



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
**Centro Biomédico**  
**Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes**

Isabella Cattani Pinto Cavalieri

**Efeitos da exposição aguda ao material particulado proveniente da  
queima de combustível diesel e biodiesel dos ônibus da cidade do  
Rio de Janeiro em pulmão de camundongos**

Rio de Janeiro  
2017

Isabella Cattani Pinto Cavalieri

**Efeitos da exposição aguda ao material particulado proveniente da queima de combustível diesel e biodiesel dos ônibus da cidade do Rio de Janeiro em pulmão de camundongos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Bruna Romana de Souza

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C377 Cavaliere, Isabella Cattani Pinto.  
Efeitos da exposição aguda ao material particulado proveniente da  
queima de combustível diesel e biodiesel dos ônibus da cidade do Rio de  
Janeiro em pulmão de camundongos / Isabella Cattani Pinto Cavaliere –  
2017.  
57 f.

Orientadora: Bruna Romana de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em  
Biologia Humana e Experimental.

1. Ar - Poluição - Teses. 2. Pulmões - Doenças – Teses. 3.  
Combustíveis diesel – Teses. 4. Biodiesel - Teses. I. Souza, Bruna  
Romana de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de  
Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.24 (815.3)

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou  
parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Isabella Cattani Pinto Cavalieri

**Efeitos da exposição aguda ao material particulado proveniente da queima de combustível diesel e biodiesel dos ônibus da cidade do Rio de Janeiro em pulmão de camundongos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dra. Bruna Romana de Souza (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Josiane Sabbadini Neves

Universidade Federal do Rio de Janeiro

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Angela de Castro Resende

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2017

## DEDICATÓRIA

A minha família, amigos e professores.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por sempre me dar força e mostrar que está comigo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais que fizeram o possível e o impossível na minha educação e por todo amor e incentivo.

Ao meu namorado, Danillo Surica pelo companheirismo e incentivo nessa jornada.

A minha orientadora Bruna Romana de Souza, pelo acolhimento, orientação, e aprendizado científico e profissional.

Ao professor Samuel Valença, por todo aprendizado, orientação e auxílio.

A professora Andréa Monte Alto Costa por toda ajuda e sugestões.

Ao professor Luis Cristóvão pelo apoio e incentivo.

Ao professor Walter Zin e a Giovanna Carvalho pela ajuda nas análises respiratórias.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório que me ajudaram e me incentivaram, Aline, Bianca, Emanuel, Fernanda e Marco.

A todo grupo do Laboratório de Reparo Tecidual e do Laboratório de Biologia Redox.

A minha amiga querida, Adriane Reis, por toda amizade e incentivo.

A todos que me ajudaram durante essa jornada. Muito obrigada!

Perseguir, sem cessar, uma meta: Este é o segredo do sucesso.

*Anna Pavlova*

## RESUMO

CAVALIERI, Isabella Cattani Pinto. *Efeitos da exposição aguda ao material particulado proveniente da queima de combustível diesel e biodiesel dos ônibus da cidade do Rio de Janeiro em pulmão de camundongos*. 2017. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Uma das principais formas de poluição atmosférica nos centros urbanos do Brasil provém da combustão de diesel dos motores de ônibus e caminhões. O diesel no Brasil é composto por combustível diesel e biodiesel (BS) com o objetivo de reduzir a poluição do ar. Assim, nosso objetivo foi investigar o efeito da exposição ao material particulado BS proveniente da queima de combustível do transporte público da cidade do Rio de Janeiro em pulmões de camundongos. O material particulado BS foi coletado dos canos de descarga dos ônibus da frota do transporte público da cidade do Rio de Janeiro e foi dissolvido em uma mistura de solução salina e dimetilsulfóxido. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram tratados com 250 µg ou 1000 µg de material particulado BS e o animais controle com veículo por instilação intranasal ao longo de cinco dias consecutivos. No 6º dia, 10 animais por grupo foram sacrificados, os pulmões e lavado broncoalveolar foram coletados. Dez animais por grupo foram reservados apenas para a análise da mecânica pulmonar. Foi demonstrado que o material particulado BS foi capaz de penetrar no parênquima pulmonar dos grupos BS 250 µg e BS 1000 µg. Além disso, o aglomerado de partículas BS no parênquima pulmonar foi maior nos grupos BS 250 µg e BS 1000 µg do que nos camundongos controle. A instilação do material particulado BS aumentou a elasticidade estática (Est) e a pressão resistiva pulmonar ( $\Delta P1$ ) nos grupos BS 250 µg e BS 1000 µg quando comparado ao grupo controle. O número de macrófagos e os níveis proteicos de proteína do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) também estavam aumentados nos pulmões dos grupos BS 250 e 100 µg. O material particulado BS aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio e os níveis de malondialdeído nos grupos tratados quando comparado ao grupo controle. A expressão proteica da glutamato cisteína ligase subunidade modificada foi menor no grupo BS 250 µg do que no grupo controle. A expressão proteica do fator nuclear relacionado à eritróide 2 (Nrf2), e do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e da enzima heme oxigenase-1 (HO-1) foi maior no grupo BS 250 µg, mas menor no grupo BS 1000 µg, quando comparado ao grupo controle. Em conclusão, a instilação do material particulado BS promove a resposta inflamatória e o dano oxidativo no pulmão de camundongos ativando as vias Nrf2/HO-1 e NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$ .

Palavras-chave: Poluição do ar. Mistura de diesel/biodiesel. Inflamação. Dano oxidativo. Pulmão. Camundongos.



## ABSTRACT

CAVALIERI, Isabella Cattani Pinto. *Effects of acute exposure to particulate matter from burning diesel fuel and biodiesel from the buses of the city of Rio de Janeiro in mice lungs*. 2017. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

One of the main forms of air pollution in urban centers of Brazil comes from diesel combustion from bus and truck engines. Diesel in Brazil is composed of diesel fuel and biodiesel (BS) with the aim of reducing air pollution. Thus, our aim was to investigate the effect of BS particulate matter exposure from fuel burning by public transport of Rio de Janeiro City in mice lung. BS particulate matter was collected from the exhaust pipes of buses from the public transportation fleet of Rio de Janeiro City and dissolved in saline/dimethyl sulfoxide. Female C57BL/6 mice were treated with 250 µg or 1000 µg of BS particulate matter and the control group with vehicle by intranasal instillation along five consecutive days. After sixth day, 10 animals per group were euthanized and the lungs and bronchoalveolar lavage were collected. Ten animals were separated only for pulmonary mechanic analysis. We demonstrated that BS particulate matter was able to penetrate into the lung in the BS 250 µg and BS 1000 µg groups. In addition, the agglomerate of BS particulate matter in pulmonary parenchyma was higher in the BS 250 µg and BS 1000 µg groups than in the control group. The instillation of BS particulate matter increased the static elastance (*Est*) and lung resistive pressure ( $\Delta P_1$ ) in BS 250 µg and BS 1000 µg groups when compared to control group. Furthermore, the macrophage number and protein levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were also increased in lung of the BS 250 and 1000 µg group when compared to control group. The BS particulate matter enhanced reactive oxygen species synthesis and the malondialdehyde levels in both treated groups when compared to control group. The expression of glutamate cysteine ligase modifier subunit was lower in the BS 250 µg group than in the control group. The protein expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and heme oxygenase-1 (HO-1) enzyme was higher in BS 250 µg group, but lower in BS 1000 µg group, than in control group. In conclusion, the BS particulate matter instillation promotes inflammatory response and oxidative damage in mice lung activating Nrf2/HO-1 and NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$  pathways.

Keywords: Air pollution. Diesel/biodiesel mixture. Inflammation. Oxidative damage.  
Lung. Mice.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da montagem experimental para mecânica pulmonar.....	27
Figura 2 -	Análise macroscópica e microscópica do pulmão de camundongos expostos com o material particulado BS .....	35
Figura 3 -	Avaliação microscópica e bioquímica da resposta inflamatória do pulmão de camundongos expostos ao veículo e ao material particulado BS .....	38
Figura 4 -	Avaliação das enzimas antioxidantes e das subunidades da glutamato cisteína ligase (GCL) em pulmão de camundongos expostos ao veículo e ao material particulado BS .....	40
Figura 5 -	Avaliação do dano oxidativo em pulmão de camundongos expostos ao veículo e ao material particulado BS.....	42
Figura 6 -	Via do fator nuclear relacionado à eritróide 2 (Nrf2) e do fator nuclear kappa b (NF-κB) em pulmão de camundongos controle e de camundongos expostos ao material particulado BS.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrões nacionais de qualidade do ar estabelecidos pela Resolução CONAMA 03/1990 .....	16
Tabela 2 - Conteúdo de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos do material particulado BS .....	36
Tabela 3 - Mecânica respiratória .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta E$	Componente viscoelástico da elastância
$\Delta P$	Varição da pressão
$\Delta P_1$	Pressão resistiva pulmonar
$\Delta P_2$	Pressão viscoelástico/inomogêneo
ANOVA	Análise de variância
BS	Combustível diesel e biodiesel
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CO	Monóxido de carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DP	Desvio padrão
Edyn	Elastância dinâmica
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
Est	Elastância estática
GCLC	Glutamato cisteína ligase subunidade catalítica
GCLM	Glutamato cisteína ligase subunidade modificada
GPx	Glutationa peroxidase
HE	Hematoxilina e eosina
HO-1	Heme oxigenase-1
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
KPE	Tampão fosfato de potássio
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MPO	Mieloperoxidase
NBT	Nitrotetrazalium
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrogênio
Nrf2	Fator nuclear relacionado à eritróide 2

O <sub>3</sub>	Ozônio
PBS	Tampão salina fosfato
Pel	Pressão de retração elástica do pulmão
Pi	Ponto de inflexão
PL	Pressão transpulmonar
PM	Material particulado
Ptr	Pressão traqueal
SO <sub>2</sub>	Dióxido de enxofre
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	Fator de necrose tumoral
V'	Fluxo aéreo
VT	Volume corrente

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA</b> .....	15
1.1	<b>Poluição através da queima do combustível diesel</b> .....	17
2	<b>VIA DO FATOR NUCLEAR KAPPA B (NF-κB)</b> .....	19
3	<b>VIA DO FATOR NUCLEAR RELACIONADO À ERITRÓIDE 2 (Nrf2).</b>	20
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
4.1	<b>Geral</b> .....	21
4.2	<b>Específicos</b> .....	21
5	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
5.1	<b>Animais</b> .....	22
5.2	<b>Coleta do material particulado BS e preparação da solução</b> .....	22
5.3	<b>Análise do tamanho e da composição do material particulado BS</b>	23
5.4	<b>Desenho experimental</b> .....	23
5.5	<b>Mecânica pulmonar</b> .....	23
5.6	<b>Lavado broncoalveolar</b> .....	28
5.7	<b>Homogeneizado tecidual</b> .....	28
5.8	<b>Análise microscópica</b> .....	28
5.9	<b>Imunofluorescência contra Nrf2 e NF-κB</b> .....	29
5.10	<b>Dosagem das espécies reativas de oxigênio (EROs)</b> .....	29
5.11	<b>Dosagem de nitrito</b> .....	30
5.12	<b>Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico</b> .....	30
5.13	<b><i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)</i></b> .....	31
5.14	<b>Western blot</b> .....	31
5.15	<b>Zimografia</b> .....	32
5.16	<b>Análise estatística</b> .....	33
6	<b>RESULTADOS</b> .....	34
6.1	<b>Composição e distribuição do material particulado BS no pulmão de camundongo</b> .....	34
6.2	<b>Avaliação da mecânica pulmonar</b> .....	37
6.3	<b>A instilação do material particulado BS elevou a síntese de TNF-α e o influxo de macrófagos no pulmão de camundongos</b> .....	37

6.4	<b>A instilação do material particulado BS reduziu os níveis proteicos de GCLM no pulmão de camundongos.....</b>	<b>39</b>
6.5	<b>A instilação do material particulado BS elevou a produção de EROs, os níveis de peroxinitrito e a peroxidação lipídica no pulmão de camundongos.....</b>	<b>41</b>
6.6	<b>Efeito da instilação do material particulado BS sob as vias do Nrf2 e NF-κB no pulmão de camundongos.....</b>	<b>43</b>
7	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>
	<b>ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais.....</b>	<b>56</b>
	<b>ANEXO B - Comprovação de submissão do artigo científico.....</b>	<b>57</b>

## INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a poluição atmosférica é uma das grandes causas de efeitos adversos à saúde, levando a doenças cardiovasculares, respiratórias e ao câncer (Krzyzanowski *et al.*, 2005). Devido ao impacto causado à saúde, estima-se que em 2012, 7 milhões de mortes no mundo foram causadas pela poluição atmosférica (Krzyzanowski *et al.*, 2005).

O material particulado produzido através da combustão de diesel é composto principalmente por metais e por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, sendo estes compostos altamente tóxicos para o sistema respiratório. Em modelos animais, a exposição aguda a partículas de diesel aumenta o número de células inflamatórias no lavado broncoalveolar e a liberação de citocinas pró-inflamatórias como fator tumoral de necrose (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) no pulmão (Nemmar *et al.*, 2012; Yanamala *et al.*, 2013). Além da indução da resposta inflamatória, há a indução do estresse oxidativo, observado através do aumento dos níveis das espécies reativas de oxigênio (EROs) em pulmão de camundongos expostos às partículas de diesel e a poluentes atmosféricos (Chan *et al.*, 2013; Nemmar *et al.*, 2015). Foi demonstrado que atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase, que são essenciais para o processo de defesa antioxidante, aumentam em pulmão de ratos expostos a partículas da poluição atmosférica (Gurgueira *et al.*, 2002).

