatively regulates T cell activation and prevents autoimmunity. **Nat. Immunol.** v. 12, p.1002-1009, 2011.

CHAPMAN, J.Y.; CHOI, A.M.K.; Exhaled monoxides as a pulmonary function test: use of exhaled nitric oxide and carbon monoxide. **Clin Chest Med.** v.22, n.4, p.817-36, 2001.

CHEN, T.M.; GOKHALE, J.; SHOFER, S.; KUSCHNER, W.G.; Outdoor air pollution nitrogen dioxide, sulfur dioxide, and carbon monoxide health effects. **American Journal of Medicine Science.** v.333, n.4, p.249-256, 2007.

CHEN, X.; ZHANG, L.W.; HUANG, J.J.; SONG, F.J.; ZHANG, L.P.; QIAN, Z.M.; TREVATHAN, E.; MAO, H.J.; et al. Long-term exposure to urban air pollution and lung cancer mortality: a 12-year cohort study in northern China. **Total Environment science.** v. 571 :855–861, 2016.

CHENGUANG, L.; XIANFENG, W.; NA, P.; LANZHONG, W.; YUPING, W.; TENGFEI X.; YU, Z.; et al. Impact of airborne particulate matter on pediatric hospital admissions for pneumonia among children in Jinan, China: A case-crossover study. **Journal of the Air & Waste management Association.** v.67, n.6, p.669-676, 2017.

CHIBA, Y.; MATSUSUE, K.; MISAWA, M.; RhoA, a possible target for treatment of airway hyperresponsiveness in bronchial asthma. **Journal of Pharmacological Sciences.** v.114, n.3, p.239-247, 2010.

CHURG, A.; BRAUER, M.; CARMEN AVILA-CASADO, M.; FORTOUL, T.I.; WRIGHT, J.L.; Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. **Environ Health Perspect.** v.111, n.5, p. 714-718, 2003.

CHU, Y.H.; KAO, S.W.; TANTOH, D.M.; KO, P.C.; LAN, S.J.; LIAW, Y.P.; Association between fine particulate matter and oral cancer among Taiwanese men. **J. Investigate. Med.** v. 67, p. 34-38, 2019.

CIENCEWICKI, J.; TRIVEDI S.; KLEEBERGER SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. **J Allergy Clin Immunol.** v.122, n.3, p.456-468, 2008.

COCKCROFT, D.W.; DAVIS, B.E.; Mechanisms of airway hyperresponsiveness. **J Allergy Clin Immunol.** n.118, p.551-559, 2006.

COHN, L.; ELIAS, J.A.; CHUPP, G.L.; Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. **Annu Rev Immunol.** v.22, p.789-815, 2004.

COUTO,N.; WOOD, J.; BARBER, J.; The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. **Free Radic Biol Med.** v. 95, p.27-42, 2016.

CURTIS, L.; WILLIAN, R.; SMITH-WILLIS, P.; FENYVES, E.; PAN, Y.; Adverse health effects of outdoor pollutants. **Environment International.** v.32, p. 815-830, 2006.

DAIBER, A.; DI LISA, F.; FERDINANDY, P.; Pharmacology of oxidative stress: translational opportunities. **Br J Pharmacol.** V. 174, p.1511-13, 2017.

DASTOORPOOR, M.; RIAHI, A.; YAZDANINEJHAD, H.; BORSI, S.H.; KHANJANI, N.; KHODADADI, N.; MOHAMMADI, M.J.; et al. Exposure to particulate matter and carbon monoxide and cause-specific cardiovascular-respiratory disease mortality in Ahvaz. **Toxin Rev.** p. 1-11, 2020.

DASTOORPOOR, M.; SEKHAVATPOUR, Z.; MASOUMI, K.; MOHAMMADI, M.J.; AGHABABAEIAN, H.; et al. Air pollution and hospital admissions for cardiovascular disease in Ahvaz, Iran. **Total Environment Science.** v.652, p. 1318-1330, 2019.

DE CASTRO BRAS L. E.; FRANGOGIANNIS, N. G.; Extracellular matrix-derived peptides in tissue remodeling and fibrosis. **Matrix Biol.** 91-92, 176-187, 2020.

DE GENARO, I. S.; et al. Low-dose chlorine exposure impairs lung function, inflammation and oxidative stress in mice. **Life Sciences, [S. I.]**, v. 267, p. 118912, 2021.

DEKKERS, B.G.J.; SAAD, S.I.; VAN SPELDE, L.J.; BURGESS, J.K.; Basement membranes in obstructive lung disease. **Matrix Biol.**, v. *Plus* 12, 2021.

DI DOMENICO, M.; BENEVENUTO, S.G.D.M.; TOMASINI, P.P.; YARIWAKE, V.Y.; DE OLIVEIRA ALVES, N. ; RAHMEIER, F.L. ; DA CRUZ FERNANDES, M.; MOURA, D.J.; NASCIMENTO SALDIVA, P.H.; VERAS, M.M. Exposure to concentrated fine particulate matter (PM2.5) induces brain damage in pre- and postnatally exposed mice. **Neurotoxicology.** v.79, p.127 – 141, 2020.

