

LILIAN KATIÊ DA SILVA NAGATO

**ACOMPANHAMENTO TEMPORAL DA FUNÇÃO E
HISTOLOGIA PULMONARES EM CAMUNDONGOS
EXPOSTOS À FULIGEM DA QUEIMA DE ÓLEO**

Tese submetida à Universidade Federal do Rio
de Janeiro visando à obtenção do Grau de Doutor
em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Orientador: Walter Araujo Zin



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2007**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Nagato, Lilian Katiê da Silva

Acompanhamento temporal da função e histologia pulmonares em camundongos expostos à fuligem da queima de óleo.

xvi, 111 f.

Orientador: Walter Araujo Zin

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Programa de Ciências Biológicas – Fisiologia – 2007

Referências Bibliográficas: f. 99-111

1. Poluição Atmosférica 2. ROFA 3. Mecânica Respiratória 4. Elastância 5. Morfometria 6. Camundongo.

I. Zin, Walter Araújo. II Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Ciências Biológicas, Fisiologia. III. Título.

**ACOMPANHAMENTO TEMPORAL DA FUNÇÃO E HISTOLOGIA
PULMONARES EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS À FULIGEM DA
QUEIMA DE ÓLEO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia)

Data: 05/12/2007

APROVADA POR:

Prof. Walter Araújo Zin, Ph.D - Orientador
Prof. Titular, IBCCF^o, UFRJ

Prof. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, Ph.D
Prof. Titular, USP

Prof. José Roberto Lapa e Silva, Ph.D
Prof. Titular, UFRJ

Prof. Marcelo Marcos Morales, Ph.D
Prof. Adjunto, IBCCF^o, UFRJ

Prof. Débora Souza Faffe, Ph.D - Revisora
Prof^a. Adjunto, IBCCF^o, UFRJ

Rio de Janeiro
Dezembro de 2007

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Respiração do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-MCT, PRONEX-FAPERJ).

A Deus, que sempre me deu
esperanças quando eu mais precisei
delas.

Aos meus pais, Masaharu e Maria,
meus maiores incentivadores neste
caminho.

Ao meu querido irmão, Rafael. Eu
simplesmente não imagino minha vida
sem ele.

AGRADECIMENTOS

Existem algumas pessoas que contribuíram para a elaboração desta tese e para muitas das conquistas pessoais e profissionais da minha vida, a essas pessoas eu devo meu agradecimento.

- Prof. Walter Zin, meu orientador. Por todos os puxões de orelha, as palavras de incentivo, pela maturidade adquirida até aqui, e principalmente, pelo exemplo de força, professor e pesquisador. Pela incansável dedicação durante a elaboração desta tese. Certamente, tudo ficou melhor após as suas contribuições. Segue, nas próximas páginas, o resultado das horas de trabalho. Muitíssimo obrigada por tudo!

- Prof^a. Patricia Rocco, por sua competência. Obrigada pela disponibilidade e atenção que possibilitaram esse meu caminho.

- Prof^a. Débora Faffe, por todas as suas contribuições durante o período de convivência neste laboratório. Agradeço ainda pela cuidadosa e criteriosa revisão desta tese.

- Prof. Paulo Saldiva, por ter me cedido a ROFA e pelas dúvidas retiradas ao longo do projeto.

- Prof. Olaf, pela realização da análise da composição da fuligem desse estudo.

- Prof^a. Patrícia Bozza, pela grande colaboração e por todo meu aprendizado em seu laboratório.

- Minha querida amiga Flávia Brandão, amiga de todas as horas, sempre disposta a me auxiliar. Chegar até aqui não seria possível sem a sua colaboração. Obrigada por tudo.

- Meus amigos: Renata Bujokas, Erica Heredia, Erica Carreiro, Elias Nemi, Isabel Taboada, Patrícia Cheles, Marcelle Correa, enfim, amigos que sempre estão ao meu lado, com quem posso contar sempre. Sou muito grata por saber que posso confiar em vocês.
- Todas as pessoas da minha família que sempre acreditaram no meu trabalho e compreenderam os momentos de dedicação a este estudo.
- Aos demais amigos aqui não citados, seriam muitos... sigo certa da importância que cada um desempenha na minha existência.
- Viviane Cagido, Flávia Mazzoli, Mariana Genuíno, Cris Dias, Débora Xisto, Cristiane Nascimento, Alba Fernandes, Halina Cidrini, Sheila Fagundes, Silviane Fernandes, Douglas Riva: companheiros queridos do laboratório, sempre prontos a me ajudar em todos os momentos, cada um com a sua característica peculiar. Obrigada pelo carinho, cooperação e pelos momentos juntos. Poder contar sempre com vocês foi muito bom para mim.

RESUMO

NAGATO, Lilian Katiê da Silva. **ACOMPANHAMENTO TEMPORAL DA FUNÇÃO E HISTOLOGIA PULMONARES EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS À FULIGEM DA QUEIMA DE ÓLEO.** Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

A fuligem da queima de óleo (ROFA) é um poluente industrial composto de metais, ácidos e outros componentes desconhecidos. Nós analisamos temporalmente a mecânica e histologia pulmonares em camundongos BALB/c expostos à poluição atmosférica induzida por ROFA. Para tal, mecânica respiratória (pressões resistiva e viscoelástica, e elastância estática pulmonar), histologia (microscopia óptica e eletrônica) e celularidade total e diferencial do lavado broncoalveolar (BAL) e sangue foram avaliados 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a instilação intranasal de salina (C, 10 µl) ou ROFA (0,2 µg em 10 µL salina). Além disso, a composição da ROFA foi analisada para metais pesados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e compostos organoclorados. A pressão resistiva do pulmão aumentou precocemente (6 h) (186,3%), enquanto a elastância estática e pressão viscoelástica aumentaram em 24 h (88,4% e 68,8%, respectivamente). Todos os parâmetros de mecânica permaneceram elevados até 96 h e retornaram aos valores de C em 120 h. A fração de alvéolos colapsados aumentou (2,9 → 26,2%) 24 h após instilação de ROFA, mantendo valores maiores do que C até 96 h (23,4% em 48 h; 26,4% em 72 h; 26,4% em 96 h). O metal mais encontrado na amostra foi o ferro. Embora a celularidade no BAL tenha sido similar em todos os grupos, o grupo ROFA apresentou maior quantidade de neutrófilos no sangue em 24 e 48 h (93,2% e 134%, respectivamente) do que o grupo C. Em conclusão, a exposição à ROFA, mesmo em dose baixa, induziu modificações na mecânica e histologia pulmonares que se mantiveram até o quarto dia.

Palavras chaves: poluição atmosférica; ROFA; mecânica pulmonar; elastância; camundongo.

ABSTRACT

NAGATO, Lilian Katiê da Silva. **Time course of pulmonary function and histology in mice exposed to residual oil fly ash.** Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

Residual oil fly ash (ROFA) is an industrial pollutant containing metals, acids, and unknown materials complexed. We analyzed the time course of lung mechanics and histology in BALB/c mice exposed to atmospheric pollution induced by ROFA. For this purpose, lung mechanical parameters (lung resistive and viscoelastic pressures, and static elastance), histology (light and electron microscopy) and total and differential cell counts in the bronchoalveolar lavage (BAL) and blood were analyzed 6, 24, 48, 72, 96 and 120 h after intranasal instillation of saline (Ctrl, 10 μ L) or ROFA (0.2 μ g in 10 μ L saline). Besides, the composition of ROFA was analyzed for heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and organochlorine. Lung resistive pressure augmented early (6 h) in the course of lung injury (186.3%), but static elastance and viscoelastic pressure increased only at 24 h (88.4% and 68.8%, respectively). All mechanical parameters remained elevated until 96 h and returned to control at 120 h. The volume fraction of collapsed alveoli increased (2.9 \rightarrow 26.2%) 24 h after ROFA instillation, remaining higher than Ctrl until 96 h (23.4% at 48 h; 26.4% at 72 h; 26.4% at 96 h). The principal constitutive transition metal in ROFA sample was iron. Although the cellularity in BALF was similar in all groups, ROFA group showed higher amounts of neutrophils in the blood at 24 and 48 h (93.2% and 134%, respectively) than Ctrl. In conclusion, the exposure to ROFA, even in low doses, induced early changes in lung mechanics and histology that remained until day 4.

Keywords: atmospheric pollution; ROFA; lung mechanics; elastance; mice.

LISTA DE SIGLAS

\dot{V} - Fluxo

$\Delta P_{1,L}$ - Variação de pressão necessária para vencer o componente viscoso pulmonar (cmH₂O)

$\Delta P_{2,L}$ - Variação de pressão necessária para vencer o componente viscoelástico e/ou inomogêneo pulmonar (cmH₂O)

ΔP_{eq} - Variação de pressão do equipamento (cmH₂O)

ΔP_{tot} - Variação de pressão total (cmH₂O)

BAL - Lavado broncoalveolar

CL – Complacência do pulmão

CPT - Capacidade pulmonar total

CRF - Capacidade residual funcional

Crs – Complacência do sistema respiratório

Csp – Complacência específica

CV - Capacidade vital

CVF - Capacidade vital forçada

Cw – Complacência da parede torácica

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica

E2 – Elastância do componente viscoelástico (corpo de Maxwell)

Edyn,L – Elastância dinâmica do pulmão

Ers – Elastância estática do sistema respiratório

Est,L - Elastância estática do pulmão (cmH₂O.ml⁻¹)

Est,w - Elastância estática da parede torácica (cmH₂O.ml⁻¹)

FiO₂ – Fração inspirada de oxigênio

IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

IG - Imunoglobulina

IL – Interleucina

MA – Macrófagos Alveolares

MIP-1 β – Proteína inflamatória de macrófago - 1 β

MN - Mononuclear

PaO₂ – Pressão parcial arterial de oxigênio

PEEP – Pressão positiva ao final da expiração

Pel – Pressão de retração elástica do pulmão

Pi – Pressão pulmonar no ponto de inflexão

PI e PII – Pneumócitos tipos I e II

PL – Pressão transpulmonar

PM – Material particulado

Pmáx,rs - Pressão máxima do sistema respiratório ou pressão de pico inspiratória (cmH₂O)

PMN – polimorfonuclear

Ptr - Pressão traqueal (cmH₂O)

R – Resistência total

Raw – Resistência das vias aéreas

Req - Resistência do equipamento (cmH₂O.ml⁻¹.s)

ROFA – Fuligem da queima de óleo

T_I – Tempo inspiratório

TNF - α – Fator de necrose tumoral - α

V_T – Volume corrente

LISTA DAS ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Modelo unicompartmental	031
Figura 2. Modelo do método de oclusão ao final da inspiração	032
Figura 3. Modelo de molas e amortecedores	034
Figura 4. Montagem experimental para medida da mecânica respiratória	046
Figura 5. Traçados de fluxo, volume e pressão transpulmonar obtidos a partir do método de oclusão da via aérea ao final da inspiração	049
Figura 6. Reticulo para quantificação morfométrica	052
Figura 7. Gráficos de variação de pressão	065
Figura 8. Gráficos de variação de elastâncias do pulmão	066
Figura 9. Fotomicrografia de parênquima pulmonar dos grupos C e ROFA.....	069
Figura 10. Microscopia eletrônica de parênquima pulmonar do grupo C.....	073
Figura 11. Microscopia eletrônica de parênquima pulmonar do grupo ROFA 24	074
Figura 12. Celularidade do sangue	076
Figura 13. Celularidade do lavado broncoalveolar	077

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1. Fatores que afetam a resposta aos poluentes aéreos	004
Tabela 2. Padrões nacional e internacional de qualidade do ar	019
Tabela 3. Parâmetros da mecânica respiratória	064
Tabela 4. Celularidade do parênquima pulmonar	070
Tabela 5. Morfometria pulmonar	071
Tabela 6. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	079
Tabela 7. Compostos organoclorados.....	080
Tabela 8. Metais	081

SUMÁRIO

Folha de Rosto	I
Ficha Catalográfica	ii
Folha de Aprovação	iii
Agências Financiadoras	iv
Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de Siglas	X
Lista de Ilustrações	xii
Lista de Tabelas	xiii
Sumário	xiv
I. Introdução	001
I.1 Aspectos Gerais e Justificativa	002
I.2 Material Particulado	006
I.3 Fuligem da Queima do Óleo (ROFA)	009
I.3.1. Definição e Classificação de Metais	010
I.4 Efeitos da Poluição sobre o Trato Respiratório	011
I.4.1. Aspectos Gerais de Defesa Pulmonar	011
I.4.2. Padrões de Qualidade de Ar	016
I.4.3. Ação da Poluição sobre o Trato Respiratório	020
I.4.4. Deposição de Partículas Inaláveis no Trato Respiratório	022
I.5 Mecânica Respiratória	025

