



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**



DANIEL MARINHO LAKS

**A COMPOSIÇÃO DAS PARTÍCULAS DE DIESEL
INFLUENCIA A TOXICIDADE PULMONAR
AGUDA: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS.**

**Rio de Janeiro
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DANIEL MARINHO LAKS

**A COMPOSIÇÃO DAS PARTÍCULAS DE DIESEL
INFLUENCIA A TOXICIDADE PULMONAR
AGUDA: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Orientador: Walter Araújo Zin



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2008**

Laks, Daniel Marinho

A composição das partículas de diesel influencia a toxicidade pulmonar aguda: Um estudo experimental em camundongos. / Daniel Marinho Laks. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2008.

XVII, 192f.: 28 il.; 29,7 cm.

Orientador: Walter Araújo Zin.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), 2008.

Referências bibliográficas: f. 71-79.

1. Diesel 2. Material Particulado 3. Mecânica respiratória. I. Zin, Walter Araújo. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia. III. Título.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia da respiração, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob orientação do professor Walter Araújo Zin, na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)

FOLHA DE APROVAÇÃO**“A Composição das Partículas de Diesel Influencia A Toxicidade Pulmonar Aguda: Um Estudo Experimental em Camundongos”****DANIEL MARINHO LAKS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)

Rio de Janeiro, 05 de setembro de 2008.

**DR. WALTER ARAÚJO ZIN IBCCF/UFRJ
(ORIENTADOR)**

DR. JOSÉ ROBERTO LAPA E SILVA HUCFF/UFRJ

DRA. TÂNIA MARIA ORTIGA CARVALHO IBCCF/UFRJ

DR. MARCELO EINICKER LAMAS IBCCF/UFRJ

**DRA. VÂNIA MARIA CORRÊA COSTA IBCCF/UFRJ
(REVISORA)**

**DRA. CLÁUDIA DOS SANTOS MERMELSTEIN ICB/UFRJ
(SUPLENTE EXTERNA)**

Dedico este trabalho a todos aqueles que me apoiaram durante sua realização ou me impuseram dificuldades que me fizeram apreciar minhas conquistas, me tornando uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo incentivo durante esse processo de crescimento pessoal e profissional. A meu pai por ser um exemplo de pessoa na minha vida. A minha mãe por todo o amor, carinho e dedicação na minha criação. Ao meu avô por me ensinar a rir dos meus problemas quando parecem demasiado grandes e a resolvê-los quando me sinto preparado para tal. A minha avó por estar sempre junto comigo e por me mostrar que dedicar-se as pessoas amadas é um grande bem. A minha irmã por todas as confidências trocadas e todo o sentimento de proteção familiar.

Agradeço ao meu orientador Walter Araújo Zin pelos ensinamentos, apoio e cobranças que me trouxeram até aqui. A professora Debora Souza Faffe por me ensinar que sempre podemos nos lapidar a fim de atingir nossos objetivos com excelência. A minha revisora, Vânia Maria Corrêa Costa, por sua solicitude e competência indiscutíveis na correção do meu trabalho. A Sandra Brito, secretária da pós-graduação, por me ajudar a resolver todas as questões e pendências nesses dois anos com um sorriso no rosto e uma grande simpatia sempre. Aos técnicos João Luiz Coelho R. Alves e Antônio Carlos Quaresma por toda a ajuda na realização dos experimentos e amizade incondicional. A todos os professores e compõem minha banca e a todos os meus companheiros de laboratório.

Agradeço a minha amiga Ana Gabriela Ledo por toda a ajuda prestada na formatação da tese e pela companhia nos momentos de divertimento, absolutamente necessários para uma mente criativa e equilibrada. A meus amigos Ramon Peçanha, Ricardo Luzardo e Álvaro Padron por todos os momentos de força quando pensava em desistir e por toda a amizade dedicada e fortalecida a cada dia desse período. A meus amigos Gabriel Kubrusly e Pablo Friedman por uma vida inteira. Agradeço também a meu grande amigo Edil Luis Santos por tudo que me ensinou e me inspirou nesse caminho.

Agradeço a todas as pessoas que me fizeram ver cores quando tudo parecia preto e branco.

“Quando não se distingue mais a linha que separa a desilusão da
nostalgia, conseguiu-se algo somente possível com o passar dos dias.
Uma perspectiva no tempo”

Gabriel Garcia Marques.

RESUMO

LAKS, Daniel Marinho. **Ciências biológica (fisiologia)**: A composição das partículas de diesel influencia sua toxicidade pulmonar aguda: um estudo experimental em camundongos. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (mestrado em ciências biológicas/ fisiologia) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Partículas ambientais têm sido consistentemente associadas a efeitos adversos a saúde, levando principalmente a altas taxas de mortalidade e morbidade por afecções cardiorrespiratórias. Motores a diesel representam a maior fonte de partículas no cenário urbano. Objetivamos modificar a composição das partículas de diesel por diferentes procedimentos de extração, para relacionar alterações no perfil químico a indicadores correspondentes de toxicidade respiratória. Camundongos BALB/c machos receberam instilação intranasal de salina, partículas de diesel intactas (DEP), partículas de diesel previamente tratadas com metanol (MET), hexano (HEX) ou ácido nítrico (NA). A composição elemental e os compostos orgânicos foram analisados. Vinte e quatro horas após a instilação intranasal, parâmetros respiratórios foram aferidos e tecido pulmonar foi coletado para análise histológica. A elastância estática aumentou significativamente no grupo DEP em relação aos outros grupos, exceto MET. HEX e NA foram diferentes de diesel, porém não apresentaram diferença significativa para os grupos CTRL e MET. O componente viscoelástico da elastância mostrou-se aumentado nos grupos DEP, MET e NA; HEX não foi significativamente diferente de CTRL. Os grupos DEP e MET apresentaram aumento significativo na resistência das vias aéreas superiores, enquanto DEP, MET e NA apresentaram aumento na resistência de vias aéreas periféricas. Todos os grupos apresentaram aumento na resistência total quando comparados a CTRL. DEP, MET e NA mostraram aumento significativo no infiltrado de células polimorfonucleares. Em conclusão, partículas de diesel tratadas com hexano (hex) revelaram um padrão de sistema respiratório bastante similar ao gru

CTRL, indicando que o tratamento com hexano atenua a inflamação pulmonar elicitada por partículas de diesel.

Palavras-chave: Diesel. Material Particulado. Mecânica respiratória.

ABSTRACT

LAKS, Daniel Marinho. **Ciências biológica (fisiologia)**: A composição das partículas de diesel influencia sua toxicidade pulmonar aguda: um estudo experimental em camundongos. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (mestrado em ciências biológicas/ fisiologia) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Ambient particles have been consistently associated with adverse health effects, yielding mainly high cardiorespiratory morbidity and mortality. Diesel engines represent a major source of particles in the urban scenario. We aimed to modify the composition of diesel particles, by means of different extraction procedures, to relate changes in chemical profile to corresponding indicators of respiratory toxicity. Male BALB/c mice were nasally instilled with saline, diesel particles treated or not, and assigned to five groups: saline (SHAM), intact diesel particles (DEP), diesel particles previously treated with methanol (METH), hexane (HEX) or nitric acid (NA). Elemental composition and organic compounds were analyzed. Twenty-four hours after nasal instillation respiratory parameters were measured and lung tissue was collected for histological analysis. Static elastance was significantly increased in groups DEP and MET in relation to the other groups. HEX and NA were different from DEP but not significantly different from SHAM and METH groups. The difference between dynamic and static elastance was increased in DEP, METH and NA treatments; HEX was not statistically different from SHAM. DEP and METH groups presented significantly increased upper airways resistance, while DEP, METH and NA showed higher peripheral airways resistance values. All groups had a higher total resistance than SHAM. DEP, METH and NA showed significant increased infiltration of polymorphonuclear cells. In conclusion, diesel particles treated with hexane (HEX) resulted in a respiratory system profile very similar to that in SHAM group, indicating

that hexane treatment attenuates pulmonary inflammation elicited by diesel particles.

Keywords: Diesel. Particulate Matter. Respiratory mechanics.

LISTA DE ABREVIATURAS

CEL TOT	celularidade total
CL	compacência do pulmão
Crs	complacência do sistema respiratório
CTRL	controle
Cw	complacência da parede torácica
DEP	material particulado proveniente da combustão do óleo diesel
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
D[3,2]	média da distribuição do tamanho das partículas medida pela sua superfície
D[4,3]	média da distribuição do tamanho das partículas medida pelo seu volume
D (v. 0,1)	diâmetros nos quais 10% das partículas se encaixam
D (v. 0,5)	diâmetros nos quais 50% das partículas se encaixam
D (v. 0,9)	diâmetros nos quais 90% das partículas se encaixam
Edyn	elastância dinâmica
Ers	elastância do sistema respiratório
Est	elastância estática
EL	elastância do pulmão
EPM	erro padrão da média
Ew	elastância da parede torácica
E2	componente elástico
HEX	partículas de diesel previamente tratadas com hexano
HPAs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
In	intranasal
ip	intraperitoneal
MET	partículas de diesel previamente tratadas com metanol
MN	células mononucleares
NA	partículas de diesel previamente tratadas com ácido nítrico
P	pressão
Pel	ponto de retração elástica
ppm	partes por milhão
PEEP	pressão positiva ao final da expiração
PL	pressão transpulmonar
PM	material particulado
Pmax	valor máximo de pressão
PMN	células polimorfonucleares
PM10	partículas grossas apresentam diâmetro aerodinâmico entre 2,5 µm e 10 µm
PM2,5	partículas finas têm diâmetro entre 2,5 µm e 0,1 µm
PI	ponto de inflexão
Ptr	pressão traqueal
-R	resistência
Raw	resistência da parede torácica
rpm	rotações por minuto
Rrs	resistência do sistema respiratório

Rtis	resistência tecidual
r	raio
rs	sistema respiratório
R2	componente resistivo
Req	resistência total do equipamento
SO ₂	dióxido de enxofre
T	tensão
V	volume
V'	fluxo
v	velocidade constante
V _t	volume corrente
ΔE	componente viscoelástico da elastância
ΔP _{eq}	variação de pressão determinada pelo equipamento
ΔP1	pressão necessária pra se vencer os componentes de vias aéreas centrais
ΔP2	pressão necessária pra vencer os componentes viscoelásticos/inomogêneos do pulmão
ΔV	variação de volume gasoso mobilizado
τ	constante de tempo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo linear uni-compartimental	31
Figura 2	Esquema do método de oclusão ao final da inspiração	32
Figura 3	Modelo de molas e amortecedores.....	34
Figura 4	Montagem experimental.....	47
Figura 5	Método de oclusão ao final da inspiração.....	51
Figura 6	Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.	54
Figura 7	Histograma representando a freqüência de cada classe de diâmetro de partícula.....	62
Figura 8	Histograma representando a freqüência de cada classe de diâmetro de partícula	62
Figura 9	Histograma representando a freqüência de cada classe de diâmetro de partícula.....	63
Figura 10	Histograma representando a freqüência de cada classe de diâmetro de partícula	64
Figura 11	Elastância estática e componente viscoelástico da elastância dinâmica do pulmão	67
Figura 12	Pressão viscosa, pressão para vencer os componentes viscoelásticos/inomogêneos e pressão total do pulmão	68
Figura 13	Fotomicrografias do parênquima pulmonar corado com hematoxilina-eosina	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração de metais nas partículas de diesel intactas e após o tratamento com diferentes procedimentos de extração	58
Tabela 2	Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos das partículas de diesel intactas e após os diferentes procedimentos de extração.	59
Tabela 3	Diâmetros médios das partículas de diesel intactas e após o tratamento com diferentes procedimentos de extração.	61
Tabela 4	Fluxo aéreo, volume corrente, variações de pressões e elastâncias do pulmão durante ventilação mecânica	66
Tabela 5	Percentual de células mononucleares e polimorfonucleares por área de tecido pulmonar	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	ASPECTOS GERAIS E JUSTIFICATIVA	18
1.2	MATERIAL PARTICULADO	21
1.3	MATERIAL PARTICULADO PROVENIENTE DA COMBUSTÃO DO ÓLEO DIESEL	24
1.4	MECÂNICA RESPIRATÓRIA	25
1.4.1	Noções básicas	25
1.4.2	Estudo da mecânica respiratória	29
2	OBJETIVOS	39
2.1	OBJETIVO GERAL	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	ANIMAIS UTILIZADOS.....	41
3.2	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	41
3.3	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA FULIGEM DA QUEIMA DO ÓLEO	42
3.3.1	Coleta das partículas	42
3.3.1.a	Tratamento das partículas	42
3.3.2	Análise da composição das partículas	43
3.3.3	Análise do tamanho das partículas	43
3.4	MECÂNICA RESPIRATÓRIA	44
3.4.1Método de oclusão ao final da inspiração..	48
3.5	ESTUDO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO.....	52
3.5.1	Remoção dos pulmões e análise histopatológica.	52
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4	RESULTADOS	57
4.1	COMPOSIÇÃO DAS PARTÍCULAS.....	57
4.2	TAMANHO DAS PARTÍCULAS.....	60
4.3	MECÂNICA RESPIRATÓRIA..	64
4.4	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	69
4.4.1	Análise quantitativa e qualitativa	69
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÕES	84
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
8	ANEXO I MANUSCRITO INHALATION TOXICOLOGY ..	95

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

1.1- ASPECTOS GERAIS E JUSTIFICATIVA

A preocupação com poluentes aéreos em cidades data do ano de 1272 DC, quando uma neblina de fumaça de carvão foi descrita pelo rei Edward I (Stern e cols, 1984). A partir disso, eventos documentados ocorreram tanto na Europa quanto nos Estados Unidos. Houve pelo menos dois grandes episódios de poluição na cidade de Londres e seus subúrbios durante a década de cinquenta. Decorreram da queima de carvão para aquecimento de espaços e geração de energia, coincidindo com uma estagnação da atmosfera local. Durante o episódio de dezembro de 1952, que depois ficou conhecido como *London fog*, houve um aumento repentino de aproximadamente 4000 mortes e um aumento não quantificado em morbidade por problemas cardiorrespiratórios entre residentes da cidade (Logan, 1952). A partir disso instalou-se uma grande preocupação com os efeitos deletérios da poluição atmosférica, marcada pelo *Air pollution control act of London* criado em 1956, que levou a uma grande diminuição no uso de carvão e melhora na atmosfera da cidade. Diversos outros países aderiram ao ato inglês, levando a uma grande diminuição dos problemas relacionados à combustão a partir da década de sessenta em países da Europa e Estados Unidos. Esse efeito é diretamente relacionado à utilização de equipamentos para controlar as emissões de dióxido de enxofre (SO₂), partículas totais suspensas e ao uso de combustíveis com baixas taxas de enxofre para geração de energia e aquecimento (www.epa.gov).

A situação mostra-se diferente em países não desenvolvidos, onde os problemas de combustão não controlada, utilização de combustíveis com altas taxas de enxofre e emissões industriais permanecem até hoje.

Atualmente, partículas ambientes estão freqüentemente associadas a efeitos adversos a saúde, levando a altas taxas de morbidade e mortalidade por problemas cardiorrespiratórios (Dockery, 1993, Schwartz, 1994, Pope, 1996). Com a industrialização crescente dos países a quantidade de emissão de poluentes liberados na atmosfera tanto por indústrias quanto por meios de transporte aumenta, levando a sérios riscos para a saúde pública.

Os meios de transporte desempenham um papel fundamental na vida dos indivíduos e na sociedade atual. A maneira com que as pessoas interagem, trabalham, organizam a produção, desenvolvem as cidades e têm acesso a serviços e bens está intimamente relacionada com o desenvolvimento da mobilidade. Em sociedades aonde as pessoas dependem de meios de transporte motorizados, espera-se que os veículos se tornem cada vez mais seguros, luxuosos e velozes, sendo assim utilizados com cada vez mais freqüência. Essas expectativas, entretanto, não levam em consideração as conseqüências: aumento no consumo de combustível, elevação das emissões de gases poluentes e grande número de pessoas expostas a poluentes perigosos que causam sérios problemas de saúde (WHO, 2005).

O trafego contribui com uma gama de poluentes aéreos gasosos e material particulado suspenso (PM) de diferentes tamanhos e composições. Emissões de partículas primárias por canos de descarga de transportes urbanos respondem por até 30% de PM fino (menos de 2,5 μm de diâmetro aerodinâmico ou PM 2,5) em áreas urbanas (Takizawa, 2004). O transporte urbano é também o maior contribuinte

para emissão de dióxido de nitrogênio e benzeno em cidades, sendo essa a maior razão do não cumprimento dos valores limites para esses poluentes, estabelecido pela União Européia, em países europeus (WHO, 2005).

Sendo assim, os efeitos da poluição atmosférica proveniente da queima de combustíveis fósseis permanecem relevantes para pesquisadores e profissionais de saúde, devido ao aumento constante da dependência de meios de transporte, rápida transformação dos meios de produção, crescimento da população mundial e migração da população rural para áreas urbanas. Principalmente no que concerne os países não desenvolvidos, já que existe um número reduzido de estudos sobre os efeitos respiratórios do material particulado proveniente da combustão de combustíveis fósseis provenientes desses países.

Classificam-se os poluentes como partículas em suspensão (poeiras, emissões atmosféricas e industriais, fumaças, microorganismos) e poluentes gasosos (gases e vapores), anormalmente presentes em altas concentrações na atmosfera.

A exposição aos poluentes aéreos pode resultar em conseqüências agudas, repercussões crônicas ou efeitos latentes. As influências agudas e crônicas podem ocorrer tanto em pacientes com doença pré-existente como em indivíduos previamente saudáveis (Galán e cols., 2003; Souza e cols., 1998). Os poluentes atmosféricos podem, também, potenciar a resposta a alérgenos por aumento de permeabilidade epitelial, recrutamento e ativação de células inflamatórias, estresse oxidativo nas vias aéreas e liberação de neuropeptídios.

Com o objetivo de reconhecer os mecanismos pelos quais a poluição atmosférica leva à lesão pulmonar, foram desenvolvidos vários modelos animais de exposição à poluição (Campen e cols., 2002; Hougaard e cols., 2008 ; Nurkiewicz e

cols., 2008; Takano e cols., 1997, Takenaka e cols., 2004). Dentre eles, o uso de material particulado proveniente da queima do óleo diesel (DEP) representa uma forma de agressão ao trato respiratório, mimetizando condições de exposição a partículas ambientais. Muito se estuda acerca do processo de agressão pulmonar, porém ainda não há relatos sobre as alterações temporais da mecânica respiratória e sua relação com as características morfométricas.

O presente trabalho estuda, pela primeira vez, os efeitos da exposição aguda ao material particulado proveniente da queima de diesel (DEP), em doses e composição representativas da realidade de centros urbanos brasileiros, sobre as propriedades elásticas, resistivas e viscoelásticas e/ou inomogêneas pulmonar e suas alterações histológicas e estruturais. Ademais, para o presente estudo, foram averiguadas as concentrações dos componentes dos materiais particulados utilizados, o tamanho das partículas e sua frequência de distribuição em classes de diâmetro.