A cidade do Rio de Janeiro possui a segunda maior concentração de pessoas, veículos e indústrias no Brasil, além disso, há altos níveis de poluição do ar. Para reduzir a emissão de poluentes atmosféricos, principalmente em ônibus e caminhões, houve a adição de 7% de biodiesel no combustível diesel comercial, gerando o combustível diesel e biodiesel (BS) (Brasil, 2014). Portanto, nenhum estudo demonstrou o efeito da exposição em pulmão ao material particulado BS obtido através do cano de descarga de ônibus. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da exposição aguda a partículas de biodiesel/diesel proveniente da queima de combustível dos ônibus da cidade do Rio de Janeiro em pulmão de camundongos.



## 1 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

O aumento da poluição atmosférica está relacionado ao desenvolvimento econômico, urbanização, consumo de energia e transporte (Who, 2006). As pessoas estão constantemente suscetíveis à exposição à poluição atmosférica, principalmente as que vivem em grandes centros urbanos, onde são encontradas maiores fontes de poluidores atmosféricos. A problemática da poluição atmosférica ocorre devido a diversidade de fontes de emissão de poluentes. As principais fontes de emissão de poluentes são indústrias e veículos automotores (Braga *et al.*, 2001). Sendo que os principais poluentes responsáveis pela poluição do ar são: o material particulado (PM), o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>), ozônio (O<sub>3</sub>), monóxido de carbono (CO) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Who, 2006; Chen e Kan, 2008). Além dos compostos conhecidos e monitorados, há outros compostos que não são monitorados no ar, podendo dessa maneira ser um fator preocupante para a poluição atmosférica (Pereira *et al.*, 2005).

Devido a necessidade de se controlar a emissão de poluentes na atmosfera, foram estabelecidos no Brasil os padrões de qualidade do ar através da Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) 03/1990 (Conama, 1990). A resolução indica os limites das concentrações encontradas no ar, sendo definido como padrão primário o limite máximo para a concentração de um determinado composto (Tabela 1). Caso a concentração do composto encontrada no ar seja ultrapassada do padrão primário haverá possivelmente danos à saúde.

Tabela 1 - Padrões nacionais de qualidade do ar estabelecidos pela Resolução CONAMA 03/1990

<b>Poluentes</b>	<b>Padrões Primários</b>	<b>Tempo</b>
Partículas Totais em Suspensão	240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	24 horas*
Partículas Inaláveis	80 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Média geométrica anual
	150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	24 horas*
	50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Média aritmética anual
Dióxido de Enxofre	365 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	24 horas*
	80 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Média aritmética anual
Monóxido de Carbono	40.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (35 ppm)	1 hora*
	10.000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (9ppm)	8 horas*
Dióxido de Nitrogênio	320 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	1 hora
	100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Média aritmética anual
Ozônio	160 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	1 hora*

Legenda: \*Não deve ser excedido mais que uma vez ao ano.  
 Fonte: Resolução CONAMA 03/1990 (Conama, 1990).

Além da constante liberação de poluentes atmosféricos, o fator meteorológico possui um importante papel na dispersão desses poluentes. O fenômeno de inversão térmica pode ser considerado como um agravante para a qualidade do ar (Braga *et al.*, 2001; Epa, 2003). Uma vez que durante esse fenômeno há uma presença de ar frio acima da superfície que impede com que o ar mais quente próximo ao solo se movimente (Braga *et al.*, 2001), devido a isso, a inversão térmica dificulta a dispersão das partículas presentes abaixo dessa camada de ar frio (Braga *et al.*, 2001; Epa, 2003).

As características do PM podem variar de acordo com as suas fontes de emissão, possuindo uma influência direta no seu tamanho e sua composição, sendo a classificação do PM feita de acordo com seu tamanho aerodinâmico (Guarieiro e Guarieiro, 2013). As partículas totais em suspensão são aquelas que apresentam características de tamanho igual ou inferior a 100  $\mu\text{m}$  (Braga *et al.*, 2001; Guarieiro e Guarieiro, 2013). As partículas menores ou iguais a 10  $\mu\text{m}$  (PM<sub>10</sub>) são consideradas partículas inaláveis (Braga *et al.*, 2001; Guarieiro e Guarieiro, 2013). Dentro das

partículas inaláveis há a classificação das partículas menores, como as partículas grossas ( $PM_{10-2,5}$ ) que possuem tamanho aerodinâmico entre 10 e 2,5  $\mu m$  (Braga *et al.*, 2001; Guarieiro e Guarieiro, 2013). Já as partículas finas ( $PM_{2,5}$ ) são caracterizadas como menores do que 2,5  $\mu m$  e as ultrafinas ( $PM_{0,1}$ ) são consideradas menores do que 0,1  $\mu m$  (Braga *et al.*, 2001; Guarieiro e Guarieiro, 2013). A capacidade de penetrar através do sistema respiratório está diretamente relacionada ao seu tamanho aerodinâmico (Braga *et al.*, 2001; Epa, 2010; Guarieiro e Guarieiro, 2013). Partículas com o tamanho menor do que 10  $\mu m$  ( $PM_{10}$ ) são capazes de penetrar nas vias aéreas superiores do sistema respiratório (Braga *et al.*, 2001; Guarieiro e Guarieiro, 2013). Em contra partida, partículas finas ( $PM_{2,5}$ ) são depositadas nas vias aéreas superiores e as partículas ultrafinas ( $PM_{0,1}$ ) possuem a capacidade de alcançar as regiões alveolares do pulmão (Braga *et al.*, 2001; Guarieiro e Guarieiro, 2013).

A poluição atmosférica pode causar graves alterações no parênquima pulmonar. Um estudo *in vitro* com exposição de material particulado em diferentes linhagens de células pulmonares epiteliais humanas (BEAS-2B e A549), observou uma elevação da síntese da interleucina-8 (IL-8), que é indicada como um importante fator quimiotático para neutrófilo (Gualtieri *et al.*, 2010). Um recente estudo demonstrou que células expostas ao  $PM_{2,5}$  aumentaram a expressão gênica da heme oxigenase-1 (HO-1), do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e do TNF- $\alpha$ . Nesse mesmo estudo, porém, com a exposição do  $PM_{2,5}$  em camundongos, foi observado o aumento de macrófagos no lavado broncoalveolar. Entretanto, não foi visto diferença na expressão do TNF- $\alpha$  no lavado broncoalveolar de camundongos (He *et al.*, 2016).

### 1.1 Poluição através da queima do combustível diesel

A cidade do Rio de Janeiro possui a segunda maior concentração de veículos e indústrias no Brasil, possuindo a maior emissão de poluição do país (Cabral Filho e Ramos, 2013). Os principais compostos que são tóxicos para o sistema respiratório encontrados nas partículas provenientes da queima do diesel são metais, como cádmio, cromo, cobre e ferro e os hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos como benzo [a] antraceno, benzo [a] pireno e benzo [b] fluoranteno (Laks *et al.*, 2008). Sendo assim, como estratégia para a redução da emissão de poluentes atmosféricos causados pelos veículos foi implementada no Brasil a adição de 7% de biodiesel em combustíveis diesel (Brasil, 2014), devido ao fato de que a queima de biodiesel em veículos possa talvez reduzir a produção de partículas finas e poluentes gasosos.

Um estudo em camundongos demonstrou que uma única exposição a partículas de diesel aumenta a expressão de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-6 em camundongo (Sunil *et al.*, 2009). Outro estudo, porém *in vitro*, observou que diferentes concentrações de partículas de diesel foram capazes de aumentar a síntese das EROs em células epiteliais alveolares do tipo II (Patel *et al.*, 2011). Além destas alterações, outros estudos também observaram que a instilação intranasal de partículas de diesel em camundongos eleva os níveis de malondialdeído, que é um marcador de peroxidação lipídica (Nemmar *et al.*, 2012). Um recente estudo demonstrou que a instilação das partículas de diesel foi capaz de induzir a resposta inflamatória indicada pelo aumento de macrófagos e neutrófilos em lavado broncoalveolar de camundongos (Larcombe *et al.*, 2014). Porém, quando os animais foram expostos à inalação das partículas de diesel, não foi observado o aumento da resposta inflamatória (Larcombe *et al.*, 2014).

## 2 VIA DO FATOR NUCLEAR KAPPA B (NF- $\kappa$ B)

O fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) é um heterodímero que consiste principalmente em duas subunidades, a p65 e p50, sendo ele diretamente relacionado à resposta inflamatória (Barnes e Karin, 1997). Quando não ativado, o NF- $\kappa$ B está presente no citoplasma associado a uma proteína inibitória chamada de I $\kappa$ B, que impede a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo (Lawrence, 2009). Quando as células são estimuladas pelo estresse oxidativo ou pela inflamação, o I $\kappa$ B sofre fosforilação e degradação, permitindo a passagem do NF- $\kappa$ B para o núcleo celular (Lawrence, 2009). Alguns estímulos permitem a ativação e consequentemente a liberação e translocação do NF- $\kappa$ B, dentre eles estão, citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , oxidantes (peróxido de hidrogênio) e lipopolissacarídeos (Barnes e Karin, 1997). Após a translocação para o núcleo, o NF- $\kappa$ B se liga a regiões promotoras específicas dos genes inflamatórios participando da transcrição para posterior liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), quimiocinas (IL-8), enzima inflamatória (iNOS), moléculas de adesão e receptores (Barnes e Karin, 1997).

Estudos têm demonstrado o aumento da resposta inflamatória, caracterizado pelo aumento do número de células polimorfonucleares e macrófagos, no pulmão de camundongos expostos a poluentes atmosféricos (Laks *et al.*, 2008; Nemmar *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2014). A exposição de camundongos a poluentes atmosféricos também eleva os níveis de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e de IL-6 no lavado broncoalveolar e da expressão do TNF- $\alpha$  e da IL-6 no pulmão de camundongos (Laks *et al.*, 2008; Sunil *et al.*, 2009; Yoshizaki *et al.*, 2015). Além disso, a exposição de células epiteliais brônquicas humanas ao material particulado do diesel promoveu a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B após 6 horas da exposição, por um efeito dose e tempo dependente (Dagher *et al.*, 2007). Outro estudo também observou que células epiteliais brônquicas humanas expostas a material particulado apresentavam um aumento na expressão do I $\kappa$ B fosforilado após 24 horas de incubação (Watterson *et al.*, 2012).

### 3 RESPOSTA ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA VIA DO FATOR NUCLEAR RELACIONADO À ERITRÓIDE 2 (Nrf2)

A poluição atmosférica também pode desencadear um dano tecidual associado ao estresse oxidativo (Nemmar *et al.*, 2015). O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio oxirredução, que é caracterizado como desequilíbrio entre a produção e liberação de oxidantes e também dos antioxidantes (Avery, 2011). Sendo que os antioxidantes possuem um papel essencial na defesa do sistema biológico contra os oxidantes (Avery, 2011). Uma via de extrema importância para o sistema de defesa antioxidante é a via do Nrf2 (Blake *et al.*, 2010). A ativação da via do Nrf2 é iniciada a partir de um estímulo, como por exemplo, o estresse oxidativo (Blake *et al.*, 2010). Dessa maneira, o Nrf2 que está acoplado ao seu repressor denominado como Keap-1, é translocado para o núcleo e participará da transcrição e liberação de proteínas, como: HO-1, SOD-1, NAD(P)H quinona oxirredutase 1, glutamato cisteína ligase catalítica (GCLC), glutamato cisteína ligase modificada (GCLM), glutathione S transferase, que participam da defesa antioxidante e restauração do sistema oxirredução da célula (Kensler *et al.*, 2007).

Um estudo demonstrou que a exposição de macrófagos humanos a partículas provenientes da queima de uma mistura com etileno, oxigênio e argônio foi capaz de aumentar a ativação do Nrf2 de maneira dose-dependente e elevar a expressão da HO-1 (Chan *et al.*, 2013). Nesse mesmo estudo foi visto que a exposição de ratos a partículas por 6 horas não alterou a expressão da HO-1, SOD-1 e -2 e catalase 2, 24 e 48 horas após a exposição (Chan *et al.*, 2013). Entretanto, a expressão de HO-1 foi aumentada após 48 horas de exposição (Chan *et al.*, 2013). Foi observado em um estudo *in vitro*, que macrófagos expostos a partículas de diesel demonstraram um aumento na expressão proteica do Nrf2 de 20 minutos até 6 horas após a exposição (Li *et al.*, 2004). Contudo, a expressão da HO-1 foi aumentada de 4 horas até 6 horas após a exposição das partículas de diesel (Li *et al.*, 2004).

Assim, a hipótese desse estudo é que a exposição aos poluentes ambientais provenientes da queima do combustível BS promove alterações na resposta inflamatória e no estresse oxidativo no pulmão de camundongos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Investigar os efeitos da exposição aguda ao material particulado BS proveniente da queima de combustível BS dos ônibus da cidade do Rio de Janeiro em pulmão de camundongos.