I.5.1. Noções Básicas	025
I.5.2. Estudo da Mecânica Respiratória	029
II. Objetivos.....	038
III. Materiais e Métodos	040
III.1. Animais Utilizados	041
III.2. Caracterização dos Grupos Experimentais	041
III.3. Mecânica Respiratória	042
III.3.1. Método de Oclusão ao Final da Inspiração	047
III.4. Estudo Histológico e Morfométrico	050
III.4.1. Remoção dos Pulmões e Análise Histopatológica	050
III.5. Microscopia Eletrônica de Trasmissão	053
III.6. Análise da Celularidade do Lavado Broncoalvelolar e Sangue	054
III.7. Análise da Composição da Fuligem da Queima de Óleo (ROFA)	055
III.7.1. Análise dos Metais Pesados	055
III.7.1.a. Extração Total	055
III.7.2. Análise dos Organoclorados e Hidrocarbonetos Policíclicos	
Aromáticos	056
III.7.2.a. Extração da Amostra	056
III.7.2.b. Purificação	057
III.7.2.c. Fracionamento	058
III.7.2.b. Cromatografia	059
III.8. Análise Estatística	060
IV. Resultados	062
IV.1. Mecânica Pulmonar.....	063
IV.2. Análise Histológica e Morfométrica	067

IV.2.1. Análise Qualitativa	067
IV.2.2. Análise Quantitativa	067
IV.3. Microscopia Eletrônica	072
IV.4. Análise da Celularidade Lavado Broncoalveolar e do Sangue	075
IV.5. Análise dos Organoclorados e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	078
IV.6. Análise dos Metais	078
V. Discussão	082
VI. Conclusões.....	097
VII. Referências Bibliográficas.....	099

INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

I.1- ASPECTOS GERAIS E JUSTIFICATIVA

O grande desafio da industrialização tem um terrível preço: a poluição atmosférica. Das perspectivas de saúde pública e clínica, a poluição atmosférica permanece um tópico pertinente para pesquisadores e profissionais de saúde, devido ao rápido crescimento da população mundial, assim como o fenômeno da migração da população rural para áreas urbanas.

Em dezembro de 1952, ocorreu uma inversão de temperatura em Londres, levando a um considerável acúmulo de poluentes atmosféricos emitidos pela queima de combustíveis fósseis. Esse fenômeno foi associado a um abrupto aumento na taxa de mortalidade, resultando em aproximadamente 4000 mortes excedentes (Logan, 1952). Embora as mortes por todas as causas (exceto por acidente automobilístico) tenham aumentado, a maior elevação se deu por doenças respiratórias. A notável associação temporal entre o incidente de Londres e o incremento da mortalidade deixou poucas dúvidas de que a poluição atmosférica foi a causa dos óbitos. Este episódio catalisou esforços para “purificar” o ar e, a partir disso, uma diminuição nos níveis de poluição foi observada em muitos países.

Apesar de drásticos episódios de poluição atmosférica estarem associados a excessiva mortalidade em diferentes regiões do mundo (Logan, 1952; Nemery e cols., 2001), ozônio (O₃), os aerossóis ácidos e materiais particulados parecem ser os principais responsáveis pelos efeitos adversos sobre a saúde, considerando os atuais níveis de exposição. Anualmente, são lançados na atmosfera 300 milhões de toneladas de resíduos. No passado, os operários eram as primeiras vítimas da

poluição; no entanto, com a urbanização crescente, toda a população passou a sofrer com esse fenômeno.

A poluição atmosférica ambiental pode resultar da queima de combustíveis fósseis, incluindo, por exemplo, emissões de automóveis ou fontes como lareiras. Os incineradores, fundições e outras atividades industriais também podem ser responsáveis pela emissão de uma variedade de componentes ácidos, orgânicos e metálicos que causam alterações na qualidade do ar, e provocando efeitos adversos e importantes à saúde (Brunekreef & Holgate, 2002; Brunekreef & Sunyer, 2003; Farhat e cols., 2005; Gonçalves e cols., 2005; Lin e cols., 2004; Rivero e cols., 2005; Saldiva e cols., 1994; Schenker, 1993; Stone, 2000).

Deve ser ressaltada, ainda, a existência de variabilidade na resposta individual a determinado poluente aéreo, a qual pode ser afetada por vários fatores (Tabela 1). Nas grandes cidades e áreas industrializadas, ao contrário das zonas rurais, a maior morbidade e mortalidade por doenças respiratórias está relacionada à poluição atmosférica, comprometendo principalmente crianças, pneumopatas e idosos. De maneira geral, as crianças são mais sensíveis do que os adultos a qualquer forma de poluição atmosférica, devido à imaturidade de seu aparelho respiratório (Farhat e cols. 2005; Lee e cols, 2003; Lin e cols. 2004; Nicolai e cols, 2003; Saldiva e cols., 1994). Entre os pneumopatas, os pacientes alérgicos, asmáticos ou com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) são os mais afetados (Brown e cols., 2002; Galán e cols., 2003; MacNee & Donaldson, 2000). Nos indivíduos atópicos, a exposição à poluição atmosférica aumenta a responsividade das vias aéreas aos alérgenos (Brunekreef & Sunyer, 2003; Gavett e cols., 1997; 1999; Macnee & Donaldson, 2000). Já os idosos são mais vulneráveis aos efeitos da

poluição por apresentarem resposta imune reduzida (Bennett e cols., 1996; Martins e cols., 2002; Saldiva e cols., 1995).

Tabela 1 – Fatores que afetam a resposta aos poluentes aéreos

Poluente	Grau de exposição (concentração)
	Duração da exposição
	Tamanho da partícula
Co-exposição	Outros poluentes (interno e externo)
	Alérgenos
	Infecções virais
	Condições metereológicas
	Grau de atividade física
	Tabagismo (ativo e passivo)
Fatores Individuais	Atopia
	Idade
	Doença pré-existente
	Medicação em uso
	Limitação ao fluxo aéreo
	Hiperresponsividade brônquica

Classificam-se os poluentes como partículas em suspensão (poeiras, emissões atmosféricas e industriais, fumaças) 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 potencializar a resposta a alérgenos por aumento de:

- 1) permeabilidade epitelial;
- 2) recrutamento e ativação de células inflamatórias;
- 3) estresse oxidativo nas vias aéreas e;
- 4) 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; Gavett e cols., 1997; 1999; Hamada e cols., 2002; Kodavanti e cols., 1997; 1998; 2002). Dentre eles, o uso de fuligem de queima do óleo (ROFA) representa uma forma de agressão ao trato respiratório, mimetizando condições de exposição a partículas ambientais. Muito se estuda acerca do processo de agressão pulmonar, no entanto, 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 temporais da exposição aguda à ROFA sobre as propriedades elásticas, resistivas e viscoelásticas e/ou inomogêneas pulmonar e suas alterações histológicas e estruturais. Ademais, além de explorar este aspecto, nossos estudos também se fizeram em função da análise do lavado broncoalveolar e sangue, bem como das concentrações dos componentes dessa fuligem.

I.2– MATERIAL PARTICULADO

Material particulado (PM) 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.

Há várias evidências de que 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 como aquelas com diâmetro aerodinâmico entre 2,5 μm e 10 μm (PM_{10}), as partículas finas são aquelas com diâmetro entre 2,5 μm e 0,1 μm ($\text{PM}_{2,5}$), e as partículas ultrafinas com diâmetro menor do que 0,1 μm (Brown e cols., 2002; Churg & Brauer, 1997; Dusseldorp e cols., 1995; Peters e cols., 1997). Os materiais particulados com diâmetro menor ou igual a 10 μm (PM_{10}) são considerados partículas inaláveis, pois podem atingir 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 que contenham elementos de transição, 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 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, observaram que pacientes com DPOC apresentavam maior deposição de partículas ultrafinas no pulmão, quando comparados a indivíduos saudáveis. Da mesma maneira, Peters e colaboradores (Peters e cols., 1997) observaram, com espectrômetro de aerossol, 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 pico de fluxo 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 μm e apenas 4% eram partículas ultrafinas. Samet e colaboradores (Samet e cols., 2007) observaram, em indivíduos saudáveis não fumantes, uma modesta diferença dos parâmetros cardiopulmonares entre os diferentes tamanhos de partículas. Essas divergências podem resultar de diferentes métodos aplicados nesses trabalhos. Alguns autores sugerem que as partículas ultrafinas causem 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 “irregulares” causam diferentes efeitos sobre a saúde (Franck & Herbarth, 2002).

Assim como ocorre com a mortalidade, diferentes grupos de diversos países também evidenciaram associações entre MP e admissões hospitalares, tanto para crianças como para adultos. As associações mais observadas estão relacionadas à 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 MP 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.

I.3 – FULIGEM DA QUEIMA DE ÓLEO (ROFA)

A fuligem da queima de óleo (ROFA) é um material particulado com diâmetro aerodinâmico médio $\leq 2,5 \mu\text{m}$, produto da combustão do óleo, geralmente inorgânica, e de composição variada dependendo da classe do combustível e da temperatura de combustão (Dusseldorp e cols., 1995; Gavett e cols., 1997; Kodavanti e cols., 1997; 1998; 2002). Normalmente, possui alta concentração de metais de transição, sendo estes apontados como um dos componentes pelos quais a ROFA pode causar inflamação pulmonar em animais saudáveis e em modelos animais de lesão cardiopulmonar (Campen e cols., 2002; Dreher e cols., 1997; Gavett e cols., 1999; Kodavanti e cols., 1997; 1998; 2002). A ROFA, portanto, mimetiza a exposição aguda à poluição, constituindo um modelo de lesão pulmonar direta (Dreher e cols., 1997).

As diferentes concentrações de metais na composição da ROFA têm sido altamente relacionadas com o grau de lesão pulmonar e toxicidade. Um estudo realizado com duas formas diferentes de ROFA, contendo principalmente ferro, níquel e vanádio, ou contendo zinco, demonstrou que apesar de ambas as formas apresentarem resposta inflamatória pulmonar, a ROFA composta de zinco teve efeito mais intenso (Gavett e cols., 1997). Concomitantemente, a inflamação pulmonar induzida por ROFA foi reproduzida por Dreher e colaboradores, mostrando a influência da interação entre os metais na gravidade da lesão pulmonar e nas variações do grau de lesão (Dreher e cols., 1997).

Gavett e colaboradores (Gavett e cols., 1999), em experimento com instilação intratraqueal de ROFA composta, principalmente, por vanádio, níquel e ferro, demonstraram aumento significativo de células inflamatórias no lavado

broncoalveolar em camundongos saudáveis, além de aumento de IL-5 e da quantidade de neutrófilos no pulmão nas primeiras vinte e quatro horas.

Os modelos de poluição atmosférica induzida por exposição à ROFA utilizam a instilação intratraqueal (Antonini e cols., 2002; 2004; Campen e cols., 2002; Dreher e cols., 1997; Gavett e cols., 1997; 1999; Ghio e cols., 2001; Kodavanti e cols., 1997; 1998; Lewis e cols., 2003; Nurkiewicz e cols., 2006), a inalação via aerossol (Hamada e cols., 2002) e a instilação intranasal (Kodavanti e cols., 2002; Medeiros Jr. e cols., 2004) como vias de administração. No entanto, independentemente da via utilizada, podem ser observadas alterações funcionais e estruturais, incluindo lesão pulmonar aguda com espessamento do septo alveolar, aumento da celularidade e inflamação (Campen e cols., 2002; Dreher e cols., 1997; Gavett e cols., 1997; 1999; Ghio e cols., 2001; Hamada e cols., 2002; Kodavanti e cols., 1997; 1998; 2002).

I.3.1 – Definição e Classificação de Metais

A classe dos metais compreende o maior grupo dos elementos químicos, sendo o termo “metal” referente às características de boa condutividade elétrica e térmica. Compreendem-se como metais pesados aqueles elementos cuja densidade excede $5,0 \text{ g/cm}^3$ (Förstner & Wittmann, 1979).

Nieboer e Richardson (Nieboer & Richardson, 1980), em seu sistema de categorização empregando as propriedades dos ácidos de Lewis, classificaram os metais pesados como elementos de classe A, B ou intermediária (“borderline”). A classificação refere-se à preferência que os elementos apresentam para a formação de complexos. Na primeira classe estão aqueles com tendência a se ligarem com o oxigênio. A segunda engloba os que preferencialmente formam grupamentos

sulfatados (*sulphur-*) ou nitrogenados (*nitrogen-*), e a última exhibe aspectos de ambas as classes.