DIKALOV, A.; Cross talk between mitochondrial and NADPH oxidases. **Free Radic Biol Med.** v. 51, p. 1289-1301, 2011.

DOELMAN, C.J.; BAST, A.; **Oxygen radicals in lung pathology.** **Free Radic Biol Med.** v.9, n.5, p.381-400, 1990.

DOS SANTOS, T.M.; RIGHETTI, R.F.; CAMARGO, L.D.N.; SARAIVA-ROMANHOLO, B.M.; ARISTOTELES, L.R.C.R.B.; DE SOUZA, F.C.R.; FUKUZAKI, S.; ALONSO-VALE, M.I.C; CRUZ, M.M.; PRADO, C.M.; LEICK, E.A.; MARTINS, M,A.; TIBÉRIO, I.F.L.C.; Effect of Anti-IL17 Antibody Treatment Alone and in Combination With Rho-Kinase Inhibitor in a Murine Model of Asthma. **Front. Physiol.** v.9, p.1183, 2018.

DYSART, M.M.; GALVIS, B.R.; RUSSELL, A.G.; BARKER, T.H.; Environmental particulate (PM2.5) augments stiffness-induced alveolar epithelial cell mechanoactivation of transforming growth factor beta. **PLoS One.** v.16, n. 9, 2014.

EIYMO, M.W.A.; MPOLLO, M.S.; BRANDT, E.B.; SHANMUKHAPPA, S.K.; ARUMUGAM, P.I.; TIWARI, S.; LOBERG, A.; et al. Placenta growth factor augments airway hyperresponsiveness via leukotrienes and IL-13. **J Clin Invest.** v.126, n.2, p.571-584, 2016.

ELE, M.; ICHINOSE, T.; YOSHIDA, S.; et al. PM 2.5-induced lung inflammation in mice: differences in the inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells. **J Appl Toxicol.** v. 37, p. 1203-1218, 2017.

EMAM, B.; SHAHSAVANI, A.; KHODAGHOLI, F.; ZARANDI, S.M.; HOPKE, P.K.; HADEI, M.; BEHBAHANI, H.; YARAHMADI, M.; Effects of prenatal and early life exposure to PM_{2.5} and gases on autism-like phenotypes in male rat pups. **Toxicology of particles and Fibers**. v. 17, n.8, 2020.

ERZURUM, S.C.; New insights into oxidant biology in asthma. **Ann Am Thorac Soc**. v. 13, p.S35-S39, 2016.

FERNANDO, I.P.S.; JAYAWARDENA, T.U.; KIM, H.S.; LEE, W.W.; VAAS, A.P.J.P.; et al.; Beijing urban particulate matter-induced injury and inflammation in human lung epithelial cells and the protective effects of fucosterol from *Sargassum binderi* (Sonder ex J. Agardh). **Environ Res**. v.172, p.150–158, 2019.

FRANÇOIS J., KANDASAMY A., YEH Y. T., SCHWARTZ A., AYALA C., MEILI R., et al.; The interaction between matrix deformation and the coordination of spin events governs the directed migration of Neutrophils in 3D matrices. **Sci. Adv**. v. 7, n.29, 2021.

FULKERSON, P.C.; ROTHENBERG, M.E.; HOGAN, S.P.; Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma. **Clin Exp Allergy**. v. 35, p. 1251–3, 2005.

GAGLIARDO, R.; et al.; Persistent Activation of Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway in Severe Uncontrolled Asthma. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, v. 168, n. 10, p.1190-1198, 2003.

GHIO, A.J.; CARTER, J.D.; RICHARDS, J.H.; et al. Iron and iron-related proteins in the lower respiratory tract of patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. v.31, p.395-400, 2003.

GINA - Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and Prevention Program. 2022. Available from: <http://www.ginaasthma.org>

GRAY, D.L.; WALLACE, L.A.; BRINKMAN, M.C.; BUEHLER, S.S.; LA LONDE, C.; Respiratory and cardiovascular effects of metals in ambient particulate matter: a critical review. **Rev Environ Contam T**. v.234, p.135–203, 2015.

GRAYSON, M.H.; HOLTZMAN, M.J.; Asthma. **ACP Medicine**. 2013.

GUO, Z.; HONG, Z.; DONG, W.; et al; PM 2.5 - induced oxidative stress and mitochondrial damage in the nasal mucosa of rats. **Int J Environ Res Publ Health** . v. 14, 2017.

GUZIK, T.J.; CHEN, W.; GONGORA, M.C.; GUZIK, B.; LOB, H.E.; MANGALAT, D.; et al. Calcium-dependent NOX5 NADPH oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol**. v. 52, p. 1803-1809, 2008.

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**. v.192, n.1, p.111–117, 2014.