### 4.2 Específicos

- a) Avaliar a composição e o tamanho do material particulado BS;
- b) Quantificar o número de macrófagos no parênquima pulmonar comparando animais expostos ao veículo e ao material particulado BS;
- c) Quantificar o aglomerado do material particulado BS no parênquima pulmonar;
- d) Avaliar marcadores inflamatórios através dos níveis proteicos de TNF- $\alpha$  e metaloproteinase de matriz-12 (MMP-12);
- e) Avaliar o estresse oxidativo através da dosagem das EROs, nitrito, catalase, SOD, glutathiona peroxidase (GPx), iNOS e nitrotirosina;
- f) Investigar o dano oxidativo através do níveis de malondialdeído (MDA);
- g) Avaliar os efeitos da exposição aguda ao material particulado BS sobre a expressão de NF- $\kappa$ B e Nrf2;
- h) Analisar a mecânica respiratória.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Foram utilizados 60 camundongos C57BL/6, fêmeas, com 8 a 10 semanas de idade. Os animais foram obtidos da Fundação Bio Rio e aclimatados por 2 semanas antes do início do experimento. Durante o experimento, os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro de 12h. Os animais receberam cuidados de acordo com a Legislação Brasileira de Experimentação Animal (nº 11.794, 8 de Outubro, 2008). Os animais receberam a ração padrão e água *ad libitum*. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro recebendo a identificação nº 01200.001568/2013-87.

### 5.2 Coleta do material particulado BS e preparação da solução

O material particulado proveniente da combustão do BS foi coletado do escapamento dos ônibus do transporte público da cidade do Rio de Janeiro da linha circular 607 da empresa Viação Acari. As partículas foram gentilmente coletadas utilizando uma escova de dente macia em mais de um ônibus. Os ônibus utilizavam combustível BS 500 tipo B contendo 500 partes/milhão de enxofre e eram equipados com o motor Mercedes Benz MB OM 924 LA. Após a coleta, uma parte do material particulado BS foi separado e enviado para a análise do tamanho e da composição. O restante foi pesado (0,405 g) e ressuspenso em 40 ml de uma mistura contendo solução salina (cloreto de sódio a 0,9%) e dimetilsulfóxido a 2%. Obtendo uma suspensão de 10 µg/µl de partículas.



### **5.3 Análise do tamanho e da composição do material particulado BS**

O tamanho do material particulado BS foi analisado através da polidispersividade, (ZetaPals, Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, EUA). A análise da polidispersividade avalia a distribuição de tamanho entre as partículas analisadas. A composição do material particulado BS foi analisada através da cromatografia gasosa e da espectrofotometria de massa pelo Laboratório Oceanus (Rio de Janeiro, Brasil).

### **5.4 Desenho experimental**

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos, sendo 20 animais por grupo: grupo controle recebeu 25 µL do veículo (98% salina e 2% dimetil sulfóxido); grupo BS 250 µg recebeu 25 µl da suspensão do material particulado BS; grupo BS 1000 µg recebeu 100 µl da suspensão do material particulado BS. A instilação intranasal do grupo BS 1000 µg foi dividida em duas instilações por dia por conta da alta dose de material particulado BS. Todos os animais foram instilados via intranasal durante 5 dias consecutivos. Para a instilação, os animais foram anestesiados com sevoflurano (Laboratório Crisália, São Paulo, Brasil). Com objetivo de evitar a sedimentação das partículas, antes de cada instilação, a solução contendo as partículas em suspensão foi homogeneizada com o auxílio de um vórtex.

### **5.5 Mecânica Pulmonar**

Após 5 dias de instilação intranasal com material particulado BS, 10 animais por grupo foram sedados com diazepam (1 mg/kg, intraperitoneal), e anestesiados com pentobarbital sódico (20 mg/kg, intraperitoneal). Essa combinação medicamentosa é suficiente para manter o animal em anestesia por 1 hora.

Depois de anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma pequena mesa sob foco cirúrgico, sendo seus membros fixados por esparadrapo. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada traqueotomia com introdução de jelco, sendo a cânula fixada à traqueia por meio de fios de algodão. Os animais foram paralisados com injeção intravenosa de brometo de pancurônio (0,1 mg/kg, intravenoso).

Os camundongos foram, então, acoplados à prótese ventilatória e ventilados por um ventilador de fluxo constante (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideu, Uruguai) com frequência de 100 incursões respiratórias por minuto e um volume corrente (VT) de 0,2 ml.

Foi estabelecida uma pressão positiva ao final da expiração de aproximadamente 2 cmH<sub>2</sub>O, a fim de evitar o colapso alveolar e o desenvolvimento de atelectasias resultantes da abertura do espaço pleural (Saldiva *et al.*, 1992).

O ventilador foi ajustado para gerar uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração durante as medidas de mecânica. Foram tomados cuidados para a manutenção de volume (VT = 0,2 ml) e fluxo ( $V' = 1$  ml/s) constantes em todos os animais, a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e tempo inspiratório nas variáveis medidas (Kochi *et al.*, 1988a; b; Similowski *et al.*, 1989).

O tubo traqueal foi conectado a um pneumotacógrafo para pequenos animais, para medida de fluxo aéreo ( $V'$ ), sendo o respirador acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. Este é constituído por uma cânula metálica com duas saídas laterais ligadas a um transdutor diferencial de pressão, Validyne MP 45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA), para medida de fluxo aéreo, sendo o volume corrente obtido por integração digital do sinal de fluxo. Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a um transdutor diferencial de pressão Validyne MP45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA) para medida da PL (Ptr).

O espaço morto do equipamento foi de 0,3 ml. Os sinais de  $V'$  e Ptr foram condicionados e amplificados em um polígrafo Beckman tipo R (Beckman Instruments, Schiller Park, IL, EUA). Os sinais foram, então, passados através de filtros Bessel de 8 polos (902LPF, Frequency Devices, Haverhill, MA, EUA), convertidos de analógicos para digitais em conversor de 12 bits (DT-2801A, Data Translation, Malboro, MA, EUA) e armazenados em computador. Todos os dados foram coletados usando o software LABDAT (RHT-InfoData Inc., Montreal, QC, Canadá).

Durante a análise da mecânica respiratória evitou-se ao máximo a manipulação da cânula traqueal com aspirações e insuflações, para eliminar possíveis interferências sobre os parâmetros medidos.

Os parâmetros de mecânica respiratória foram determinados através de 10 ciclos respiratórios que foram capturados por animal e a análise efetuada pelo método de oclusão ao final da inspiração utilizando o software para análise de dados ANADAT (RHT-InfoData Inc., Montreal, Quebec, Canadá).

O método de oclusão ao final da inspiração (Bates *et al.*, 1985) permite analisar separadamente os componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inhomogêneo do sistema respiratório.

No animal com o tórax aberto, a  $P_{tr}$  é, na realidade, a pressão transpulmonar (PL); logo todos os parâmetros medidos correspondem à mecânica pulmonar. Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da PL até um ponto de inflexão ( $P_i$ ), a partir do qual o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão ( $P_{el}$ ). A diferença de pressão, que caracteriza a queda rápida inicial ( $\Delta P_1$ ), é representada pela diferença entre a pressão máxima inicial e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta ( $P_i$ ) e corresponde ao componente viscoso pulmonar. A segunda variação de pressão, representada pela queda lenta, do  $P_i$  ao platô ( $P_{el}$ ), reflete a pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do tecido pulmonar. A soma de  $\Delta P_1$  e  $\Delta P_2$  fornece a variação total de pressão no pulmão.

As elastâncias estática (Est) e dinâmica (Edyn) do pulmão foram obtidas dividindo-se  $P_{el}$  e  $P_i$ , respectivamente, pelo volume corrente (VT). O componente viscoelástico da elastância ( $\Delta E$ ) foi, então, obtido pela diferença entre Edyn e Est.

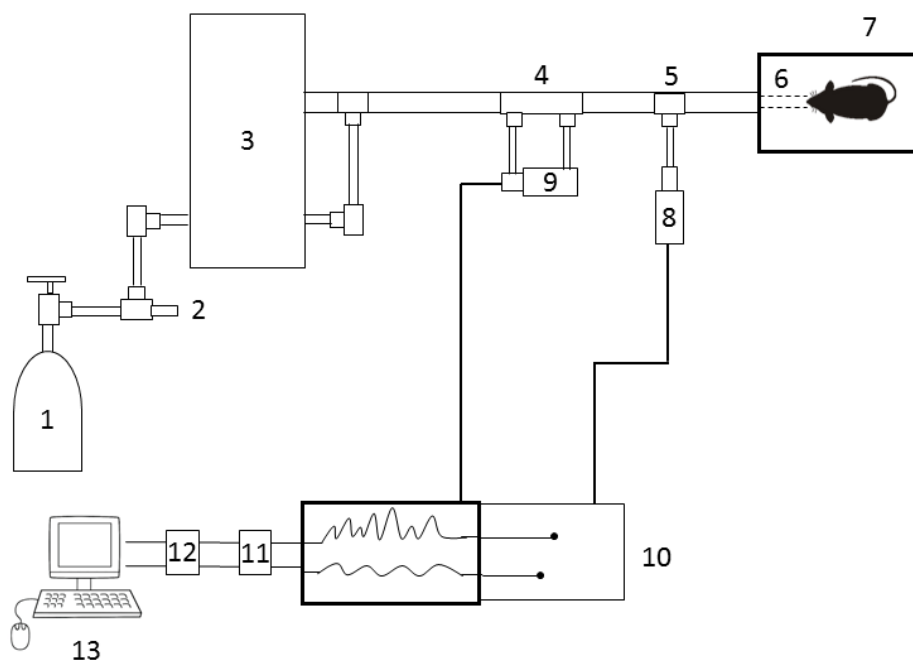
Para a realização da oclusão, o ventilador mecânico utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o volume nunca cai à zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno fluxo. Este fluxo será responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, de  $P_i$  e  $P_{el}$ . Por isso, foi feita correção de acordo com Kochi *et al.* (1988b).

A resistência total do equipamento, incluindo a cânula traqueal, foi previamente aferida através da aplicação de fluxos de ar ao sistema, com

concomitante registro das variações de pressão ( $\Delta P$ ). A variação de pressão determinada pelo equipamento foi subtraída das pressões resistivas do pulmão, de tal forma que os resultados representam propriedades mecânicas intrínsecas.

Os parâmetros de mecânica pulmonar foram medidos 10 vezes em cada animal, sendo cada animal representado pela média de 10 ciclos respiratórios coletados. Uma representação da montagem experimental para mecânica pulmonar encontra-se na Figura 1.

Figura 1 - Representação da montagem experimental para mecânica pulmonar



Legenda: (1) Cilindro de ar comprimido; (2) Válvula redutora de pressão; (3) Ventilador de fluxo inspiratório constante composto; (4) Pneumotocógrafo; (5) Peça em "T" para medição de pressão na abertura das vias aéreas; (6) Cânula traqueal; (7) Mesa cirúrgica; (8) Transdutor diferencial de pressão transpulmonar; (9) Transdutor diferencial de pressão para medição de fluxo; (10) Polígrafo de oito canais para amplificação dos sinais de fluxo e pressão; (11) Filtros passa-baixa Bessel de 8 polos; (12) Conversor analógico-digital de 12 bits; (13) Microcomputador.

Fonte: A autora, 2017.

## 5.6 Lavado broncoalveolar

No sexto dia, os 10 animais restantes de cada grupo foram anestesiados com sevoflurano e mortos por deslocamento cervical. Para a coleta do lavado broncoalveolar, a traqueia foi exposta, canulada e os pulmões foram lavados três vezes com 0,5 ml de solução salina (cloreto de sódio a 0,9%). As amostras de lavado broncoalveolar foram rapidamente estocadas em gelo a fim de evitar lise celular. Foi utilizado um microscópio óptico para a contagem das células totais do lavado broncoalveolar para posterior normalização da dosagem da EROs. As amostras foram centrifugadas a 600 g por 10 minutos e o sobrenadante coletado e estocado a -20°C para realização de futuras análises bioquímicas.

## 5.7 Homogeneizado tecidual

O pulmão direito foi macerado no tampão de lise (Sigma - Aldrich, St Louis, MO) e a concentração total de proteína foi determinada através do ensaio colorimétrico de ácido bicincônico (#23227; Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN). O lisado pulmonar foi utilizado também para análises bioquímicas e de western blot.

## 5.8 Análise microscópica

O pulmão esquerdo foi removido, fixado em formaldeído a 4%, processado e incluído em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para a quantificação do número de macrófagos e do aglomerado de materiais particulados BS no parênquima pulmonar. Para isto, 10 campos aleatórios por animal foram analisados utilizando uma objetiva de 40x (Zeiss Primo Star; Zeiss-Vision, Oberkochen, Alemanha). Os resultados do número de macrófagos ou do aglomerado de materiais particulados BS foram expressos em mm<sup>2</sup>. Para uma

imagem macroscópica representativa dos pulmões, foram feitas fotos do pulmão de cada grupo experimental.