Pode-se ainda separar os metais em: essenciais e não essenciais. Os metais não essenciais são aqueles cuja função biológica ainda é desconhecida. Já os metais conhecidos como elementos essenciais (sódio, potássio, magnésio, cálcio, molibdênio, manganês, ferro, cobalto, cobre e zinco) são encontrados em todos os tecidos saudáveis. Os sintomas associados à sua deficiência podem ser atribuídos a um distúrbio bioquímico específico (Förstner & Wittmann, 1979) e a restauração das funções ocorre após a reposição desses elementos nos tecidos. Os metais de transição essenciais, como o zinco, funcionam principalmente como catalizadores de reações bioquímicas.

I.4 – EFEITOS DA POLUIÇÃO SOBRE O TRATO RESPIRATÓRIO

I.4.1. Aspectos Gerais de Defesa Pulmonar

À medida que as partículas se depositam no trato respiratório, são removidas pelos mecanismos de defesa pulmonar.

As vias aéreas superiores são recobertas por epitélio colunar pseudoestratificado ciliado, contendo células colunares e células basais. As células basais diminuem progressivamente de número da traquéia até os brônquios e têm por função aderir o epitélio à membrana basal (Evanas & Shami, 1989). A população de células colunares se distribui igualmente até os bronquíolos terminais, sendo composta por células ciliadas e não ciliadas, dispostas sobre uma membrana basal comum. As células não ciliadas, ou células mucosas, são as progenitoras primárias de todo o epitélio colunar das vias aéreas e incluem células sem grânulos secretores

(intermediárias, indeterminadas, ou pré-secretoras), células com grânulos secretores densos (serosas ou de Clara) e células com grânulos secretores (pequenos grânulos mucosos e células caliciformes) (Evanas & Shami, 1989).

O epitélio alveolar é formado por células do tipo I, que recobrem 93-97% da superfície alveolar, e por células tipo II, que cobrem de 3-5% da área de superfície. As células tipo II agem como progenitoras para o epitélio alveolar, multiplicando-se para sua renovação e para a formação das células totalmente diferenciadas tipo I (Evanas & Shami, 1989).

As células endoteliais delineiam os vasos sanguíneos pulmonares, constituindo o tipo celular mais numeroso residente no pulmão e o de maior índice de proliferação celular (Evanas & Shami, 1989).

No interstício pulmonar, as células residentes são os fibroblastos, as células musculares lisas e os pericitos. Os fibroblastos representam mais de 95% dessas células, sendo separados morfológicamente em célula intersticial e fibroblastos sintetizadores de colágeno. A população de células intersticiais do pulmão normal contém, também, pequeno número de células migratórias, como monócitos e células plasmáticas, leucócitos polimorfonucleares e macrófagos. Durante a resposta inflamatória, o número de células migratórias intersticiais pode aumentar dramaticamente (Evanas & Shami, 1989).

Encontram-se macrófagos pulmonares em pelo menos dois compartimentos diferentes: nos espaços aéreos (incluindo alvéolos e vias aéreas de condução) e no interstício pulmonar. Os macrófagos alveolares estão presentes na superfície do epitélio alveolar, onde fagocitam partículas e participam de numerosos eventos bioquímicos, e, em sua maioria, derivam de monócitos do sangue periférico (Crowell e cols., 1992; Oliver e cols., 1996). Os macrófagos intersticiais encontram-se

primariamente ao redor dos grandes vasos e vias aéreas, não sendo tão numerosos quanto os alveolares (Evanas & Shami, 1989; Sibille & Reynold, 1990). Há dois mecanismos claramente definidos pelos quais os macrófagos alveolares se desenvolvem: (a) migração de monócitos do sistema vascular para o espaço alveolar, com subsequente diferenciação em macrófago alveolar e (b) divisão dos macrófagos alveolares existentes (Evanas & Shami, 1989; Sibille & Reynold, 1990).

Os pulmões representam a maior área de contato do corpo humano com o meio externo, contendo cerca de 300 milhões de alvéolos e mobilizando um volume de cerca de 10.000-15.000 litros de ar por dia (Danel, 1996; West, 1996). Dessa forma, as vias aéreas se encontram constantemente expostas a vários organismos e/ou partículas presentes no ar ambiente. Além do fator ambiental, o trato respiratório também pode ser afetado por microorganismos circulantes no sangue (Danel, 1996).

As causas de lesões das vias aéreas são múltiplas, variando tanto em sua natureza quanto em seu efeito. O trato respiratório responde a esses diferentes agentes por meio de reações inflamatórias acompanhadas de proliferação celular (Chrétien & Nébut, 1996).

Por estar sujeito a vários tipos de agressão, direta (via inalação) ou indireta (via hematogênica), o trato respiratório apresenta mecanismos de defesa capazes de prevenir o desenvolvimento de processos infecciosos e lesões pulmonares. Os diferentes mecanismos de reposta pulmonar contra fatores agressores podem ser mecânicos, imunológicos e enzimáticos (Chrétien & Nébut, 1996).

Os fatores mecânicos representam a forma mais elementar de proteção, sendo representados, principalmente, pelo “clearance” traqueobrônquico. Participam desse tipo de defesa as secreções brônquicas e o aparelho mucociliar, por meio do

isolamento de partículas estranhas que penetram na árvore traqueobrônquica e sua posterior expulsão por expectoração ou deglutição. Já as partículas solúveis são absorvidas pela corrente sanguínea através da mucosa brônquica ou pelos ductos pinocíticos (Chrétien & Nébut, 1996).

A defesa imunológica é determinada por processos humorais e/ou celulares. O mecanismo humoral depende de imunoglobulinas de origem local (IgA) e sistêmica (IgA e IgG). O muco presente na superfície do trato respiratório também exerce ação imunológica. O mecanismo celular é representado principalmente pela fagocitose, realizada por células polimorfonucleares (PMN) e por fagócitos mononucleares provenientes da corrente sanguínea, assim como os macrófagos alveolares. Durante o processo de fagocitose, há produção e liberação de radicais livres e aumento da atividade de receptores celulares, assim como maior produção de citocinas, tais como a interleucina (IL)-1 e fator de necrose tumoral (TNF)- α . O tecido linfóide brônquico, composto de linfócitos vindos do sangue, nódulos linfopiteliais e nódulos peribrônquicos, também exerce importante papel na resposta antigênica (Chrétien & Nébut, 1996).

O sistema de defesa enzimático está envolvido na transformação de substâncias inaladas. Os sistemas mais estudados têm sido o sistema “protease-antiprotease” (envolvido na homeostase da estrutura pulmonar), o sistema anil hidroxicarbono hidroxilase, o citocromo P450 contido nas células de Clara e outros sistemas enzimáticos envolvidos na formação e eliminação de ânions superóxidos (Chrétien & Nébut, 1996).

As vias aéreas distais (bronquíolos) e os alvéolos são desprovidos dos mecanismos mecânicos de defesa. O principal fator que permite a eliminação de pequenas partículas inaladas que atingem essa região é o sistema fagocítico,

representado pelos macrófagos alveolares e neutrófilos polimorfonucleares. Além desse mecanismo de defesa, essas células fagocitárias estão implicadas em processos de lesão aguda e crônica, como potencialmente capazes de iniciar e perpetuar essas alterações. Os macrófagos podem interagir com outras células e moléculas através da liberação de numerosos produtos (como metabólitos de oxigênio, enzimas, mediadores, citocinas, hormônios polipeptídeos e lipídeos bioativos), além da expressão de vários receptores de superfície (Sibille & Reynold, 1990).

Os macrófagos, células residentes no pulmão normal, representam a maioria dos fagócitos do trato respiratório inferior, constituindo, em geral, 85% das células obtidas em lavado broncoalveolar (LBA) de indivíduos normais. Por outro lado, os PNM estão quase ausentes, perfazendo cerca de 1-2% das células no LBA. Entretanto, os PMN podem ser rapidamente recrutados para o interior das estruturas pulmonares em resposta a um agente patológico (Crowell e cols., 1992; Oliver e cols., 1996; Sibille & Reynold, 1990).

Por meio de receptores superficiais para vários ligantes e do grande número de produtos secretados, os macrófagos pulmonares podem responder a fatores ambientais e eliminar micropartículas que atingem o trato respiratório inferior. Os macrófagos exercem papel essencial em processos inflamatórios pela liberação de radicais de oxigênio (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila), enzimas proteolíticas (lisozima, elastase, colagenase e antiproteases) e citocinas (IL-1, TNF- α , fator de crescimento de fibroblastos). Além de sua função primordial de fagocitose, os macrófagos desempenham um complexo papel no remodelamento tecidual nos processos inflamatórios, assim como na indução de mecanismo regulador de imunidade específica (Oliver e cols, 1996; Sibille & Reynold, 1990).

Os neutrófilos (PMN), apesar de pouco numerosos no espaço alveolar, são encontrados em grande quantidade na vasculatura pulmonar, mais especificamente no leito capilar pulmonar, o qual atua como um grande reservatório de PMN. Alguns desses PMN encontram-se em íntimo contato com as células endoteliais, formando uma camada marginal, a qual permite rápido recrutamento de PMN em direção ao espaço alveolar (Oliver e cols., 1996; Sibille & Reynolds, 1990).

Os mecanismos que regulam a migração de PMN ainda são pouco conhecidos. No entanto, aparentemente, essa migração não requer aumento da permeabilidade vascular (Oliver e cols., 1996; Stein-Streinlein & Toews, 1996). Um grande número de moléculas é capaz de induzir a migração de PMN para os locais de inflamação, principalmente pela secreção de IL-8 (Oliver e cols., 1996).

A função primordial dos PMN é a fagocitose, sendo sua atividade antibacteriana exercida pela produção de radicais de oxigênio (peróxido de hidrogênio, superóxido e radicais hidroxila) e liberação de enzimas contidas nos grânulos, como elastase, mieloperoxidase, hidrolase e outras (Oliver e cols., 1996).

Apesar de seu papel de defesa, os fagócitos podem estar associados a processos de agressão, principalmente no pulmão. A liberação de radicais de oxigênio, de proteases neutras e enzimas lisossômicas pode levar à degradação da matriz pulmonar, além de apresentar atividade citotóxica contra diferentes tipos celulares, como células epiteliais e endoteliais e fibroblastos (Oliver e cols., 1996; Sibille & Reynolds, 1990).

I.4.2 – Padrões de Qualidade do Ar

É clara a associação entre poluição e mortalidade. Mesmo com concentrações abaixo do padrão de qualidade do ar, o efeito da poluição na saúde

humana é mostrado estatisticamente pela verificação de associação entre variação de concentrações de poluentes e admissão em prontos socorros, e, também, aumento de mortalidade, em estudos realizados em diversos países. Em São Paulo encontrou-se aumento de 23% na admissão de crianças menores de 13 anos em prontos socorros no dia em que as concentrações de PM_{10} chegaram a $95 \mu g/m^3$. Verifica-se, ainda, um aumento de 13% na mortalidade de idosos em concentrações de PM_{10} da ordem de $120 \mu g/m^3$ (Saldiva e cols., 1994; 1995). Em estudos toxicológicos em ratos e rãs, para avaliar os efeitos diretos dos poluentes nos pulmões, verificaram-se alterações de comportamento, processos de inflamação e infecção das vias respiratórias (Machione e cols., 1999; Saldiva e cols., 2002).

Alguns efeitos toxicológicos de gases poluentes e material particulado inalável encontram-se bem descritos na literatura (Lin e cols., 1999; 2004; Saldiva e cols., 1992; 1995; Souza e cols., 1998). Por meio da respiração, os poluentes atingem as vias respiratórias, das narinas aos alvéolos pulmonares, promovendo diferentes processos de inflamação, que debilitam o sistema respiratório. Os efeitos adversos da poluição na saúde são mais notados em crianças, idosos e pessoas que padecem de afecções respiratórias e cardiovasculares. Nestas a poluição leva a um agravamento do quadro de saúde, promovendo infecções mais graves como bronquites, pneumonias, asma, câncer, podendo, também, antecipar o óbito (Brown e cols., 2002; Cohen & Pope, 1995; Farhat e cols., 2005; Galán e cols., 2003; Lin e cols., 1999; 2004; MacNee & Donaldson, 2000).