1.2– MATERIAL PARTICULADO

Material particulado (PM) se refere-se a uma mistura de partículas sólidas ou líquidas em suspensão no ar, que varia em forma, composição e origem, sendo o maior componente urbano da poluição do ar.

A exposição a elevados níveis de poluentes particulados inaláveis está intimamente relacionada com maior mortalidade e morbidade por doenças cardiovasculares e respiratórias (Galán e cols., 2003; Gonçalves e cols., 2005; Rivero e cols. 2005; Saldiva e cols., 1994; Schenker, 1993). Todavia, pouco se conhece acerca de como os diferentes tamanhos e composições de partículas influenciam esses efeitos adversos.

De modo geral, as partículas podem ser classificadas em grossas, finas e ultrafinas, de acordo com o seu diâmetro aerodinâmico. As partículas grossas apresentam diâmetro aerodinâmico entre 2,5 μm e 10 μm (PM_{10}), as partículas finas têm diâmetro entre 2,5 μm ($\text{PM}_{2,5}$) e 0,1 μm , e as partículas ultrafinas mostram diâmetro menor do que 0,1 μm (Brown e cols., 2002; Churg & Brauer, 1997; Dusseldorp e cols., 1995; Peters e cols., 1997). Os PM com diâmetro menor ou igual a 10 μm (PM_{10}) são considerados partículas inaláveis, pois atingem as vias respiratórias inferiores.

As partículas grossas são geradas a partir do solo ou outros materiais da crosta e apresentam deposição rápida. Nas cidades com alta densidade de tráfego, uma fração significativa das partículas grossas resulta da fricção dos pneus dos veículos com o asfalto das ruas, contendo elementos de pavimento e de borracha pneumática. As partículas finas e ultrafinas originam-se, de maneira geral, de processos de combustão de automotores, indústrias ou usinas termoelétricas. São encontradas na fumaça de queima de madeira, de carvão e de petróleo; e apresentam tempo de suspensão na atmosfera mais longo (dias e semanas), com dispersão mais uniforme em zonas urbanas (Brown e cols., 2002; Dusseldorp e cols., 1995; Peters e cols., 1997).

O PM_{10} afeta as pessoas de forma mais contínua do que qualquer outro poluente. Contribuem para esta ação um grande número de substâncias químicas, incluindo metais, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e agentes biológicos como endotoxinas e glicanos (Mukae e cols., 2001; Saldiva e cols., 2002; van Eeden e cols., 2001). Em alguns estudos, o PM_{10} parece ter efeitos adversos sem apresentar uma dose limiar, sugerindo que este é um material altamente tóxico. Entretanto, os

componentes individuais de PM_{10} não são particularmente tóxicos nos níveis presentes no ar (Pope e cols., 1995).

Estudos anteriores demonstraram ser o material particulado ultrafino mais patogênico do que PM 's de outros tamanhos devido à sua elevada deposição nos alvéolos, capacidade para atingir o interstício do pulmão e grande área de superfície por massa (Brown e cols., 2002; Peters e cols., 1997). Entretanto, os achados são controversos. Brown e colaboradores (Brown e cols., 2002), por meio de cintigrafia, relataram que pacientes com DPOC apresentavam maior deposição de partículas ultrafinas no pulmão, quando comparados a indivíduos saudáveis. Similarmente, Peters e colaboradores (Peters e cols., 1997) observaram que a maior parte das partículas depositadas no pulmão de pacientes asmáticos eram finas, embora houvesse grande quantidade de partículas ultrafinas. Esses dados estavam diretamente relacionados com a diminuição do fluxo máximo expiratório. Ao contrário, Churg e Brauer (Churg & Brauer, 1997), na autópsia de tecido pulmonar do lobo superior de indivíduos não fumantes, observaram, por microscopia eletrônica, a presença de vários tipos de metais e que aproximadamente 96% das partículas encontradas possuíam diâmetro menor do que $2,5 \mu m$ e apenas 4% eram partículas ultrafinas. Samet e colaboradores (Samet e cols., 2007) observaram, em indivíduos saudáveis não fumantes, uma discreta diferença dos parâmetros cardiopulmonares frente aos diferentes tamanhos de partículas. Essas divergências podem resultar de diferentes métodos aplicados nesses trabalhos. Alguns autores sugerem que as partículas ultrafinas causam toxicidade principalmente devido ao seu tamanho mais do que por sua composição química (Li e cols., 1996).

Outro fator importante, que poderia influenciar na trajetória da partícula é o seu formato, como descrito por Franck e Herbarth em um estudo com microscopia

eletrônica em duas cidades da Alemanha. Os autores concluíram que partículas esféricas ou partículas “irregulares” causam efeitos diferentes sobre a saúde (Franck & Herbarth, 2002).

Assim como ocorre com a mortalidade, diferentes grupos de diversos países também evidenciaram associações entre PM e admissões hospitalares, tanto para crianças como para adultos. As associações mais observadas relacionam-se a asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, pneumonias, infecções do trato respiratório superior, descompensação de quadros de insuficiência cardíaca, arritmias cardíacas diversas e quadros isquêmicos coronarianos. Os efeitos do PM para morbidade são maiores do que aqueles observados em termos de mortalidade, porém obedecem ao mesmo perfil descrito anteriormente: curta latência, dependência de dose e ausência de uma concentração abaixo da qual não são observados efeitos sobre a saúde da população.

1.3 – MATERIAL PARTICULADO PROVENIENTE DA QUEIMA DO ÓLEO DIESEL (DEP)

Motores a diesel representam a maior fonte de partículas no cenário urbano, e esforços consideráveis têm sido realizados, a fim de reformular a composição do diesel e a tecnologia dos motores para reduzir suas emissões tóxicas (McDonald JD, 2004; U.S. EPA 2000). Diversos componentes do material particulado respondem pelo efeito potencialmente tóxico do diesel, como metais (Adamson e cols., 2000; Gavet e cols., 2003; Costa & Dreher, 1997), enxofre e espécies orgânicas, principalmente hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Li e cols., 2002; Hiura e cols., 1999; Penning e cols., 1999). Metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos encontram-se absorvidos na superfície das partículas de diesel ou presos dentro do

invólucro de carbono (Li e cols., 2002; Pozzi e cols., 2003). Compostos de superfície podem ser retirados por procedimentos de extração relativamente simples, possibilitando a investigação dos efeitos deletérios dos constituintes específicos.

1.4 - MECÂNICA RESPIRATÓRIA

1.4.1 Noções básicas

A respiração é um processo cíclico, que envolve trabalho mecânico dos músculos respiratórios para a movimentação do sistema respiratório. O sistema respiratório é formado por dois componentes: o pulmão e a parede torácica. Como a parede torácica subentende-se todas as estruturas que se movimentam durante o ciclo respiratório à exceção dos pulmões. A pressão motriz, gerada pela contração muscular durante a inspiração, precisa vencer forças de oposição, tais como: a) forças elásticas dos tecidos pulmonares e parede torácica; b) forças resistivas resultantes do fluxo de gás pelas vias aéreas e movimentação das moléculas constituintes dos tecidos pulmonar e da parede torácica (D'Angelo e cols., 1994); c) forças viscoelásticas dos tecidos pulmonares e da parede torácica; d) forças plastoelásticas responsáveis pela histerese (Hildebrandt, 1970); e) forças inerciais (dependentes da massa dos tecidos e dos gases) (Mead, 1961); f) forças gravitacionais (incluídas nas forças elásticas) (Milic-Emili, 1977); e g) forças de distorção da parede torácica. Contudo, durante a respiração basal, as forças inerciais e de distorção da parede são consideradas desprezíveis (Rodarte & Rehder, 1986).

Elasticidade é uma propriedade da matéria que permite ao corpo retornar à sua forma original após ter sido deformado por uma força sobre ele aplicada. Um

corpo perfeitamente elástico, como uma mola, obedecerá à lei de Hooke, onde, a variação de comprimento é diretamente proporcional à força aplicada, até que seu limite elástico seja atingido. Em visão tridimensional, teríamos volume proporcional à pressão.

A parede torácica e o tecido pulmonar possuem propriedades elásticas e obedecem à Lei de Hooke, ampliada, de modo que quanto maior a pressão motriz, maior o volume de gás inspirado. A inclinação da curva volume-pressão ou a relação entre a variação de volume gasoso mobilizado (ΔV) e a pressão necessária para manter o sistema respiratório insuflado naquele volume é conhecida como complacência do sistema respiratório (C_{rs}). Logo, $C_{rs} = \Delta V / P_{el,rs}$, onde $P_{el,rs}$ corresponde à pressão de retração elástica do sistema respiratório.

Freqüentemente utiliza-se a elastância ao invés da complacência. Esta corresponde ao inverso da complacência ($E_{rs} = 1/C_{rs}$), ou seja, é a relação entre a variação de pressão e o volume mobilizado resultante. O cálculo da elastância do sistema respiratório apresenta vantagens, já que as elastâncias do pulmão (E_L) e da parede torácica (E_w) são adicionadas diretamente: $E_{rs} = E_L + E_w$, enquanto se somam os inversos das complacências: $1/C_{rs} = 1/C_L + 1/C_w$.

O comportamento elástico do pulmão é atribuído a dois fatores. Um deles corresponde aos componentes elásticos do tecido pulmonar (fibras elásticas e colágenas dentre outros). Acredita-se que o comportamento elástico do pulmão não dependa do simples alongamento das fibras de tecido conjuntivo, mas, principalmente, do seu arranjo geométrico. Todas as estruturas pulmonares encontram-se interligadas pela trama de tecido conjuntivo pulmonar, de forma que, quando há insuflação, todos esses componentes se dilatam. Esse fenômeno é

denominado “interdependência”, que contribui para manter todos os espaços aéreos abertos.

Além das propriedades elásticas dos tecidos pulmonares, os pulmões ainda apresentam um importante fator que contribui para as suas características elásticas: a tensão superficial exercida pelas moléculas que recobrem a zona de troca gasosa. A tensão superficial em uma interface ar-líquido aparece porque as moléculas do líquido são atraídas com maior intensidade ao longo da superfície do próprio líquido do que para a fase gasosa acima deste. A tensão superficial pode ser definida como a força que age sobre uma linha imaginária de 1 cm de comprimento na superfície de um líquido. Essa tensão surge porque as forças atuando entre as moléculas do líquido são muito maiores do que aquelas entre líquido e gás, disso resultando que a área líquida se torna a menor possível.

Em uma estrutura esférica como uma bolha de sabão, a tensão superficial tem a propriedade importante de gerar pressão no interior da bolha. A relação entre a tensão superficial na parede e a pressão desenvolvida dentro da bolha de sabão é dada pela lei de Laplace. Essa afirma que, para cada superfície de uma bolha, a pressão (P) é igual ao dobro da tensão (T) dividida pelo raio (r), ou, para ambas as superfícies, $P = 4T/r$. Entretanto, quando somente uma interface está envolvida, como em um alvéolo esférico revestido por líquido na sua face interna, o numerador tem a constante 2 em lugar de 4. Considerando-se dois alvéolos de diferentes tamanhos conectados através de uma via aérea comum, e com tensão superficial semelhante, pode-se depreender, com base na Lei de Laplace, que a pressão no alvéolo menor seria maior do que no alvéolo maior. Desta forma, os alvéolos menores esvaziar-se-iam nos maiores, resultando em vários alvéolos colapsados e outros hiperinsuflados. Contudo, isso não ocorre nos pulmões normais, pois a tensão

superficial do surfactante, líquido de composição protéica ($\cong 10\%$) e, principalmente, fosfolipídica ($\cong 90\%$) secretado pelos pneumócitos tipo II, é consideravelmente menor do que a da solução salina que recobre as mucosas pulmonares. Dessa forma, há um equilíbrio entre os alvéolos maiores e menores, com uma mesma pressão mantida em seus interiores.

Durante a movimentação do sistema respiratório, quando ocorre fluxo de gás, um elemento adicional ao elástico precisa ser vencido pela pressão motriz: a resistência. A resistência do sistema respiratório (R_{rs}) pode ser calculada dividindo-se $P_{res,rs}$ pelo fluxo aéreo. $P_{res,rs}$ é a pressão resistiva do sistema respiratório, ou seja, a pressão necessária para vencer seus componentes resistivos. Semelhantemente à complacência, e pelas mesmas razões, a resistência do sistema respiratório pode ser subdividida em seus componentes pulmonar e de parede.

A resistência pulmonar pode ser subdividida em dois subcomponentes: a resistência das vias aéreas (R_{aw}), que depende do fluxo de ar no interior dos pulmões, e a resistência tecidual (R_{tis}), determinada pelas perdas energéticas geradas pela viscosidade (isto é, atrito) pertinentes à movimentação do pulmão. A resistência das vias aéreas pode ser influenciada pela geometria da árvore traqueobrônquica, pelo volume pulmonar, pela complacência das vias aéreas, pela viscosidade do gás mobilizado e pela musculatura lisa dos brônquios. A resistência tecidual depende da velocidade de deslocamento, tanto durante a inspiração como na expiração. A resistência da parede torácica também é determinada pelas perdas energéticas geradas pela viscosidade pertinente à movimentação das moléculas que constituem os tecidos da parede torácica.

Além dos componentes elásticos e resistivos, o sistema respiratório apresenta, também, propriedades viscoelásticas, que atuam no tecido pulmonar e na

parede torácica. A viscoelasticidade foi descrita, a partir do comportamento de fios de seda, por Wilhelm Weber em 1835. Esse tipo de material obedece à lei da proporcionalidade entre a força aplicada e o alongamento resultante (Lei de Hooke), porém apenas por um curto período de tempo após a aplicação da força. Quando a carga permanece por um tempo prolongado, o alongamento passa a aumentar continuamente. O alongamento tempo-dependente representa uma propriedade universal, presente em vários tecidos animais (Dorrington, 1980).

Substâncias viscoelásticas, quando mantidas sob deformação constante, apresentam queda da tensão, chamada de relaxamento de tensão (“stress relaxation”), ou simplesmente, relaxamento, quando o corpo é estirado. Por outro lado, sob tensão constante, o corpo tende a se deformar continuamente com o decorrer do tempo, fenômeno chamado “creep”. Faz-se notar que esta deformação não se mostra irreversível, mas sim reproduzível, podendo ser repetida, desde que seja precedida por um período de tempo durante o qual o material permaneça em condições de repouso, a fim de apagar a memória do evento anterior. Do ponto de vista morfofuncional, a viscoelasticidade ocorre a nível do tecido pulmonar e da parede torácica e permite o intercâmbio de energia (pressão) entre o componente elástico e o resistivo. Por exemplo, durante uma pausa inspiratória, a energia potencial (pressão) acumulada no componente elástico pode ser dissipada sob a forma de calor pelo componente resistivo.

1.4.2 - Estudo da Mecânica Respiratória

Na tentativa de compreender a complexidade do sistema respiratório e seus componentes (pulmão e parede torácica), além dos diversos mecanismos envolvidos durante a respiração, foram utilizados modelos matemáticos relativamente simples,

que se aproximam ao máximo da realidade. Para tanto, faz-se necessária a interpretação fisiológica de variáveis mensuráveis como fluxo, volume e pressão na abertura das vias aéreas.

O modelo mais simples utiliza 2 elementos, uma resistência (representada por um tubo) e uma elastância (representada por um balão) (Figura 1). Esse modelo baseia-se na assertiva de que as propriedades mecânicas do sistema respiratório independem do volume pulmonar e do fluxo, e que os fatores inerciais são desprezíveis. Considerando-se o sistema respiratório normal, esse modelo pode ser utilizado, e tornou-se tão popular que geralmente refere-se à equação a ele associada como "equação de movimento do sistema respiratório". Essa equação é dada por $P(t) = E.V(t) + R.V'(t)$, onde, em qualquer instante t , E e R representam, respectivamente, a elastância e a resistência do sistema respiratório e P significa a pressão motriz capaz de produzir volume (V) e fluxo aéreo (V'). Entretanto, apesar do modelo de compartimento único continuar sendo amplamente utilizado, não é possível empregá-lo com precisão para o estudo da mecânica em presença de doenças pulmonares, sendo necessário um modelo de dois ou mais compartimentos, que apresentem diferentes constantes de tempo para descrever o comportamento mecânico do sistema respiratório. Além disso, essa equação de movimento não explica o decaimento lento da pressão traqueal observado após oclusão das vias aéreas ao final da inspiração (Bates e cols., 1985a; 1985b; Don & Robson, 1965), a dependência de frequência de R e E na faixa de 0-2 Hz (Barnas e cols., 1987; Bates e cols., 1989; Brusasco e cols., 1989; Hantos e cols., 1986; 1987), bem como a presença de histerese na curva volume-pressão quase-estática em pulmões isolados (Similowski & Bates, 1991).

Passa-se, então, ao estudo da mecânica respiratória utilizando-se modelos bicompartimentais que consideram a heterogeneidade de distribuição de gás nos pulmões (Mead, 1961) e a viscoelasticidade dos tecidos (Mount, 1955).

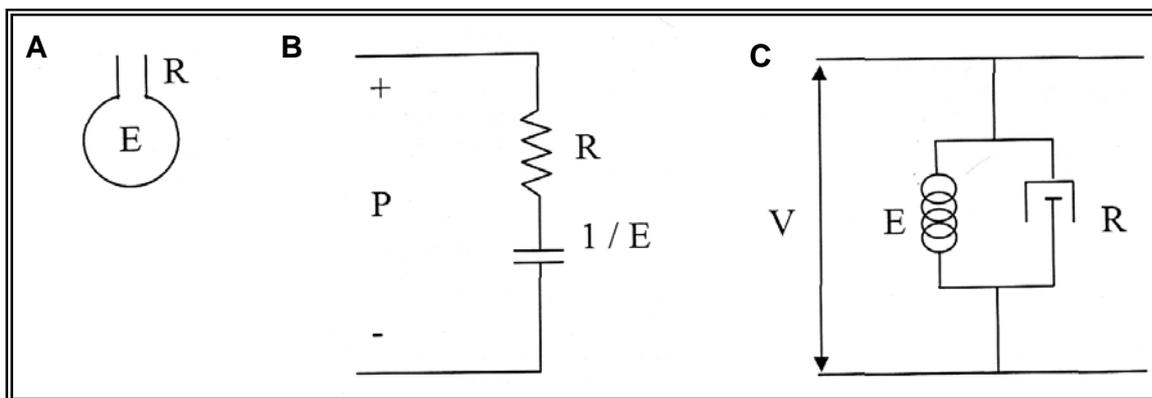


Figura 1 - Modelo linear uni-compartimental. Representação anatômica (A), elétrica (B) e reológica (corpo de Voigt, C). R, resistência do sistema respiratório; E, elastância do sistema respiratório; V, variações de volume; P, pressão.

Na década de 60 foram descritos os primeiros modelos bicompartimentais para estudo da mecânica respiratória, associando a natureza multicompartimental do sistema respiratório à heterogeneidade da distribuição de gás nos pulmões (Otis e cols., 1956; Mead, 1969) ou à viscoelasticidade dos tecidos (Mount, 1955).