HART, T.A.; et al. Activation and Localization of Transcription factor, nuclear factor-kappaB in asthma. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 158, n.5, p.1585-92. 1998.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S.; NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes Dev**. v. 26, n. 3, p. 203-34, 2012.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S.; Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. **Semin Immunol**. v.26, n. 3, p.253-66, 2014.

HEDMER, M.; KARLSSON, J.E.; 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**. v.87, n.6, p.623–634, 2014.

HE, F.; LIAO, B; PU, J.; et al. Exposure to environmental particulate matter induced COPD in a mouse model and a description of the underlying mechanism. **Scientific Representative**. v. 7, 2017.

HE, M.; ICHINOSE, T.; YOSHIDA, Y.; et al. Urban PM_{2.5} exacerbates allergic inflammation in the murine lung via a TLR2/TLR4/ MyD88-signaling pathway. **Sci Rep**. v. 7, 2017.

HELFRICH, S.; MINDT, B.C.; FRITZ ,J. H.; DUERR, C.U.; Group 2 innate lymphoid cells in respiratory allergic inflammation. **Front. Immunol**. v.10, n.930, 2019.

HIRSHON, J.M.; SHARDELL, M.; ALLES, S.; POWELL, J.L.; SQUIBB, K.; ONDOV, J.; et al. Elevated ambient air zinc increases pediatric asthma morbidity. **Environ Health Perspect**. v.116, n.6, p.826–831, 2008.

HOUGH, K.P.; CURTISS, M.L.; BLAIN, T.J.; LIU, R.M.; TREVOR, J.; DESHAN,E J.S.; et al.; Airway remodeling in asthma. **Front**. v.7, 2020.

HUANG, K.L.; LIU, S.Y.; CHOU, C.C.; LEE, Y.H.; CHENG, T.J.; The effect of size-segregated ambient particulate matter on Th1/Th2-like immune responses in mice. **PLoS One**. v.12, n.2, p.e0173158, 2017.

HUSSAIN, I.; RANDOLPH, D.; BRODY, S.L.; SONG, S.K.; HSU, A.; KAHN, A.M.; CHAPLIN, D.D.; HAMILOS, D.L.; Induction, distribution and modulation of upper airway allergic inflammation in mice. **Clin Exp Allergy**. v.31, n.7, p.1048-59, 2001.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2021. Acesso em 11/12/2022. Disponível em: ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2021/estimativa_dou_2021.pdf

IEMA. Instituto de Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Espírito Santo. 2021. Disponível em: <https://iema.es.gov.br/qualidadedoar/historico>.

JAMES, A.; Airway remodeling in asthma. **Curr Opin Pulm Med**. v.11, n.1, p.1-6,

2005.

JANSSEN, L.J.; PREMJI, M.; NETHERTON, S.; CATALI, A.; COX, G.; KESHAVJEE, S.; CRANKSHAW, D.J.; Excitatory and inhibitory actions of isoprostanos in human and canine airway smooth muscle. **J Pharmacol Exp Ther.** v.295, n.2, p.506-11, 2000.

JARJOUR, N.N.; CALHOUN, W.J.; Enhanced production of oxygen radicals in asthma. **J Lab Clin Med.** v.123, n.1, p.131-6, 1994.

JUNG, M. H.; KIM, H. R.; PARK, Y. J.; PARK, D. S.; CHUNG, K. H.; OH, S. M.; Genotoxic effects and oxidative stress induced by organic extracts of particulate matter (PM10) collected from a subway tunnel in Seoul, Korea. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [S. l.], v. 749, n. 1–2, p. 39–47, 2012.

KATSUMATA, U.; MIURA, M.; ICHINOSE, M.; KIMURA, K.; TAKAHASHI, T.; INOUE, H.; TAKISHIMA, T.; Oxygen radicals produce airway constriction and hyperresponsiveness in anesthetized cats. **Am Rev Respir Dis.** v.141, n.5 Pt 1, p.1158-61, 1990.

KOTARU, C.; SCHOONOVER, K.J.; TRUDEAU, J.B.; HUYNH, M.L.; ZHOU, X.; HU, H.; WENZEL, S.E.; Regional fibroblast heterogeneity in the lung: implications for remodeling. **Am J Respir Crit Care Med.** v.173, n.11, p.1208-15, 2006.

KRUG, N.; HOHLFELD, J.M.; KIRSTEN, A.M.; KORNMANN, O.; BEEH, K.M.; et al. Allergen-induced asthmatic responses modified by a GATA3-specific DNzyme. **N Engl J Med.** v.372, n.21, p.1987-1995, 2015.

LANÇAS, T.; KASAHARA, DI.; PRADO, C.M.; TIBÉRIO, I.F.; MARTINS, M.A.; DOLHNIKOFF, M.; Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. **J Appl Physiol.** v.100, n.5, p.1610-6, 2006.

LAWSON, J.A.; ROKACH, J.; FITZGERALD, G.A.; Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipide peroxidation in vivo. **J Biol Chem.** V.274, n.35, p.24441-4, 1999.