### 5.9 Imunofluorescência contra Nrf2 e NF-κB

Antes da marcação com os respectivos anticorpos, os cortes foram desparafinizados em xilol por 5 minutos e hidratados em álcool nas concentrações de 100%, 90%, 70% por 3 minutos em cada, por fim foram imersos em água destilada. Após essa etapa, os cortes foram incubados com tampão citrato (pH 6,0) para a recuperação antigênica. Em seguida, os cortes foram bloqueados com albumina bovina a 3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) dissolvida em tampão salina fosfato (PBS) por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente com anticorpos contra Nrf2 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) ou NF-κB (1:50; Santa Cruz Biotechnology) produzidos em coelho e cabra, respectivamente. Após a lavagem, os cortes foram incubados com anticorpos secundários anti-coelho Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1:200) ou anti-cabra Alexa Fluor 647 (1:200; Invitrogen). Para a análise no microscópio de fluorescência, os cortes foram embebidos em meio de montagem Vectashield contendo DAPI (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA).

### 5.10 Dosagem das espécies reativas de oxigênio (EROs)

A estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi realizada por meio de um método colorimétrico adaptado de Choi *et al.* (2006). O método é baseado na reação do sal azul de nitrotetrazolium (NBT) (Sigma-Aldrich) com as espécies reativas de oxigênio. Sendo que 90% do sal reage exclusivamente com ânion superóxido. Algumas outras espécies reativas reagem menos seletivamente com esse sal, como: radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso (Choi *et al.*, 2006). As frações celulares do lavado broncoalveolar foram ressuspensas em 100 µl de tampão fosfato de potássio (KPE) e 100 µl da

solução de NBT a 0,1% foi adicionado a reação. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 600 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 500 µl de tampão KPE e centrifugado a 600 g por 10 minutos. Após a repetição da lavagem com tampão KPE, o pellet foi ressuscitado em hidróxido de potássio a 2M. A reação colorimétrica foi lida a 630 nm em leitor de ELISA (Anthos Zenyth 200 rt, Biochrom, Cambourne, Reino Unido). Os resultados foram expressos como µg de cristais de formazan por números de células. A formação dos cristais de formazan resulta da redução do NBT principalmente pelo ânion superóxido.

### 5.11 Dosagem de nitrito

A dosagem de nitrito é utilizada para a avaliação da síntese de óxido nítrico, uma vez que esse radical possui um tempo de meia vida curta. Assim, a formação desse radical é mensurada através da formação do nitrito, que é um produto da degradação estável. A detecção dos níveis de nitrito é feita por meio da reação de Griess (Green *et al.*, 1982). Para a reação, 50 µl de homogeneizado do pulmão foram misturados a 50 µl de água destilada. A amostra diluída foi transferida para uma placa de 96 poços em duplicata e misturada a 50 µl de solução de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 2,5%. A mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, 50 µl de solução de naftiletilenodiamina a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5% foram adicionados a mistura. Concentrações crescentes de nitrito (0; 0,1; 1,0; 10; 25; 50; 75; 100 µM) foram preparadas e utilizadas como curva padrão. A reação foi lida a 540 nm em leitor de ELISA (Anthos Zenyth 200 rt, Biochrom). Os resultados foram expressos em µM de nitrito por mg proteína total.

### 5.12 Análise da peroxidação lipídica

Para avaliar a peroxidação lipídica, os níveis de MDA foram medidos através do método de detecção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Draper e



Hadley, 1990). Durante a lipoperoxidação há a formação de MDA e este subproduto da peroxidação reage ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico. Para isto, 150 µl de cada homogeneizado de pulmão foram tratados com 150 µl de ácido tricloroacético a 10% e a mistura foi centrifugada a 3600 g por 15 minutos. Em seguida, 150 µl do sobrenadante foram separados e misturados a 150 µl de ácido tiobarbitúrico a 0,67%. A mistura foi aquecida por 10 minutos a 95°C. Concentrações crescentes de 1,1,3,3 tetrametoxipropano (0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 50; 100 µM) foram preparadas e utilizadas como curva padrão. A reação colorimétrica foi lida a 532 nm em leitor de ELISA (Anthos Zenyth 200 rt, Biochrom). Os resultados foram expressos em µM de MDA por mg de proteína total.

### 5.13 *Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA)*

A detecção dos níveis proteicos de TNF- $\alpha$  foi realizado no lavado broncoalveolar através do ensaio de ELISA, de acordo com as normas do fabricante (#555-268; BD BioSciences, San Diego, CA). Os resultados foram expressos as em pg/mL de TNF- $\alpha$ .

### 5.14 **Western blot**

As proteínas do lisado pulmonar (50 ou 100 µg) foram separadas em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio a 8%, 10% ou 12% por eletroforese. Uma alíquota de padrão de peso molecular também foi incluída aos géis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas em solução de leite desnatado a 3% (Nestlé, São Paulo, Brasil) dissolvida em PBS contendo 0,05% de Tween-20. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por 2h com anticorpos: contra a MMP-12 produzido em policlonal de coelho (59 kDa) (Santa Cruz Biotechnology; 1:200), contra a catalase produzido em policlonal de cabra policlonal (64 kDa) (1:200; Santa Cruz Biotechnology), contra a superóxido dismutase 3 produzido em policlonal de

cabra (SOD-3) (32 kDa) (1:200; Santa Cruz Biotechnology), contra a glutathione peroxidase 1/2 produzido em policlonal de coelho (GPx-1/2) (22-31 kDa) (1:200; Santa Cruz Biotechnology;), contra a GCLC produzido em policlonal de coelho (72 kDa) (1:2500; Sigma-Aldrich), contra a GCLM produzido em policlonal de coelho (36-28 kDa) (1:2500; Sigma-Aldrich), contra a iNOS produzido em policlonal de coelho (130 kDa) (1:200; Santa Cruz Biotechnology), contra a nitrotirosina produzido em policlonal de coelho (85 kDa) (1:200; Santa Cruz Biotechnology), contra o Nrf2 produzido em policlonal de coelho (61 kDa) (1:200; Santa Cruz Biotechnology), contra a proteína kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap-1) produzido em policlonal de coelho (69 kDa) (1:200; Santa Cruz Biotechnology), contra a HO-1 produzido em policlonal de cabra (32 kDa) (1:400; Santa Cruz Biotechnology), contra NF- $\kappa$ B produzido em policlonal de cabra (55-43 kDa) (1:50; Santa Cruz Biotechnology). Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas e incubadas com os anticorpos secundários conjugados a peroxidase: anti-camundongo (1:100; Dako, Carpinteria, CA) ou anti-cabra (1:100) ou anti-coelho (1:500) (Santa Cruz Biotechnology). A detecção do complexo antígeno-anticorpos foi realizada por quimiluminescência (Santa Cruz Biotechnology) e com o auxílio do sistema de ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories). Após a remoção dos anticorpos primários e secundários, as membranas foram reutilizadas para a detecção dos níveis proteicos de  $\beta$ -actina (42 kDa) (1:1000; Sigma-Aldrich). As bandas foram medidas com o auxílio do software de imagens ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

### 5.15 Zimografia

Para a atividade gelatinolítica da metaloproteinase de matriz-2 (MMP-2) foi utilizada a análise por zimografia. Para isto, 30  $\mu$ g de proteína do homogeneizado do pulmão foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 1 mg/ml de gelatina (Sigma-Aldrich). Alíquotas de padrão de peso molecular e de controle positivo (meio condicionado por fibroblastos da pele de camundongos) também foram aplicadas ao gel (Bio-Rad). Em seguida, o gel foi dividido em duas partes: um gel contendo de 250 kDa a 50 kDa de proteínas e outro gel contendo 50 kDa até 10

KDa de proteínas. O gel contendo de 250 kDa a 50 kDa de proteínas foi lavado em Triton X-100 a 0,5% e incubado com tampão de desenvolvimento a pH 8,4 (Tris-HCl a 50 mM, cloreto de cálcio dihidratado a 5 mM e cloreto de zinco a 2 mM) (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA; Vetec, Duque de Caxias, 5 mM Brasil) por 12 horas a 37°C sem agitação. Após a incubação, o gel foi corado com Comassie blue a 0,25 por 30 minutos e lavada em uma mistura contendo 50% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 40% de água destilada para obter um contraste entre as bandas. O gel foi digitalizado com o auxílio do sistema ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories) e as bandas foram medidas com o auxílio do software de imagens ImageJ (National Institutes of Health). Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias. O gel contendo 50 kDa até 10 kDa de proteínas foi submetido a transferência como descrito no item acima. A expressão proteica de  $\beta$ -actina (42 kDa) (1:1000; Sigma-Aldrich) foi realizada como descrito acima.

#### **5.16 Análises estatísticas**

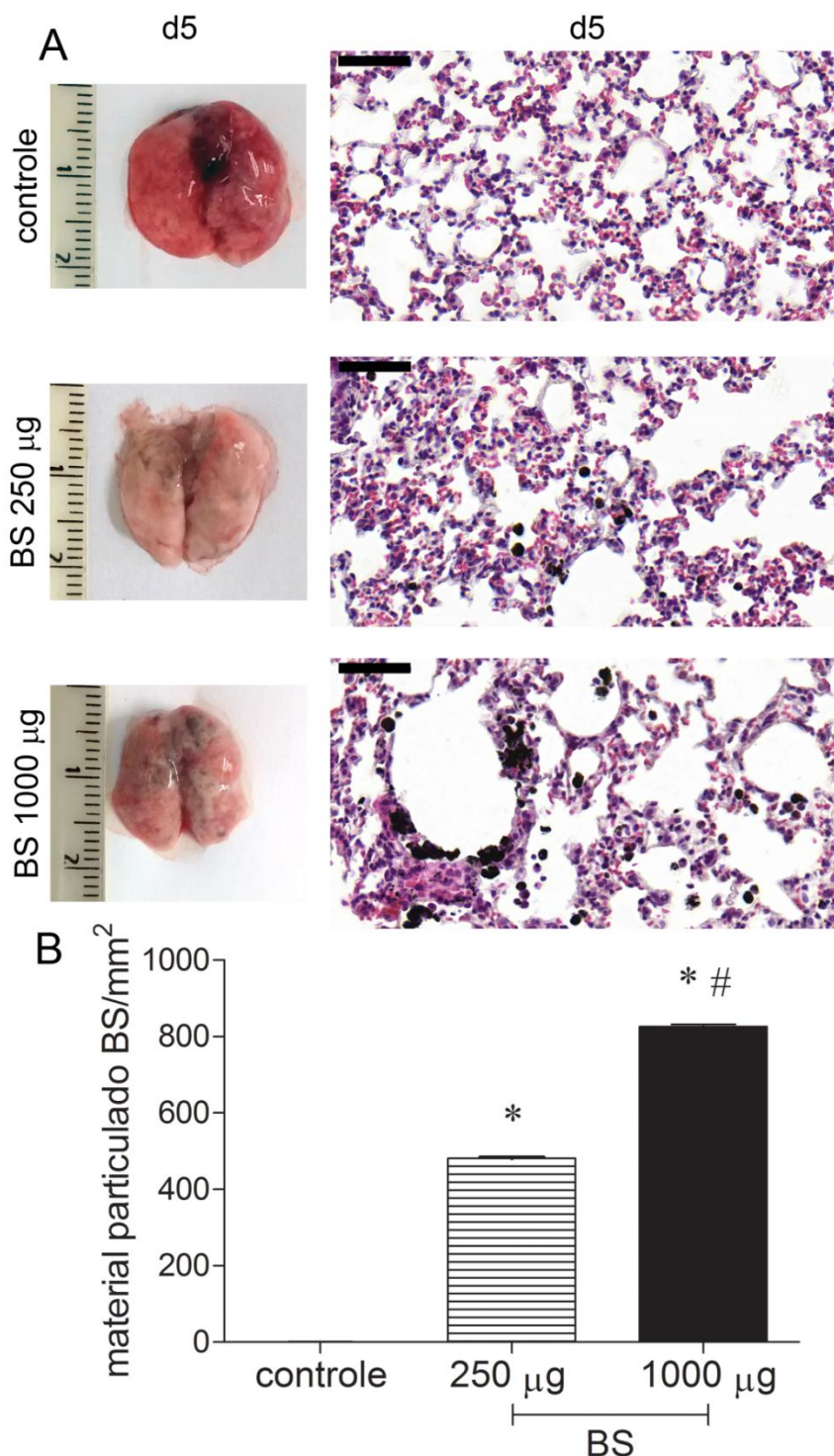
Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP). Para a análise estatística foi utilizado a análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste Bonferroni's ou teste Kruskal-Wallis com pós teste Dunn's usando o software Graph Pad Prism versão 5 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Composição do material particulado BS e distribuição no pulmão de camundongo

Pode-se observar nas fotos obtidas após a coleta dos pulmões dos grupos tratados com 250 e 1000  $\mu\text{g}$  de material particulado BS a presença de pontos escuros na região apical dos pulmões (Figura 2A). Para confirmar a penetração do material particulado no parênquima pulmonar, cortes histológicos foram corados com HE e o aglomerado do material particulado BS também foi quantificado. Foram observados nas fotomicrografias aglomerados escuros de partículas distribuídos no parênquima pulmonar nos grupos BS 250  $\mu\text{g}$  e BS 1000  $\mu\text{g}$  (Figura 2A). Não foram observados aglomerados de partículas no parênquima pulmonar do grupo controle (Figura 2A). Assim, o número de aglomerados foi maior no grupo BS 250 e 1000  $\mu\text{g}$  quando comparado ao grupo controle 5 dias após a exposição (Figura 2B). Além disso, o grupo BS 1000  $\mu\text{g}$  demonstrou um número maior de aglomerados quando comparado ao grupo BS 250  $\mu\text{g}$  5 dias após a exposição (Figura 2B). O material particulado BS apresentou uma média de tamanho de  $0,393 \pm 0,020 \mu\text{m}$  e foi composto principalmente de acenaftileno, fluoretano, naftaleno e pireno (Tabela 1).