Devido aos efeitos prejudiciais dos poluentes no ser humano, vários países estabeleceram padrões de qualidade do ar. Os padrões de qualidade definem, para cada poluente, o limite máximo de concentração ao qual a população pode ficar exposta, de forma a garantir proteção a sua saúde e bem-estar. Esses valores

baseiam-se em diversos estudos epidemiológicos e experimentais, que identificaram os principais poluentes e suas repercussões sobre a saúde. Os padrões nacionais de qualidade do ar foram definidos pela portaria normativa nº. 348 de 14/03/1990 do IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis) e transformados na resolução CONAMA nº. 03/90 (CETESB, 1997), sendo idênticos aos internacionais, porém, com as evidências sobre os efeitos danosos do $PM_{2,5}$ à saúde humana, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) criou um padrão de qualidade do ar específico para esta fração fina do particulado inalado (EPA, 2006).

Foram estabelecidos dois padrões de qualidade do ar. O padrão primário estabelece o limite máximo de concentração de poluentes tolerável para a saúde da população, enquanto o secundário, mais rigoroso, prevê o mínimo de efeito adverso à população, fauna e flora, deteriorização de materiais e comprometimento à visibilidade. Nas áreas urbanas aplicam-se somente os padrões primários, ao passo que os secundários destinam-se ao uso em áreas de preservação. A tabela 2 expõe os valores do padrão primário nacional e da EPA de qualidade do ar: particulado total em suspensão, partículas inaláveis, fumaça, dióxido de enxofre, monóxido de carbono, ozônio e dióxido de nitrogênio.

Tabela 2– Padrões nacional e internacional de qualidade do ar

Poluente	Tempo de Exposição	Padrão CETESB Primário ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Padrão EPA Primário ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Partículas Totais em Suspensão	24 horas	240	-
	MGA	80	-
Partículas Inaláveis (PM_{10})	24 horas	150	150
	MAA	50	50
Partículas Finas ($\text{PM}_{2,5}$)	24 horas	-	35
	MAA	-	15
Fumaça	24 horas	150	-
	MGA	60	-
Dióxido de Enxofre	24 horas	365	365
	MGA	80	80
Dióxido de Nitrogênio	1 hora	320	-
	MGA	100	100
Monóxido de Carbono	1 hora	40.000 (35 ppm)	40.000 (35 ppm)
	8 horas	10.000 (9 ppm)	10.000 (9 ppm)
Ozônio	1 hora	160	235
	8 horas	-	157

Médias de 24, 8 e 1 hora não podem ser excedidas mais de uma vez em um ano

MAA = média aritmética anual, MGA = média geométrica anual; PM = material particulado; ppm = partículas por milhão; CETESP = Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental; EPA = Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

I.4.3 – Ação da poluição sobre o Trato Respiratório

Há evidências de que a ROFA pode comprometer o epitélio pulmonar, causando lesão e inflamação. Essas respostas seriam influenciadas por: 1) número de partículas, 2) área de superfície da partícula, 3) composição química da partícula, 4) interação entre os metais, 5) intersticialização de partículas e 6) estresse oxidativo (Dreher e cols., 1997; Dye e cols., 1997; Gavett e cols., 1997; Kodavanti e cols., 1997; 1998; Lewis e cols., 2003).

Acredita-se que o estresse oxidativo se inicia pelo contato da célula com a partícula (através da liberação localizada de altas concentrações de metais de transição), e prossegue com a liberação de espécies reativas de oxigênio de leucócitos inflamatórios, que migram para dentro dos espaços aéreos como resultado da interação primária entre as células pulmonares e as partículas (Dye e cols., 1997; Rahman & MacNee, 1998). O estresse oxidativo é um mecanismo sinalizador geral dentro das células pulmonares, que estimula a transcrição de um número de genes pró-inflamatórios para citocinas, enzimas antioxidantes, receptores e moléculas de adesão (Rahman & MacNee, 1998).

Li e colaboradores descreveram que a instilação de PM₁₀ em ratos produziu influxo neutrofílico para o interior dos espaços aéreos, com estresse oxidativo caracterizado por redução da concentração de glutathione (enzima que atua como “removida” de radicais livres). Além disso, houve aumento da permeabilidade epitelial, um efeito que poderia aumentar a intersticialização de partículas e criar inflamação intersticial (Li e cols., 1996).

Paralelamente, há evidência de aumento da expressão de marcadores bioquímicos 24 horas após a exposição à ROFA, tais como: 1) proteína total e albumina, indicando dano na barreira epitelial alveolar; 2) desidrogenase láctica,

enzima citoplasmática indicadora de lesão celular e citotoxicidade e 3) acetil- β -D-glicosaminidase, enzima lisossomal indicadora de liberação de protease (Gavett e cols., 1997; 1999).

As células epiteliais das vias aéreas estão em uma localização particularmente vulnerável por serem as primeiras a interagir com as partículas inaláveis e, por isso, possuem maior risco de lesão. No segmento traqueobrônquico, o movimento ciliar e a secreção de muco ajudam na remoção dessas partículas. O muco pode participar muito benéficamente do processo, pela remoção dos poluentes exógenos e inativação de moléculas oxidantes. Porém, como já demonstrado em alguns estudos (Jiang e cols., 2000; Longphre e cols., 2000), a ROFA pode estimular a secreção de mucina (principal componente do muco). O excesso de secreção de muco, por sua vez, pode gerar obstrução de vias aéreas, aumento do risco de infecção, e comprometimento da troca gasosa. Os mecanismos relacionados com esse excesso de secreção podem estar envolvidos com o estresse oxidativo causado dentro das células epiteliais (Jiang e cols., 2000; Longphre e cols., 2000).

O epitélio do sistema respiratório está constantemente exposto a oxidantes, não somente provenientes de fontes exógenas, como também pelas espécies oxidativas liberadas pelas células inflamatórias ativadas nas vias aéreas. A interação dos macrófagos alveolares (MA) com as partículas atmosféricas aumenta a atividade fagocítica dos mesmos e liberação de mediadores inflamatórios como TNF- α (Goldsmith e cols., 1997). Os efeitos das partículas inaláveis sobre a saúde variam de mudanças mínimas a profundas lesões agudas e crônicas. Porém, o mecanismo exato dessas ações dos particulados e o papel dos MA ainda necessita ser esclarecido.

Um estudo *in vitro* com MA de hamsters saudáveis expostos a partículas de ROFA e de ar ambiente concentrado (Goldsmith e cols., 1997) demonstrou que ambas as partículas causaram um aumento dose-dependente do estresse oxidativo intracelular, o qual pode contribuir para uma subsequente ativação e produção de mediadores inflamatórios.

A ativação e mobilização de células inflamatórias, a produção de proteínas na fase aguda e a produção de mediadores inflamatórios circulantes caracterizam a resposta inflamatória sistêmica.

Van Eeden e colaboradores (van Eeden e cols., 2001) analisaram citocinas produzidas pelos MA na exposição a diferentes tamanhos e concentrações de partículas. Os MA foram incubados com ROFA, partículas do ambiente urbano, partículas de carbono e partículas de látex produzindo aumento dose-dependente na produção de TNF- α . Além disso, os autores observaram que a estimulação de MA pelas partículas atmosféricas acarreta a produção de citocinas pró-inflamatórias, particularmente interleucina (IL)-6, IL-1 β , proteína inflamatória de macrófagos -1 α (MIP-1 α), e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) “*in vitro*”, e que essas citocinas são também encontradas no sangue de indivíduos expostos à poluição atmosférica aguda.

A inibição da frequência de batimentos ciliares após exposição à ROFA, observada por Schiff e Grahan (Schiff & Grahan, 1984), seria outro importante fator no favorecimento do acúmulo de secreção e, posteriormente, infecção.

I.4.4 – Deposição de Partículas Inaláveis no Trato Respiratório

Durante a inspiração, as partículas são transportadas com o ar inspirado das vias aéreas superiores para as regiões de troca gasosa do pulmão. Um determinado

número de partículas ficará retido no sistema respiratório ao tocar a superfície úmida das vias aéreas, um fenômeno geralmente conhecido com *deposição de partículas*. Por conseguinte, com a expiração nem todas as partículas são expelidas em suspensão gasosa.

A característica mais importante que influencia a deposição das partículas no trato respiratório é o seu tamanho. Modelos de deposição de partículas inaláveis relacionam o diâmetro aerodinâmico da partícula ao local de deposição no pulmão (Bennett e cols, 1996; Churg e Brauer; 1997; Heinrick e cols, 2003).

As partículas inaladas de maior tamanho normalmente se depositam nas vias aéreas superiores ou grandes vias aéreas inferiores, sendo eliminadas com espirro, tosse e assoar do nariz. Já as partículas finas, depositam-se mais facilmente na periferia do pulmão, sendo eliminados pela expectoração ou deglutição, fagocitadas pelos macrófagos ou absorvidas pela corrente sanguínea (Kreyling & Scheuch, 2000; Raabe, 1999; Schulz e cols., 2000).

Os locais de deposição também são influenciados pela geometria das vias aéreas e alvéolos, padrão ventilatório (frequência respiratória e volume corrente), respiração nasal/ oral e secreções respiratórias (Schulz e cols., 2000). O aumento do volume corrente com fluxo aéreo constante, transporta partículas mais distalmente e aumenta o tempo médio de permanência das mesmas dentro do pulmão. Conseqüentemente, mais partículas atingem estruturas periféricas menores com mais tempo disponível para o transporte gravitacional e difusional, havendo portanto, um aumento na deposição total para todos os tamanhos de partículas. Por outro lado, o aumento do fluxo aéreo, com volume corrente constante aumenta a deposição para partículas maiores que 2 μm , diminuindo, porém o depósito de partículas menores. Isso ocorre porque, fluxos mais altos aumentam a probabilidade

de agregação de partículas por impactação nas grandes vias aéreas de condução; em contrapartida, cai o número de partículas adicionadas por difusão e sedimentação, devido ao menor tempo disponível para deposição.

O transporte da partícula entre o nariz e os alvéolos decorre do processo de convecção, resultante de gradientes de pressão gerados ao longo das vias aéreas durante a respiração. Se por um lado a área de seção transversa das vias aéreas aumenta rapidamente em direção à periferia do pulmão (West, 1996), a velocidade do fluxo diminui dentro das vias aéreas de condução para as vias de transição e região alveolar do pulmão (West, 1996). Conseqüentemente, o tempo de permanência das partículas dentro das vias aéreas de condução é curto, e vai aumentando em direção à periferia do pulmão.

Quando as partículas não seguem, mas divergem do fluxo aéreo, e assim entram em contato com a superfície, ocorre a deposição de partículas. Essa divergência entre o fluxo aéreo e a trajetória da partícula é principalmente devida aos mecanismos de transporte de partículas: difusional, gravitacional e inercial. Até que ponto cada um desses mecanismos irá contribuir para o depósito de uma partícula específica dependerá das características físicas da mesma (Raabe, 1999). O transporte difusional é realizado principalmente pelas partículas finas. As colisões entre as moléculas de gás e uma partícula causam vários pequenos deslocamentos dessa partícula. A distância que uma partícula percorrerá em decorrência da difusão aumenta com o tempo e com a diminuição do seu diâmetro (Raabe, 1999). A inércia de uma partícula depende de sua densidade e diâmetro, além da velocidade do fluxo aéreo. A impactação inercial provavelmente ocorre nas grandes vias aéreas de condução do pulmão, onde a velocidade do fluxo é elevada e onde ocorrem rápidas mudanças na direção fluxo aéreo (Raabe, 1999).

I.5 - MECÂNICA RESPIRATÓRIA

I.5.1 Noções básicas

A respiração é um processo cíclico que envolve trabalho mecânico dos músculos respiratórios para a movimentação do sistema respiratório. Dois componentes formam o sistema respiratório: o pulmão e a parede torácica. Como parede torácica subentende-se todas as estruturas que se movem durante o ciclo respiratório à exceção dos pulmões. A pressão motriz, que é aquela 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).

A elasticidade constitui 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, ou seja, 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.

O tecido pulmonar e a parede torácica 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 motriz necessária para manter o sistema respiratório insuflado 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.

Cabe ressaltar que, ao invés de complacência, é freqüentemente utilizada a elastância. 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 que se somam os inversos das complacências: $1/C_{rs} = 1/C_L + 1/C_w$.

Dois fatores respondem pelo comportamento elástico do pulmão. Um deles corresponde aos componentes elásticos do tecido pulmonar (fibras elásticas e colágenas). 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 de atuação entre as moléculas do líquido são muito maiores do que aquelas entre líquido e gás, resultando em que a área líquida torna-se 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 o número 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 inspirado 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”. É importante notar que esta deformação não é irreversível, mas sim reproduzível, podendo ser repetida, desde que seja precedida por um período de tempo onde o material permaneça em condições de repouso, a fim de apagar a memória do evento anterior. Do ponto de vista morfofuncional, a viscoelasticidade ocorre ao 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.