Em 1985, Bates e colaboradores representaram o modelo, originalmente proposto por Mount, na forma de um modelo físico composto por elementos elásticos representados por molas e por elementos resistivos expressos por amortecedores (Bates e cols., 1985b). Os autores realizaram uma análise teórica do comportamento não homogêneo do sistema respiratório submetido à ventilação mecânica com fluxo inspiratório constante, seguida por oclusão súbita das vias aéreas. Imediatamente após a oclusão, ocorre uma queda rápida da pressão traqueal (ΔP_1), indo do seu valor máximo (P_{max}) até um ponto de inflexão (P_i), seguida por uma queda lenta

(ΔP_2) até atingir um platô aparente, que corresponde à pressão de retração elástica do sistema respiratório (P_{el}), como mostrado na Figura 2.

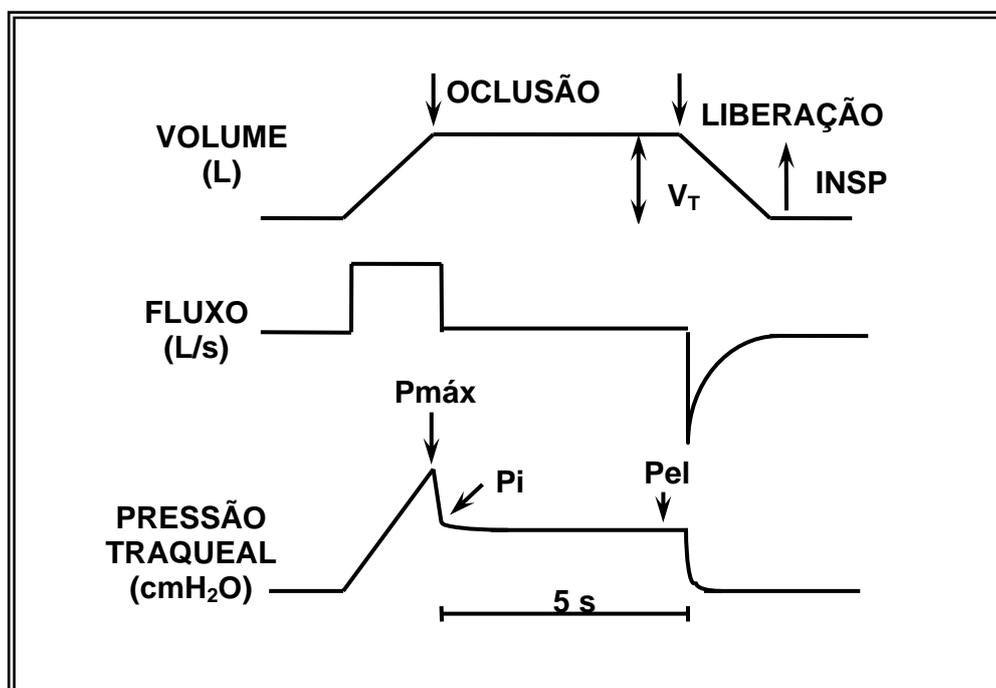


Figura 2 – Esquema do método de oclusão ao final da inspiração. Registros de volume, fluxo aéreo e pressão traqueal em função do tempo. O platô foi alcançado transcorrida uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas ao término da inspiração, atinge-se o valor máximo de pressão ($P_{máx}$), seguido de uma queda rápida na pressão transpulmonar até ser atingido um ponto de inflexão (P_i). Essa primeira queda de pressão (ΔP_1) corresponde à pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão. Em seguida ocorre uma queda lenta da pressão (ΔP_2) correspondente à pressão gasta para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até se chegar a um ponto de equilíbrio elástico, representado pela pressão de retração elástica pulmonar (P_{el}). INSP, inspiração; V_T , volume corrente.

O modelo de Bates e colaboradores (Bates e cols., 1988) é constituído por dois submodelos, pulmão e parede torácica, apresentando um arranjo em paralelo,

uma vez que são submetidos à mesma variação de volume (Figura 3). A subunidade pulmonar consiste de um amortecedor, representando a resistência das vias aéreas ($R_{init,L}$) em paralelo com um corpo de Kelvin, que consiste de uma mola representando a elastância estática ($E_{st,L}$) em paralelo com um corpo de Maxwell, caracterizado por uma mola, componente elástico ($E_{2,L}$), e um amortecedor, componente resistivo ($R_{2,L}$), dispostos em série. $E_{2,L}$, $R_{2,L}$ e a constante de tempo correspondente ($\tau_{2,L}=R_{2,L}/E_{2,L}$) estimam as propriedades viscoelásticas do pulmão. Já a subunidade da parede torácica é representada por uma resistência ($R_{init,w}$) e pelo corpo de Kelvin, caracterizado pela elastância estática da parede torácica ($E_{st,w}$) e pelos parâmetros que correspondem a viscoelasticidade ($E_{2,w}$, $R_{2,w}$ e $\tau_{2,w}$). (Bates e cols., 1988)

Quando se alonga esse modelo (afastamento das duas barras horizontais) a uma velocidade constante (v), a carga da mola E_2 aumenta com o tempo (T_i) e a velocidade do amortecedor R_2 se aproxima da velocidade de alongamento (v); assim, a força exercida pela mola E_2 aproxima-se de $R_2.v$. Se for realizada uma interrupção de fluxo, o movimento relativo das duas barras horizontais cessa. Com isso, o comprimento da mola E_2 diminui gradualmente até atingir seu comprimento de equilíbrio. Logo, nesse modelo, o decaimento pressórico lento (ΔP_2), observado após a interrupção do fluxo, é interpretado como equivalente ao relaxamento da mola E_2 , resultando em dissipação calórica de energia no amortecedor R_2 .

Baseado no modelo de Bates e colaboradores (Bates e cols., 1988), a queda de pressão que ocorre imediatamente após a oclusão das vias aéreas, durante a insuflação pulmonar com fluxo constante, fornece a variação de pressão do sistema respiratório que seria obtida na ausência de desigualdades da constante de tempo e “stress relaxation”, ou seja, o componente viscoso ou homogêneo do sistema

respiratório. A queda mais lenta da pressão, que ocorre subseqüentemente até ser atingindo o platô, reflete a pressão dissipada em decorrência da viscoelasticidade e/ou heterogeneidade do sistema, as quais determinam, respectivamente, o “stress relaxation” e o “pendelluft” (Bates e cols., 1985a; 1988).

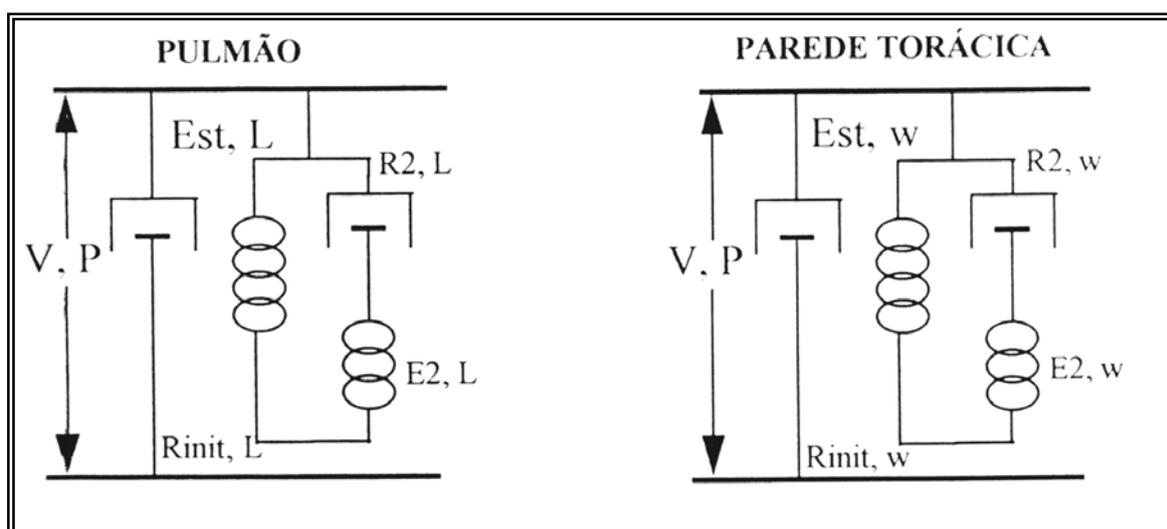


Figura 3 - Modelo de molas e amortecedores para interpretação da mecânica do sistema respiratório com a técnica de interrupção do fluxo, proposto por Bates e colaboradores (Bates e cols., 1985). Pulmão e parede torácica apresentam um componente resistivo ($R_{init,L}$ e $R_{init,w}$, respectivamente) em paralelo com um corpo de Kelvin; este composto por componente elástico (Est,L e Est,w , respectivamente), representando a elastância estática dos dois compartimentos, em paralelo com um corpo de Maxwell, conjunto de amortecedor e mola em série ($R_{2,L} - E_{2,L}$, e $R_{2,w} - E_{2,w}$, respectivamente), os quais representam o comportamento viscoelástico. A distância entre as duas barras horizontais é análoga ao volume pulmonar (V) e a tensão entre elas é análoga à pressão na abertura das vias aéreas (P).

“Stress relaxation pulmonar” é a capacidade do pulmão de se adaptar a uma insuflação mantida, apresentando redução da pressão em função do tempo. Quando permanece sob um comprimento constante (volume), o pulmão pode alterar sua tensão com o tempo, logo, o gradiente de pressão diminui progressivamente. O “stress relaxation” ocorre após alterações súbitas do comprimento, “strain”. Nesse

caso, súbito significa que o tempo necessário para o estiramento é menor do que a constante de tempo ($\tau_2 = R_2.C_2$). O “stress relaxation” depende do realinhamento da matriz extracelular e de perdas de energia nos tecidos pulmonares e na interface ar-líquido (Horie & Hildebrandt, 1971). Já o “pendelluft” é a transferência de um pequeno volume de gás dos compartimentos pulmonares de maior pressão para os compartimentos de menor pressão, representando o reajuste estático das diferenças regionais de volume pulmonar resultantes de desigualdades de constante de tempo (Bates e cols., 1985a; Otis e cols., 1956).

Vários fatores contribuem para o “stress relaxation” no pulmão, como o fenômeno de abertura e fechamento das vias aéreas e espaços alveolares, e as perdas de energia nos tecidos e na interface ar-líquido. As fibras de colágeno e elastina, isoladamente, apresentam pouca adaptação ao estiramento, mas o arranjo da matriz fibro-elástica apresenta contribuição significativa para este fenômeno. Alguns autores ressaltam o papel da interface ar-líquido como o principal determinante do “stress relaxation” no pulmão (Horie & Hildebrandt, 1971).

O comportamento não homogêneo da parede torácica não está completamente esclarecido. A parede torácica pode se comportar como um sistema de dois compartimentos, um de baixa complacência, representando pela caixa torácica e outro de complacência mais elevada, o abdômen (Peslin e cols., 1975). Além disso, a pressão intrapleural não é uniforme em toda a cavidade torácica, sendo afetada pela contração do diafragma e pela movimentação do abdômen (D'Angelo e cols., 1974). As propriedades mecânicas do sistema respiratório podem sofrer influência da parede abdominal (Zin e cols., 1989), ajudando a explicar a queda não homogênea da pressão pleural após a oclusão das vias aéreas. A abertura extensa da parede abdominal leva ao aumento de elastância e resistência,

provavelmente secundário à redistribuição de volumes gasosos no pulmão (Zin e cols., 1989).

O primeiro estudo em animais realizado de acordo com o proposto por Bates e cols. (Bates e cols., 1985b), com subdivisão do sistema em seus componentes pulmonar e de parede, foi realizado por Saldiva e colaboradores em 1987 (Saldiva e cols., 1987). Posteriormente, outros trabalhos também demonstraram a contribuição significativa da parede torácica para as desigualdades do sistema respiratório (Auler e cols., 1987; D'Angelo e cols., 1994; Macedo-Netto e cols., 1998; Moreira e cols., 1997; Rocco e cols., 1999; Zin e cols., 1989), comprovando que elas podem ser atribuídas aos componentes pulmonar e de parede.

O método de oclusão das vias aéreas após insuflação com fluxo constante não é capaz de determinar a contribuição relativa do "pendelluft" (desigualdades de constantes de tempo) e do "stress relaxation" (componente viscoelástico) para o desenvolvimento da queda lenta observada na pressão traqueal (Bates e cols., 1985a; 1988; Kochi e cols., 1988b). No entanto, vários autores acreditam ser a maior contribuição representada provavelmente pelo "stress relaxation" (Bates e cols., 1988; Kochi e cols., 1988a; Similowski e cols., 1991).

No final dos anos 80, foi demonstrada, por meio do método de oclusão ao final da inspiração, a dependência das resistências pulmonares, de parede e do sistema em relação ao fluxo e volume (Kochi e cols., 1988a e 1988b). Em condições de isovolume, as resistências intrínsecas pulmonares ($R_{in,L}$), da parede ($R_{in,w}$) e do sistema respiratório ($R_{in,rs}$) aumentam linearmente com o aumento do fluxo, enquanto a pressão necessária para vencer a viscoelasticidade e/ou inhomogeneidade e o pendelluft ($\Delta P_{2,L}$, $\Delta P_{2,w}$ e $\Delta P_{2,rs}$) aumenta progressivamente, mas a variação deste crescimento decai, chegando a zero (Similowski e cols., 1989).

Em outras palavras, se fosse possível calcular uma resistência utilizando-se esses valores de pressão e fluxo no momento da oclusão, ela cairia com a elevação do fluxo. Na situação de isofluxo, aumentando-se o volume, $R_{in,L}$, $R_{in,w}$ e $R_{in,rs}$ decrescem, enquanto que $\Delta P_{2,L}$, $\Delta P_{2,w}$ e $\Delta P_{2,rs}$ aumentam de modo similar àquele obtido em situação de isovolume (D'Angelo e cols., 1989; Kochi e cols., 1988a e 1988b; Similowski e cols, 1989).

Em 1988, o modelo de oclusão ao final da inspiração foi validado por estudos experimentais utilizando-se cápsulas posicionadas em pontos diferentes da superfície pleural. Ao medir diretamente a pressão alveolar, comprovou-se ser esta homogênea em todo o pulmão, apresentando pico de pressão coincidente com o ponto de inflexão (P_i) observado na curva de pressão traqueal. Logo, a pressão alveolar mostra comportamento semelhante ao encontrado na segunda fase da pressão traqueal, a de queda lenta. Tal observação indica que a variação de pressão responsável pela queda lenta (ΔP_2) ocorre em consequência a um fenômeno nas vias aéreas bem distais, alvéolo e tecido pulmonar. Logo, ΔP_2 é uma manifestação do comportamento tecidual de adaptação ao estresse (Bates e cols., 1988; Saldiva e cols., 1992).

Apesar de haver diversas técnicas para analisar a mecânica do sistema respiratório, nos últimos anos o método da oclusão ao final da inspiração vem sendo bastante utilizado, tanto em animais, quanto em seres humanos anestesiados (Auler e cols., 1987; Bates e cols., 1985b; D'Angelo e cols., 1994; 1989; Macedo-Neto e cols., 1998; Rocco e cols., 1999; Saldiva e cols., 1987). Este método foi empregado no presente trabalho, por fornecer informações individualizadas sobre o componente pulmonar e permitir a análise de suas propriedades elástica, viscosa e viscoelástica.

OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Estudar as alterações mecânicas, morfométricas e celulares do sistema respiratório em um modelo murino de exposição à fuligem da queima de óleo diesel não tratado (DEP), e estudar as alterações citadas acima em um modelo de exposição a partículas que sofreram diferentes procedimentos de extração, assim determinando a composição e o tamanho destas.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar, pelo método de oclusão ao final da inspiração, as propriedades resistivas, elásticas e viscoelásticas e/ou inomogêneas do pulmão de camundongos expostos à fuligem da queima de óleo diesel não tratado e partículas que sofreram diferentes procedimentos de extração.
2. Estudar as alterações da celularidade total e diferencial no parênquima pulmonar.
3. Quantificar a composição das partículas utilizadas.
4. Quantificar as classes de tamanhos das partículas utilizadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados quarenta e seis camundongos BALB/c, pesando 25 ± 5 g (média \pm DP), oriundos do Centro Multi-Institucional para investigação de Bioterismo (CEMIB), Universidade de Campinas (UNICAMP). Os animais foram cuidados conforme o guia preparado pelo Comitê de Cuidados e Uso dos Animais de Laboratório do Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos (U. S. Department of Health and Humane Services) e de acordo com a convenção de Helsinki para o uso e cuidado dos animais. Aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CAUAP) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

3.2 - CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, recebendo uma única instilação de 10 μ L de solução salina (NaCl a 0,9%) por via intranasal (CTRL, n=10), ou 15 μ g de partículas de diesel diluídas em salina (10 μ L) intactas (DEP, n=9) ou previamente tratadas com metanol (MET, n=9), hexano (HEX, n=9) ou ácido nítrico (NA, n=9). Para a instilação intranasal os animais foram anestesiados com sevofluorano e se recuperaram rapidamente do procedimento.

3.3 – ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA FULIGEM DA QUEIMA DO ÓLEO

3.3.1 – Coleta das partículas

Um filtro coletor de partículas foi acoplado ao cano de descarga de seis ônibus da frota de transporte público da cidade de São Paulo, equipados com motor Mercedes Benz MB1620, 210 HP, sem injeção eletrônica de combustível, funcionando com diesel contendo 550 ppm de enxôfre. Esse tipo de ônibus foi escolhido por ser o mais freqüente operando em São Paulo, com base nas informações fornecidas pelo poder municipal. O filtro acoplado aos ônibus era formado por uma esponja de aço inoxidável colocada na linha do cano de descarga do veículo. As partículas de diesel foram coletadas após um dia de operação de rotina dos ônibus e estocadas para estudo toxicológico.

3.3.1.a – Tratamento das partículas

A massa total das partículas coletadas foi dividida em quatro amostras. Uma das amostras não recebeu qualquer tratamento, enquanto as outras três foram submetidas a diferentes protocolos de extração: a) extração ácida: as partículas foram imersas em 160 ml de HNO₃ 65% (pH = 3.0), sonicadas durante 60 minutos e descansaram por 24 horas. A seguir, a solução foi centrifugada por 20 minutos a 600 g à temperatura de 5°C e 10 minutos a 1000 g à temperatura de 10°C. O sobrenadante foi coletado e as partículas foram secas a 57°C dentro de uma capela por 48 horas antes de serem utilizadas; b) extração com 2 solventes orgânicos com polaridades diferentes: as partículas foram imersas em 160 ml de metanol ou de hexano, sonicadas durante 60 minutos e descansaram por 24 horas. As soluções

foram centrifugadas por 15 minutos a 1000 g a 10°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado estocado em dissecador a vácuo por 15 horas.