Figura 2 - Análise macroscópica e microscópica do pulmão de camundongos expostos ao material particulado BS



Legenda: (A) - imagem macroscópica e microscópica do pulmão de camundongos 5 dias após a exposição ao material particulado BS, os cortes foram corados com HE e a barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ ; (B) - quantificação do número de aglomerados de material particulado BS por  $\text{mm}^2$  no pulmão de camundongos após 5 dias de exposição; (A) e (B) - resultados ( $n=10$ ) estão expressos em média  $\pm$  DP; \* $p<0.05$  vs. grupo controle #vs. grupo BS 250  $\mu\text{g}$ . Abreviaturas: BS, combustível diesel e biodiesel; HE, hematoxilina e eosina.

Fonte: A autora, 2017.

Tabela 2 - Conteúdo de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos do material particulado BS

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Acenafteno	< 0,002
Acenaftileno	0,011
Antracina	< 0,002
Benzo [a] antraceno	< 0,002
Benzo [a] pireno	< 0,002
Benzo [b] fluoranteno	< 0,002
Benzo [k] fluoranteno	< 0,002
Benzo [g, h, i] perileno	< 0,002
Criseno	< 0,002
Dibenzo (a, h) antraceno	< 0,002
Fenantreno	< 0,002
Fluoranteno	0,047
Fluoreno	< 0,002
Indeno (1,2,3- cd) pireno	< 0,002
Naftaleno	0,098
Pireno	0,033

Legenda: Valores são expressos como mg/kg.

Fonte: A autora, 2017.

## 6.2 Redução da função pulmonar

A elastância estática ( $E_{st}$ ) reflete a capacidade de retração elástica do sistema respiratório e a pressão resistiva pulmonar ( $\Delta P_1$ ) corresponde à pressão utilizada para vencer a resistência de vias aéreas centrais. Dessa forma, a  $E_{st}$  e a  $\Delta P_1$  foram elevadas nos grupos BS 250  $\mu\text{g}$  e BS 1000  $\mu\text{g}$  quando comparadas ao grupo controle 5 dias após a exposição. (Tabela 3). A pressão viscoelástica/inomogênea ( $\Delta P_2$ ) corresponde à pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico do tecido pulmonar e componente viscoelástico da elastância ( $\Delta E$ ) corresponde à diferença entre  $E_{dyn}$  e  $E_{st}$ .

Tabela 3 – Mecânica respiratória

Parâmetros	Grupos		
	controle	250 $\mu\text{g}$	1000 $\mu\text{g}$
$\Delta P_1$ (cmH <sub>2</sub> O)	0,07 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,05*	0,15 $\pm$ 0,04*
$\Delta P_2$ (cmH <sub>2</sub> O)	0,91 $\pm$ 0,12	0,97 $\pm$ 0,13	0,85 $\pm$ 0,08
$E_{st}$ (cmH <sub>2</sub> O/mL)	20,45 $\pm$ 1,52	24,63 $\pm$ 2,97*	24,49 $\pm$ 1,58*
$\Delta E$ (cmH <sub>2</sub> O/mL)	4,56 $\pm$ 0,62	4,83 $\pm$ 0,67	4,16 $\pm$ 0,34

Legenda:  $\Delta P_1$ , pressão resistiva pulmonar;  $\Delta P_2$ , pressão viscoelástico/inomogêneo;  $E_{st}$ , elastância estática;  $\Delta E$ , componente viscoelástico da elastância. Dados estão em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0.05$  vs. grupo controle.

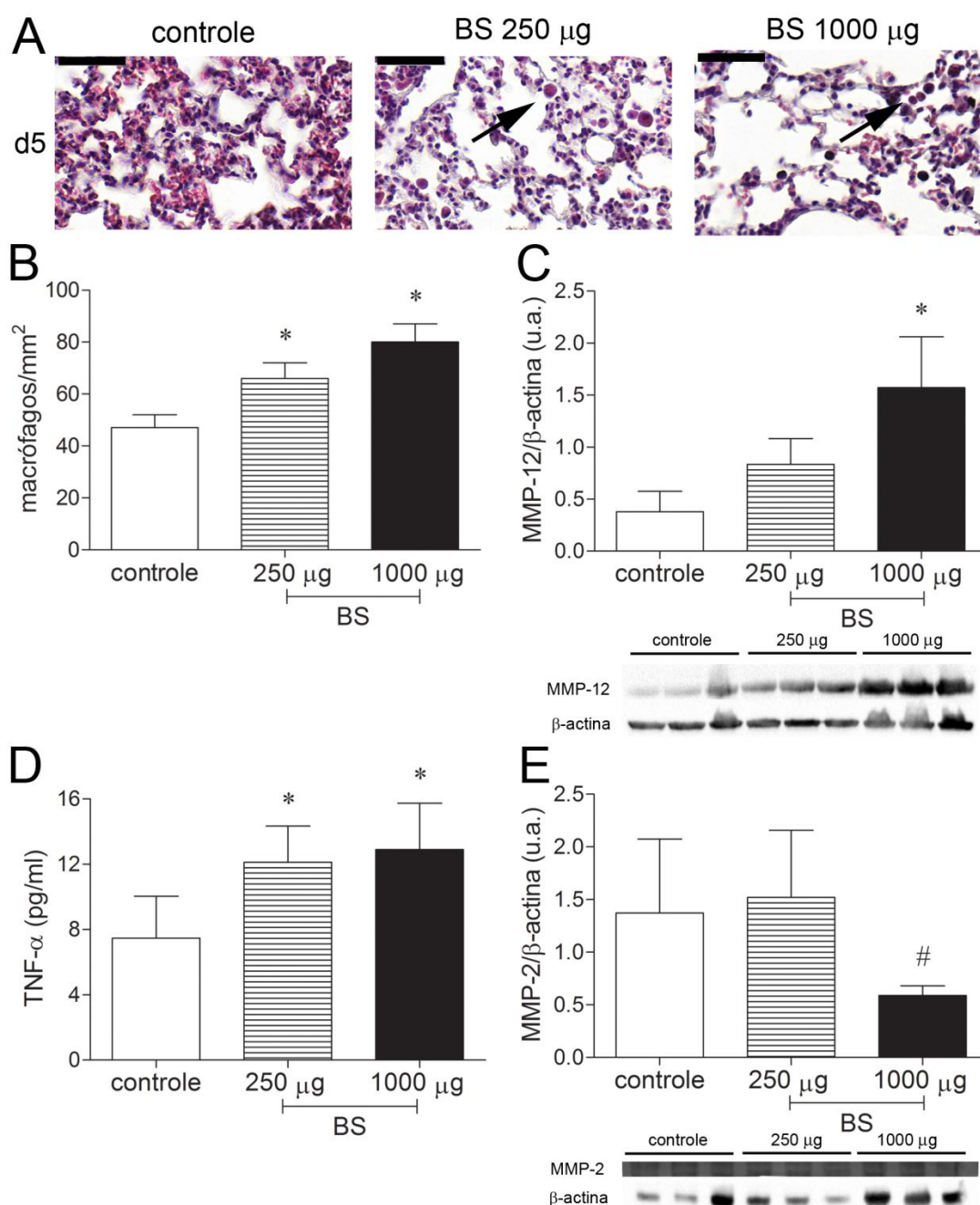
Fonte: A autora, 2017.

## 6.3 A instilação do material particulado BS aumentou a síntese proteica de TNF- $\alpha$ e o influxo de macrófagos no pulmão de camundongos

O número de macrófagos no parênquima alveolar foi maior nos grupos BS 250  $\mu\text{g}$  e BS 1000  $\mu\text{g}$  quando comparado ao grupo controle 5 dias após a exposição ao material particulado BS (Figura 3A, B). A expressão proteica da MMP-12 foi maior apenas no grupo BS 1000  $\mu\text{g}$  quando comparado ao grupo controle 5 dias após a exposição ao material particulado BS (Figura 3C). Os níveis proteicos de TNF- $\alpha$  no

lavado broncoalveolar estavam maiores nos grupos BS 250  $\mu\text{g}$  e BS 1000  $\mu\text{g}$  quando comparado ao grupo controle 5 dias após a exposição ao material particulado BS (Figura 3D). A atividade gelatinolítica da MMP-2 ativa foi menor no grupo BS 1000  $\mu\text{g}$  quando comparado ao grupo controle e ao grupo BS 250  $\mu\text{g}$  5 dias após a exposição ao material particulado BS (Figura 3E).

Figura 3 - Avaliação microscópica e bioquímica da resposta inflamatória do pulmão de camundongos expostos ao veículo e ao material particulado BS





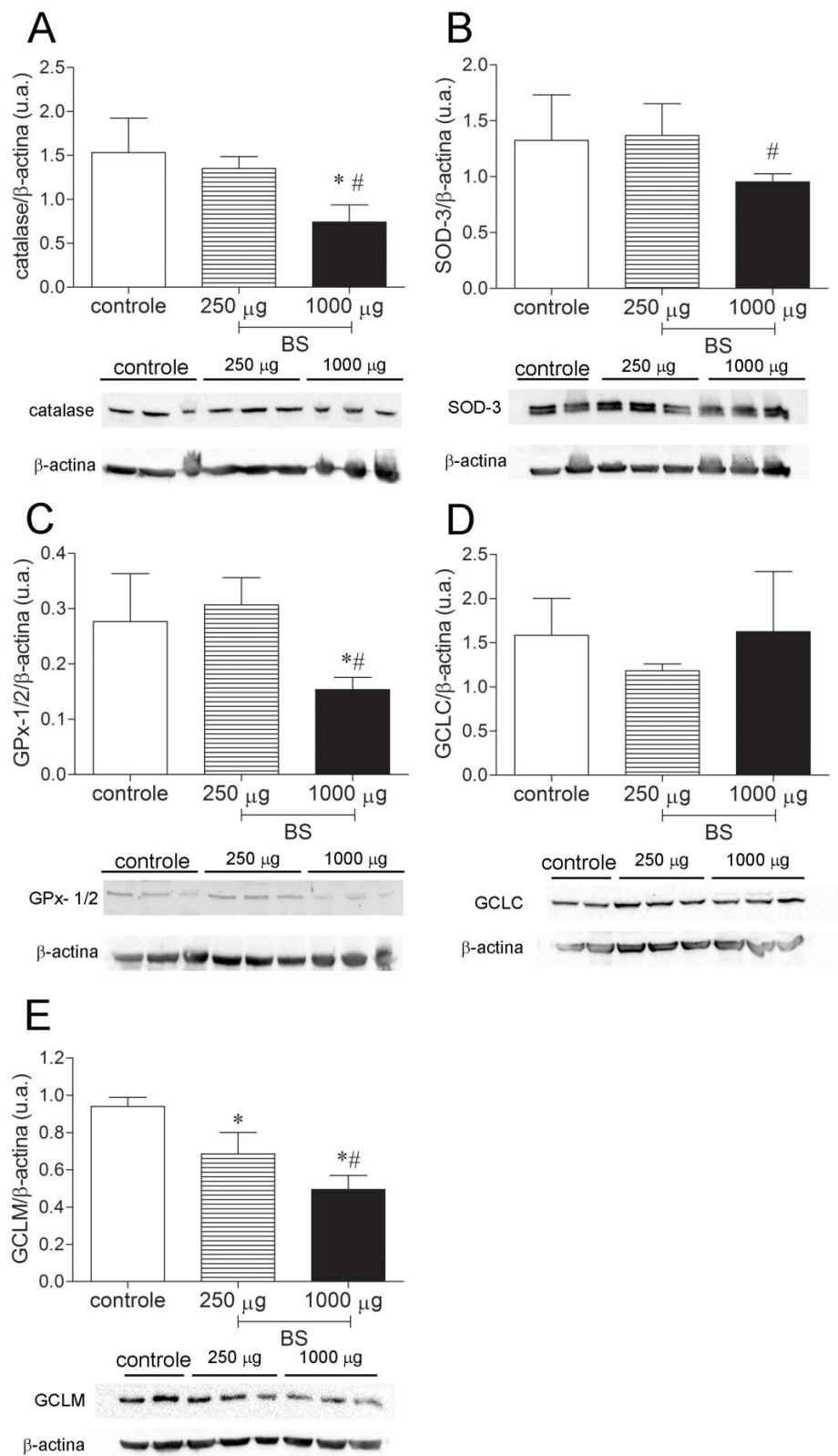
Legenda: (A) - imagem representativa da distribuição de macrófagos (setas pretas) no pulmão de camundongos após 5 dias (d5) de exposição ao material particulado BS, os cortes foram corados com HE e a barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ ; (B) - número de macrófagos por  $\text{mm}^2$  no pulmão de camundongos 5 dias após a exposição; (C) - expressão proteica da MMP-12 no pulmão de camundongos por western blot após 5 dias de exposição ao material particulado BS; (D) - níveis proteicos do TNF- $\alpha$  no lavado broncoalveolar por ELISA 5 dias após a exposição; (E) - atividade gelatinolítica da MMP-2 no pulmão de camundongos 5 dias após a exposição ao material particulado BS; (B), (C), (D) e (E) – resultados (n=10) estão expressos em média  $\pm$  DP; \* $p < 0.05$  vs. grupo controle #vs. grupo BS 250  $\mu\text{g}$ . Abreviaturas: BS, combustível diesel e biodiesel; MMP-12, metaloproteinase da matriz-12; TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$ ; MMP-2, metaloproteinase de matriz-2.