I.5.2 - 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 isso, faz-se necessária a interpretação fisiológica de variáveis mensuráveis como fluxo, volume e pressão na abertura das vias aéreas.

O modelo mais simples é composto por 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 são, respectivamente, a elastância e a resistência do sistema respiratório e P representa 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).

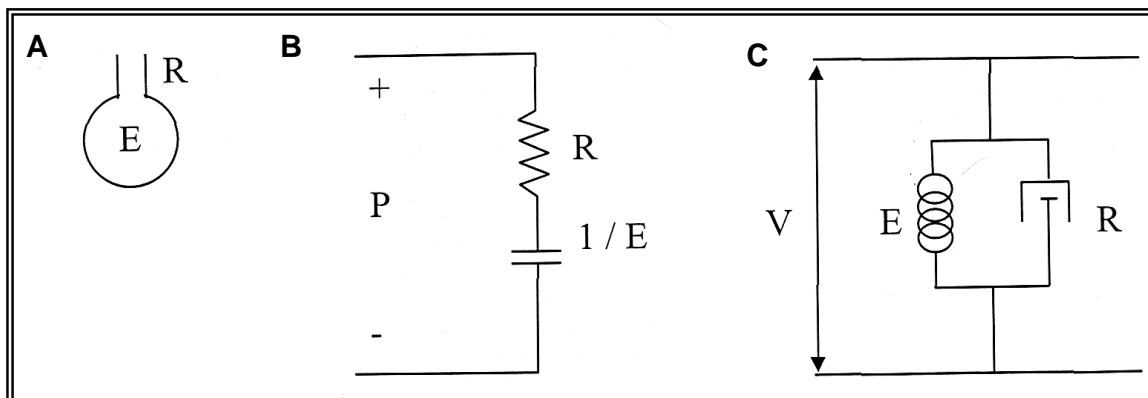


Figura 1 - Modelo linear uni-compartimental. Representação anatômica (A), elétrica (B) e reológica (corpo de Voigt, C). R, resistência do sistema respiratório; E, elastância do sistema respiratório; V, variações de volume; P, pressão.

Na década de 60 foram descritos os primeiros modelos bicompartimentais para estudo da mecânica respiratória, que associavam 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, que corresponde à pressão de retração elástica do sistema respiratório (P_{el}), como mostrado na Figura 2.

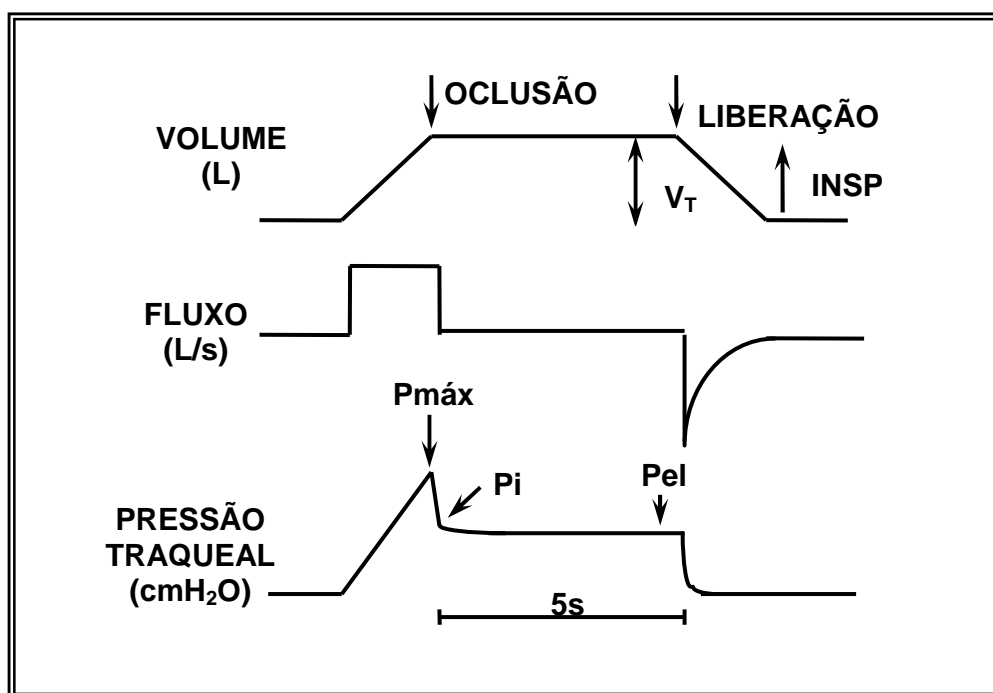


Figura 2 - Modelo do método de oclusão ao final da inspiração. Registros de volume, fluxo aéreo e pressão traqueal em função do tempo.

O modelo de Bates e colaboradores 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 ($R_{nit,L}$) 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 ($R_{nit,w}$) 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 $\tau_{2,w}$).

Quando esse modelo é alongado (afastamento das duas barras horizontais) a uma velocidade constante (v), a carga da mola E2 aumenta com o tempo (T_i) e a velocidade do amortecedor R2 se aproxima da velocidade de alongamento (v), assim, a força exercida pela mola E2 aproxima-se de $R2.v$. Se uma manobra de “interrupção de fluxo” for realizada, o movimento relativo das duas barras horizontais cessa. Com isso, o comprimento da mola E2 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 E2, resultando em dissipação calórica de energia no amortecedor R2.

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 subsequentemente até ser atingindo o platô, reflete a pressão dissipada em decorrência da viscoelasticidade e/ou inhomogeneidade do sistema, as quais são determinadas, respectivamente, pelo “stress relaxation” e “pendelluft” (Bates e cols., 1985a; 1988).

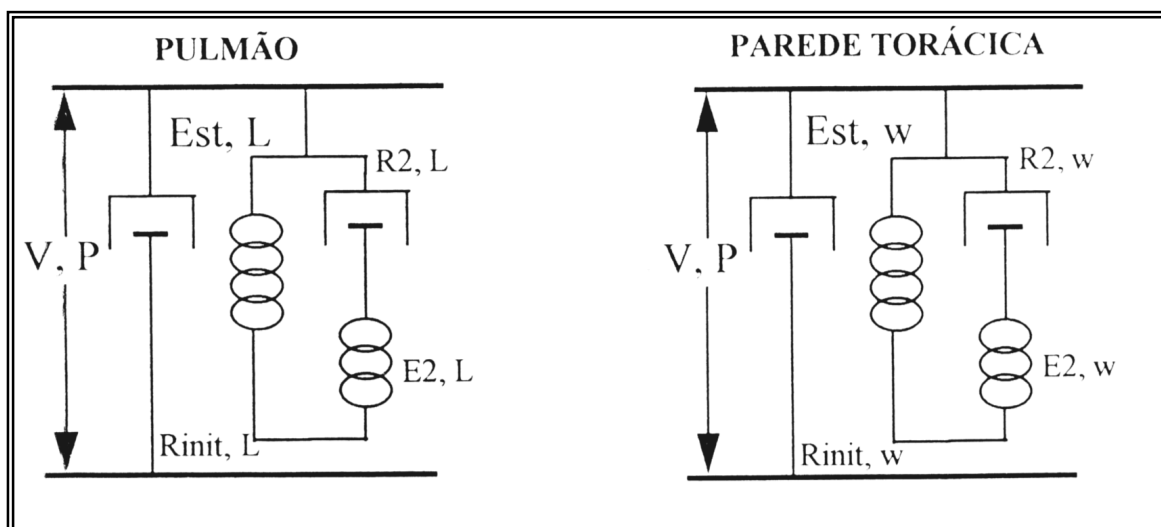


Figura 3 - Modelo de molas e amortecedores para interpretação da mecânica do sistema respiratório com a técnica de interrupção do fluxo, proposto por Bates e colaboradores (Bates e cols., 1985). Pulmão e parede torácica apresentam um componente resistivo ($R_{init,L}$ e $R_{init,w}$, respectivamente) 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 da 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 (Horie & Hildebrandt, 1971). 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, ajudando a explicar a queda não homogênea da pressão pleural após a oclusão das vias aéreas (Zin e cols., 1989). A abertura extensa da parede abdominal leva ao aumento da 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, através 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 ($R_{int,L}$), da parede ($R_{int,w}$) e do sistema respiratório ($R_{int,rs}$) aumentam linearmente com o aumento do fluxo, enquanto que 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, $R_{int,L}$, $R_{int,w}$ e $R_{int,rs}$ 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 através de estudos experimentais utilizando-se cápsulas posicionadas em pontos diferentes da superfície pleural. Ao medir diretamente a pressão alveolar, comprovou-se ser esta homogênea através dos pulmões, 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; Corrêa e cols., 2001; 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

II – OBJETIVOS

II.1 - OBJETIVO GERAL

Acompanhar, durante cinco dias, as alterações mecânicas, morfométricas e celulares respiratórias em um modelo murino de exposição à fuligem da queima de óleo (ROFA), determinando a composição desta.

II.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 (ROFA).
2. Estudar as alterações morfométricas e a celularidade total e diferencial no parênquima pulmonar.
3. Realizar a análise da celularidade do sangue e do lavado broncoalveolar.
4. Realizar a análise ultraestrutural do parênquima pulmonar.
5. Quantificar a composição da ROFA utilizada.

MATERIAIS E MÉTODOS

III – MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 - ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados setenta camundongos BALB/c, pesando 25 ± 5 g (média \pm DP), oriundos do biotério do Laboratório de Fisiologia da Respiração do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 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, 1985) e de acordo com a convenção de Helsinki para o uso e cuidado dos animais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CAUAP) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

III.2 - CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Setenta camundongos BALB/c, pesando 25 ± 5 g (média \pm DP) foram aleatoriamente divididos em dois grupos principais: no grupo controle os animais receberam 10 μ l de solução salina (NaCl a 0,9%) por instilação intranasal (i.n.) (n=10), e no grupo ROFA, os animais receberam 20 μ g de ROFA diluídos em 1 mL solução salina, com volume final de 10 μ L administrado por i.n. (n = 60). Para a instilação intranasal os animais foram anestesiados com sevoflurano e se recuperaram rapidamente do procedimento.

Todos os animais foram analisados em 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a instilação de salina ou ROFA (n = 5 para cada tempo especificado). Dos setenta

animais utilizados, trinta e cinco animais foram submetidos à análise de mecânica respiratória e histologia, enquanto os outros trinta e cinco foram submetidos à análise de celularidade do lavado broncoalveolar (BAL) e sangue.

Após a realização da medida da mecânica respiratória “in vivo” os animais foram sacrificados e tiveram seus pulmões removidos para análise da morfometria pulmonar, quantificação da celularidade total e diferencial e análise por microscopia eletrônica.

A análise quantitativa da composição da ROFA foi realizada no Laboratório de Radioisótopos Eduardo Penna Franca, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Foram verificadas as concentrações de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e organoclorados, além da concentração de metais pesados.

A ROFA utilizada neste estudo foi extraída do incinerador de material hospitalar do Hospital Universitário da USP – SP.

III.3 – MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Nos tempos após a instilação intranasal acima especificados, os animais foram sedados com diazepam (1 mg i.p.), 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 0,80 mm de diâmetro interno, sendo a cânula fixada à traquéia por meio de fios de algodão. Os animais foram paralisados com trietiliodeto de galamina (2 mg/kg, por administração intra-peritoneal).

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

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos à 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. No instante da perfuração do diafragma foi instalada pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O, a fim de evitar o desenvolvimento de colapso pulmonar e atelectasias (Saldiva e cols., 1992; Powers e cols., 1973; Rodrigues e cols., 1993).

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 ventilador foi ajustado previamente para gerar uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração. 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 tempo inspiratório 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 (Mortola & Noworaj, 1983), para medida de fluxo aéreo (V'), sendo o respirador acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. O pneumotacógrafo 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, sendo o volume corrente obtido por integração do sinal de fluxo. Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a um transdutor diferencial de pressão Validyne MP45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA) para medida da pressão traqueal (P_{tr}).

Uma vez que modificações abruptas no diâmetro não existiram 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) (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 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a instilação intranasal de ROFA (ROFA 6, ROFA 24, ROFA 48, ROFA 72, ROFA 96 e ROFA 120) ou salina (C), sendo obtidos através do registro de 15 ciclos respiratórios pelo método da oclusão ao final da inspiração (descrito a seguir).