LEGAL, A.O.; Oxidative stress and inflammation induced by air particles in cardiovascular disease and atherosclerosis: the role of Nrf2 and AhR-mediated pathways. **Toxicol Lett.** v. 270, p. 88-95, 2017.

LEICK-MALDONADO, E.A.; KAY, FU.; LEONHARDT, M.C.; KASAHARA, DI.; PRADO, C.M.; FERNANDES, F.T.; MARTINS, M.A.; TIBÉRIO, I.F.; Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in an experimental model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. **Clin Exp Allergy.** v.34, n.1, p.145-52, 2004.

LEMANSKE, R.F.; BUSSE, W.W.; Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. **J Allergy Clin Immunol.** v.125, Suppl 2, p.95-102, 2010.

LI, R.; KOU, X.; GENG, H.; et al. Effect of PM(2.5) environment on lung mitochondrial damage and fusion/fission gene expression in rats. **Chem Res Toxicol**. v. 28, p. 408-418, 2015.

LI, T.; HU, R.; CHEN, Z.; LI, QIYUAN, L.; HUANG, S.; ZHU, Z.; ZHOU, L.; Fine particulate matter (PM_{2.5}): The culprit for chronic lung diseases in China. *Chronic Diseases and Transl. Medicine*. v.4, p.176-186, 2018.

LI, W.; ZHOU, J.; CHEN, L.; LUO, Z.; ZHAO, Y.; Lysyl oxidase, a critical intra- and extra-cellular target in the lung for cigarette smoke pathogenesis. **Int J Environ Res Public Health**. v.8, p.161–184, 2011.

LIU, C.W.; LEE, T.L.; CHEN, Y.C.; et al. Oxidative stress induced by PM 2.5 increases the expression of intercellular adhesion molecule-1 in pulmonary epithelial cells through the IL-6/AKT/STAT3/NF-κB-dependent pathway. **Part Toxicol Fiber**. v. 15, n. 4, 2018.

LIU, H.; COLAVITTI, R.; ROVIRA, I.I.; FINKEL, T.; Redox-dependent transcriptional regulation. **Circ Res**. v. 97, p. 967-974, 2005.

LIU, P.G.; 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. **Journal of the Air & Waste Management Association**, [S. l.], v. 52, n. 9, p. 1064–1074, 2002.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S.C.; NF-κB signaling in inflammation. **Signal Transduct Target Ther**. v. 2, 2017.

LORIATO, A. G.; SALVADOR, N.; LORIATO, A. A. B.; SOKOLOV, A.; NASCIMENTO, A. P.; YNOUE, R. Y.; MOREIRA, D. M.; REIS, N. C.; ALBUQUERQUE, T. T. A.; High resolution emissions inventory using WRF-SMOKE-CMAQ integrated modeling for great vitoria region. **Revista Brasileira de Meteorologia**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 521–536, 2018.

LU, X.; LI, R.; YAN, X.; et al. Airway hyperresponsiveness development and the toxicity of PM2.5. **Environmental Science and Pollution Research**.v. 28, p.6374-6391, 2021.

LUSHCHAK, V.I.; Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chem Biol Interact**. V. 224, p.164-175, 2014.

MAGNANI, N.D.; MARCHINI, T.; CALABRÓ, V.; ALVAREZ, S.; EVELSON, P.; Role of Mitochondria in the Redox Signaling Network and Its Outcomes in High Impact Inflammatory Syndromes. **Front. Endocrinol**. v.11, 2020.

MARTINS-OLIVEIRA, B.T.; ALMEIDA-REIS, R.; THEODORO-JÚNIOR, O.A.; OLIVA, L.V.; NETO DOS SANTOS NUNES, N.; OLIVO, C.R.; VILELA DE BRITO, M.; PRADO, C.M.; LEICK, E.A.; MARTINS, M.A.; OLIVA, M.L.; RIGHETTI, R.F.; TIBÉRIO; I. F. The Plant-Derived *Bauhinia bauhinioides* Kallikrein Proteinase Inhibitor (rBbKI) Attenuates Elastase-Induced Emphysema in Mice. **Mediators Inflamm**. 2016.

MEYER, N.; DALLINGA, J. W.; NUSS, S. J.; MOONEN, E. J. C.; VAN BERKEL, J. J. B. N.; AKDIS, C.; VAN SCHOOTEN, F. J.; MENZ, G.; Defining adult asthma endotypes by clinical features and patterns of volatile organic compounds in exhaled air. **Respiratory Research**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–9, 2014.

MILNE, G.L.; YIN, H.; BROOKS, J.D.; SANCHEZ, S.; JACKSON- ROBERTS; MORROW, J.D.; Quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as a measure of oxidant stress. **Methods Enzymol.** v.433, p.113-26, 2007.

MIZUTANI, N.; NABE, T.; YOSHINO, S.; IL-33 and alveolar macrophages contribute to the mechanisms underlying the exacerbation of IgE-mediated airway inflammation and remodeling in mice. **Immunology.** v. 139, p. 205-218, 2013.