3.3.2 – Análise da composição das partículas

O conteúdo de metais e elementos orgânicos das partículas tratadas e das partículas intactas foi averiguado. A análise do conteúdo de metais pesados, e suas respectivas concentrações, foi realizada no Laboratório de Poluição Atmosférica, Departamento de Patologia, Universidade de São Paulo. As concentrações de Ni, S, Fe, V, Pb, Cd, Cr, e Cu foram determinadas por um espectrômetro de fluorescência de raios-x (EDX 700HS, Shimadzu Corp, ,Kyoto, Japão).

As concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foram analisadas no Laboratório de Radioisótopos Eduardo Penna Franca, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Para tanto, utilizou-se um espectrofotômetro de absorção atômica (Varian, modelo AA-1475, Victoria, Austrália). As concentrações dos seguintes HPAs foram determinadas: benz[a]anthraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenz[ah]antraceno, e indeno[123cd]pireno.

3.3.3- Análise do tamanho das partículas

A distribuição do tamanho de partículas intactas e partículas tratadas foram averiguadas. A análise dos diâmetros médios e o histograma de distribuição das partículas foi realizada no Laboratório de Caracterização Tecnológica, Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. A média da distribuição do tamanho das partículas medida por seu volume e por sua superfície e os diâmetros nos quais se encaixam 90%, 50% e 10% das

partículas foram determinados por difração de laser (Long Bench Mastersizer S, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire , Reino Unido).

3.4 – MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Vinte e quatro horas após a instilação intranasal, os animais foram sedados com diazepam (1 mg i.p., por animal), em seguida pesados (balança Filizola, modelo BR, Indústrias Filizola SA, SP, Brasil) e, então, anestesiados com pentobarbital sódico (20 mg/kg i.p.).

Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa, sob foco cirúrgico, em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados por esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos estendidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada traqueotomia com introdução de jelco 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, sendo a cânula fixada à traquéia por meio de fios de algodão. Os animais foram paralisados com brometo de pancurônio (20 mg/kg, por administração intra-peritoneal).

Os camundongos foram, então, acoplados a um respirador artificial de fluxo constante (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideu, Uruguai) e ventilados com frequência de 100 incursões respiratórias por minuto e volume corrente (V_T) de 0,2 mL.

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos a incisão cirúrgica por tesoura na linha média do abdômen justo abaixo do apêndice xifóide. A incisão foi estendida, superficialmente, ao longo da parede torácica sobre o esterno, sendo, então, a pele do animal retirada por tração lateral. A seguir, a incisão abdominal foi estendida lateralmente, para a esquerda e para a direita, seguindo o

bordo inferior das costelas, até atingir a linha axilar anterior, bilateralmente. Com a cavidade abdominal aberta, foi possível visualizar o diafragma, que foi perfurado e seccionado segundo a mesma orientação da abertura da parede abdominal. Antes da perfuração do diafragma a traquéia foi ligada a um transdutor de pressão. Aberto o diafragma, o pulmão tendeu a se colapsar e se mediu sua pressão de retração elástica, que foi aplicada como pressão positiva ao final da expiração (PEEP), a fim de evitar o desenvolvimento de atelectasias. Essa pressão girou em torno de 2 cmH₂O (Saldiva e cols., 1992; Powers e cols., 1973; Rodrigues e cols., 1993). A traquéia foi, então, reaberta e reinstalada a respiração artificial.

Após a retirada do diafragma, a parede torácica foi removida por cortes longitudinais bilaterais ao nível da linha axilar anterior, em toda sua extensão, e corte superior, abaixo da clavícula.

O respirador foi ajustado previamente para gerar uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração, quando necessário para as medidas de mecânica pulmonar. Foram tomados cuidados especiais para a manutenção de volume ($V_T = 0,2$ mL) e fluxo ($V' = 1$ mL/s) constantes em todos os animais, a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e duração da inspiração nas variáveis medidas (Kochi e cols., 1988 a, 1988 b; Simlowski e cols., 1989).

O tubo traqueal foi conectado a um pneumotacógrafo para pequenos animais, como descrito por Mortola e Noworaj (1983), 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 conectadas a um transdutor diferencial de pressão Validyne MP 45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA), para medida de fluxo aéreo. Por meio 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 pressão traqueal (Ptr). O volume gasoso mobilizado foi obtido por integração digital do sinal de fluxo aéreo.

Uma vez que não houve modificações abruptas no diâmetro no nosso circuito, os erros de medida da resistência ao fluxo foram provavelmente evitados (Chang & Mortola, 1981; Loring e cols., 1979). O espaço morto do equipamento foi de 0,3 mL. Todos os sinais foram condicionados e amplificados em um polígrafo Beckman tipo R (Beckman, Schiller Park, IL, EUA). Os sinais de pressão e fluxo foram passados através de filtros Bessel passa-baixa de 8 pólos (902LPF, Frequency Devices, Haverhill, MA, EUA), convertidos (DT-2801A, Data Translation, Malboro, MA, EUA) de analógicos para digitais e armazenados em um computador. Todos os dados foram coletados usando-se o software LABDAT (RHT-InfoData Inc., Montreal, Quebec, Canadá), conforme esquematizado na Figura 4.

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

Os parâmetros da mecânica respiratória foram determinados 24 horas após a instilação intranasal de salina, diesel ou seus derivados, sendo obtidos por meio do registro de 10 ciclos respiratórios (em cada animal) pelo método da oclusão ao final da inspiração (descrito a seguir).

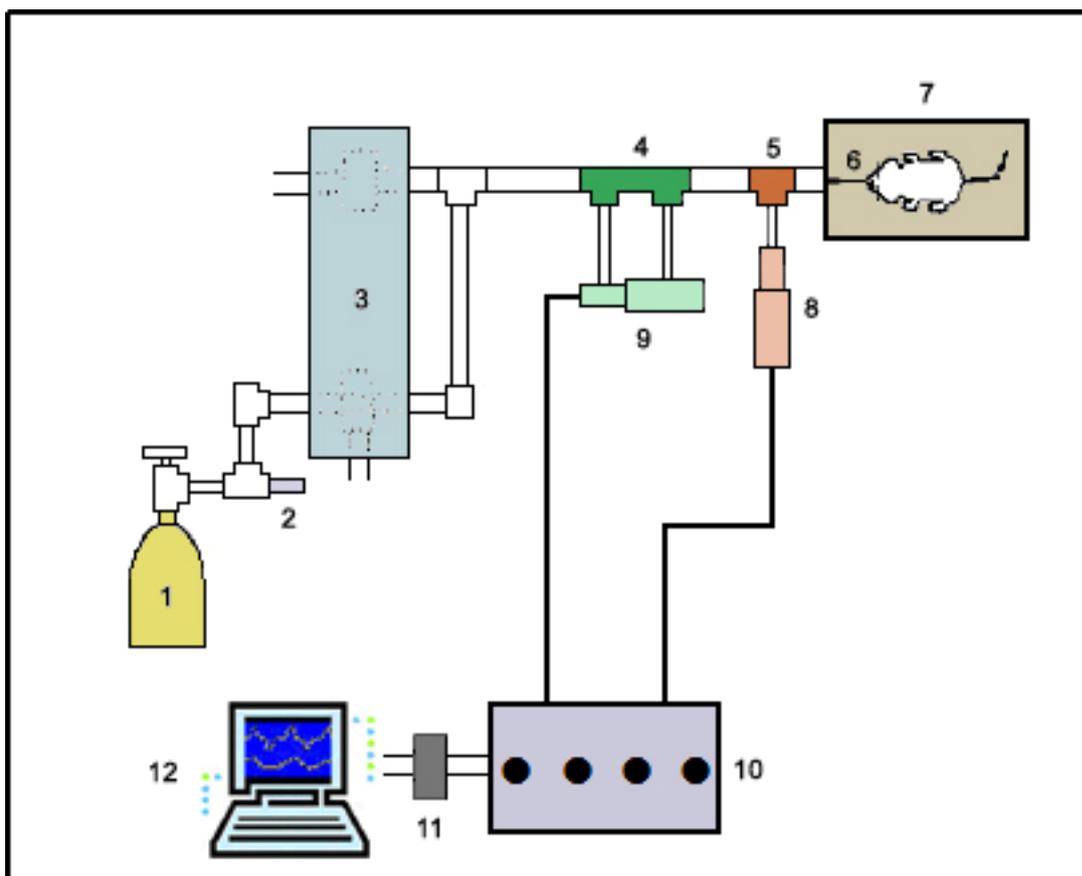


Figura 4 – Montagem experimental consistindo de:

- 1 - Cilindro de ar comprimido.
- 2 - Válvula redutora de pressão.
- 3 - Respirador de fluxo inspiratório constante composto por duas válvulas solenóides.
- 4 - Pneumotacógrafo.
- 5 - Peça em "T" para medição de pressão nas vias aéreas.
- 6 - Cânula traqueal.
- 7 - Mesa cirúrgica.
- 8 - Transdutor diferencial de pressão para medição de pressão nas vias aéreas.
- 9 - Transdutor diferencial de pressão para medição de fluxo.
- 10 - Polígrafo de oito canais para condicionamento e amplificação dos sinais de fluxo e pressão.
- 11 - Filtros e conversor analógico-digital de 12 bits.
- 12 - Microcomputador.

3.4.1 - Método de Oclusão ao Final da Inspiração

A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração (Bates e cols., 1985a), que permite analisar separadamente os componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inomogêneo do sistema respiratório.

No animal com o tórax aberto, a P_{tr} é, na realidade, a pressão transpulmonar (PL). 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 (ΔP_1) que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial (P_{max}) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta (P_i), corresponde ao componente viscoso pulmonar. A segunda variação de pressão (ΔP_2), representada pela queda lenta, do P_i ao platô (P_{el}), reflete a pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico (“*stress relaxation*”) e/ou inomogêneo (“*pendelluft*”) do tecido pulmonar. A soma de ΔP_1 e ΔP_2 fornece a variação total de pressão resistiva no pulmão (ΔP_{tot}) (Figura 5).

A elastância estática (E_{st}) do pulmão foi, então, obtida, dividindo-se P_{el} pelo volume corrente e a elastância dinâmica (E_{dyn}) do pulmão, dividindo-se P_i pelo volume corrente. O componente viscoelástico da elastância (ΔE) foi calculado pela diferença entre E_{dyn} e E_{st} .

Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o volume nunca cai a 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 e cols. (Kochi e cols., 1988a).

As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

$$\Delta P_1 = P_{max} - P_i$$

$$\Delta P_2 = P_i - P_{el}$$

$$\Delta P_{tot} = \Delta P_1 + \Delta P_2$$

$$Est = P_{el} / V_T$$

$$Edyn = P_i / V_T$$

$$\Delta E = Edyn - Est$$

Onde:

ΔP_1 = variação de pressão relativa ao componente viscoso pulmonar

ΔP_2 = variação de pressão relativa ao componente viscoelástico e/ou inhomogêneo pulmonar

ΔP_{tot} = variação total de pressão resistiva pulmonar

P_{max} = pressão pulmonar máxima atingida

P_i = pressão pulmonar no ponto de inflexão

P_{el} = pressão de retração elástica pulmonar

Est = elastância estática do pulmão

$Edyn$ = elastância dinâmica do pulmão

ΔE = variação das elastâncias

V_T = volume corrente

A resistência total do equipamento (R_{eq}), incluindo a cânula traqueal, foi previamente aferida através da aplicação de diversos fluxos de ar ao sistema, com concomitante registro das diferenças de pressão entre a entrada e a saída da tubulação (ΔP). Uma vez que $R = \Delta P / V'$, a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva $\Delta P \times V'$. A R_{eq} , constante até fluxos de 26 mL/s (bem

acima da faixa de fluxos utilizada no presente experimento), foi de 0,12 cmH₂O/mL/s. A variação de pressão determinada pelo equipamento ($\Delta P_{eq} = R_{eq} \cdot V'$) foi subtraída das pressões resistivas do pulmão, de tal forma que os resultados representam suas propriedades mecânicas intrínsecas.

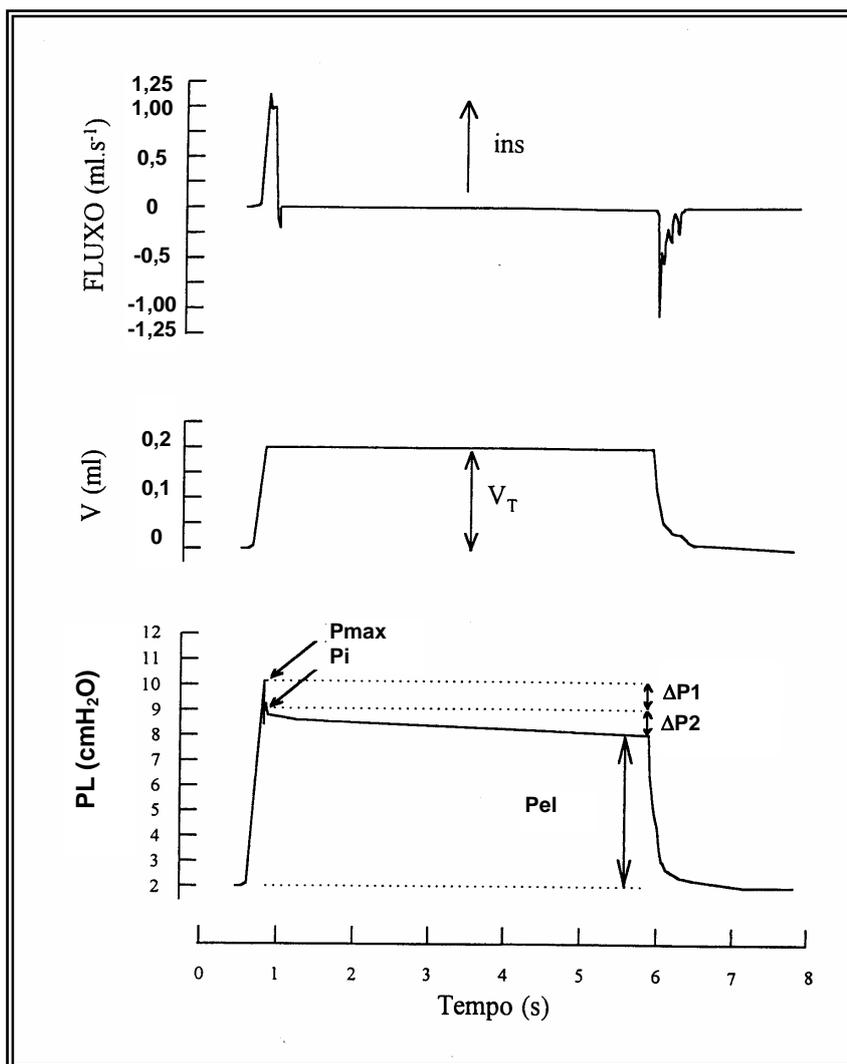


Figura 5 – Método de oclusão ao final da inspiração. Registros dos sinais de fluxo aéreo, volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo aéreo de 1 mL/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na PL ($\Delta P1$) que corresponde a $P_{max} - P_i$, pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta ($\Delta P2$), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representado pela pressão de retração elástica pulmonar (P_{el}). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O. Ins, inspiração. V_T , volume corrente.

3.5 – ESTUDO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO

3.5.1 – Remoção dos Pulmões e Análise Histopatológica

Imediatamente após a determinação da mecânica respiratória injetou-se heparina (1000 IU) por via intravenosa. Então, os pulmões foram perfundidos com solução salina e depois formol a 10% via circulação pulmonar. O animal foi, então, sacrificado por seção da aorta abdominal e da veia cava inferior, e a traquéia foi ocluída ao final da expiração com um fio de algodão. A porção abdominal do esôfago foi identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática. As estruturas do pescoço foram dissecadas com liberação das vias aéreas. A pinça que prendia o esôfago foi suavemente tracionada para cima, permitindo separá-lo das estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traquéia foi seccionada acima do local ligado pelo fio e, posteriormente, o esôfago foi separado do conjunto por leve tração. Os pulmões foram removidos *en bloc* e fixados por 48 horas em solução tamponada de formol a 10% . Depois da fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 4 μm de espessura.

As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisadas por microscopia óptica (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos. Para a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada com as estruturas pulmonares representadas.

A análise quantitativa foi realizada por meio da técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”) (Gundersen e cols., 1988), utilizando uma

ocular contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas dispostos em paralelo acoplada ao microscópio (Figura 6).

Em um aumento de 1000x (área de $10.000 \mu\text{m}^2$) foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes. A relação da quantidade de células polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares (macrófagos + linfócitos + monócitos + eosinófilos) e área de tecido pulmonar foi acessada contando os pontos da matriz que caíam em células polimorfonucleares e mononucleares e dividindo esse resultado pelo número total de pontos que caíam em área de tecido. Além disso, tiramos fotos com aumento de 200x para análise qualitativa do perfil do parênquima pulmonar de animais representativos de cada grupo.

Os valores finais foram expressos como média + erro padrão da média (EPM).

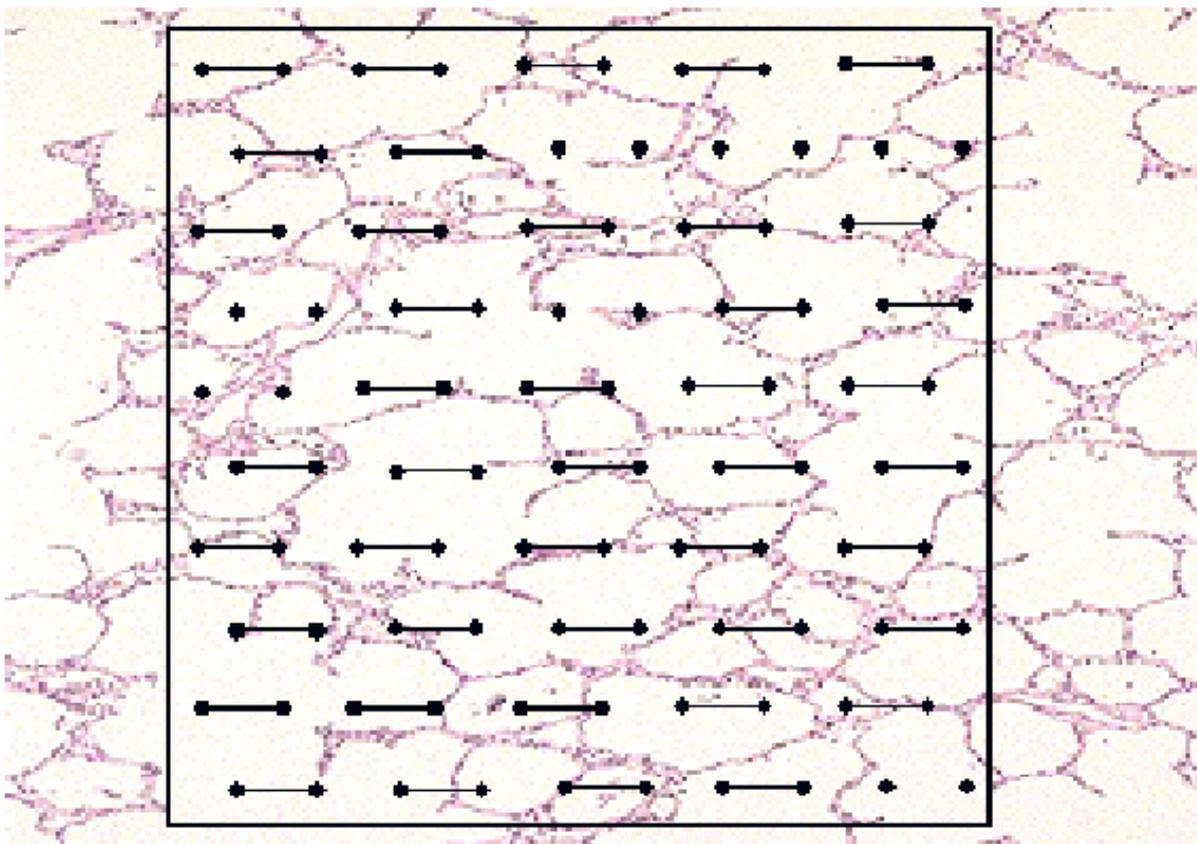


Figura 6 – Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos

3.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores finais foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov (com correção de Lilliefors) para avaliar a normalidade de suas distribuições. A seguir foi aplicado o teste da mediana de Levene, para verificar a homogeneidade de variâncias. Se os dados satisfizessem a ambos, eram aplicados testes paramétricos. No caso de qualquer um deles não ser satisfeito, transformações da variável dependente, como logarítmica ou raiz quadrada, foram empregadas.