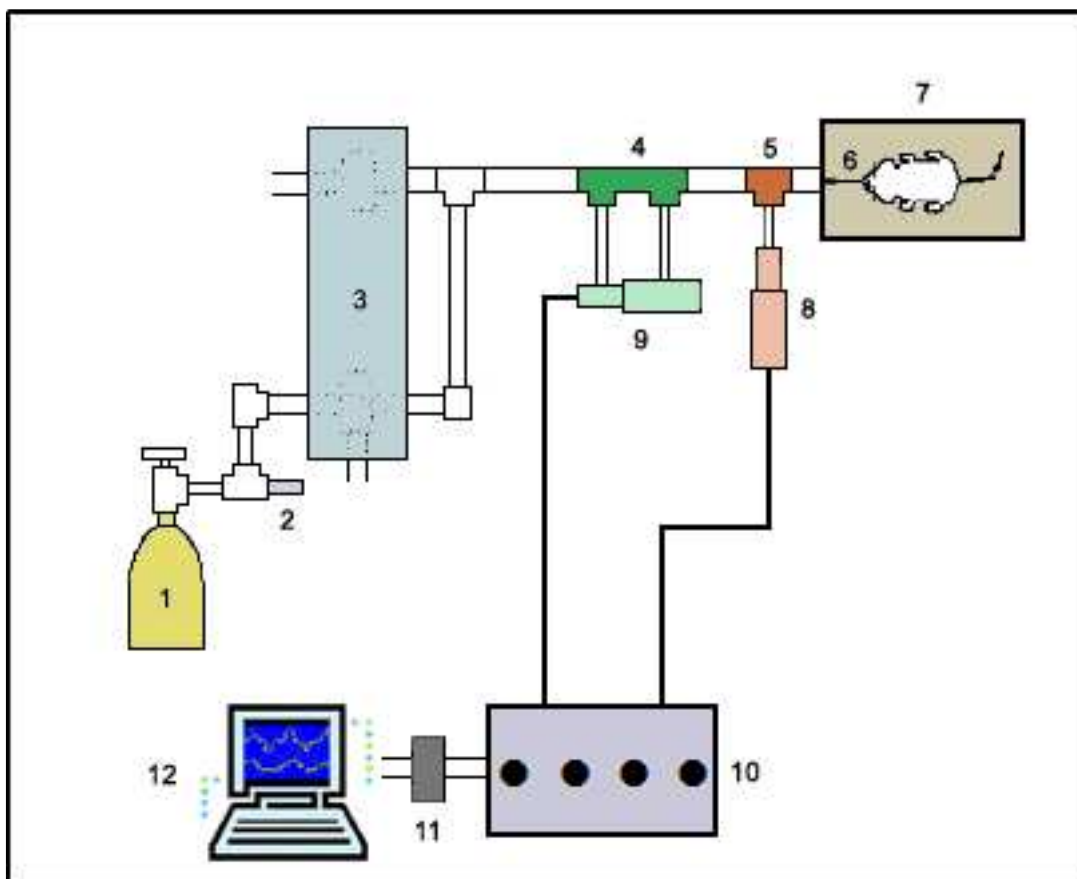


Figura 4 – Montagem experimental consistindo de:

- 1 - Cilindro de ar comprimido.
- 2 - Válvula redutora de pressão.
- 3 - Ventilador de fluxo inspiratório constante composto por duas válvulas solenóides.
- 4 - Pneumotacógrafo.
- 5 - Peça em "T" para medida de pressão nas vias aéreas.
- 6 - Cânula traqueal.
- 7 - Mesa cirúrgica.
- 8 - Transdutor diferencial de pressão para medida de pressão nas vias aéreas.
- 9 - Transdutor diferencial de pressão para medida 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.

III.3.1 - Método de Oclusão ao Final da Inspiração

A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração (Bates e cols., 1985), 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 que caracteriza a queda rápida inicial (ΔP_1), 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 no pulmão (ΔP_{tot}) (Figura 5).

A elastância estática (Est) do pulmão foi, então, obtida, dividindo-se P_{el} pelo volume corrente.

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 colaboradores (Kochi e cols., 1988a).

As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

$$\begin{aligned} \Delta P1 &= P_{max} - P_i \\ \Delta P2 &= P_i - P_{el} \\ \Delta P_{tot} &= \Delta P1 + \Delta P2 \\ Est &= P_{el} / V_T \\ E_{dyn} &= P_i / V_T \\ \Delta E &= E_{dyn} - Est \end{aligned}$$

Onde:

$\Delta P1$ = variação de pressão relativa ao componente viscoso pulmonar

$\Delta P2$ = variação de pressão relativa ao componente viscoelástico e/ou inhomogêneo pulmonar

ΔP_{tot} = variação total de pressão 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

V_T = volume corrente

A resistência total do equipamento (R_{eq}), incluindo a cânula traqueal, foi previamente aferida através da aplicação de fluxos de ar ao sistema, com concomitante registro das variações de pressão (ΔP). Uma vez que $R = \Delta P / V'$, a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva $\Delta P \times V'$. A

Req, constante até fluxos de 26 mL/s (bem acima da faixa de fluxos utilizada no presente experimento), foi de $0,12 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. A variação de pressão determinada pelo equipamento ($\Delta P_{\text{eq}} = \text{Req} \cdot V'$) foi subtraída das pressões resistivas do pulmão, de tal forma que os resultados representam suas propriedades mecânicas intrínsecas.

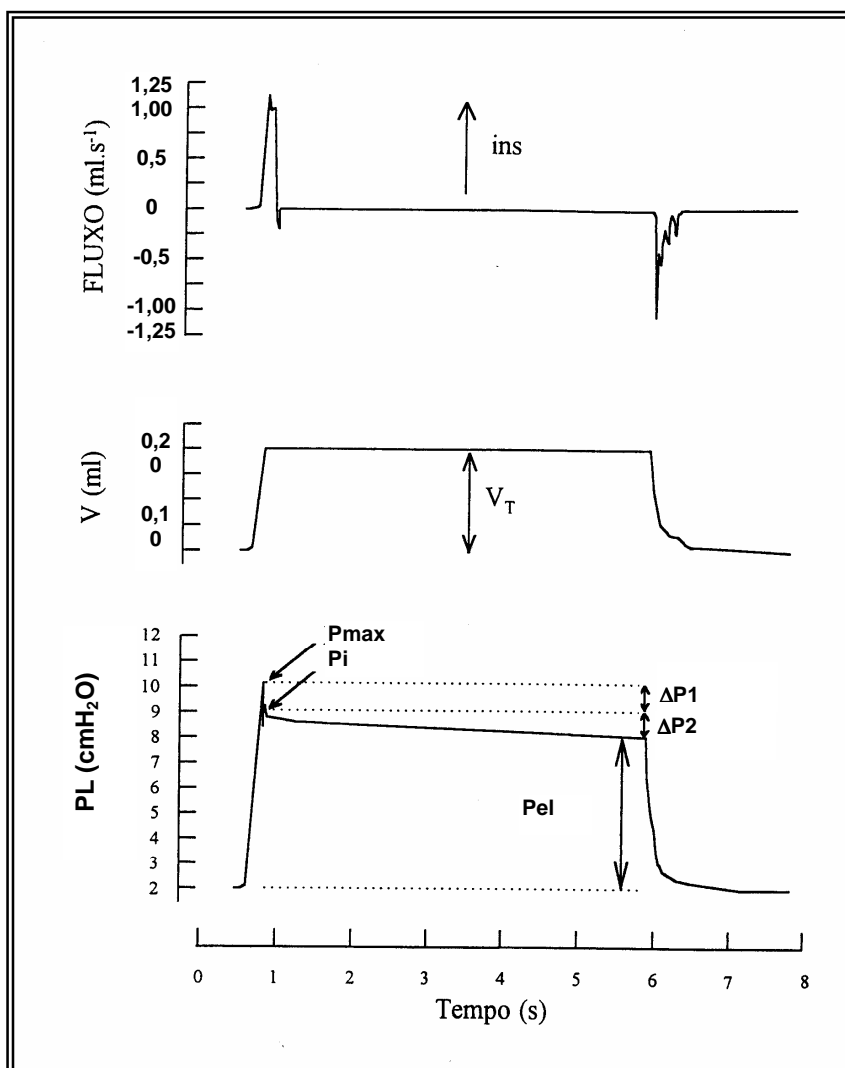


Figura 5 – Método de oclusão ao final da inspiração. Registros dos sinais de fluxo aéreo, volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo aéreo de 1 mL/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na PL ($\Delta P1$) que corresponde a $P_{\text{max}} - P_i$, 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 cmH_2O . Ins, inspiração. V_T , volume corrente.

III.4 – ESTUDO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO

III.4.1 – Remoção dos Pulmões e Análise Histopatológica

Ao término do experimento, o animal foi imediatamente sacrificado por seção da aorta abdominal e 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 esquerdos foram resfriados por imersão rápida em nitrogênio líquido (aproximadamente 3 min), retirados e mantidos em solução de Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) a -70° C por 24 h. Após esse período, o material foi desidratado progressivamente por imersão em soluções com concentrações crescentes de etanol (Nagase e cols., 1996):

- MC-1: etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a -20°C durante 1h;
- MC-2: etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a -20°C durante 1h;
- MC-3: etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a -20°C durante 1h;
- etanol a 100%, a -20°C durante 1h e, em seguida, a -4°C durante 24h.

Depois da fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 3 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 através da técnica convencional de contagem de pontos ("point-counting") (Gundersen e cols., 1988), utilizando uma ocular acoplada ao microscópio contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas dispostos em paralelo (Figura 6).

Em um aumento de 200x foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. Foi quantificada a fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados (Weibel, 1990). O número de pontos que caíram em área de alvéolo normal, colapsado ou hiperinsuflado foi dividido pelo total de pontos contados em cada campo analisado (normal + colapsado + hiperinsuflado) e expresso sob a forma de percentual.

Em um aumento de 1000x foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes para quantificação de: tecido pulmonar, células polimorfonucleares (neutrófilos) e células mononucleares (macrófagos + linfócitos + monócitos).