MOMTAZAN, M.; GERAVANDI, S.; RASTEGARIMEHR, B.; VALIOUR, A.; RANJBARZADEH, A.; YARI, A.R.; DOBARADARAN, S.; BOSTAN, H.; FARHADI, M.; DARABI, F.; OMIDI KHANIABADI, Y.; MOHAMMADI, M.J.; An investigation of particulate matter and relevant cardiovascular risks in Abadan and Khorramshahr in 2014-2016. **Toxin Rev.** v. 38, p.290-297, 2019.

MORALES, X.; CORTES-DOMINGUEZ, I.; ORTIZ-DE-SOLORZANO, C.; Modeling the mechanobiology of cancer cell migration using 3D biomimetic hydrogels. **Gels.** v.7, n.1, 2021.

MOREIRA, D.M.; TIRABASSI, T.; MORAES, M. R. Meteorologia e poluição atmosférica. **Ambiente & Sociedade**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–13, 2008.

MORROW, J.D.; The isoprostanes - unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress. **Curr Pharm Des.** v.12, n.8, p.895-902, 2006.

NADEAU, K.; MCDONALD-HYMAN, C.; NOTH, E.M.; et al. Ambient air pollutin impairs the regulatory function of T cells in asthma. **J Allergy Clin Immunol.** v. 126, p. 845-852, 2010.

NATHAN, C.; DING, A.; SnapShot: reactive oxygen intermediates (ROI). **Cell.** v. 140, p. 951-952, 2010.

NAWROTH, J.C.; LUCCHESI, C.; CHENG, D.; SHUKLA, A.; NGYUEN, J.; SHROFF, T.; et al.; A lung airway microengineering chip models key features of virus-induced asthma exacerbation. **Am. J. Breathing. Cell. mol. Biol.** v.63, n.5, 2020.

NI, L.; and DONG, C.; Roles of myeloid and lymphoid cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Front. Immunol.** v. 9, 1431, 2018.

NIH, Ed.. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Research. Washington DC, National Academy Press. 1996.

NISSEN, G.; HOLLAENDER, H.; TANG, F.S.M.; WEGMANN, M.; LUNDING, L.; VOCK, C.; et al.; Tumstatin fragment selectively inhibits neutrophil infiltration in experimental asthma exacerbation. **Clinic Exp. Allergy.** v.48, n.11, p.1483–1493, 2018.

OBERDORSTER, G.; OBERDORSTER, E.; OBERDORSTER, J.; Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environ Health Perspect.** v.113, p.823–839, 2005.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S.; The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 1, n. 4, 2009.

OGINO, K.; ZHANG, R.; TAKAHASHI, H.; KUBO, M.; MURAKAMI, I.; WANG, D.H.; et al. Allergic airway inflammation by nasal inoculation of particulate matter (PM2.5) in NC/NgaMice. **PLoSOne.** v.9, n.3, p.e92710, 2014.

OMS/WHO - World Health Organization. 7 million deaths annual linked to air pollution. Geneva. 2022 Available at: [http:// www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/databases/en/](http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/databases/en/). Accessed Jun 8, 2022.

OMS/WHO - World Health Organization. Burden of disease from household air pollution for 2012. Geneva. 2012. Available at: [http://www.who.int/phe/health_topics outdoorair/databases/FINAL_HAP_ AAP_BoD_24March2014.pdf?ua¼1](http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/databases/FINAL_HAP_AAP_BoD_24March2014.pdf?ua¼1); 2014. Accessed Jun 8, 2022.

OPAS/OMS - Organização Pan Americana da Saúde. Organização Mundial da Saúde Informativo. 2008. Disponível em: <http://www.opas.org.br/ambiente>. Acesso em: dezembro de 2022.

OSTRO, B.; ROTH, L.; MALIG, B.; MARTY, M.; The effects of fine particle components on respiratory hospital admissions in children. **Environ Health Perspect.** v.117, n.3, p.475–480, 2009.

OZKAN, A. D.; TOPAL, A. E.; DANA, A.; GULER, M.O.; TEKINAY, A.B.; Atomic force microscopy for the investigation of molecular and cellular behavior. **Micron.** v.89, p.60–76, 2016.

PAIK, Y.H.; KIM, J.; AOYAMA, T.; DE MINICIS, S.; BATALLER, R.; BRENNER, D.A.; Role of NADPH oxidases in liver fibrosis. **Antioxid Redox Signal.** v. 20, p. 2854-2872, 2014.

PARCHAMI, M.; MOTLAGH, M.S.; PARDAKHTI, A.; Particulate matter concentrations and characterization in urban subway system-case study Tehran, Iran. **J Environ Health Sci Eng.** v. 27, n. 20, p. 953-962, 2022.

PATEL, D.F.; SNELGROVE, R.J.; The multifaceted roles of matrixin Pro-Gly-Pro in lung health and disease. **Eur. Respir. Rev.** v.27, n.148, 2018.