As diferenças entre os grupos foram comparadas através da análise de variância de uma via (one-way ANOVA) e, quando múltiplas comparações foram necessárias, utilizou-se o teste de Tukey.

Em todos os testes, o nível de significância foi de 5%.

A análise estatística foi realizada com o programa estatístico SigmaStat 3.11 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EUA).

RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1- COMPOSIÇÃO DAS PARTÍCULAS

O tratamento das partículas de diesel com as substâncias utilizadas no protocolo descrito acima alterou apreciavelmente sua composição, como demonstrado nas tabelas 1 e 2. Em termos de análise de elementos, Ni, S, V, e Pb (Tabela 1) foram os elementos mais afetados pelos diferentes procedimentos de extração, enquanto Fe, Cd, e Cu não foram alterados na mesma magnitude. Interessantemente, após o tratamento com hexano, alguns elementos (S, Ni, Cd, e Cu) apresentaram tendência a aumentar sua concentração, provavelmente como resultado do enriquecimento relativo da fração inorgânica das partículas, devido à remoção de parte da fração orgânica. A quantidade de compostos orgânicos investigados no presente estudo diminuiu com os diferentes procedimentos de extração (Tabela 2), sendo a maior eficiência alcançada no tratamento com hexano.

Tabela 1: Concentração de metais nas partículas de diesel intactas e após o tratamento com diferentes procedimentos de extração.

Metais (ppm)	DEP	MET	HEX	NA
Níquel (Ni)	0.181 ± 0.037	0.140 ± 0.009	0.319 ± 0.014	0.106 ± 0.026
Enxofre (S)	0.626 ± 0.416	0.000 ± 0.000	0.985 ± 0.145	0.000 ± 0.000
Ferro (Fe)	74.556 ± 2.266	82.604 ± 0.785	63.996 ± 0.544	89.311 ± 1.863
Vanádio (V)	0.037 ± 0.013	0.026 ± 0.001	0.016 ± 0.021	0.026 ± 0.034
Chumbo (Pb)	0.050 ± 0.047	0.035 ± 0.016	0.037 ± 0.021	0.010 ± 0.013
Cádmio (Cd)	0.029 ± 0.008	0.128 ± 0.020	0.125 ± 0.044	0.052 ± 0.003
Cromo (Cr)	0.161 ± 0.116	0.156 ± 0.005	0.166 ± 0.023	0.159 ± 0.008
Cobre (Cu)	0.017 ± 0.001	0.075 ± 0.030	0.147 ± 0.008	0.068 ± 0.013

As concentrações de metais nas partículas foram determinadas por um espectrômetro de fluorescência de raio-x. Os valores são expressos como média ± EPM. DEP, partículas de diesel *in natura*; MET, HEX, e NA, partículas tratadas com metanol, hexano e ácido nítrico, respectivamente.

Tabela 2. Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos das partículas de diesel intactas e após os diferentes procedimentos de extração.

HPAs (ng/g)	DEP	MET	HEX	NA
Naftaleno	49,23	ND	ND	ND
Acenaftileno	179,48	5,08	ND	35,79
Fluoreno	683,94	45,75	ND	80,37
Antraceno	94,73	ND	ND	1,43
Pireno	12838,27	631,31	5,90	4457,30
Benzo (a) Antraceno	1162,73	107,23	0,57	346,27
Benzo (b) Fluoranteno	789,93	201,21	ND	749,51
Benzo (k) Fluoranteno	562,28	10,58	0,03	55,80
Benzo (a) Pireno	1642,28	26,42	0,15	68,11

Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) determinada por espectrofotometria de absorção atômica. DEP, MET, HEX e NA representam as partículas não tratadas e aquelas tratadas com metanol, hexano e ácido nítrico, respectivamente. O tratamento com metanol extraiu acenaftileno, fluoreno e pireno. Hexano foi eficiente na remoção de pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno e benzo[a]pireno. O tratamento com ácido nítrico (HNO₃) extraiu todos os HPAs, exceto naftaleno. O antraceno foi o HPA mais eficientemente extraído pelo ácido nítrico.

4.2- TAMANHO DAS PARTÍCULAS

O tratamento das partículas de diesel com as substâncias utilizadas nos protocolos de extração alterou apreciavelmente seus diâmetros médios (medidos por volume e superfície das partículas) e a frequência das partículas por classe de tamanhos,, como demonstrado na tabela 3 nas figuras 7, 8, 9 e 10. Em termos de distribuição do tamanho das partículas, o tratamento com ácido nítrico foi o que mais alterou o diâmetro médio das partículas e sua distribuição, seguido pelo tratamento com metanol. O ácido nítrico removeu grande parte das partículas finas, chegando a um total de 80% de partículas maiores que 10 μm (figura 10) enquanto o tratamento com metanol concentrou 60% do seu total de partículas maiores que 10 μm (Figura 8). O tratamento com hexano foi o que menos alterou o tamanho das partículas, deixando-o muito similar àquele do diesel não tratado.

Tabela 3: Diâmetros médios das partículas de diesel intactas e após o tratamento com diferentes procedimentos de extração.

Diâmetros médios	DEP	MET	HEX	NA
D [4,3]	10,02 μm	16,51 μm	9,44 μm	41,65 μm
D [3,2]	3,60 μm	4,01 μm	2,34 μm	7,24 μm
D (v. 0,1)	1,54 μm	1,57 μm	0,84 μm	3,35 μm
D (v. 0,5)	6,80 μm	12,49 μm	5,28 μm	30,96 μm
D (v. 0,9)	22,60 μm	37,36 μm	24,08 μm	95,49 μm

Os diâmetros médios das partículas foram determinados por difração de laser. D [4,3] é a média da distribuição do tamanho de partículas medida por seu volume. D [3,2] é a média da distribuição do tamanho de partículas medida por sua superfície. D (v. 0,1), D (v. 0,5) e D (v. 0,9) são os diâmetros nos quais 10%, 50% e 90% das partículas se encaixam, respectivamente. Os valores são expressos como média. DEP, partículas de diesel *in natura*; MET, HEX, e NA, partículas tratadas com metanol, hexano e ácido nítrico, respectivamente.

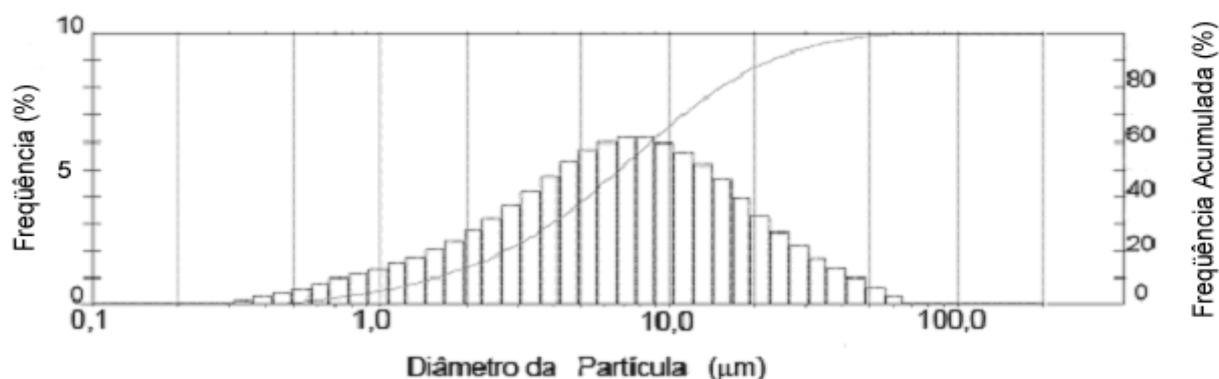


Figura 7 – Histograma representando a frequência de cada classe de diâmetro de partícula. A linha sigmóide contínua representa a frequência acumulada em função do diâmetro das partículas. Análise da granulometria do material particulado proveniente da queima de diesel sem tratamento posterior. A análise foi determinada por difração de laser.

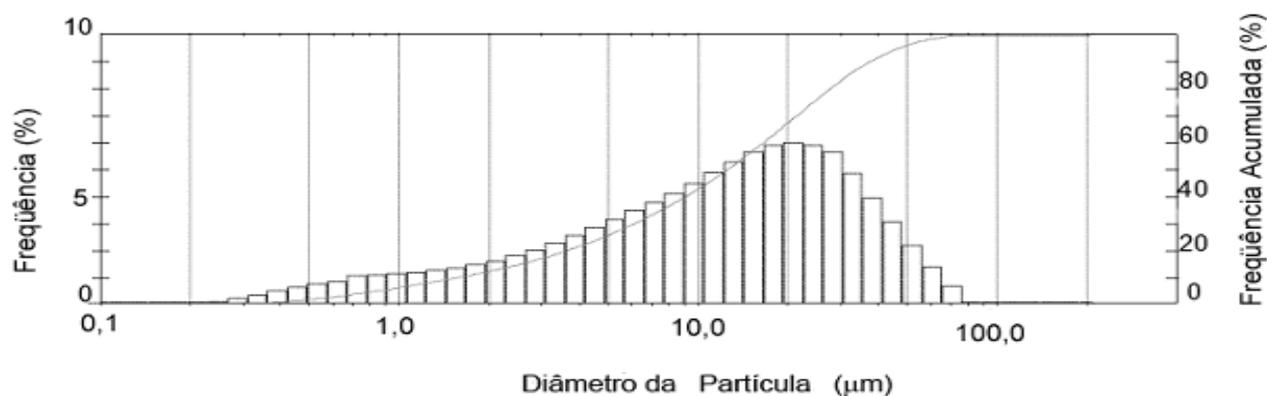


Figura 8 – Histograma representando a frequência de cada classe de diâmetro de partícula. A linha sigmóide contínua representa a frequência acumulada em função do diâmetro das partículas. Análise da granulometria do material particulado proveniente da queima de diesel tratado posteriormente com metanol. A análise foi determinada por difração de laser.

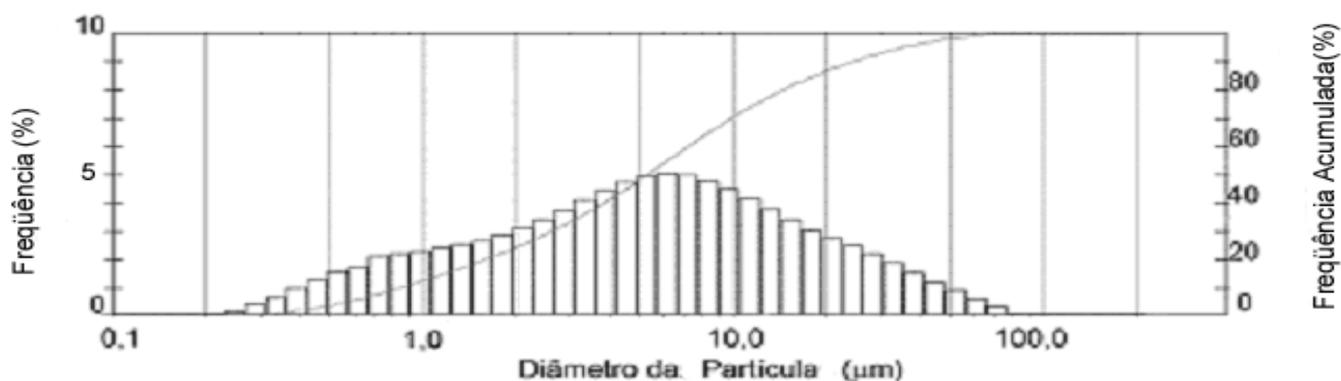


Figura 9 – Histograma representando a frequência de cada classe de diâmetro de partícula. A linha sigmóide contínua representa a frequência acumulada em função do diâmetro das partículas. Análise da granulometria do material particulado proveniente da queima de diesel tratado posteriormente com hexano. A análise foi determinada por difração de laser.

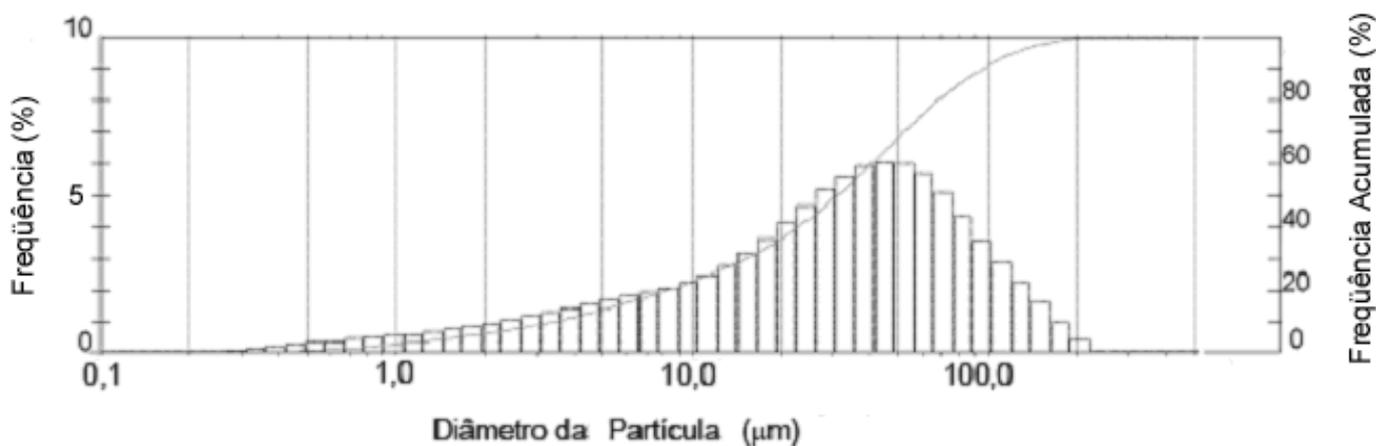


Figura 10 – Histograma representando a frequência de cada classe de diâmetro de partícula. A linha sigmóide contínua representa a frequência acumulada em função do diâmetro das partículas. Análise da granulometria do material particulado proveniente da queima de diesel tratado posteriormente com ácido nítrico. A análise foi determinada por difração de laser.

4.3- MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Os valores de volumes e fluxo utilizados durante o experimento estão mostrados na tabela 4 e não variaram significativamente entre os grupos estudados.

As diferenças entre os parâmetros de mecânica respiratória (Est, ΔE , $\Delta P1$, $\Delta P2$ e ΔP_{tot}) observadas entre os animais do grupo que recebeu salina (CTRL) e os dos grupos que receberam 15 μg de partículas de diesel não tratadas ou tratadas com metanol hexano e ácido nítrico (DEP, MET, HEX e NA) diluídas 10 μL de solução salina estão, representadas na tabela 4 e nas figuras 11 e 12.

A elastância estática aumentou significativamente após a instilação intranasal de partículas de diesel (DEP, $p=0,0001$) quando comparada com camundongos controle. HEX e NA não apresentaram diferença estatística quando comparados com o grupo CTRL e MET. HEX e NA foram diferentes de DEP ($p=0,002$ e $p=0,005$ respectivamente), como mostrado na Tabela 4 e Figura 11.

ΔE , que representa a diferença entre elastância dinâmica e estática, aumentou nos grupos DEP ($p=0,002$), MET ($p=0,001$) e NA ($p=0,032$) quando comparados ao grupo CTRL (Tabela 4 e Figura 11). HEX não demonstrou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo CTRL.

DEP e MET apresentaram maiores valores de pressão utilizados para vencer a resistência das vias aéreas ($p=0,001$ e $p=0,003$ respectivamente), representado por $\Delta P1$, quando comparados com camundongos CTRL, como apresentado na Tabela 4 e Figura 12. A Figura 12 mostra que os tratamentos com DEP, MET e NA apresentaram valores significativamente maiores de pressão utilizada para vencer os componentes de viscoelasticidade/inomogeneidades do pulmão ($p=0,001$, $p=0,001$ e

$p=0,021$ respectivamente), como representado por ΔP_2 , quando comparados a camundongos CTRL.

A resistência pulmonar total (ΔP_{tot}) apresentou aumento de magnitude em todos os tratamentos, exceto HEX, quando comparados ao grupo CTRL ($p<0,05$).

Como regra geral, o tratamento com hexano foi o mais eficiente em reduzir os efeitos adversos promovidos pela inalação de partículas de diesel na mecânica respiratória (Tabela 4 e Figuras 11 e 12).

Tabela 4 – Fluxo aéreo, volume corrente, variações de pressões e elastâncias do pulmão durante ventilação mecânica nos animais dos grupos controle e daqueles que receberam partículas de diesel intactas ou tratadas com metanol, hexano e ácido nítrico.