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

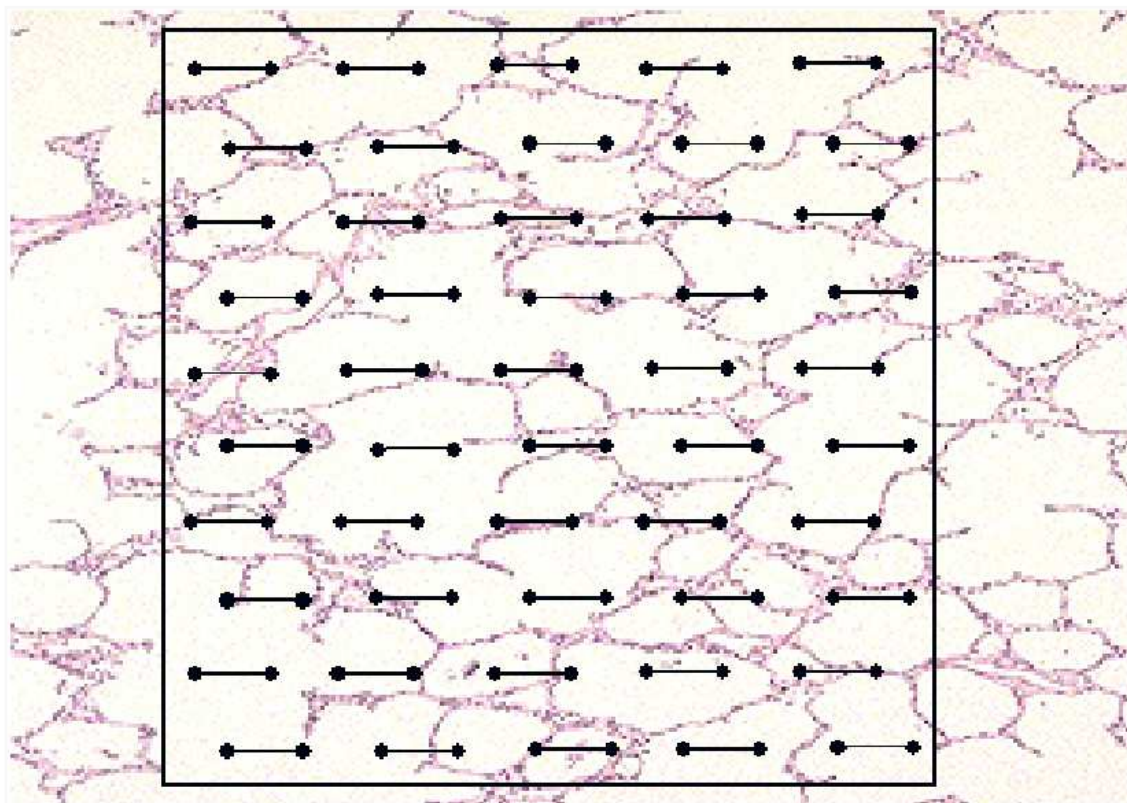


Figura 6 – Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos

III.5 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para a análise por microscopia eletrônica foram retirados dois fragmentos de parênquima pulmonar do pulmão direito de cada animal (0,2x0,2x0,2 cm). Os fragmentos foram colocados em glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4 por 2 h, sendo posteriormente lavados em solução de sacarose, constituída de 4,5 g de NaCl e 8,9 g de sacarose diluídos em 500 mL de água destilada, até a pós-fixação. A seguir, os fragmentos foram imersos em solução de tetróxido de ósmio (1% em água, contendo 133 mg de sacarose por mL) por 2 h. Após a lavagem em água bidestilada as preparações foram colocadas na geladeira em acetato de uranila 0,5% contendo 133 mg de sacarose, por um tempo que variou de 2 a 24 h. O processo foi continuado, efetuando-se a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, progredindo gradativamente até álcool absoluto, sendo, então, o tecido mergulhado em óxido de propileno por 15 minutos (2 vezes). Iniciando a fase de embebição, as amostras foram colocadas em misturas de partes iguais de óxido de propileno e resina (araldite). Os frascos contendo os fragmentos foram colocados para girar (1 rotação a cada 4 minutos, por 1 hora). Posteriormente, as peças foram colocadas por 16 h em resina com a seguinte composição: 10 mL de araldite (Cy-205), 8 mL de endurecedor DDSA (anidrido de ácido doxecenil succínico), 0,5 mL de acelerador (N-benzildimetilamina) e 0,1 mL de plastificante (dibutilftaltato). Ao término de 16 h, as amostras foram colocadas em moldes de silicone com nova resina, para polimerização em estufa a 60°C, por 5 dias. Concluída a polimerização, os espécimes foram aparados e cortes semifinos obtidos com o ultramicrótomo Porter Blum MT2 (Sorvall, Waltham, MA, EUA). Tais cortes, com 0,5 µm de espessura, foram montados em lâminas de vidro e corados com uma mistura de azul

de metileno a 1% e azur II, em partes iguais e a quente. Nestes cortes, selecionaram-se áreas representativas das lesões. De cada espécime, 2 blocos, contendo aproximadamente 10 fragmentos cada um, foram submetidos à análise para seleção dos cortes ultrafinos.

Para o estudo ultraestrutural, os cortes ultrafinos com espessura em torno de 90 nanômetros foram contrastados por acetato de uranila a 2% durante 30 minutos e, finalmente, por citrato de chumbo por 10 minutos. A observação dos cortes e as eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico JEOL (JEOL 1010, Tóquio, Japão).

III.6 – ANÁLISE DA CELULARIDADE DO LAVADO BRONCOALVEOLAR E DO SANGUE

Para a análise da celularidade do lavado broncoalveolar e do sangue foram utilizados outros 35 camundongos. Primeiramente, o sangue foi retirado da cauda do animal após serem anestesiados com isoflurano, e foram realizados os esfregaços nas lâminas. Em seguida os camundongos, foram sacrificados em uma câmara de CO₂ e o lavado broncoalveolar foi realizado pela lavagem dos pulmões por duas vezes consecutivas com 1 mL de PBS 1x, estéril a 37° C, através da cânula traqueal.

A contagem total de leucócitos do sangue periférico e do fluido do lavado broncoalveolar foi efetuada em câmaras de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 10 x), após diluição (40 x) das mesmas em solução de Turk (ácido acético 2%). A análise diferencial de leucócitos foi realizada sob objetiva de imersão em citoesfregaços obtidos em citocentrífuga (Shandon – 450 rpm por 5 minutos), corados pelo método May Grunwald-Giemsa. De acordo com este método, as lâminas ficam imersas no May Grunwald por 3 minutos para fixação e coloração de

grânulos celulares, 2 minutos em água para retirada do excesso de corante e 15 minutos no Giemsa, onde o núcleo foi corado.

A contagem diferencial de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos foi realizada com microscópio óptico (100 células por lâmina) em aumento de 1000x.

III.7 – ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA FULIGEM DA QUEIMA DO ÓLEO (ROFA)

III.7.1 – Análise dos metais pesados

Os experimentos de extração/solubilização dos metais pesados presentes no particulado retido no filtro foram conduzidos sob o princípio básico: expor o material em solução ácida, visando obter a um extrato com volume final aferido, no qual os metais estejam solubilizados.

Todos os metais foram analisados em espectrofotômetro por absorção atômica de chama (modelo AA 1475, Varian, Austrália), seguindo padrões de recomendação (VARIAN, 1981) e experiências do Laboratório de Radioisótopos na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Foram quantificados os seguintes metais: cobre (Cu), cádmio (Cd), cromo (Cr), níquel (Ni), manganês (Mn), ferro (Fe), chumbo (Pb) e zinco (Zn).

III.7.1.a - Extração total dos metais

Para estimar o conteúdo total de metais pesados no sedimento, transferiu-se as amostras para cadinhos de teflon em banho de areia a quente e procedeu-se a digestão com 5 mL de HNO₃ 65% (P.A.). Abaixo do ponto de fervura, levaram-se as amostras à total evaporação. Este momento de maior temperatura é o de maior

eficiência da digestão do ácido, porém, não se deve ultrapassar o ponto de total evaporação, pois pode haver perda de elementos por volatilização.

Adicionou-se, então, 5 mL de HCl 37% (P.A.), levando-se mais uma vez ao ponto de secura da amostra, e finalmente solubilizando o extrato com HCl 0,1 M. O volume final aferido, com auxílio de uma proveta de vidro, foi de 15 mL deste último ácido diluído. As amostras foram, então, armazenadas em frascos plásticos em geladeira até o momento da análise no espectrofotômetro.

III.7.2 – Análise dos organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

As análises de organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) se baseiam em técnicas cromatográficas de separação e estão divididas em quatro etapas principais: extração, purificação, fracionamento e determinação dos poluentes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês "HPLC").

- a) Extração quantitativa dos poluentes da matriz;
- b) Purificação do extrato com o objetivo de remover compostos que poderiam interferir na análise instrumental;
- c) Fracionamento dos poluentes no extrato purificado em três grupos de poluentes;
- d) Determinação dos poluentes por cromatografia de gás com detector de captura de elétron (GC-ECD) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

III.7.2.a - Extração da amostra

Matrizes como particulado apresentam uma gama de substâncias orgânicas associadas, principalmente adsorvidas às partículas minerais. Para um melhor desempenho na extração de poluentes orgânicos com polaridades distintas, se faz necessário a utilização de solventes orgânicos com polaridades intermediárias.

Solventes como, acetona, diclorometano, n-hexano e acetonitrila são amplamente utilizados na extração desses contaminantes (Pastor e cols., 1997; Torres e cols., 2002).

Neste estudo, foram pesados dois gramas de peso seco (p.s.) de amostra de partículas em tubos de vidro. Os tubos foram vedados com tampas de Teflon e identificados. Cada amostra foi extraída, adicionando-se uma mistura de 12 mL de n-hexano/acetona (3x 20 minutos), utilizando aparelho de ultra-som em banho quente (~90°C). Para cada extração, a proporção da mistura era alterada da seguinte forma: 1) 1:4 v/v n-hexano/acetona; 2) 1:1 v/v n-hexano/acetona; 3) 4:1 v/v n-hexano/acetona. Foi adicionado 1 mL de isoctano para cada etapa. Após cada lavagem, as amostras foram centrifugadas a 800 rpm por 15 minutos e posteriormente transferidas para balões de vidro.

III.7.2.b - Purificação

O extrato adquirido das matrizes contém poluentes como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, mas também outros compostos que podem aumentar o ruído analítico, dificultando a quantificação cromatográfica futura. Japenga e colaboradores (Japenga e cols., 1987) desenvolveram técnicas cromatográficas de purificação para poluentes orgânicos, utilizando reagentes com ação dessulfurizante (Torres e cols., 2002). Este agente é composto de uma mistura de óxido de alumínio impregnado por uma solução aquosa de sulfito de sódio e hidróxido de sódio, em uma quantidade mínima de água (11%).

Para a etapa de purificação, os extratos foram previamente concentrados em um evaporador rotatório. Após concentrado, cada extrato foi transferido para uma coluna cromatográfica aberta, empacotada com 7 gramas de agente dessulfurizante

($\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Na}_2\text{SO}_3$ em 11% de água). Primeiramente, a coluna foi ativada pela eluição de 15 mL de n-hexano. O primeiro solvente eluído é descartado. A coluna foi eluída posteriormente com 15 mL de n-hexano. Por fim, o eluato purificado foi recolhido e avolumado em balões volumétricos de 50 mL. As amostras foram armazenadas em freezer (-10°C), para a etapa seguinte.

III.7.2.c - Fracionamento

O fracionamento é uma etapa de separação, que facilita a análise e posterior quantificação das substâncias em estudo. A outra vantagem da técnica de fracionamento é preservar o equipamento cromatográfico contra possíveis compostos mais reativos, principalmente a coluna do aparelho (HPLC).

O extrato é fracionado de maneira que resultem três sub-extratos, cada um contendo uma parte dos poluentes a serem determinados:

FRAÇÃO 1: Pipetaram-se 25 mL de solução dessulfurada, contida no balão volumétrico de 50 mL, para um balão grande e reduziu-se o volume até cerca de 0,5 mL (“extrato purificado concentrado”). Colocaram-se 3 g de sílica gel em uma coluna cromatográfica estreita, depois de ter colocado um pouco de algodão previamente lavado com n-hexano, na saída da coluna. Transferiu-se o “extrato purificado concentrado” para o topo da sílica gel, assegurando a transferência completa com uma mínima quantidade de n-hexano. Elui-se a coluna com 15 mL de n-hexano e recolheu-se o eluato em um balão pequeno. Reduziu-se o volume até cerca de 0,5 mL ou até um outro volume dependente da concentração esperada.

FRAÇÃO 2: Continuou-se a eluição da coluna com 25 mL de n-hexano/éter etílico (9:1) e recolheu-se o eluato em um balão grande. Adicionou-se 0,5 ml de isoctano e reduziu-se o volume até cerca de 0,5 mL.

FRAÇÃO 3: Transferiu-se o conteúdo do balão volumétrico de 50 mL, que restou depois de terem sido removidos 25 mL, para um balão grande. Usou-se n-hexano para conseguir a transferência completa. Reduziu-se o volume até cerca de 0,5 mL. Colocaram-se 3 g de sílica gel em uma coluna cromatográfica estreita, transferindo o resíduo contido no balão grande para o topo da sílica gel. Elui-se com 7 mL de n-hexano e desprezou-se o eluato. Em seguida, eluiu-se com 35 mL de n-hexano/éter etílico (9:1) e recolheu-se o eluato em um balão grande. Por evaporação, chegou-se até 1 mL e adicionou-se 0,5 mL de acetonitrilo e 0,5 mL de solução do padrão interno BBC-T. Reduziu-se o volume até cerca de 1 mL.

III.7.2.d - Cromatografia

Organoclorados

Para análise de compostos organoclorados, utilizou-se um cromatógrafo a gás (Shimadzu, modelo GC-14B com injetor automático AOC-1400) equipado com detector da captura de elétrons. Foi injetado um volume de 2 µL por amostra, o gás utilizado foi hidrogênio ultra-puro com fluxo de 16,2 mL/min . A temperatura do injetor e detector foram 300 °C e 310 °C, respectivamente. Foram analisados 20 organoclorados: gama hexaclorohexano (G-HCH), hexaclorobenzeno (HCB), heptacloro, endosulfan, aldrin, dieldrin, endrin, hepta-epox, policlorado bifenila (PCB) - 28, PCB-52, PCB-118, PCB-153, PCB-138, PCB-180, PCB-209, posição orto (*op'*) -diclodifenildicloroetileno (DDE), posição para (*pp'*)-DDE, *pp'*- diclodifenildicloroetano (DDD), *op'*- dicloredifenitricloroetano (DDT), *pp'*- DDT.