PATEL, M.M.; HOEPNER, L.; GARFINKEL, R.; CHILLRUD, S.; REYES, A.; QUINN, J.W.; 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.** v.180, n.11, p.1107–1113, 2009.

PEDRUZZI, R.; 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, [S. l.],** v. 26, n. 16, p. 16125–16144, 2019.

PIGATI, P.A.; RIGHETTI, R.F.; POSSA, S.S.; SARAIVA-ROMANHOLO, B.S.; RODRIGUES, A.P.D.; et al. Y-27632 is associated with corticosteroid-potentiated control of pulmonary remodeling and inflammation in guinea pigs with chronic allergic inflammation. **BMC Pulmonary Medicine**. v. 15, n.85, 2015.

POSSA, S.S.; CHARAFEDDINE, H.T.; RIGHETTI, R.F.; SILVA, P.A.; ALMEIDA-REIS, R.; SARAIVA-ROMANHOLO, B.M.; PERINI, A.; PRADO, C.M.; LEICK-MALDONADO, E.A.; MARTINS, M.A.; TIBÉRIO, I.D.; Rho-Kinase Inhibition Attenuates Airway Responsiveness, Inflammation, Matrix Remodeling and Oxidative Stress Activation Induced by Chronic Inflammation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v. 303, n. 11, p. 939-952, 2012.

PRADO, C.M.; LEICK-MALDONADO, E.A.; YANO, L.; LEME, A.S.; CAPELOZZI, V.L.; MARTINS, M.A.; TIBÉRIO, I.F.L.C.; Effects of Nitric Oxide Synthases in Chronic Allergic Airway Inflammation and Remodeling. **Am J of Respiratory Cell and Mol biology**. v.35, p. 457-465, 2006.

PRADO, C.M.; LEICK-MALDONADO, E.A.; KASAHARA, D.I.; CAPELOZZI, V.L.; MARTINS, M.A.; TIBÉRIO, I.F.L.C.; Effects of acute and chronic nitric oxide inhibition in an experimental model of chronic pulmonary allergic inflammation in guinea pigs. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v.289, n.4, p.677–83, 2005.

QU, J.; LI, Y.; ZHONG, W.; GAO, P.; HU, C.; Recent developments in the role of reactive oxygen species in allergic asthma. **J Thorac Dis**. v.9, n.1, p.E32–E43, 2017.

RAO, X.; ZHONG, J.; BROOK, R.D.; RAJAGOPALAN, S.; Effect of Particulate Matter Air Pollution on Cardiovascular Oxidative Stress Pathways. **Antioxid Redox Signal**. v. 28, n. 9, p. 797-818, 2018.

RHEE, S.G.; KIL, I.S.; Multiple functions and regulation of mammalian peroxiredoxins. **Annu Rev Biochem**. v. 86, p. 749-775, 2017.

RHODEN, K.J.; BARNES, P.J.; Effect of hydrogen peroxide on guinea-pig tracheal smooth muscle in vitro: role of cyclo-oxygenase and airway epithelium. **British Journal of Pharmacology**. v. 98, n.1, p.325-330, 1989.

RICCIARDOLO, F.L.M.; STERK, P.J.; GASTON, B.; FOLKERTS, G.; Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiol Rev**. v.84, n.3, p.731-65, 2004.

RIGHETTI RF.; Effects of Rho-kinase inhibition in lung tissue with chronic inflammation. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. v.192, p. 134-146, 2014.

RODWAY, G.W.; CHOL, J.; HOFFMAN, L.A.; SETHI, J.M.; Exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma: clinical implications. **Chron Respir Dis**. v.6, n.1, p.19-29, 2009.

ROSA, M.J.; BENEDETTI, C.; PELI, M.; DONNA, F.; NAZZARO, M.; FEDRIGHI, C.; ZONI, S.; MARCON, A.; ZIMMERMAN, N.; WRIGHT, R.; LUCCHINI, R.; Association between personal exposure to ambient metals and respiratory disease in Italian adolescents: a cross-sectional study. **BMC Pulm Med**. v.16, n.6, 2016.

SANTOS, J.M.; REIS, N. C. Caracterização e Quantificação de Partículas Sedimentadas na Região da Grande Vitória. 2011. Disponível em: iema.es.gov.br/Media/iema/CQAI/Documentos/Relatorio_Final_Partículas_Sedimentaveis_RGV.

SARKAR, S.; RIVAS-SANTIAGO, C.E.; IBIRONKE, O.A.; CARRANZA, C.; MENG, Q.; OSORNIO-VARGAS, A.; ZHANG, J.; TORRES, M.; CHOW, J.C.; WATSON, J.G.; OHMAN-STRICKLAND, P.; et al.; The size of urban particulate matter differentially affects cytotoxicity and human immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*. ***PloS One***. v. 14,2019.

SAYGIN, M.; GONCA, T.; OZTURK, O.; HAS, M.; CALISKAN, S.; HAS, Z.G; AKKAYA, A.; To investigate the effects of air pollution (PM10 and SO2) on respiratory diseases asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Turkish. Thoracic. J.** v.18, p.33–39, 2017.