Grupos	Fluxo (mL/s)	Volume (mL)	Est (cmH ₂ O.mL ⁻¹)	ΔE (cmH ₂ O.mL ⁻¹)	ΔP1 (cmH ₂ O)	ΔP2 (cmH ₂ O)	ΔPtot (cmH ₂ O)
CTRL	1,00 ± 0	0,20 ± 0	21,67 ± 3,50 ^a	5,10 ± 1,28 ^a	0,45 ± 0,18 ^a	1,01 ± 0,24 ^a	1,45 ± 0,38 ^a
DEP	1,00 ± 0	0,20 ± 0	35,24 ± 6,87 ^b	7,42 ± 1,04 ^b	0,79 ± 0,24 ^b	1,49 ± 0,23 ^b	2,28 ± 0,28 ^b
MET	1,00 ± 0	0,20 ± 0	31,00 ± 5,55 ^{a,b,c}	7,84 ± 1,22 ^b	0,81 ± 0,20 ^b	1,56 ± 0,24 ^b	2,37 ± 0,17 ^b
HEX	1,00 ± 0	0,20 ± 0	25,02 ± 4,35 ^{a,c}	6,06 ± 0,87 ^{a,b}	0,63 ± 0,13 ^{a,b}	1,22 ± 0,19 ^{a,b}	1,85 ± 0,16 ^a
NA	1,00 ± 0	0,20 ± 0	26,31 ± 4,03 ^{a,c}	6,90 ± 1,65 ^b	0,66 ± 0,11 ^{a,b}	1,39 ± 0,34 ^b	2,05 ± 0,34 ^b

Est, elastância estática do pulmão; ΔE = componente viscoelástico da elastância dinâmica; ΔP1, ΔP2, pressões dissipadas para vencer a resistência e a viscoelasticidade/inomogeneidades pulmonares, respectivamente; ΔPtot = ΔP1+ ΔP2. Os valores correspondem à média de nove animais em cada grupo tratado e dez animais no grupo controle ± erro padrão da média (10 determinações por animal). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

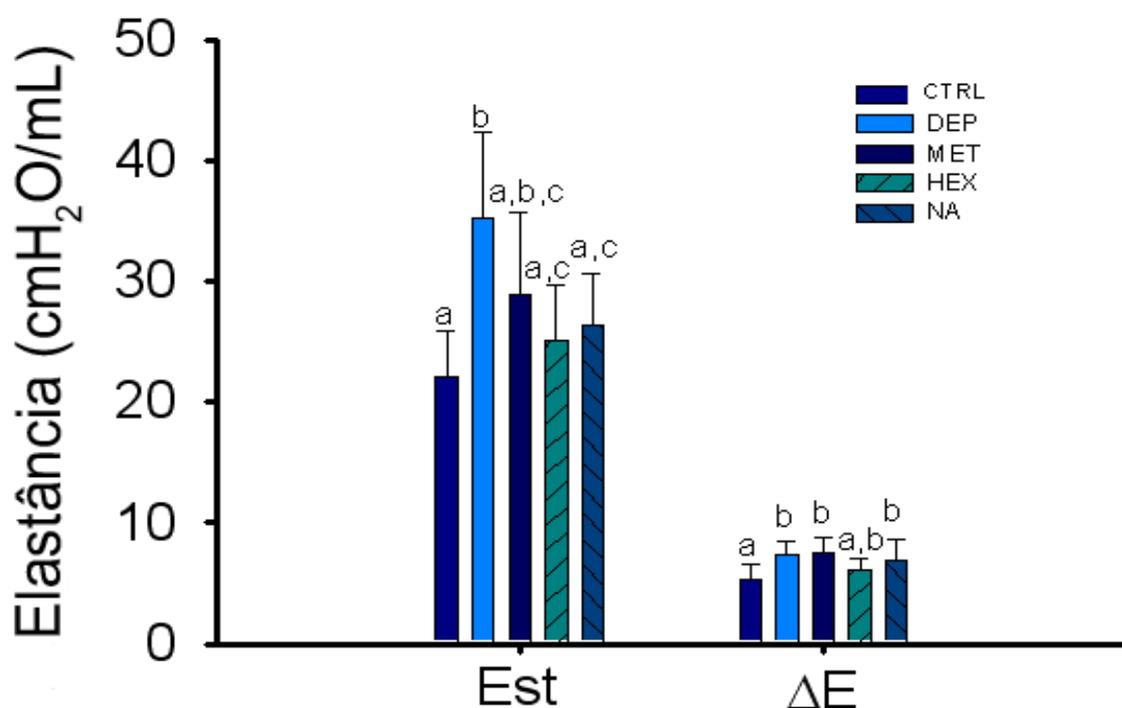


Figura 11 – Elastância estática (Est) e componente viscoelástico da elastância dinâmica do pulmão (ΔE) em camundongos analisados 24 horas após instilação intranasal de salina (CTRL) ou de partículas de diesel intactas (DEP) e tratadas com metanol (MET), hexano (HEX) e ácido nítrico (NA). Valores representam média + EPM de 9-10 animais em cada grupo (10 determinações por animal). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

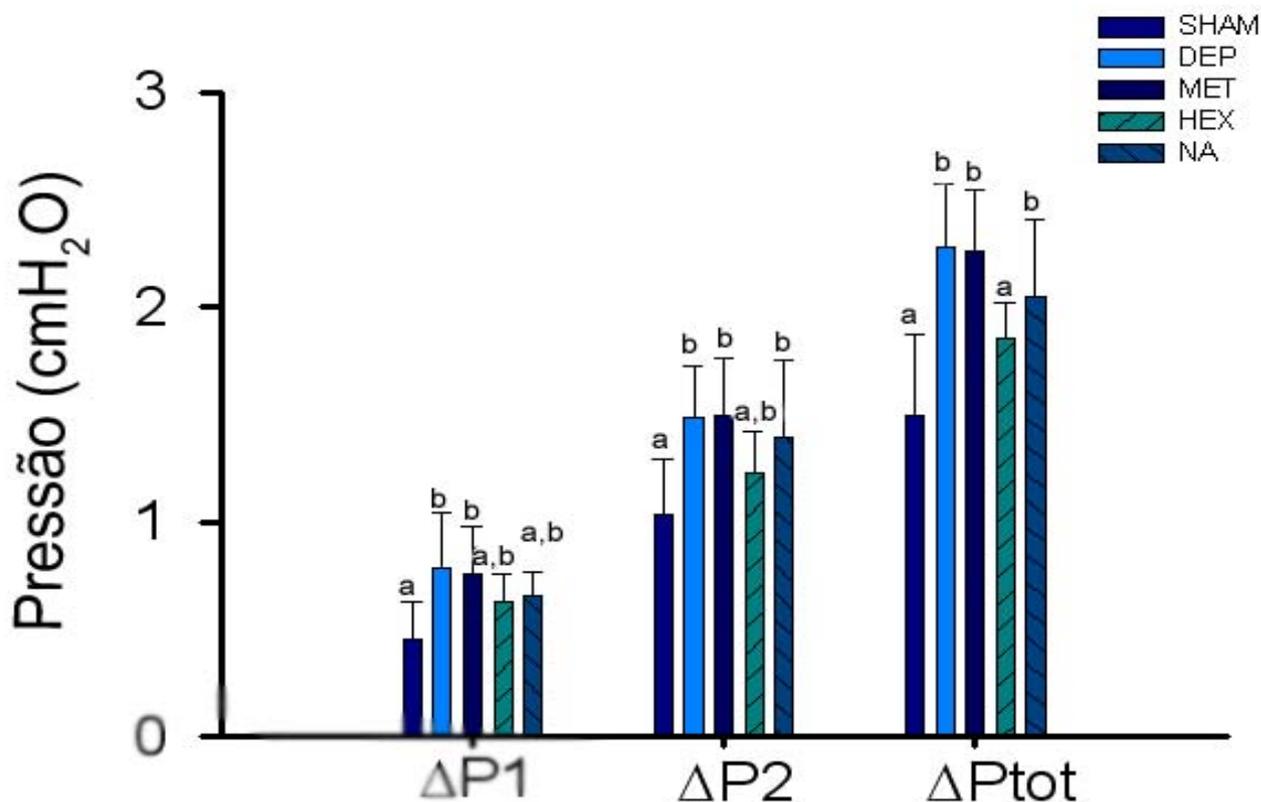


Figura 12 – Pressão viscosa ($\Delta P1$), pressão para vencer os componentes viscoelásticos/inomogêneos ($\Delta P2$) e pressão total (ΔP_{tot}) do pulmão em camundongos analisados 24 horas após instilação intranasal de salina (CTRL) ou de partículas de diesel intactas (DEP) e tratadas com metanol (MET), hexano (HEX) e ácido nítrico (NA). Valores representam média + EPM de 9-10 animais em cada grupo (10 determinações por animal). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

4.4- ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

4.4.1 - Análise Quantitativa e Qualitativa.

Os valores obtidos na análise quantitativa dos grupos CTRL, DEP, MET, HEX e NA encontram-se na tabela 5 e o perfil do parênquima pulmonar para os diferentes materiais particulados utilizados encontram-se na Figura 13. Os valores da Tabela 5 representam a média de 9-10 lâminas por grupo, com a observação de 10 campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. A Figura 13 representa fotomicrografias em aumento de 200x do parênquima pulmonar de animais representativos de cada grupo.

Partículas de diesel intactas (DEP), e partículas tratadas com metanol (MET) e ácido nítrico (NA) aumentaram significativamente a infiltração de células polimorfonucleares e apresentaram uma redução percentual na quantidade de células mononucleares ($p = 0,001$ $p = 0,005$ e $p = 0,001$; respectivamente), quando comparadas ao grupo controle (CTRL), o mesmo achado pode ser observado nas fotomicrografias do parênquima pulmonar, onde o grupo que mais se assemelhou a agressão gerada pelas partículas de diesel intactas foi o grupo das partículas de diesel tratadas com ácido nítrico, seguido pelo grupo de partículas tratadas com metanol, nos três grupos observa-se alvéolos colapsados e septos alveolares edemaciados, confirmando um perfil inflamatório. Por outro lado, partículas tratadas com hexano (HEX) apresentaram um padrão muito similar ao grupo controle, indicando que o tratamento com hexano estaria atenuando a inflamação pulmonar induzida por partículas de diesel.

Tabela 5 – Percentual de células mononucleares e polimorfonucleares por área de tecido pulmonar dos grupos controle (CTRL) e nos grupos que receberam partículas de diesel intactas, tratadas com metanol, hexano e ácido nítrico.

GRUPO	MN (%)	PMN (%)	CEL TOT (%)
CTRL	24,7 ± 2,2 ^a	13,7 ± 2,2 ^a	38,3 ± 3,2
DEP	10,9 ± 0,5 ^b	35,1 ± 3,5 ^b	46,0 ± 3,2
HEX	23,2 ± 6,3 ^a	19,1 ± 4,3 ^c	44,6 ± 5,8
MET	18,4 ± 2,2 ^a	24,1 ± 2,4 ^{b, c}	42,5 ± 2,2
NA	17,3 ± 1,8 ^a	32,6 ± 2,9 ^b	47,6 ± 3,4

Fração de área de tecido ocupada por células. PMN = polimorfonucleares, MN = mononucleares, CEL TOT = celularidade total. Os valores correspondem à média de 10 campos por lâmina de 9-10 animais de cada grupo ± erro padrão da média dos grupos controle (CTRL), partículas de diesel intactas (DEP) e tratadas com metanol (MET), hexano (HEX) ou ácido nítrico (NA). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

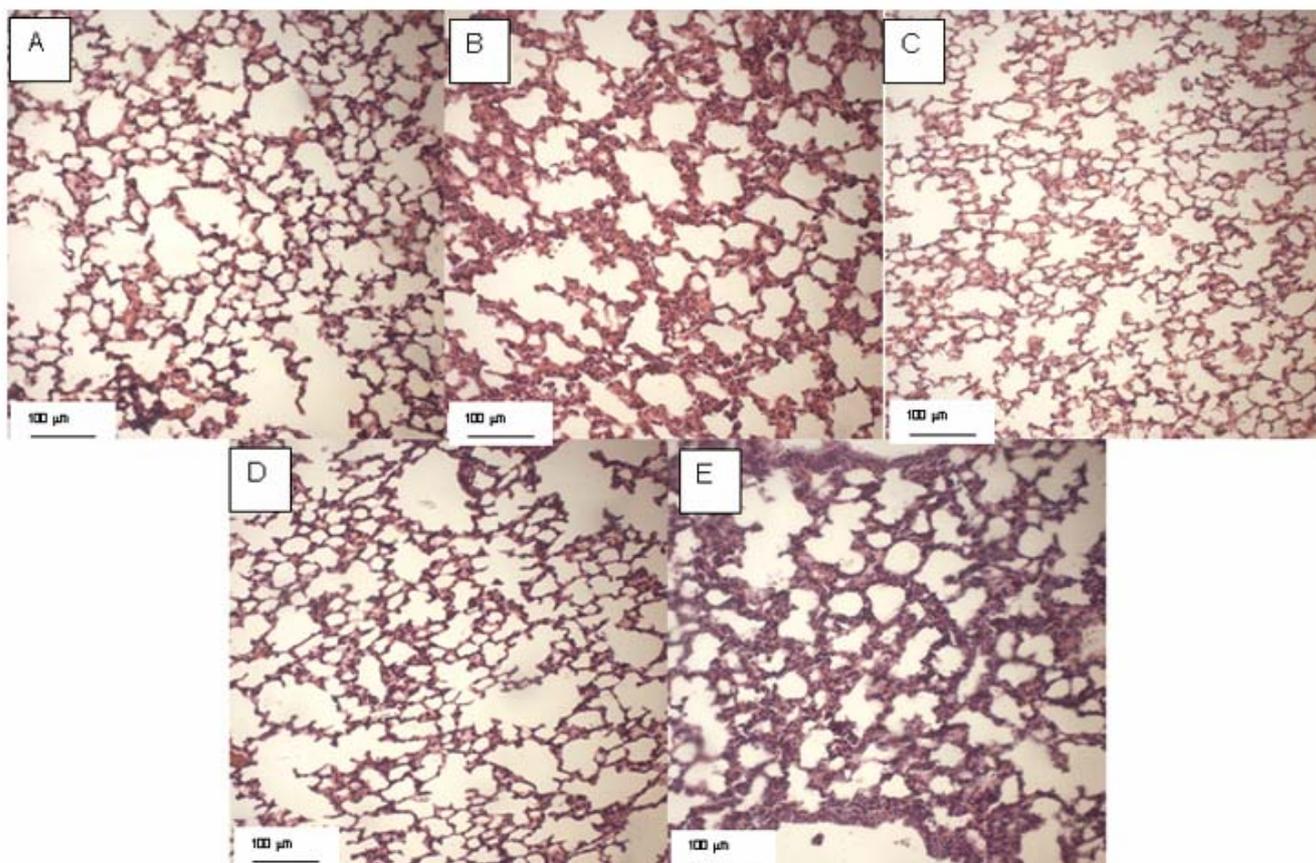


Figura 13. Fotomicrografias do parênquima pulmonar corado com hematoxilina-eosina. Pulmões representativos de animais que receberam solução salina (painel A), partículas de diesel in natura (painel B), e partículas de diesel pré-tratadas com metanol, hexano e ácido nítrico (painéis C, D e E, respectivamente). Aumento original = 200x

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

A poluição atmosférica, mesmo com valores abaixo dos níveis recomendados pelos órgãos responsáveis, tem sido associada ao decréscimo da função pulmonar e das taxas de pico de fluxo, além de aumento na ausência de estudantes nas escolas em indivíduos normais (Farhat e cols., 2005; Hong e cols., 2007; MacNee & Donaldson, 2000; Martins e cols., 2002; Pope e cols., 1995; Schenker, 1993; Souza e cols., 1998). Além disso, podem-se observar alterações no sistema imunológico desses indivíduos, com redução do “clearance” mucociliar (Jiang e cols., 2000; Machione e cols., 1999).

O estudo dos efeitos da poluição atmosférica no parênquima pulmonar de seres humanos torna-se difícil ou senão impraticável devido a necessidade de mediadas invasivas. No entanto, é possível obter-se fragmentos de tecido pulmonar a partir de ressecções durante procedimento cirúrgico ou pulmões inteiros em autópsias de indivíduos expostos à poluição atmosférica, com o objetivo de estudar a influência da composição, o tempo e o grau de exposição sobre a estrutura e função pulmonares (Martins e cols., 2002; Souza e cols., 1998). Porém, esse tipo de estudo ainda não é realizado de forma sistemática. Além disso, estudos com humanos apresentam diversas variáveis difíceis de controlar, fatores como idade e consumo de cigarros poderiam impedir a análise precisa das conseqüências da poluição atmosférica sobre o parênquima pulmonar.

A escolha da espécie animal, dentre as diversas disponíveis para a pesquisa experimental é um passo importante para a correta interpretação dos resultados. Como regra geral, a espécie filogeneticamente mais próxima à humana possui a

melhor correlação clínica e a possibilidade de controlar as variáveis ambientais, sociais e patológicas em animais de experimentação justificou, no nosso experimento, a escolha de pequenos animais. Por esse motivo trabalhamos com camundongos BALB/c, os quais, além de permitirem uma adequada avaliação dos mediadores inflamatórios e serem bastante presentes em experimentos com inalação de partículas a curto e longo prazo, não necessitam de um período muito longo de tempo para se encontrarem em condições experimentais após o nascimento.

Como havia um grupo que inalava salina além dos grupos que inalavam material particulado proveniente da combustão de óleo diesel, tratado ou não, e ambos estavam expostos às mesmas condições cirúrgicas e ventilatórias, podemos admitir que as alterações encontradas foram decorrentes exclusivamente do procedimento realizado e não de uma interferência causada pelo tipo de preparação.

Utiliza-se amplamente o modelo experimental com material particulado, entre eles o proveniente da combustão de diesel para fins de estudo da lesão inflamatória pulmonar, pois se mostra capaz de mimetizar alterações morfológicas e funcionais encontradas em situações clínicas desencadeadas pela exposição à poluição atmosférica, com efeitos lesivos no sistema biológico (Campen e cols., 2002; Hougaard e cols., 2008 ; Nurkiewicz e cols., 2008; Takano e cols., 1997, Laks e cols., 2008; Takenaka e cols., 2004).

O material particulado proveniente da combustão do óleo diesel constitui parte do material particulado complexo, emitido por veículos automotivos, mostra uma composição rica em metais e componentes orgânicos. É considerada uma partícula fina, com diâmetro aerodinâmico menor do que 2,5 μm e capaz de formar agregados de partículas de maiores tamanhos. Sendo assim, permanece no ar por longo

tempo, podendo, também, depositar-se nas vias aéreas distais (Behndig e cols., 2006; Japar, 1995).

O material particulado utilizado no presente estudo foi coletado diretamente do cano de descarga de seis ônibus circulantes na cidade de São Paulo após um dia rotineiro de operação. A dose utilizada de partículas (10 μ L i.n. de solução a 15 μ g/mL) foi inferior aos níveis máximos recomendados pelos órgãos competentes. Em nosso modelo experimental, estes níveis foram, teoricamente um pouco abaixo do que seria depositado nos pulmões ao longo de 24 horas em uma cidade com as características de São Paulo, que exhibe uma média de concentração anual de $PM_{2,5}$ de aproximadamente 20 μ g/m³.

O presente estudo visou modificar a composição das partículas provenientes da combustão do óleo diesel, utilizando diferentes procedimentos de extração, tentando associar alterações no perfil químico das partículas a indicadores correspondentes da toxicidade respiratória. Como demonstrado nas Tabelas 1 e 2, os tratamentos utilizados com diferentes substâncias foram efetivos em modificar a composição e até mesmo a distribuição das classes de tamanho das partículas.