Fonte: A autora, 2017.

#### **6.4 A instilação do material particulado BS reduziu a enzima GCLM no pulmão de camundongos**

A expressão proteica da catalase estava menor no grupo BS 1000  $\mu\text{g}$  quando comparado aos grupos controle e BS 250  $\mu\text{g}$  5 dias após a exposição (Figura 4A). A expressão proteica da SOD-3 estava menor no grupo BS 1000  $\mu\text{g}$  quando comparado ao grupo BS 250  $\mu\text{g}$  5 dias após a exposição (Figura 4B). Os níveis proteicos de GPx 1/2 foi menor no grupo BS 1000  $\mu\text{g}$  quando comparado ao grupo controle e ao grupo BS 250  $\mu\text{g}$  5 dias após a exposição (Figura 4C). Não houve diferença significativa nos níveis proteicos de GCLC entre os grupos controle, BS 250  $\mu\text{g}$  e BS 1000  $\mu\text{g}$  5 dias após a exposição (Figura 4D). Entretanto, os níveis de GCLM estavam menores no grupo BS 250  $\mu\text{g}$  quando comparado ao grupo controle (Figura 4E). Além disso, os níveis de GCLM também estavam menores no grupo BS 1000  $\mu\text{g}$  quando comparado aos grupos controle e BS 250  $\mu\text{g}$  5 dias após a exposição (Figura 4E).

Figura 4 - Avaliação das enzimas antioxidantes e das subunidades da glutamato cisteína ligase (GCL) em pulmão de camundongos expostos ao veículo e ao material particulado BS



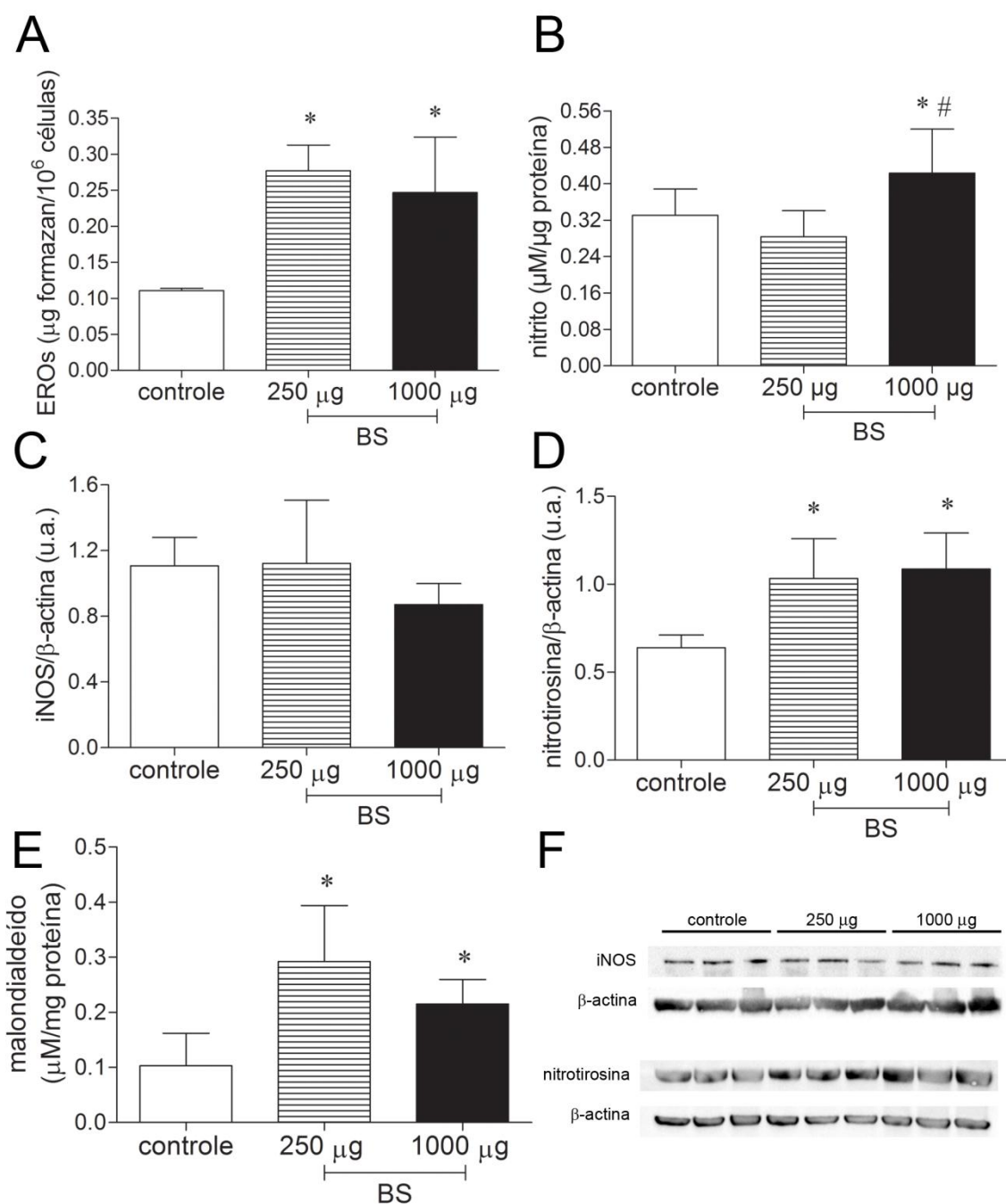
Legenda: (A) - níveis proteicos de catalase no pulmão de camundongos por western blot 5 dias após a exposição ao material particulado BS; (B) - níveis proteicos de SOD-3 em pulmão de camundongos por western blot após 5 dias de exposição ao material particulado BS; (C) - níveis proteicos da GPx-1/2 no pulmão de camundongos 5 dias após a exposição; (D) - níveis proteicos da GCLC no pulmão de camundongos por western blot 5 dias após a exposição; (E) - níveis proteicos da GCLM em pulmão de camundongos por western blot 5 dias após a exposição; (A), (B), (C), (D) e (E) – resultados (n=10) estão expressos em média  $\pm$  DP; \*p<0.05 vs. grupo controle #vs. grupo BS 250  $\mu$ g. Abreviaturas: BS, combustível diesel e biodiesel; SOD-3, superóxido dismutase-3; GPx-1/2, glutathione peroxidase-1/2; GCLC, glutamato cisteína ligase subunidade catalítica; GCLM, glutamato cisteína ligase subunidade modificadora

Fonte: A autora, 2017.

### **6.5 A instilação do material particulado BS elevou a produção de EROs, os níveis de peroxinitrito e a peroxidação lipídica no pulmão de camundongos**

Os níveis de EROs estavam maiores nos grupos BS 250  $\mu$ g e BS 1000  $\mu$ g quando comparado ao grupo controle 5 dias após a exposição (Figura 5A). Os níveis de nitrito estavam maiores no grupo BS 1000  $\mu$ g quando comparado ao grupo controle e ao grupo BS 250  $\mu$ g 5 dias após a exposição (Figura 5B). Não houve diferença nos níveis de iNOS entre os grupos controle, BS 250  $\mu$ g e BS 1000  $\mu$ g (Figura 5C,F). Os níveis proteicos de nitrotirosina estavam maiores no grupo BS 250  $\mu$ g e BS 1000  $\mu$ g quando comparado ao grupo controle 5 dias após a exposição (Figura 5D,F). A instilação intranasal do material particulado BS durante 5 dias elevou os níveis de malondialdeído no pulmão dos grupos BS 250  $\mu$ g e BS 1000  $\mu$ g quando comparado ao grupo controle (Figura 5E).

Figura 5 - Avaliação do dano oxidativo no pulmão de camundongos expostos ao material particulado BS



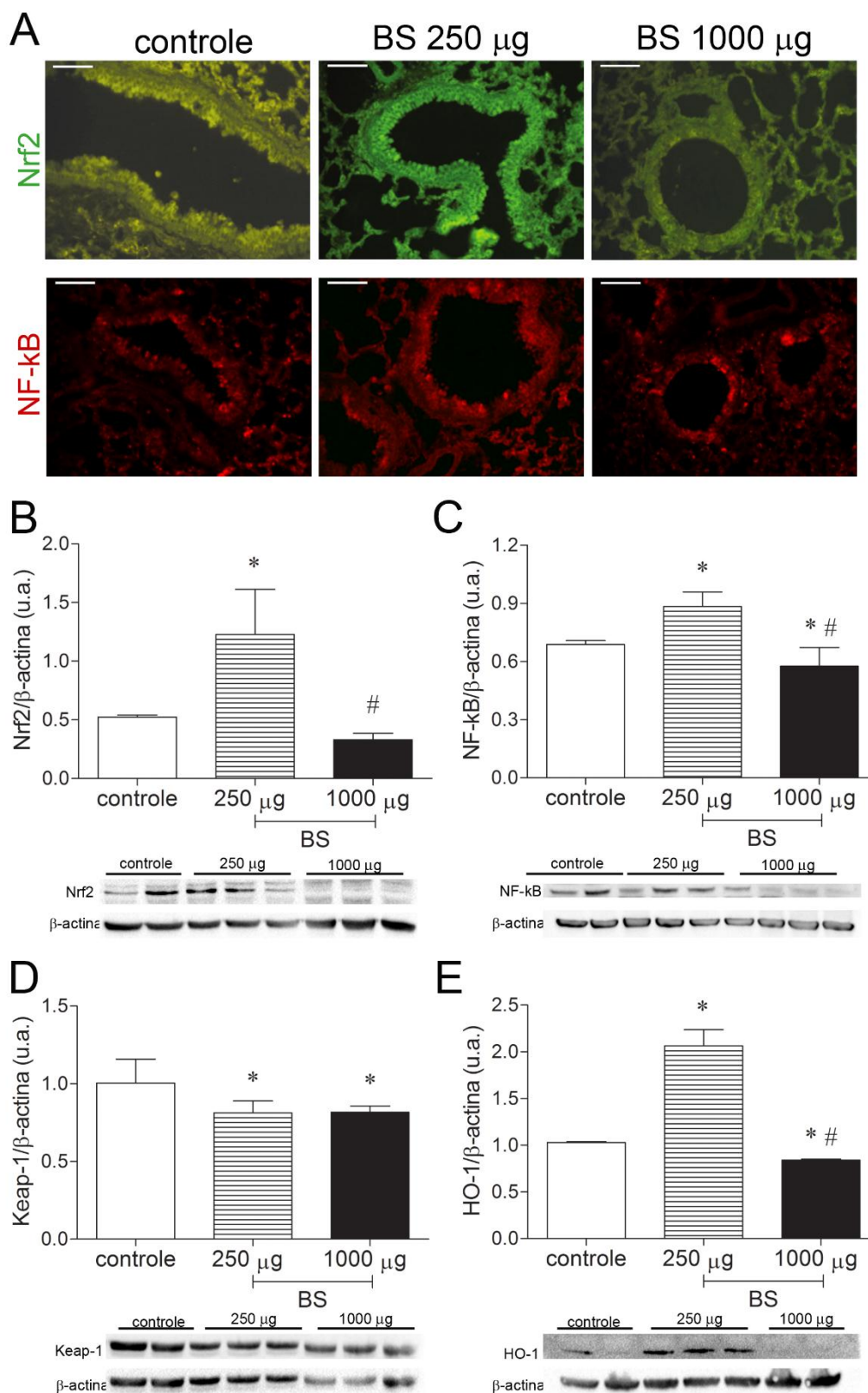
Legenda: (A) - níveis de EROs no pulmão de camundongos expostos ao material particulado BS; (B) - níveis de nitrito no pulmão de camundongos 5 dias após a exposição; (C) - níveis proteicos de iNOS no pulmão de camundongos por western blot 5 dias após a exposição; (D) - níveis proteicos de nitrotirosina no pulmão de camundongos 5 dias após a exposição; (E) - níveis de malondialdeído no pulmão de camundongos 5 dias após a exposição; (F) - imagens representativas do western blot para iNOS e nitrotirosina; (A), (B), (C), (D) e (E) - resultados ( $n=10$ ) estão expressos em média  $\pm$  DP; \* $p<0.05$  vs. grupo controle #vs. grupo BS 250  $\mu\text{g}$ . Abreviaturas: BS, combustível diesel e biodiesel; EROs, espécies reativas de oxigênio; iNOS, óxido nítrico sintase induzível.

Fonte: A autora, 2017.