SCHAAFSMA, D.; BOS, I.; SOPHIE, T.; ZUIDHOF, A. B.; ZAAGSMA, J.; MEURS, H.; Inhalation of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 reverses allergen-induced airway hyperresponsiveness after the early and late asthmatic reaction. **Respiratory Research**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 121, 2006.

SEATON, A.; CHERRIE, J.; DENNEKAMP, M.; DONALDSON, K.; HURLEY, JF; TRAN, CL. The London Underground: dust and hazards to health. **Occupational and Environmental Medicine**. v. 62, n. 6, p. 355–362, 2005.

SEIM, E.; Production of reactive oxygen species and chemiluminescence by human monocytes during differentiation and lymphokine activation in vitro. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C**. v.90, p. 179-185, 1982.

SHADIE, A.M.; HERBERT, C.; KUMAR, R.K.; Ambient particulate matter induces an exacerbation of airway inflammation in experimental asthma: role of interleukin-33. **Clin Exp Immunol**. v.177, n.2, p.491-499, 2014.

SHAN, Y.; & WANG, H.; The structure and function of cell membranes examined by atomic force microscopy and single-molecule force spectroscopy. **Chem Soc Rev.**, v.44, p. 3617–3638, 2015.

SHELLER, J.R.; POLOSUKHIN, V.V.; MITCHELL, D.; CHENG, D.S.; PEEBLES, R.S.; BLACKWELL, T.S.; Nuclear factor kappa B induction in airway epithelium increases lung inflammation in allergen-challenged mice. **Exp Lung Res**. v. 35, n. 10, p. 883-95, 2009.

SHIRAKI, A.; KUME, H.; MAKINO, Y.; ITO, S.; SHIMOKATA, K.; HONJO, H.; KAMIYA, K.; Role of Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ sensitization in 8-iso-PGF₂ α -induced contraction in airway smooth muscle. **Clin Exp Allergy**. v.39, n.2, p.236-245, 2008.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D.P.; Oxidative stress. **Annu Rev Biochem**. v.86, p.715-748, 2017.

STELMASZCZYK-EMMEL, A.; Regulatory T cells in children with allergy and asthma: it's time to act. **Respirat Physiol Neurobiol.** v. 209, p. 59-63, 2015.

SUN, L.; FU, J.; ZHOU, Y.; Metabolism Controls the Balance of Th17/T-Regulatory Cells. **Front. Immunol.** v. 8, 2017.

SYLVESTER, J.T.; The tone of pulmonary smooth muscle: ROK and Rho Music. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v.287, p.624-L630, 2004.

TAI, Y.; WANG, Q.; KORNER, H.; ZHANG, L.; WEI, W.; Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. **Front Pharmacol.** v. 9, 2018.

TAKAC, I.; SCHRODER, K.; ZHANG, L.; LARDY, B.; ANILKUMAR, N.; LAMBETH, J.D.; et al. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. **J Biol Chem.** v. 286, p. 13304-13313, 2011.

TILLIE-LEBLOND, I.; GOSSET, P.; TONNEL, A.B.; Inflammatory events in severe acute asthma. **Allergy.** v.60, n.1, p.23-9, 2005.

TOPF, U.; SUPPANZ, I.; SAMLUK, L.; WROBEL, L.; BOSER, A.; SAKOWSKA, P.; et al.; Quantitative proteomics identifies redox switches for global translation modulation by mitochondrially produced reactive oxygen species. **Nat Commun.** v.9, p. 324, 2018.

TRIPATHI, A.K.; SULLIVAN, D.J.; STINS, M.F. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium through NF-kappaB. **Infect Immun,** v.74, n.6, p.3262-70, 2006.

TULIC, M.K.; HAMID, Q.; Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: potential therapeutic target Roger S. Mitchell lecture. **Chest.** v.123, n.3 Suppl, p.348S-55S, 2003.

ÜBEL, C.; GRASER, A.; KOCH, S.; RIEKER, R.J.; LEHR, H.A.; MÜLLER, M.; FINOTTO, S.; Role of Tyk-2 in Th9 and Th17 cells in allergic asthma. **Sci Rep.** v. 4, p. 5865, 2014.

VAN DER VLIET, A.; DANYAL, K.; HEPPNER, D.E.; Dual oxidase: a novel therapeutic target in allergic disease. **Br J Pharmacol.** v. 175, p. 1401, 2018.

VAN DER VLIET, A.; Nox enzymes in allergic airway inflammation. **Biochim Biophys Acta.** v. 1810, p. 1035-1044, 2011.

VAN DER VLIET, A.; NADPH oxidases in lung biology and pathology: host defense enzymes and more. **Free Radic Biol Med.** v. 44, p. 938-955, 2008.

WAGNER, E.M.; BLEECKER, E.R.; PERMUTT, S.; LIU, M.C.; Direct assessment of small airways reactivity in human subjects. **Am J Respir Crit Care Med.** v.157, n.2, p.447-52, 1998.