Administramos doses ambientalmente relevantes de partículas de partículas de diesel (15 μ g por instilação intranasal), pois doses maiores poderiam promover alterações pulmonares devido a um *overload* de partículas, que poderia mascarar a caracterização dos efeitos gerados por diferentes composições de partículas. Mais especificamente, espera-se que altas doses de partículas no espaço alveolar desencadeiem resposta inflamatória independentemente do seu perfil químico (WHO, 2004).

As características das partículas utilizadas no presente estudo dependem, do ciclo de direção e operação dos ônibus utilizados, que por sua vez, dependem das

condições de tráfego e perfil do motorista. Mais ainda, a tecnologia do motor e as características do combustível utilizado como fonte para a obtenção das partículas utilizadas provavelmente refletem a situação padrão das frotas de ônibus operantes em países em desenvolvimento. Assim, os efeitos adversos encontrados após a instilação de partículas intactas de diesel não representam o potencial tóxico do diesel utilizando a tecnologia de ponta presente hoje, mas provavelmente, indicam as consequências do uso de combustível abaixo dos padrões estabelecidos para países desenvolvidos, combinado a motores de baixa tecnologia (Leung & Harrison, 1999).

As partículas em suspensão foram administradas nos camundongos por instilação intranasal. Esse procedimento afeta não apenas a distribuição do tamanho das partículas, mas também o padrão de deposição das mesmas. Entretanto, essa estratégia nos permitiu realizar os procedimentos de extração química sem a necessidade de coletar grandes quantidades de partículas, o que implicaria em maior tempo de coleta e na possibilidade de modificação do perfil químico das partículas durante a coleta. Dessa forma, nossos resultados podem não refletir de forma precisa as interações das partículas com o sistema respiratório quando administradas por aerossol, mas mostra-se conveniente para conduzir estudos comparativos de toxicidade das partículas.

Baixas doses de partículas de diesel intactas promovem alterações significativas no parênquima pulmonar, como demonstrado por dois indicadores independentes: mecânica respiratória e histologia pulmonar.

Para o estudo da mecânica respiratória, decidimos utilizar o método de oclusão ao final da inspiração. Diferentes técnicas foram desenvolvidas para a análise da mecânica respiratória, porém o método de oclusão das vias aéreas ao

final da inspiração nos possibilita medir as propriedades elásticas, resistivas e viscoelásticas do sistema respiratório e seus componentes (Bates e cols., 1985b; 1988; Broseghini e cols, 1988; Eissa e cols, 1992; Kochi e cols., 1988a e 1988b; Peseti e cols, 1991; Ranieri e cols, 1994; Saldiva e cols., 1992; Similowski e cols., 1989; Tantucci e cols, 1992).

Por estarmos trabalhando com camundongos, não dividimos o sistema respiratório em seus componentes de parede torácica e sistema respiratório, pois retiramos a porção anterior do gradil costal. Portanto, avaliamos os componentes resistivo, elástico e viscoelástico pulmonares. Sem a remoção da parede torácica anterior, é necessário o uso de cateter esofageano para determinar a variação da pressão intrapleural e, através da aferição concomitante da pressão traqueal, calcular a pressão transpulmonar (Bates e cols., 1985b; 1988; Zin e cols., 1983).

Estudos prévios mostraram que a toracotomia influi sobre a mecânica respiratória, descrito aumento da elastância e da resistência tecidual pulmonar e da parede torácica, porém a elevação da resistência pode ser prevenida pelo uso de pressão positiva ao final da expiração (PEEP). As alterações mecânicas, nesse caso, decorrem da movimentação do diafragma e do gradil costal, levando à compressão da base pulmonar com conseqüente atelectasia (Rodrigues e cols., 1993). Todavia, as modificações mecânicas citadas acima são evitadas pela remoção de toda a parede torácica anterior, como no presente estudo.

A fim de evitar o colapso pulmonar e a geração de áreas de atelectasia, a utilização da PEEP se torna imprescindível. Durante a anestesia, há formação de áreas de atelectasia com conseqüente redução da capacidade residual funcional (CRF) (Hedenstierna, 1990; Powers e cols., 1973). O uso de PEEP pode levar a um aumento do volume pulmonar, relacionado a uma melhor oxigenação (Berend e

cols., 1982). A aplicação de PEEP leva a pelo menos três conseqüências fisiológicas individualizadas: aumento no número de alvéolos ventilados, alteração do débito cardíaco e redistribuição do fluxo sanguíneo pulmonar (Powers e cols., 1973). A utilização de PEEP é capaz de alterar por si só os parâmetros da mecânica respiratória, reduzindo a resistência e a elastância do pulmão e a elastância da parede torácica, porém não afeta o comportamento dinâmico dos tecidos (D'Angelo e cols., 1989). A resistência pulmonar representa principalmente a resistência das vias aéreas, que diminui com o aumento do volume pulmonar, a queda dessa resistência com o uso de PEEP provavelmente se deve a um aumento do diâmetro das vias aéreas secundário ao incremento do volume pulmonar. A redução da elastância pulmonar pode ser explicada por vários fatores, entre eles a abertura de pequenas vias aéreas e/ou eliminação de atelectasias (D'Angelo e cols., 1992).

No presente trabalho o nível de PEEP utilizado foi de aproximadamente 2 cmH₂O, sendo apenas o necessário para evitar o colapamento das vias aéreas e manter a CRF fisiológica (Saldiva e cols., 1992). Mais ainda, os efeitos provocados pela utilização da PEEP atenuam-se na presença de tórax aberto. Isso se deve ao fato de que sem a parede torácica não há redução dos fluxos sanguíneos devida a compressão da veia cava e da aorta.

Este método permite observar as alterações em ΔP_{tot} , que refletem as modificações nos componentes resistivos e viscoelásticos e/ou inomogêneos pulmonar. ΔP_1 reflete a pressão dissipada para vencer a resistência de vias aéreas centrais e o componente viscoso de pulmão (Similowski e cols., 1989). ΔP_2 está relacionada ao relaxamento da tensão ("stress relaxation") do tecido pulmonar (Bates e cols., 1988; D'Ângelo e cols., 1989; Saldiva e cols., 1992). Este método tem sido amplamente utilizado, permitindo a avaliação da mecânica respiratória em

animais e seres humanos anestesiados (D'Angelo e cols, 1989; 1994; Saldiva e cols, 1987), em procedimentos cirúrgicos (Auler e cols., 1987; Moreira e cols., 1997; Rodrigues e cols., 1993; Zin e cols., 1989), assim como em diferentes modelos experimentais que mimetizam afecções encontradas na prática hospitalar (Auler e cols., 1987; Moreira e cols., 1997).

As influências das variações de V , V' e duração da inspiração sobre os parâmetros de mecânica, foram evitadas em nossos experimentos pela utilização de V e V' aproximadamente iguais, não contribuindo, assim, para as diferenças mecânicas encontradas. Similowski e colaboradores (Similowski e cols., 1989) relataram que os valores das resistências observadas durante a insuflação com fluxo constante dependem, na realidade, da duração da inspiração, corroborando assim nossa assertiva.

No presente trabalho, houve incremento do componente elástico do pulmão, refletido na elastância estática (E_{st}) e no Δ representativo do componente viscoelástico do pulmão (ΔE), principalmente nos grupos que receberam partículas com maior concentração de elementos orgânicos (Figuras 11 e 12). Esse aumento pode ser resultado de alterações estruturais no pulmão decorrentes da inflamação, como demonstra o aumento de infiltrado de células polimorfonucleares (Tabela 5).

O componente viscoelástico (ΔP_2) também se mostrou alterado nos grupos que receberam partículas com maiores concentrações de elementos orgânicos. Essas alterações podem ser atribuídas a um maior aporte de células inflamatórias que estariam gerando modificações estruturais no pulmão (Tabela 5).

O aumento de ΔP_1 (Figura 12) reflete elevação da resistência das vias aéreas (Bates e cols., 1988b; Saldiva e cols., 1992). Somente os animais que receberam partículas de diesel intactas e tratadas com metanol apresentaram alteração nesse

parâmetro, sugerindo que elementos orgânicos de polaridade intermediária não estão diretamente relacionados aos efeitos tóxicos das partículas.

Aumentos significativos, tanto em $\Delta P1$ quanto em $\Delta P2$ geram um aumento de ΔP_{tot} (Figura 12). Somente o grupo HEX não apresentou diferenças para o grupo controle nesse parâmetro, demonstrando que a remoção de elementos orgânicos de polaridades extremas estão intimamente relacionados a toxicidade da partícula de diesel no cenário brasileiro.

Os achados de celularidade no presente estudo corroboram as alterações mecânicas encontradas, demonstrando que partículas com menor concentração de elementos orgânicos desencadeiam menor resposta inflamatória e conseqüentemente menores alterações estruturais no pulmão.

As alterações observadas foram indicativas de lesão tanto nas vias aéreas quanto nos espaços aéreos distais, como demonstrado nas Figuras 11 e 12 e na Tabela 5, confirmando que partículas de diesel presentes no cenário de países em desenvolvimento exibem um potencial tóxico importante.

Dentre os diferentes procedimentos de extração utilizados, as partículas de diesel tratadas com hexano apresentaram o menor efeito tóxico. Como esperado, elas continham a menor concentração de PAHs mensurada, como demonstrado na Tabela 2. Metanol, um solvente que extrai compostos orgânicos de polaridade intermediária, não influenciou substancialmente a toxicidade das partículas. Nossos achados indicam que compostos orgânicos de baixa polaridade desempenham papel fundamental na determinação da toxicidade das partículas. A Figura 13 mostra que a administração de partículas tratadas com hexano resultou em um perfil do parênquima pulmonar similar ao do grupo controle, partículas tratadas com metanol não produziram alterações substanciais, e os efeitos deletérios das partículas

inaladas puderam ser facilmente percebidos com administração de partículas de diesel intactas e partículas tratadas com ácido nítrico. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos provenientes de material particulado urbano também foram associados com mutagênese e aberrações cromossomais (Somers e cols., 1992, Bocskay e cols., 2005).

Em nosso estudo, os metais e o enxofre afetaram a toxicidade das partículas em menor intensidade quando comparados com compostos orgânicos (Figuras 11 e 12 e Tabela 5). As concentrações relativas de metais e enxofre tiveram a mesma ou maior ordem de magnitude após a extração com hexano (Tabela 1). Esses achados não estão de acordo com o papel conhecido dos metais na determinação da toxicidade das partículas. Gurgueira e cols, 2002 demonstraram que ratos expostos à fuligem da queima de óleo (ROFA) apresentaram elevados níveis de estresse oxidativo no coração e nos pulmões, e isso estava fortemente associado com a fração metálica dessas partículas. Gavett e cols, 2003, demonstraram que o conteúdo metálico do material particulado aumentou a responsividade das vias aéreas de camundongos com doença alérgica induzida nas vias aéreas, especialmente zinco, magnésio, chumbo, cobre, cádmio e arsênico. O pequeno efeito dos metais e enxofre na modulação da toxicidade das partículas observado em nosso caso pode ser resultado de características intrínsecas das partículas utilizadas no presente estudo. Óleo diesel de baixa qualidade e a combustão incompleta devido à ausência de controle eletrônico da injeção de combustível resultou em maiores concentrações de compostos orgânicos. (Khan e cols, 2006), Assim, é possível que a natureza e a quantidade de moléculas orgânicas na nossa amostra prevaleceu na toxicidade das partículas, deixando menos espaço para os metais desempenharem seu efeito tóxico.

A exposição à poluição atmosférica altera o comportamento mecânico do sistema respiratório, uma vez que a morfologia do espaço aéreo sofre modificações.

CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

- O presente estudo foi o primeiro a relacionar a composição das partículas a alterações na mecânica respiratória e histologia pulmonar de indivíduos submetidos a doses ambientais de partículas provenientes da combustão do óleo diesel. A instilação intranasal de DEP acarretou alteração do componente viscoso e do componente viscoelástico e/ou inhomogêneo e resistivo do pulmão no período de 24 horas em camundongos BALB/c, sendo esse efeito atenuado quando a fração orgânica das partículas era removida.

- Os achados de microscopia óptica do parênquima pulmonar corroboram as alterações da mecânica pulmonar. O aumento da celularidade, principalmente o infiltrado de células polimorfonucleares indica inflamação, que poderia causar alterações estruturais no pulmão.

- Foram encontrados vários tipos de metais na amostra de diesel, porém as concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes na nossa amostra foram os principais responsáveis pelos efeitos deletérios observados. Acreditamos que a grande concentração de elementos orgânicos tenha impedido que os metais desempenhassem seu papel inflamatório.

REFERÊNCIAS

VII - REFERÊNCIAS

ADAMSON, IY. PRIEDITIS, H. HEDGECOCK, C. VINCENT, R. Zinc is the toxic factor in the lung response to an atmospheric particulate sample. **Toxicol Appl Pharmacol.** 166:111-9, 2000.

AULER-JR., J.O.; ZIN, W.A.; CALDEIRA, M.P.; CARDOSO, W.V.; SALDIVA, P.H. Pre- and postoperative inspiratory mechanics in ischemic and valvular heart disease. **Chest**, 92: 984-990, 1987.

BATES, J.H.T.; DECRAMER, M.; CHARTRAND, D.; ZIN, W.A.; BÖDDENER, A.; MILIC-EMILI, J. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. **J. Appl. Physiol.**, 59: 732-737, 1985a.

BATES, J.H.T.; ROSSI, A.; MILIC-EMILI, J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiration flow. **J. Appl. Physiol.**, 58: 1840-1848, 1985b.

BATES, J.H.T.; LUDWIG, M.S.; SLY, P.D.; BROWN, K.; MARTIN, J.G.; FREDBERG, J.J. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. **J. Appl. Physiol.**, 65: 408-414, 1988.

BATES, J.H.T.; ABE, T.; ROMERO, P.V.; SOTO, J. Measurement of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. **J. Appl. Physiol.**, 67: 488-492, 1989.

BARNAS, G.M.; YOSHINO, K.; LORING, S.H.; MEAD, J. Impedance and relative displacement of relaxed chest wall up to 4 Hz. **J. Appl. Physiol.**, 62: 71-81, 1987.

BEHNDIG AF, MUDWAY IS, BROWN JL, STENFORS N, HELLEDAY R, DUGGAN ST, WILSON SJ, BOMAN C, CASSEE FR, FREW AJ, KELLY FJ, SANDSTRÖM T, BLOMBERG A. Airway antioxidant and inflammatory responses to diesel exhaust exposure in healthy humans. **Eur Respir J.**, 27:359-65, 2006.

BENNETT, W.D.; ZEMAN, K.; KIM, C. Variability of fine particle deposition in healthy adults: effect of age and gender. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 153: 1641-1647, 1996.

BEREND, N.; CHRISTOPHER, K.L.; VOELKEL, N.F. The effect of positive end expiratory pressure on functional residual capacity. Role of prostaglandin production. **Am. Rev. Resp. Dis.**, 126: 646-647, 1982.

BOCSKAY, K.A. TANG, D; ORJUELA, M.A; LIU, X; WARBURTON, D.P; PERERA, F.P. Chromosomal aberrations in cord blood are associated with prenatal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 14:506-11, 2005.

BROSEGHINI, C.; BRANDOLESE, R.; POGGI, R.; POLESE, G.; MANZIN, E.; MILIC-EMILI, J.; ROSSI, A. Respiratory resistance and intrinsic positive end-expiratory pressure (PEEP) in patients with the adult respiratory distress syndrome (ARDS). **Eur. Respir. J.**, 1: 726-731, 1988.

BROWN, J.S.; ZEMAN, K.L.; BENNETT, W.D. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 166: 1240-1247, 2002.

BRUNEKREEF, B. & HOLGATE, S.T. Air pollution and health. **Lancet**, 360: 1233-1242, 2002.

BRUSASCO, V.; WARNER, D.O.; BECK, K.C.; RODOARTE, J.R.; REHDER, K. Partitioning of pulmonary resistance in dogs: effect of tidal volume and frequency. **J. Appl. Physiol.**, 66: 1190-1196, 1989.

CAMPEN, M.; NOLAN, J.P.; SCHLADWEILER, M.C.J.; KODAVANTI, U.P.; COSTA, D.L.; WATKINSON, W.P. Cardiac and thermoregulatory effects of instilled particulate matter-associated transition metals in healthy and cardiopulmonary-compromised rats. **J. Toxicol. Environ. Health**, 65: 1615-1631, 2002.

CHANG, H.K. & MORTOLA, J.P. Fluid dynamics factors in tracheal pressure measurement. **J. Appl. Physiol.**, 51: 218-225, 1981.

CHURG, A. & BRAUER, M. Human lung parenchyma retains PM_{2.5}. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 155: 2109-2111, 1997.

COSTA, D.L. DREHER, K.L. Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and compromised animal models. **Environ Health Perspect.** 105:1053-60, 1997.

D'ANGELO, E.; SANT'AMBROGIO, G.; AGOSTONI, E. Effect of diaphragm activity or paralysis on distribution of pleural pressure. **J Appl. Physiol.**, 37: 311-315, 1974.

D'ANGELO, E.; CALDERINI, E.; TORRI, G.; ROBATTO, F.M.; BONO, D.; MILIC-EMILI, J. Respiratory mechanics in anesthetized paralysed humans: effects of flow, volume, and time. **J. Appl. Physiol.**, 67: 2556-2564, 1989.

D'ANGELO, E.; CALDERINI, E.; TAVOLA, M.; BONO, D.; MILIC-EMILI, J. Effect of PEEP on respiratory mechanics in anesthetized paralyzed humans. **J. Appl. Physiol.**, 73: 1736-1742, 1992.

D'ANGELO, E.; PRANDI, E.; TAVOLA, M.; CALDERINI, E.; MILIC-EMILI, J. Chest wall interrupter resistance in anesthetized paralyzed humans. **J. Appl. Physiol.**, 77: 883-887, 1994

DOCKERY, DW. POPE, CA. XU, X. SPENGLER, JD. WARE, JH. FAY, ME. FERRIS, BG. SPEIZER, FE. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. **N Engl J Med.** 329:1753-9, 1993.

DON, H.F. & ROBSON, J.G. The mechanics of the respiratory system during anesthesia. **Anesthesiology**, 26: 168-178, 1965.

DORRINGTON, K.L. The theory of viscoelasticity in biomaterials. In: **The mechanical properties of biological materials** (XXXIV Symposium of the Society for Experimental biology). Cambridge: Cambridge University Press, p.289-314, 1980.

DUSSELDORP, A.; KRUIZE, H.; BRUNEKREEF, B.; HOFSCHEUDER, P.; MEER, G.; VAN OUDVOSRT, A.B. Associations of PM10 and airborne iron with respiratory health of adults living near a steel factory. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 152: 1932-1939, 1995.

EISSA, N.T.; RANIERI, V.M.; CORBEIL, C.; CHASSÉ, M.; BARIDY, J.; MILIC-EMILI, J. Effect of PEEP on the mechanics of the respiratory system in ARDS patients. **J. Appl. Physiol.**, 73:1728-35, 1992.