## 6.6 Efeito da instilação do material particulado BS sob as vias do Nrf2 e NF-κB no pulmão de camundongos

O Nrf2 é um importante fator de transcrição que está envolvido na defesa celular. Todos os grupos estudados demonstraram o citoplasma das células epiteliais bronquiolares positivo para Nrf2 após 5 dias de exposição ao material particulado BS (Figura 6A). Para quantificar a expressão de Nrf2, os níveis proteicos de Nrf2 foram estimados por western blot no homogeneizado do pulmão. Os níveis proteicos do Nrf2 foram maiores no grupo BS 250 µg quando comparado ao grupo controle 5 dias após a exposição (Figura 6B). Entretanto, os níveis de Nrf2 estavam menores no grupo BS 1000 µg quando comparado ao grupo BS 250 µg 5 dias após a exposição (Figura 6B). Todos os grupos estudados demonstraram o citoplasma das células epiteliais bronquiolares positivos NF-κB 5 dias após a exposição (Figura 6A). Os níveis proteicos do NF-κB foram maiores no grupo BS 250 µg quando comparado ao grupo controle (Figura 6C), porém, no grupo BS 1000 µg foram menores do que nos grupos controle e BS 250 µg 5 dias após a exposição ao material particulado BS (Figura 6C). A expressão proteica do Keap-1 foi reduzida nos grupos BS 250 µg e BS 1000 µg quando comparado ao grupo controle 5 dias após a exposição (Figura 6D). A expressão proteica da HO-1 estava maior no grupo BS 250 µg quando comparada ao grupo controle, porém, no grupo BS 1000 µg a expressão da HO-1 foi menor quando comparada ao grupo controle e ao grupo BS 250 µg (Figura 6E).

Figura 6 - Via do fator nuclear relacionado à eritróide 2 (Nrf2) e do fator nuclear kappa b (NF- $\kappa$ B) em pulmão de camundongos controle e de camundongos expostos ao material particulado BS



Legenda: (A) - imunofluorescência para o Nrf2 e o NF- $\kappa$ B no pulmão de camundongos 5 dias após a exposição ao material particulado BS; (B) - níveis proteicos Nrf2 no pulmão de camundongos por western blot 5 dias após a exposição; (C) - níveis proteicos do NF- $\kappa$ B no pulmão de camundongos por western blot 5 dias após a exposição; (D) - níveis proteicos do Keap-1 no pulmão de camundongos por western blot 5 dias após a exposição; (E) - níveis proteicos da HO-1 no pulmão de camundongos por western blot 5 dias após a exposição; (B), (C), (D) e (E) – resultados (n=10) estão expressos em média  $\pm$  DP; \*p<0.05 vs. grupo controle #vs. grupo BS 250  $\mu$ g. Abreviaturas: BS, combustível diesel e biodiesel; Nrf2, fator nuclear relacionado à eritróide 2; NF- $\kappa$ B fator nuclear kappa b; HO-1, heme oxigenase-1.

Fonte: A autora, 2017.

## 7 DISCUSSÃO

As partículas provenientes da combustão do diesel contribuem de forma significativa para o aumento da poluição atmosférica, além disso, ocorre uma relação com o aumento dos fatores de risco associados principalmente a doenças pulmonares. No Brasil, com o intuito de reduzir a poluição do ar causada principalmente pelas frotas de caminhões e ônibus que utilizam o diesel, foi determinada a adição de 7% de biodiesel ao combustível diesel uma vez, que essa adição de biodiesel ao diesel possa reduzir a produção de material particulado, metais e hidrocarbonetos aromáticos pela queima deste combustível. Portanto, a hipótese do estudo é que a exposição aos poluentes ambientais provenientes da queima do combustível diesel e biodiesel promove alterações na resposta inflamatória e no estresse oxidativo no pulmão de camundongos.

Dessa forma, os animais foram instilados via intranasal com duas altas doses (BS 250 e BS 1000  $\mu\text{g}$ ) do material particulado proveniente da queima do combustível BS de ônibus do transporte público da cidade do Rio de Janeiro. A instilação intranasal de partículas é um modelo amplamente utilizado e bem aceito para estudos com a poluição atmosférica, além disso, não é necessário obter grandes quantidades de amostra da poluição, facilitando o estudo com partículas de diesel (Mazzoli-Rocha *et al.*, 2008). Os moradores da cidade do Rio de Janeiro estão expostos aproximadamente a uma concentração de 150  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  das partículas totais em suspensão (Cabral Filho e Ramos, 2013). Considerando o volume de ar inalado em um período de 24 horas há então uma exposição média de 0,012  $\mu\text{g}/\text{m}^3/\text{min}$  das partículas totais em suspensão pelos moradores da cidade do Rio de Janeiro. No presente estudo, a dose de material particulado BS 250  $\mu\text{g}$  corresponde a uma exposição de 5,10  $\mu\text{g}/\text{m}^3/\text{min}$  de material particulado. Portanto, as doses do material particulado BS neste modelo de exposição foram aproximadamente 450 vezes maiores do que os níveis médios inalados pelos habitantes da cidade do Rio de Janeiro, as altas doses foram escolhidas com o objetivo de mimetizar a exposição dos motoristas de ônibus do transporte público do Rio de Janeiro uma vez que esses profissionais estão expostos constantemente e diariamente a altos níveis de material particulado, pelo fato de longos períodos de trabalho próximos aos motores dos ônibus e ao intenso tráfego de veículos.



O tamanho das partículas possui uma influência direta na capacidade de penetração nos pulmões. Motores que utilizam a queima do combustível diesel podem produzir materiais particulados com tamanhos menores do que  $2,5 \mu\text{m}$ , devido a esse tamanho reduzido, essas partículas são capazes de penetrar profundamente nos pulmões (Mitsakou *et al.*, 2007; Zin *et al.*, 2012; Guarieiro e Guarieiro, 2013). A capacidade de penetração das partículas de diesel no pulmão de camundongos é demonstrada através de instilação intranasal e intratraqueal (Zin *et al.*, 2012; Nemmar *et al.*, 2015). Um estudo demonstrou que a inalação em concentrações de  $0,3$  ou  $3 \text{ mg/m}^3$  de partículas de diesel durante 4 semanas promove de uma maneira dose dependente o aumento da fagocitose das partículas através dos macrófagos no pulmão de ratos (Sato *et al.*, 2001). No presente estudo, o material particulado BS demonstrou um tamanho médio de  $0,393 \mu\text{m}$ , esse tamanho sugere a capacidade de penetração dessas partículas no parênquima pulmonar do camundongo. Com o objetivo de testar essa hipótese, foi feita uma análise da distribuição do material particulado BS no pulmão de camundongos. Diante disso, foi observado tanto microscopicamente quanto macroscopicamente a presença e um maior número de pontos escuros no pulmão de camundongos expostos ao material particulado BS. Além disso, o número elevado de material particulado BS no pulmão de camundongos expostos a essas partículas pode estar relacionado com o aumento da rigidez do pulmão, visto pela  $E_{st}$  e pela  $\Delta P_1$ . Uma vez que a  $E_{st}$  avalia a capacidade de retração elástica do pulmão e o  $\Delta P_1$  a pressão usada para vencer a resistência das vias aéreas centrais. Foi observado que a instilação intranasal de partículas provenientes da poluição e do diesel da cidade de São Paulo aumentou a elastância estática e a pressão viscoelástica em pulmão de camundongos (Mazzoli-Rocha *et al.*, 2008; Zin *et al.*, 2012). Portanto, podemos sugerir que a instilação do material particulado BS pode prejudicar a integridade alveolar contribuindo dessa forma para uma instabilidade mecânica do pulmão.

A exposição do material particulado proveniente da queima do diesel está associada à inflamação pulmonar observado através do recrutamento de células polimorfonucleares e pela elevação da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$  em camundongos (Gowdy *et al.*, 2008). Além disso, camundongos expostos ao material particulado de diesel durante 7 dias apresentaram um aumento nos números de macrófagos no lavado broncoalveolar (Nemmar *et al.*, 2012; Yanamala *et al.*, 2013). O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina

pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos. Estudos demonstraram um aumento da expressão do TNF- $\alpha$  em pulmão de camundongos jovens e idosos após 24 horas de exposição a partículas de diesel (Sunil *et al.*, 2009; Nemmar *et al.*, 2015). No presente estudo, a instilação do material particulado BS por 5 dias foi capaz de aumentar os níveis de TNF- $\alpha$  no lavado broncoalveolar de camundongos em ambos os grupos estudados. Dessa forma, a instilação do material particulado BS pode induzir uma resposta inflamatória aguda no pulmão de camundongos observada através do aumento do influxo de macrófagos e da síntese do TNF- $\alpha$ . Outro importante fator para a inflamação são as MMPs. Amara *et al.* (2007) observou a elevação da expressão e da atividade da MMP-1 em células epiteliais alveolares humanas quando expostas a baixas doses de partículas de diesel. Porém, nós observamos apenas a alteração na expressão da MMP-2 e MMP-12 no grupo BS 1000  $\mu$ g de instilação do material particulado BS. Ainda em relação ao processo inflamatório, o NF- $\kappa$ B possui um importante papel através da indução da expressão gênica de diversas citocinas pró-inflamatórias, como o próprio TNF- $\alpha$  (Kafoury e Madden, 2005). Um estudo *in vitro* demonstrou que a exposição das células epiteliais brônquicas ao material particulado do diesel promoveu a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B após 6 horas da exposição (Takizawa *et al.*, 1999). Nosso estudo demonstrou um aumento da expressão do NF- $\kappa$ B no grupo BS 250  $\mu$ g, entretanto, uma redução da expressão no grupo BS 1000  $\mu$ g quando comparado ao controle e ao BS 250  $\mu$ g após 5 dias após a exposição ao material particulado BS. Porém, não foi possível observar a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B, sugerindo que tenha sido devido ao longo tempo de instilação do material particulado BS, já que a sua translocação foi vista logo após 6 horas de exposição. Dessa maneira, mesmo sem ter observado de fato a translocação nuclear, os resultados sugerem que a ativação do NF- $\kappa$ B pode estar envolvida no processo de resposta inflamatória induzida pela instilação do material particulado BS.

A exposição de material particulado atmosférico em modelos *in vitro* e *in vivo* está associado à geração de EROs e ao dano oxidativo (Patel *et al.*, 2011; Durga *et al.*, 2014). A exposição a partículas ultrafinas provenientes da queima do diesel e a partículas de diesel em diferentes concentrações aumenta os níveis de EROs em células A549 e em cultura de macrófagos alveolares após 1 hora de exposição. (Patel *et al.*, 2011; Durga *et al.*, 2014). Em nosso estudo, foi observado que a instilação de material particulado BS por 5 dias aumentou os níveis de EROs no

pulmão de camundongo de ambos os grupos expostos. O aumento das EROs pode estar relacionado com a presença dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no material particulado BS. Uma vez que a exposição de células epiteliais brônquicas ao extrato orgânico das partículas de diesel foi capaz de induzir a produção de EROs e de induzir o estresse oxidativo (Li *et al.*, 2002). Dessa forma, foi possível demonstrar a capacidade das partículas BS, que possuem em sua composição hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em promover a produção de EROs mesmo que por uma exposição aguda. Outro importante componente para o dano oxidativo no pulmão, são as espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Sunil *et al.* (2009) demonstrou que animais sacrificados logo após a instilação de uma única dose de partículas de diesel tiveram altos níveis de óxido nítrico no lavado broncoalveolar. No presente estudo com o grupo BS 250 µg, não foi vista alteração na síntese do óxido nítrico ou iNOS, porém, no grupo de BS 1000 µg foi observado uma alteração na síntese do óxido nítrico. Entretanto, foi possível observar o aumento dos níveis de nitrotirosina, que é um produto dos peroxinitritos. Além disso, foi possível observar a peroxidação lipídica em pulmão de camundongos de ambos os grupos instilados com material particulado BS por 5 dias. Um recente estudo, porém *in vitro* com células A549 e RAW 264,7 também demonstrou o aumento da peroxidação lipídica (Durga *et al.*, 2014). Dessa forma, nossos resultados sugerem que a instilação de material particulado BS pode levar ao aumento das EROs e da síntese de peroxinitrito, acarretando a peroxidação lipídica em pulmão de camundongos.

A defesa antioxidante é essencial para controlar a indução de dano oxidativo gerado através das EROs. No presente estudo, não foi possível observar alterações na maioria dos antioxidantes, representados pela catalase, SOD-3, GPx 1/2 e GCLC, com exceção de algumas alterações no grupo de BS 1000 µg. No entanto, Nemmar *et al.* (2010) observou que a exposição a material particulado de diesel aumentou a atividade da SOD em pulmão de ratos após 18 horas de exposição. Porém, outro estudo demonstrou que ratos expostos a partículas ultra finas geradas através da combustão de uma mistura de etileno, oxigênio e argônio não apresentaram alterações na expressão da catalase após 2, 24 e 48 horas (Chan *et al.*, 2013). Esses achados indicam que a resposta do sistema de defesa antioxidante no pulmão a exposição ao material particulado BS continua controversa e necessita de uma maior investigação. Além disso, a instilação de material particulado BS

reduziu a expressão da GCLM no pulmão de camundongo de ambos os grupos, podendo estar relacionado com a via do Nrf2, uma vez que a sua ativação está envolvida com a via da glutathiona (Kensler *et al.*, 2007).