WANG, J.; HUANG, J.; WANG, L.; et al.; Urban particulate matter triggers lung inflammation through the ROS-MAPK-NF- κ B signaling pathway. **Thorac Dis J.** v. 9, p. 4398-4412, 2017.

WANG, T.; ZHANG, T.; SUN, L.; LI, W.; ZHANG, C.; YU, L.; GUAN, Y.; Gestational vitamin B supplementation alleviates PM_{2.5}-induced autism-like behavior and impaired hippocampal neurodevelopment in mouse pups. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v.185, 2019b.

WANG, Y.; ZHANG, M.; LI, Z.; YUE, J.; XU, M.; ZHANG, Y.; YUNG, K.K.L.; LI, R.; Fine particulate matter induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in human SH-SY5Y cells. **Chemosphere.** v. 218, p.577-588, 2019a.

WANG W. Y., PEARSON A. T., KUTYS M. L., CHOI C. K., WOZNIAK M. A., BAKER B. M., et al. Tof local adhesions and directs uniaxial cell migration. **Application Bioengineer.** v.2, n.4, 2018.

WEI, H.; WEI, D.; YI, S.; et al. Oxidative stress induced by fine urban particles in cultured EA.hy926 cells. **Hum Exp Toxicol.** v. 30, p. 579-590, 2011.

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

WITTCZAK, T.; DUDEK, W.; WALUSIAK-SKORUPA, J.; SWIERCZYNSKA-MACHURA, D.; CADER, W.; KOWALCZYK, M.; et al. Metal-induced asthma and chest X-ray changes in welders. **Int Arch Occup Environ Health.**v.25, n.3, p.242–250, 2012.

WU, X.; VERSCHUT, V.; WOEST, M. E.; MATIAS, A.; Rho-Kinase 1 / 2 Inhibition Prevents Transforming Growth Factor- β –Induced. **Effects on Pulmonary Remodeling and Repair.** [S. l.], v. 11, n. January, p. 1–12, 2021.

XIAO, W.; Advances in NF- κ B Signaling Transduction and Transcription. **Cellular e Molecular Immunology.** v.1, n.6, p. 425-436, 2004.

YAMADA, K.M.; SIXT, M.; Mechanisms of 3D cell migration. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** v.20, n.12, p.738–752, 2019.

ZAMBON MONTE, E.; TOLEDO DE ALMEIDA ALBUQUERQUE, T.; ANSELMO REISEN, V.; VITÓRIA, G.; SANTO, E.; 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,** [S. l.], v. 4, p. 546–554, 2016.

ZHAO, C.; LIAO, J.; CHU, W.; WANG, S.; YANG, T.; TAO, Y.; WANG, G.; Involvement of TLR2 and TLR4 and Th1/Th2 shift in inflammatory responses induced by fine ambient particulate matter in mice. **Inhal Toxicol.** v.24, n.13, p.918–927, 2012.

ZHAO, Y.X.; ZHANG, H.R.; YANG, X.N.; ZHANG, Y.H.; FENG, S.; YU, F.X.; YAN, X.X.; Fine Particulate matter-induced exacerbation of allergic asthma via activation of

t-cell immunoglobulin and mucin domain 1. hao et al. **Chin Med J (Engl)**; v.131, n.20, p. 2461-2473, 2018.

ZHANG, L.; ZHAO, Y.; The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+) CD25(+)T cells: multiple pathways on the road. **J Cell. Physiol.** v.211, n.3, p. 590–597, 2007.

ZHANG, Y.; MURUGESAN, P.; HUANG, K.; CAI, H.; NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. **Nat Rev Cardiol.** v. 17, p. 170-194, 2020.

ZHANG, Y.; WANG, S.; ZHU, J.; et al. Effect of atmospheric PM 2.5 on expression levels of NF- κ B genes and NF- κ B-regulated inflammatory cytokines in human macrophages. **Inflammation.** v.41, p. 784-794, 2018.

ZHENG, G.N.; XU, X.J.; LI, B.; WU, K.S.; YEKEEN, T.A.; HUO, X.; Association between lung function in school children and exposure to three transition metals from an e-waste recycling area. **J Expo Sci EnvEpid.** v.23, n.1, p.67–72, 2013.

ZHOU, G.; DADA, L.A.; WU, M.; KELLY, A.; TREJO, H.; et al.; Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v. 297, p.1120– 1130, 2009.

ZHU, X.M.; WANG, Q.; XING, W.W.; LONG, M.H.; FU, W.L.; XIA, W.R.; JIN, C.; et al. PM2.5 induces autophagy-mediated cell death via NOS2 signaling in human bronchial epithelium cells. **J Biol Sci**; v.14, n.5, p.557-564, 2018.

ZOROV, D.B.; FILBURN, C.R.; KLOTZ, L.O.; ZWEIER, J.L.; SOLLITT, S.J.; Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. **J Exp Med.** v. 192, p. 1001–14, 2000. 2001.