EPA. Consulta na página da internet da Agência de Proteção Ambiental Americana. www.epa.gov.

FARHAT, S.C.L.; PAULO, R.L.P.; SHIMODA, T.M.; CONCEIÇÃO, G.M.S.; LIN, C.A. BRAGA, A.L.F.; WARTH, M.P.N.; SALDIVA, P.H.N. Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 38: 227 – 235, 2005.

FRANCK, U. & HERBARTH, O. Using scanning electron microscopy for statistical characterization of the diameter and shape of airborne particles at an urban location. **Environ. Toxicol.**, 17: 98-104, 2002.

GALÁN, I.; TOBÍAS, A.; BANEGAS, J.R.; ARÁNGUEZ, E. Short-term effects of air pollution on daily asthma emergency room admissions. **Eur. Respir. J.**, 22: 802-808, 2003.

GAVETT, SH. HAYKAL-COATES, N. COPELAND, LB. HEINRICH, J. GILMOUR, MI. Metal composition of ambient PM2.5 influences severity of allergic airways disease in mice. **Environ Health Perspect.** 111:1471-7, 2003.

GONÇALVES, F.L.T.; CARVALHO, L.M.V.; CONDE, F.C.; LATORRE, M.R.D.O.; SALDIVA, P.H.N.; BRAGA, A.L.F. The effects of air pollution and meteorological parameters on respiratory morbidity during the summer in São Paulo City. **Environ. Res.**, 31: 343– 349, 2005.

GUNDERSEN, H.J.G.; BENDTSEN, T.F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F.B.; VESTERBY, A. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**; 96: 379-94, 1988.

GURGUEIRA, S.A; LAWRENCE, J; COULL, B; MURTHY, G.G; GONZÁLEZ-FLECHA, B. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. **Environ Health Perspect.** 110:749-55, 2002.

HANTOS, Z.; DAROCZY, B.; SUKI, B.; GALGOCZY, G.; CSENDES, T. Forced oscillatory impedance of the respiratory system at low frequencies. **J. Appl. Physiol.**, 60: 123-132, 1986.

HANTOS, Z.; DAROCZY, B.; SUKI, B.; NAGY, S. Low frequency respiratory mechanical impedance in the rat. **J. Appl. Physiol.**, 63: 36-43, 1987.

HEDENSTIERNA, G. Gas Exchange during anaesthesia. **Br. J. Anaesth.**, 64: 507-514, 1990.

HILDEBRANT, J. Pressure-volume data of cat lung interpreted by a plastoelastic, linear viscoelastic model. **J. Appl. Physiol.**, 28: 365-372, 1970.

HIURA, TS. KASZUBOWSKI, MP. LI, N. NEL, AE. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. **J Immunol.** 163:5582-91, 1999.

HONG, Y-C.; HWANG, S-S.; KIM, J.H.; LEE, K-H.; LEE, H-J.; LEE, K-H.; YU, S-D.; KIM., D-S. Metal in particulate pollutants affect peak expiratory flow of schoolchildren. **Environ. Health Perspect.**, 115: 430-434, 2007.

HORI, T. & HILDEBRANDT, J. Dynamic compliance, limit cycles, and static equilibrium of excised cat lung. **J. Appl. Physiol.**, 31: 423-430, 1971.

HOUGAARD KS, JENSEN KA, NORDLY P, TAXVIG C, VOGEL U, SABER AT, WALLIN H. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice. **Part Fibre Toxicol.**, 5:3 (PMID: 18331653), 2008.

JAPAR, S.M. Motor vehicles and particulate air pollution 1995: an overview. *In*: particulate matter: health and regulatory issues VIP-49. Pittsburgh, PA, air and waste management association, pp. 577-598, 1995.

JIANG, N.; DREHER, K.L.; DYE, J.A.; LI, Y.; RICHARDS, J.H.; MARTIN, L.D.; ADLER, K.B. Residual oil fly ash induces cytotoxicity and mucin secretion by guinea pig tracheal epithelial cells via an oxidant-mediated mechanism. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 163: 221-230, 2000.

KHAN, A.B; CLARK, N.N; THOMPSON, G.J; WAYNE, W.S; GAUTAM, M; LYONS, D.W; HAWELTI, D. Idle emissions from heavy-duty diesel vehicles: review and recent data. **J Air Waste Manag Assoc.** 56:1404-19, 2006.

KOCHI, T.; OKUBO, S.; ZIN, W.A.; MILIC-EMILI, J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. **J. Appl. Physiol.**, 64: 441-450, 1988a.

KOCHI, T.; OKUBO, S.; ZIN, W.A.; MILIC-EMILI, J. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects on flow and volume. **J Appl Physiol.**, 64: 2636-2646, 1988b.

LAKS D, DE OLIVEIRA RC, DE ANDRE PA, MACCHIONE M, LEMOS M, FAFTE D, SALDIVA PH, ZIN WA. Composition of Diesel Particles Influences Acute Pulmonary Toxicity: An Experimental Study in MICE. **Inhal Toxicol.**, 4:1 (in process), 2008.

LEUNG, PL. HARRISON, RM. Roadside and in-vehicle concentrations of monoaromatic hydrocarbons. **Atmospheric Environment**, 33:191–204, 1999.

LI, X.Y.; GILMOUR, P.S.; DONALDSON, K.; MACNEE, W. Free-radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air-pollution (PM10) in-vivo and in-vitro. **Thorax**, 51: 1216-1222, 1996.

LI, N. WANG, M. OBERLEY, TD. SEMPFF, JM. NEL, AE. Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. **J Immunol.** 169:4531-41, 2002.

LIN, C.A.; PEREIRA, L.A.A.; NISHIOKA, D.C.; CONCEIÇÃO, G.M.S.; BRAGA, A.L.F.; SALDIVA, P.H.N. Air pollution and neonatal deaths in São Paulo, Brazil. **Braz. Journal Med. Biol. Res.**, 37: 765-770, 2004.

LOGAN, W.P.D. Mortality in the London fog incident. **Lancet**, 264: 336-338, 1952.

LORING, S.H.; ELLIOT, E.A.; DRAZEN, J.M. Kinetic energy loss and convective acceleration in respiratory resistance measurements. **Lung**, 156:33-42, 1979.

MACEDO-NETO, A.; SANTOS, L.V.; MENEZES, S.L.; PAIVA, D.S.S.; ROCCO, P.R.M.; ZIN, W.A. Respiratory mechanics after prosthetic reconstruction of the chest wall in normal rats. **Chest**, 113: 1667-1672, 1998.

MACCHIONE, M.; OLIVEIRA, A.P.; GALLAFRIO, C.T.; MUCHÃO, F.P.; OBARA, M.T.; GUIMARÃES, E.T.; ARTAXO, P.; KING, M.; LORENZI-FILHO, G.; JUNQUEIRA, V.C.; SALDIVA, P.H. Acute effects of inhalable particles on the frog palate mucociliary epithelium. **Environ. Health Perspect.**, 107: 829-833, 1999.

MACNEE, W. & DONALDSON, K. Exacerbations of COPD. Environmental mechanisms. **Chest**, 117: S390- S397, 2000.

MARTINS, L.C.; LATORRE, M.R.D.O.; CARDOSO, M.R.A.; GONÇALVES, P.H.N.; BRAGA, A.L.F. Poluição atmosférica e atendimentos por pneumonia e gripe em São Paulo, Brazil. **Rev. Saúde Pública**, 36: 88-94, 2002.

MCDONALD, JD. EIDE, I. SEAGRAVE, J. ZIELINSKA, B. WHITNEY, K. LAWSON, DR. MAUDERLY, JL. Relationship between composition and toxicity of motor vehicle emission samples. **Environ Health Perspect.** 112:1527-38, 2004.

MEAD, J. Mechanical properties of lungs. **Physiol. Rev.**, 41: 281-330, 1961.

MEAD, J. Contribution of compliance of airways to frequency-dependent behavior of lungs. **J. Appl. Physiol.**, 26: 670-673, 1969.

MILIC-EMILI, J. Ventilation. In: **Regional differences in the lung**. New York, N.Y., Academy Press Inc. Editado por WEST, J.B; cap. 4, p. 167-199, 1977.

MOREIRA, L.M.; GOBBI, C.; FEIJÓ, M.; ROCCO, P.R.M.; ZIN, W.A. Mechanical and morphometry after pneumoperitoneum in normal rats. **Eur. Respir. J.**, 10: 1321-1326, 1997.

MORTOLA, J.P.; NOWORAJ, J.A. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. **J. Appl. Physiol.**, 55: 250-253, 1983.

MOUNT, L.E. The ventilation flow-resistance and compliance of rat lungs. **J. Appl. Physiol.**, 127: 157-167, 1955.

MUKAE, H.; VINCENT, R.; QUINLAN, K.; ENGLISH, D.; HARDS, J.; HOGG, J.C.; VAN EEDEN, S.F. The effect of repeated exposure to particulate air pollution (PM₁₀) on the bone marrow. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 163: 201-209, 2001.

NURKIEWICZ, T. R.; PORTER, D. W.; BARGER, M.; MILLECCHIA, L.; RAO, M.K.; MARVAR, P. J.; HUBBS, A. F.; CASTRANOVA, V.; BOEGEHOLD, M. Systemic Microvascular Dysfunction and Inflammation after Pulmonary Particulate Matter Exposure. **Environ. Health Perspect.**, 114: 412–419, 2008.

OTIS, A.B.; MCKERROW, C.B.; BARTLETT, R.A.; MEAD, J.; MCILROY, M.B.; SELVERSTONE, N.J. Mechanical factors in distribution of pulmonary ventilation. **J. Appl. Physiol.**, 8: 427-443, 1956.

PENNING, TM. BURCZYNSKI, ME. HUNG, CF. MCCOULL, KD. PALACKAL, NT. TSURUDA, LS. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. **Chem Res Toxicol.** 12:1-18, 1999.

PESLIN, R.; PAPON, J.; DUVIVER, C.; RICHALET, J. Frequency response of the chest: modeling and parameter estimation. **J. Appl. Physiol.**, 39: 523-534, 1975.

PETERS, A.; WICHMANN, H.E.; TUCH, T.; HEINRICH, J.; HEYDER, J. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 155: 1376-1383, 1997.

PESETI, A.; PELOSI, P.; ROSSI, N.; VIRTUANI, A.; BRAZZI, L.; ROSSI, A. The effects of positive end-expiratory pressure on respiratory resistance in patients with the adult respiratory distress syndrome and in normal anesthetized subjects. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 144:101-7, 1991.

POPE, C.A.III; THUN, M.J.; NAMBOODIRI, M.M.; DOCKERY, D.W.; EVANS, J.S.; SPEIZER, F.E.; HEATH, C.W. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 151: 669-674, 1995.

POPE, CA III. Particulate pollution and health: a review of the Utah valley experience. **J Expo Anal Environ Epidemiol.** 6:23-34, 1996.

POWERS, S.R.; MANNAL, R.; NECLERIO, M.; ENGLISH, M.; MARR, C.; LEATHER, R.; UEDA, H.; WILLIAMS, G.; CUSTEAD, W.; DUTTON, R. physiologic consequences of positive end-expiratory pressure (PEEP) ventilation. **Ann. Surg.**, 178: 265-271, 1973.

POZZI, R. DE BERARDIS, B. PAOLETTI, L. GUASTADISEGNI, C.. Inflammatory mediators induced by coarse (PM2.5-10) and fine (PM2.5) urban air particles in RAW 264.7 cells. **Toxicology**. 183:243-54, 2003.

RANIERI, V.M.; GIULIANI, R.; FIORE, T.; DAMBROSIO, M.; MILIC-EMILI, J. Volume-pressure curve of the respiratory system predicts effects os PEEP in ARDS: "Occlusion" versus "constant flow" technique. **Am. J. Crit. Care Med.**, 149:19-27, 1994.

RIVERO, D.H.R.F.; SOARES, S.R.C.S.; LORENZI-FILHO, G.; SAIKI, M.; GODLESKI, J.J.; ANTONANGELO, L.; DOLHNIKOFF, M.; SALDIVA, P.H.N. Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of São Paulo, Brazil. **Toxicol. Sciences**, 85: 898–905, 2005.

ROCCO, P.R.M.; FONSECA, S.M.S.; PINTO, A.P.; MEDEIROS, A.S.; ZIN, W.A. Effects of prosthetic reconstruction of the abdominal wall on respiratory mechanics in rats. **Respir. Physiol.**, 115: 35-43, 1999.

RODARTE, J.R. & REHDER, K. Dynamics of respiration. In: MACKLEN, P.T.; MEAD, J. (Eds). **Handbook of Physiology**. The respiratory system. Mechanics of breathing. The American Physiological Society, Bethesda; vol. 3, cap. 10, p. 131-144, 1986.

RODRIGUES, A.C.M.; MOREIRA, L.F.P.; SOUZA, C.L.; PETTERSEN, P.C.D.; SALDIVA, P.H.N.; ZIN, W.A. Effects of thoracotomy on respiratory system, lung, and chest wall mechanics. **Chest**, 104: 1882-1886, 1993.

SALDIVA, P.H.N.; CARDOSO, W.V.; CALDEIRA, M.P.R.; ZIN, W.A. Mechanics in rats by end-inflation occlusion and single-breath methods. **J. Appl. Physiol.**, 63: 1711-1718, 1987.

SALDIVA, P.H.; KING, M.; DELMONTE, V.L.; MACCHIONE, M.; PARADA, M.A.; DALIBERTO, M.L.; SAKAE, R.S.; CRIADO, P.M.; SILVEIRA, P.L.; ZIN, W.A.; BÖHM, G.M. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. **Environ. Res.**, 57:19-33, 1992.

SALDIVA, P.H.N.; ZIN, W.A.; SANTOS, R.L.B.; EIDELMAN, D.H.; MILIC-EMILI, J. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. **J. Appl. Physiol.**, 72: 302-306, 1992.

SALDIVA, P.H.; LICHTENFELS, A.J.; PAIVA, P.S.; BARONE, I.A.; MARTINS, M.A.; MASSAD, E.; PEREIRA, J.C.; XAVIER, V.P.; SINGER, J.M.; BOHM, G.M.

Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminary report. **Environ. Res.**, 65: 218-225, 1994.

SALDIVA, P.H.; POPE, C.A. 3rd; SCHWARTZ, J.; DOCKERY, D.W.; LICHTENFELS, A.J.; SALGE, J.M.; BARONE, I.; BOHM, G.M. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. **Arch. Environ. Health**, 50:159-63, 1995.

SALDIVA, P.H.N.; CLARKE, R.W.; COULL, B.A.; STEARNS, R.C.; LAWRENCE, J.; KRISHNA MURTHY, G.G.; DIAZ, E.; KOUTRAKIS, P.; SUH, H.; TSUDA, A.; GODLESKI, J.J. Lung Inflammation Induced by Concentrated Ambient Air Particles Is Related to Particle Composition. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 165: 1610–1617, 2002.

SAMET, J.M.; GRAFF, D.; BERNTSEN, J.; GHIO, A.J.; HUANG Y.C.; DEVLIN, R.B. A comparison of studies on the effects of controlled exposure to fine, coarse and ultrafine ambient particulate matter from a single location. **Inhal. Toxicol.**, 19 Suppl 1:29-32, 2007.

SCHENKER, M. Air pollution and mortality. **N. Engl. J. Med.**, 329: 1807-1808, 1993.

SCHWARTZ, J. DOCKERY, DW. NEAS, LM. WYPIJ, D. WARE, JH. SPENGLER, JD. KOUTRAKIS, P. SPEIZER, FE. FERRIS, BG Jr.. Acute effects of summer air pollution on respiratory symptom reporting in children. **Am J Respir Crit Care Med.** 150:1234-42, 1994.

SIMILOWSKI, T.; LEVY, P.; CORBEIL, C.; ALBALA, M.; PARIENTE, R.; DERENNE, J.-P.; BATES, J.H.T.; JONSON, B.; MILIC-EMIL, J. Viscoelastic behavior of lung and chest wall in dogs determined by flow interruption. **J. Appl. Physiol.**, 67: 2219-2229, 1989.

SIMILOWSKI, T & BATES, J.H.T. Two-compartment modelling of respiratory system mechanics at low frequencies: gas redistribution or tissue rheology? **Eur. Respir. J.**, 4: 353-358, 1991.

SOMERS, D.O; MEDD, S.M; WALKER, J.E; ADAMS, M.J. Sheep 6-phosphogluconate dehydrogenase. Revised protein sequence based upon the sequences of cDNA clones obtained with the polymerase chain reaction. **Biochem J.** 288:1061-7, 1992.

SOUZA, M.B.; SALDIVA, P.H.N.; POPE, C.A.III; CAPELOZZI, V.L. Respiratory changes due to long-term exposure to urban levels of air pollution: a histopathologic study in humans. **Chest**, 113: 1312-1318, 1998.

STERN, A.C; BOUBEL, R.W; TURNER, D.B; FOX, D.L. fundamentals of air pollution. 2nd. Ed. Orlando, FL: Academic Press, 1984.

TAKANO H, YOSHIKAWA T, ICHINOSE T, MIYABARA Y, IMAOKA K, SAGAI M. Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. **Am J Respir Crit Care Med.** 156:36-42, 1997.

TAKIZAWA H. Diesel exhaust particles and their effect on induced cytokine expression in human bronchial epithelial cells. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.** 4:355-9, 2004.

TAKENAKA, S. KARG, E. KREYLING, WG. LENTNER, B. SCHULZ, H. ZIESENIS, A. SCHRAMMEL, P. HEYDER, J. Fate and toxic effects of inhaled ultrafine cadmium oxide particles in the rat lung. **Inhal Toxicol.** 16:83-92, 2004.

TANTUCI, C.; COBEIL, C.; CHASSÉ, M.; BRAIDY, J.; MATAR, J.; MILIC-EMILI, J. Flow resistance in patient with chronic obstructive pulmonary disease in acute respiratory failure. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 145: 355-360, 1992.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). Bioaccumulation testing and interpretation for the purpose of sediment quality assessment: status and needs. EPA83-R-00-001. Washington, D.C. 20460, p. 111, 2000.

VAN EEDEN, S.F.; TAN, W.C.; SUWA, T.; MUKAE, H.; TERASHIMA, T.; FUJII, T.; QUI, D.; VINCENT, R.; HOGG, J. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM₁₀). **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 164: 826-830, 2001.

WHO Regional Office for Europe. Systematic review of health aspects of airquality in Europe. Copenhagen, 2004.

WHO Regional Office for Europe. Health effects of transport-related air pollution. Copenhagen, 2005.

ZIN, W.A.; PENGELLY, L.D.; MILIC-EMILI, J. Partitioning of respiratory mechanics in anesthetized cats. **J. Appl. Physiol.**, 54: 708-713, 1983.

ZIN, W.A.; MARTINS, M.A.; SILVA, P.R., SAKAE, R.S.; CARVALHO, A.L.; SALDIVA, P.H. Effects of abdominal opening on respiratory system mechanics in ventilated rats. **J. Appl. Physiol.**, 66: 2496-2501, 1989.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)