O dano causado pelas EROs e ERNs podem ser evitadas através da ativação da via do Nrf2. O Keap-1 é uma proteína supressora que mantém o Nrf2 no citoplasma da célula (Blake *et al.*, 2010). Quando há um estímulo de estresse oxidativo ou através de xentobióticos, o Keap-1 libera o Nrf2 que então será translocado para o núcleo celular (Chan *et al.*, 2013). No núcleo da célula, o Nrf2 se liga aos elementos de resposta antioxidante, que irá a partir daí promover a expressão de antioxidantes como, HO-1, SOD-1, GPx e também genes da via da glutathiona como a GCLC e GCLM (Kensler *et al.*, 2007). Deng *et al.* (2013) demonstrou que a exposição de material particulado com 2,5 µm induziu a translocação do Nrf2 para núcleo de 30 minutos até 1 hora após o tratamento das células A549. No estudo presente, houve uma elevação da expressão do Nrf2 e da HO-1 no grupo BS 250 µg. Entretanto, a expressão do Keap-1 foi reduzida. Porém, não foi possível observar a translocação do Nrf2 para o núcleo, isso se deve possivelmente ao tempo da instilação do material particulado BS, sendo necessário um período de instilação menor para ser capaz de observar a translocação do Nrf2. Dessa forma, nossos dados sugerem que a indução do dano oxidativo através do material particulado BS pode ter estimulado a ativação do Nrf2 e da HO-1. Porém, o grupo BS 1000 µg não demonstrou alteração na expressão do Nrf2 em relação ao controle. Ainda em relação ao grupo 1000 µg, foi observado a elevação dos níveis de EROs, MMP-12 e do óxido nítrico e redução da MMP-2, catalase, GPx 1/2 e GCLM quando comparados ao grupo controle e ao grupo BS 250 µg. Esse conjunto de dados sugere que a dose de BS 1000 µg pode ter levado a uma resposta mais intensa do pulmão, exaurindo então a resposta antioxidante através do Nrf2 ou levando talvez a participação de outra via antioxidante.

## CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos podemos concluir que a exposição aguda ao material particulado BS proveniente da queima de combustível BS dos ônibus da cidade do Rio de Janeiro causou um dano no pulmão de camundongos, pois os seguintes parâmetros foram observados:

a) O material particulado derivado da queima de combustível BS era composto por partículas finas, que foram capazes de penetrar no parênquima pulmonar, e principalmente por fluoretano, naftaleno e pireno;

b) A capacidade de penetração do material particulado BS pode estar associada às alterações observadas na mecânica respiratória;

c) A exposição ao material particulado BS foi capaz de desencadear uma resposta inflamatória no pulmão de camundongos aumentando o número de macrófagos e a expressão proteica de TNF- $\alpha$  e de MMP-12;

d) A exposição ao material particulado BS foi capaz de desencadear um dano oxidativo no pulmão de camundongos aumentando a expressão de EROs, peroxinitritos e a peroxidação lipídica;

e) A resposta antioxidante foi reduzida no pulmão após a exposição do material particulado BS;

f) A resposta inflamatória e o dano oxidativo induzidos pela exposição ao material particulado BS pode estar relacionada ao aumento da expressão proteica do NF- $\kappa$ B no parênquima pulmonar;

g) O dano oxidativo induzido pela exposição ao material particulado BS também pode estar relacionado ao aumento da expressão proteica de Nrf2 e HO-1.

## REFERÊNCIAS

- AMARA, N. et al. Diesel exhaust particles induce matrix metalloprotease-1 in human lung epithelial cells via a NADP(H) oxidase/NOX4 redox-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol*, v. 293, n. 1, p. L170-81, Jul 2007.
- AVERY, S. V. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J*, v. 434, n. 2, p. 201-10, Mar 01 2011.
- BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*, v. 336, n. 15, p. 1066-71, Apr 10 1997.
- BATES, J. H.; ROSSI, A.; MILIC-EMILI, J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. *J. Appl. Physiol.* (1985), v. 58, n. 6, p. 1840-8, Jun 1985.
- BLAKE, D. J. et al. Deletion of Keap1 in the lung attenuates acute cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 42, n. 5, p. 524-36, May 2010.
- BRAGA, A. et al. Poluição atmosférica e saúde humana. In: (Ed.). São Paulo: Revista USP, 2001. p.58-71.
- BRASIL. Lei nº 13.033, de 24 de Setembro de 2014. 1 ed. Brasília: Diário Oficial da União, 2014.
- CABRAL FILHO, S.; RAMOS, M. Relatório da Qualidade do ar do Estado do Rio de Janeiro - Ano Base 2010 e 2011. first. Rio de Janeiro: Instituto Estadual do Ambiente, 2013.
- CARVALHO, G. M. et al. Time course of pulmonary burden in mice exposed to residual oil fly ash. *Front Physiol*, v. 5, p. 366, 2014.
- CHAN, J. K. et al. Combustion-derived flame generated ultrafine soot generates reactive oxygen species and activates Nrf2 antioxidants differently in neonatal and adult rat lungs. *Part. Fibre Toxicol*, v. 10, p. 34, 2013.
- CHEN, B.; KAN, H. Air pollution and population health: a global challenge. *Environ Health Prev Med*, v. 13, n. 2, p. 94-101, Mar 2008.
- CHOI, H. S. et al. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J. Immunoassay Immunochem*, v. 27, n. 1, p. 31-44, 2006.
- CONAMA. RESOLUÇÃO CONAMA N.º 003 de 28 de junho de 1990. Brasília: Diário Oficial da União, 1990.

DAGHER, Z. et al. Role of nuclear factor-kappa B activation in the adverse effects induced by air pollution particulate matter (PM2.5) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J Appl Toxicol*, v. 27, n. 3, p. 284-90, May-Jun 2007.

DENG, X. et al. PM2.5 induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell. Biol. Toxicol.*, v. 29, n. 3, p. 143-57, Jun 2013.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, v. 186, p. 421-31, 1990.

DURGA, M. et al. Effects of ultrafine petrol exhaust particles on cytotoxicity, oxidative stress generation, DNA damage and inflammation in human A549 lung cells and murine RAW 264.7 macrophages. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, v. 38, n. 2, p. 518-30, Sep 2014.

EPA. Guidelines for Developing an Air Quality (Ozone and PM2.5) Forecasting Program. In: (Ed.). Washington: United States Environmental Protection Agency, 2003. p.1-126.

\_\_\_\_\_. Quantitative Health Risk Assessment for Particulate Matter. In: MCCARTHY, G. (Ed.). Particulate Matter (PM) Standards - Documents from Review Completed in 2012 - Risk and Exposure Assessments. first. Washington: United States Environmental Protection Agency, 2010. p.1-596.

GOWDY, K. et al. Modulation of pulmonary inflammatory responses and antimicrobial defenses in mice exposed to diesel exhaust. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, v. 229, n. 3, p. 310-9, Jun 15 2008.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem*, v. 126, n. 1, p. 131-8, Oct 1982.

GUALTIERI, M. et al. Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells. *Toxicol In Vitro*, v. 24, n. 1, p. 29-39, Feb 2010.

GUARIEIRO, L. L. N.; GUARIEIRO, A. L. N. Vehicle Emissions: What Will Change with Use of Biofuel? In: FANG, Z. (Ed.). *Biofuels - Economy, Environment and Sustainability*. 1. Rijeka: InTech: Open Science, Open Mind, 2013. cap. 14, p.357-386. ISBN 978-953-51-0950-1.

GURGUEIRA, S. A. et al. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ Health Perspect*, v. 110, n. 8, p. 749-55, Aug 2002.

HE, M. et al. Differences in allergic inflammatory responses in murine lungs: comparison of PM2.5 and coarse PM collected during the hazy events in a Chinese city. *Inhal Toxicol*, v. 28, n. 14, p. 706-718, Dec 2016.

KAFOURY, R. M.; MADDEN, M. C. Diesel exhaust particles induce the over expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene in alveolar macrophages and failed to induce apoptosis through activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB). *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 2, n. 1, p. 107-13, Apr 2005.

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, v. 47, p. 89-116, 2007.

KOCHI, T. et al. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects of flow and volume. *J Appl Physiol* (1985), v. 64, n. 6, p. 2636-46, Jun 1988a.

\_\_\_\_\_. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. *J Appl Physiol* (1985), v. 64, n. 1, p. 441-50, Jan 1988b.

KRZYZANOWSKI, M.; KUNA-DIBBERT, B.; SCHNEIDER, J., Eds. Health effects of transport-related air pollution. Copenhagen: World Health Organizationed. 2005.

LAKS, D. et al. Composition of diesel particles influences acute pulmonary toxicity: an experimental study in mice. *Inhal. Toxicol*, v. 20, n. 11, p. 1037-42, Sep 2008.

LARCOMBE, A. N. et al. Route of exposure alters inflammation and lung function responses to diesel exhaust. *Inhal Toxicol*, v. 26, n. 7, p. 409-18, Jun 2014.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 1, n. 6, p. a001651, Dec 2009.

LI, N. et al. Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. *J. Immunol.*, v. 173, n. 5, p. 3467-81, Sep 1 2004.

LI, N. et al. Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *J Immunol*, v. 169, n. 8, p. 4531-41, Oct 15 2002.

MAZZOLI-ROCHA, F. et al. Comparative respiratory toxicity of particles produced by traffic and sugar cane burning. *Environ Res*, v. 108, n. 1, p. 35-41, Sep 2008.

MITSAKOU, C. et al. Lung deposition of fine and ultrafine particles outdoors and indoors during a cooking event and a no activity period. *Indoor Air*, v. 17, n. 2, p. 143-52, Apr 2007.

NEMMAR, A. et al. Emodin mitigates diesel exhaust particles-induced increase in airway resistance, inflammation and oxidative stress in mice. *Respir. Physiol. Neurobiol*, v. 215, p. 51-7, Aug 15 2015.

NEMMAR, A. et al. Time-course effects of systemically administered diesel exhaust particles in rats. *Toxicol. Lett*, v. 194, n. 3, p. 58-65, May 4 2010.



NEMMAR, A. et al. Airway resistance, inflammation and oxidative stress following exposure to diesel exhaust particle in angiotensin II-induced hypertension in mice. *Toxicology*, v. 292, n. 2-3, p. 162-8, Feb 26 2012.

PATEL, H.; EO, S.; KWON, S. Effects of diesel particulate matters on inflammatory responses in static and dynamic culture of human alveolar epithelial cells. *Toxicol. Lett*, v. 200, n. 1-2, p. 124-31, Jan 15 2011.

PEREIRA, F. A. et al. Influence of air pollution on the incidence of respiratory tract neoplasm. *J Air Waste Manag Assoc*, v. 55, n. 1, p. 83-7, Jan 2005.

SALDIVA, P. H. et al. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. *J. Appl. Physiol* (1985), v. 72, n. 1, p. 302-6, Jan 1992.

SATO, H. et al. Quantitative changes in glycosaminoglycans in the lungs of rats exposed to diesel exhaust. *Toxicology*, v. 166, n. 3, p. 119-28, Sep 25 2001.

SIMILOWSKI, T. et al. Viscoelastic behavior of lung and chest wall in dogs determined by flow interruption. *J Appl Physiol* (1985), v. 67, n. 6, p. 2219-29, Dec 1989.

SUNIL, V. R. et al. Pulmonary effects of inhaled diesel exhaust in aged mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, v. 241, n. 3, p. 283-93, Dec 15 2009.

TAKIZAWA, H. et al. Diesel exhaust particles induce NF-kappa B activation in human bronchial epithelial cells in vitro: importance in cytokine transcription. *J. Immunol*, v. 162, n. 8, p. 4705-11, Apr 15 1999.

WATTERSON, T. L. et al. Urban particulate matter activates Akt in human lung cells. *Arch Toxicol*, v. 86, n. 1, p. 121-35, Jan 2012.

WHO. WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Global update 2005. Geneva: WHO, 2006. 1-22

YANAMALA, N. et al. Biodiesel versus diesel exposure: enhanced pulmonary inflammation, oxidative stress, and differential morphological changes in the mouse lung. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, v. 272, n. 2, p. 373-83, Oct 15 2013.

YOSHIZAKI, K. et al. Chronic exposure of diesel exhaust particles induces alveolar enlargement in mice. *Respir Res*, v. 16, p. 18, Feb 07 2015.

ZIN, W. A. et al. Eugenol attenuates pulmonary damage induced by diesel exhaust particles. *J Appl Physiol* (1985), v. 112, n. 5, p. 911-7, Mar 2012.

**ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ**  
**Centro de Ciências da Saúde - CCS**

Rio de Janeiro, 27 de março de 2014

Prezado Professor Samuel dos Santos Valença

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sobre o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado: **“Desenvolvimento de marcadores pulmonares teciduais e moleculares para caracterização de estresse oxidativo na poluição ambiental por biocombustível (biodiesel).”**, onde é indicada a utilização de **200 camundongos**, foi aprovado por esta comissão no dia **26/03/2014**, sob o número de referência **125/13**. Este protocolo tem validade unicamente para os 200 animais solicitados.

Atenciosamente;

  
Prof. Marcel Frajblat  
Coordenador da CEUA-UFRJ  
SUAPE 2048490

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

## ANEXO B - Comprovação de submissão do artigo científico



Bruna Romana de Souza <romanabio@gmail.com>

---

### Submission ER\_2016\_778 received by Environmental Research

2 mensagens

**Environmental Research** <EvisSupport@elsevier.com>  
Responder a: er@elsevier.com  
Para: romanabio@gmail.com

21 de dezembro de 2016 20:13

*This message was sent automatically. Please do not reply.*

Ref: ER\_2016\_778

Title: Acute exposure to biodiesel/diesel PM promotes oxidative damage and inflammation in mouse lung through Nrf2/HO-1 and NF-κB/TNF-alpha pathways

Journal: Environmental Research

Dear Dr. Romana-souza,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Environmental Research. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL\\_ACR=ER](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=ER) and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Environmental Research

**Have questions or need assistance?**

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

---

Copyright © 2016 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.