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), acoplado a um detector de fluorescência (Shimadzu, modelo GC-14B) com duas bombas, LC-10AT e LC-10AS. A separação foi feita utilizando-se uma coluna de fase reversa ODS 250 x 4,0 mm d.i., com partícula de 0,5 µm de diâmetro e poro de 120 Å. A corrida foi feita em eluição por gradiente com rampa linear, partindo-se com (0 min) 50% de acetonitrila em água para 100% de acetonitrila ao final da corrida (40 min) com vazão de 1,0 mL/min. Foram analisados 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos neste estudo: naftaleno, acenaftileno, fluoreno, acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[ah]antraceno, benzo[ghi]perile e indeno[123cd]pireno.

III.8 - 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 igualdade de variâncias. Se os dados satisfizessem a ambos, eram aplicados testes paramétricos. No caso de qualquer um deles não ser satisfeito, testes não-paramétricos foram empregados.

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

Para comparação entre valores percentuais utilizou-se transformada arcoseno.

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

A análise estatística foi realizada com o programa estatístico SigmaStat 3.0 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, EUA).

RESULTADOS

IV- RESULTADOS

IV.1- MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Os valores de volumes e fluxo utilizados durante o experimento estão mostrados na tabela 3 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 (C) e os dos grupos que receberam 10 μ L de solução de ROFA (ROFA 6, ROFA 24, ROFA 48, ROFA 72, ROFA 96 e ROFA 120) estão, também, representadas na tabela 3 e nas figuras 7 e 8.

$\Delta P1$ apresentou aumento significativo 6 horas após a instilação intranasal de ROFA em relação ao grupo controle (C) (186,3%). $\Delta P2$, ΔP_{tot} , Est e ΔE foram significativamente maiores do que C após 24 horas da agressão (68,8%, 104,8%, 88,4% e 67,9%, respectivamente). No quinto dia (120 horas) todos os valores retornaram àqueles do grupo controle. (Figuras 7 e 8).

Tabela 3 – Fluxo aéreo, volume corrente, variações de pressões e elastâncias pulmão durante ventilação mecânica nos animais dos grupos controle e daqueles que receberam ROFA.

Grupos	Fluxo (mL/s)	Volume (mL)	Est (cmH₂O.mL⁻¹)	ΔE (cmH₂O.mL⁻¹)	ΔP1 (cmH₂O)	ΔP2 (cmH₂O)	ΔPtot (cmH₂O)
C	1,02 ± 0,01	0,20 ± 0	21,73 ± 0,79	3,12 ± 0,15	0,22 ± 0,02	0,61 ± 0,04	0,83 ± 0,04
ROFA 6	1,01 ± 0	0,20 ± 0	21,14 ± 1,45	3,60 ± 0,18	0,63 ± 0,04 *	0,71 ± 0,04	1,35 ± 0,07
ROFA 24	1,04 ± 0,02	0,20 ± 0	40,94 ± 2,61 *	5,24 ± 0,54 *	0,67 ± 0,11 *	1,03 ± 0,10 *	1,70 ± 0,15 *
ROFA 48	1,02 ± 0,01	0,20 ± 0	34,68 ± 2,17 *	5,22 ± 0,42 *	0,66 ± 0,04 *	1,04 ± 0,09 *	1,69 ± 0,10 *
ROFA 72	1,01 ± 0,01	0,20 ± 0	39,42 ± 2,82 *	4,75 ± 0,14 *	0,65 ± 0,04 *	0,95 ± 0,03 *	1,59 ± 0,03 *
ROFA 96	1,00 ± 0	0,20 ± 0	32,55 ± 4,96 *	5,13 ± 0,31*	0,53 ± 0,03 *	1,02 ± 0,07 *	1,55 ± 0,06 *
ROFA 120	1,00 ± 0	0,20 ± 0	21,61 ± 1,40	4,00 ± 0,09	0,41 ± 0,03	0,84 ± 0,02	1,25 ± 0,03

ΔP1, ΔP2: pressões dissipadas para vencer a resistência e a viscoelasticidade/inomogeneidades pulmonares, respectivamente. ΔPtot = ΔP1+ ΔP2. Est: elastância estática do pulmão. ΔE = E_{dyn} – Est. Os valores correspondem à média de cinco animais em cada grupo ± erro padrão da média (10 determinações por animal). * representa valores significativamente diferentes do grupo controle (p ≤ 0,05).

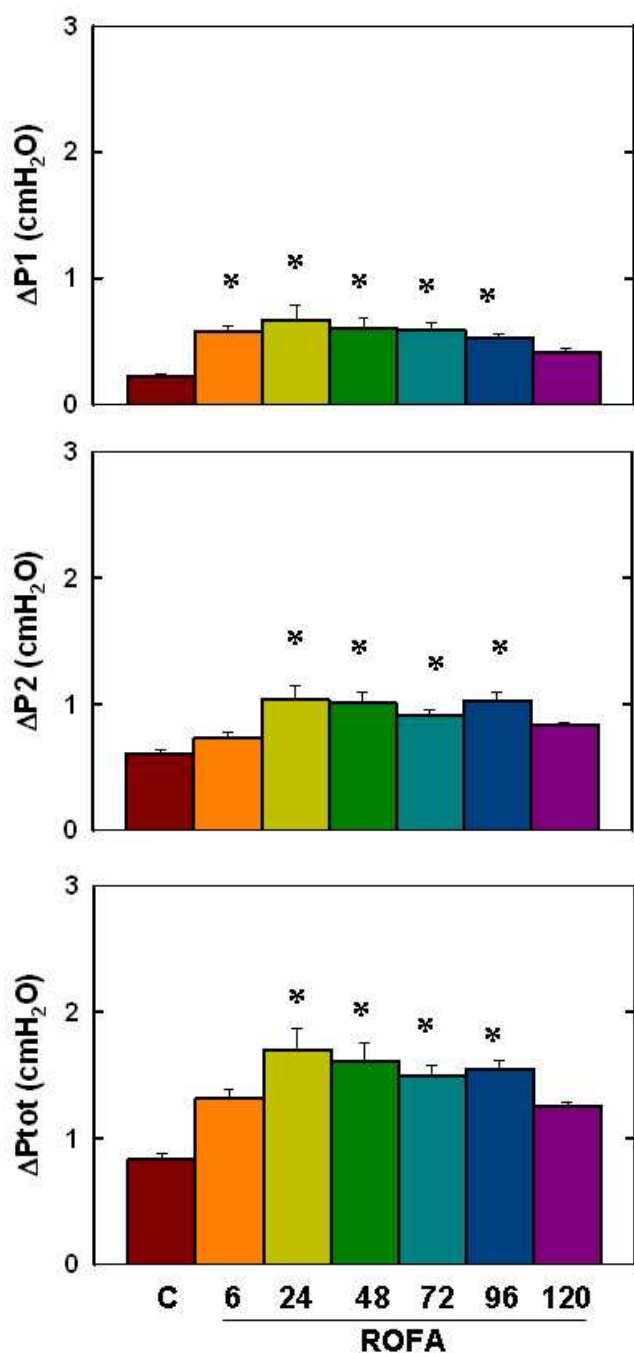


Figura 7 – Gráficos representam variações das pressões viscosa ($\Delta P1$), variações da pressão para vencer os componentes viscoelásticos/inomogêneos ($\Delta P2$) e a variação de pressão total (ΔP_{tot}) do pulmão em camundongos analisados 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após instilação intranasal de ROFA ou após instilação de salina (C). Valores representam média + EPM de 5 animais em cada grupo (10 determinações por animal). * Valores significativamente diferentes do grupo C ($p < 0,05$).

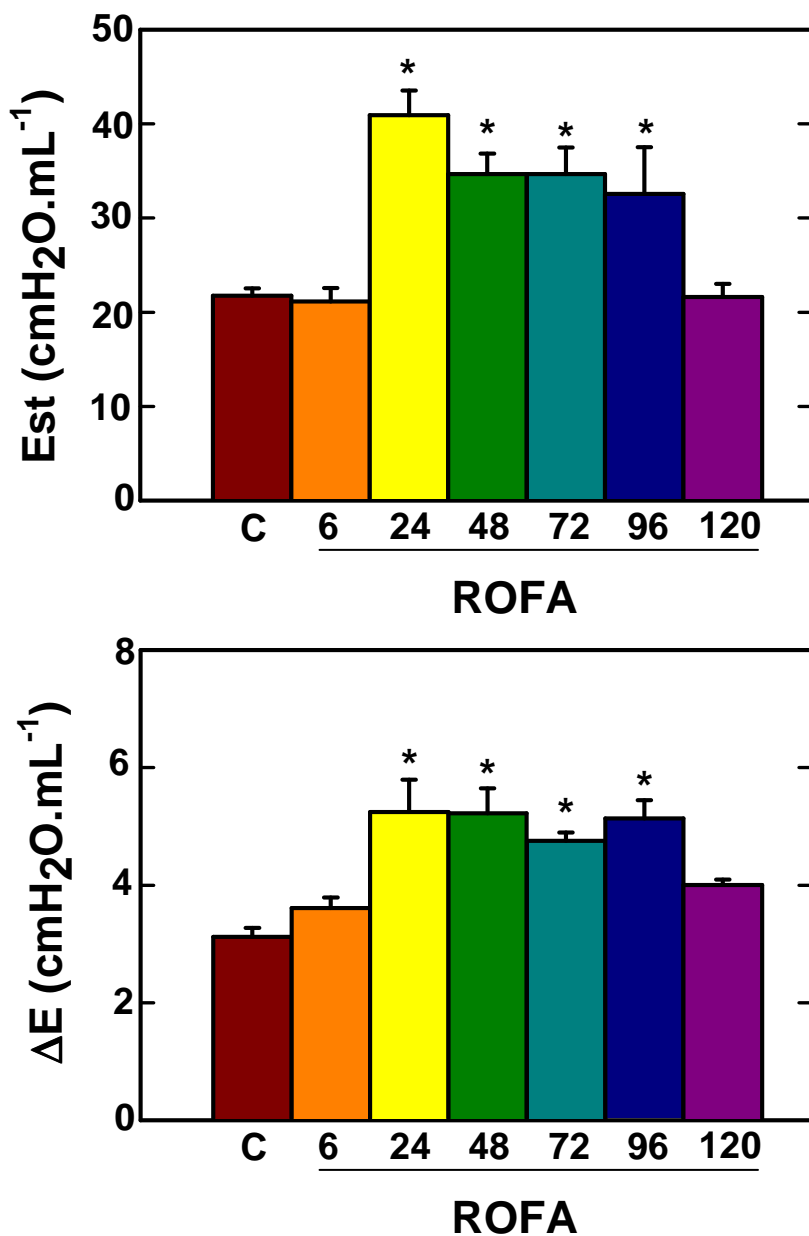


Figura 8 – Gráficos representam a elastância estática (Est) e a diferença entre elastâncias dinâmica e estática do pulmão (ΔE) em camundongos analisados 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após instilação intranasal de ROFA ou instilação de salina (C). Valores representam média + EPM de 5 animais em cada grupo (10 determinações por animal). * Valores significativamente diferentes do grupo C ($p < 0,05$).

IV.2 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

IV.2.1 - Análise Qualitativa

Na análise histopatológica qualitativa foi observada presença de colapso alveolar, com espessamento dos septos alveolares e áreas de inomogeneidades no parênquima pulmonar após 24 horas de instilação de ROFA, mantendo-se essa alteração até 96 horas pós-agressão. Além disso, observou-se aumento da celularidade em 24 horas (Figura 9).

IV.2.2 - Análise Quantitativa

Os valores obtidos na análise quantitativa dos grupos C e ROFA são apresentados nas tabelas 4 e 5. Os valores representam a média de 5 lâminas por grupo, com a observação de 10 campos aleatórios e não coincidentes por lâmina.

A quantificação de leucócitos no septo alveolar evidenciou aumento significativo no conteúdo de polimorfonucleares (PMN) 24 horas após a instilação (98%). O percentual de PMN permaneceu elevado até 96 horas, retornando a valores similares ao do grupo controle (C) no quinto dia (Tabela 4). O conteúdo total de MN foi significativamente menor 24 horas após a instilação, quando comparado ao grupo C, retornando aos valores normais em 120 horas (Tabela 4).

Na análise morfométrica do parênquima pulmonar notamos que nas primeiras 24 horas (ROFA 24) o parênquima pulmonar apresentou aumento acentuado das áreas de colapso alveolar (803,4%) com redução de 24% de alvéolos normais, quando comparado com o grupo controle (C) (Tabela 5 e Figura 9). A fração de

alvéolos normais em 120 horas após a instilação (ROFA 120) se assemelhou ao valor apresentado pelo grupo controle (C) (Tabela 5 e Figura 9).

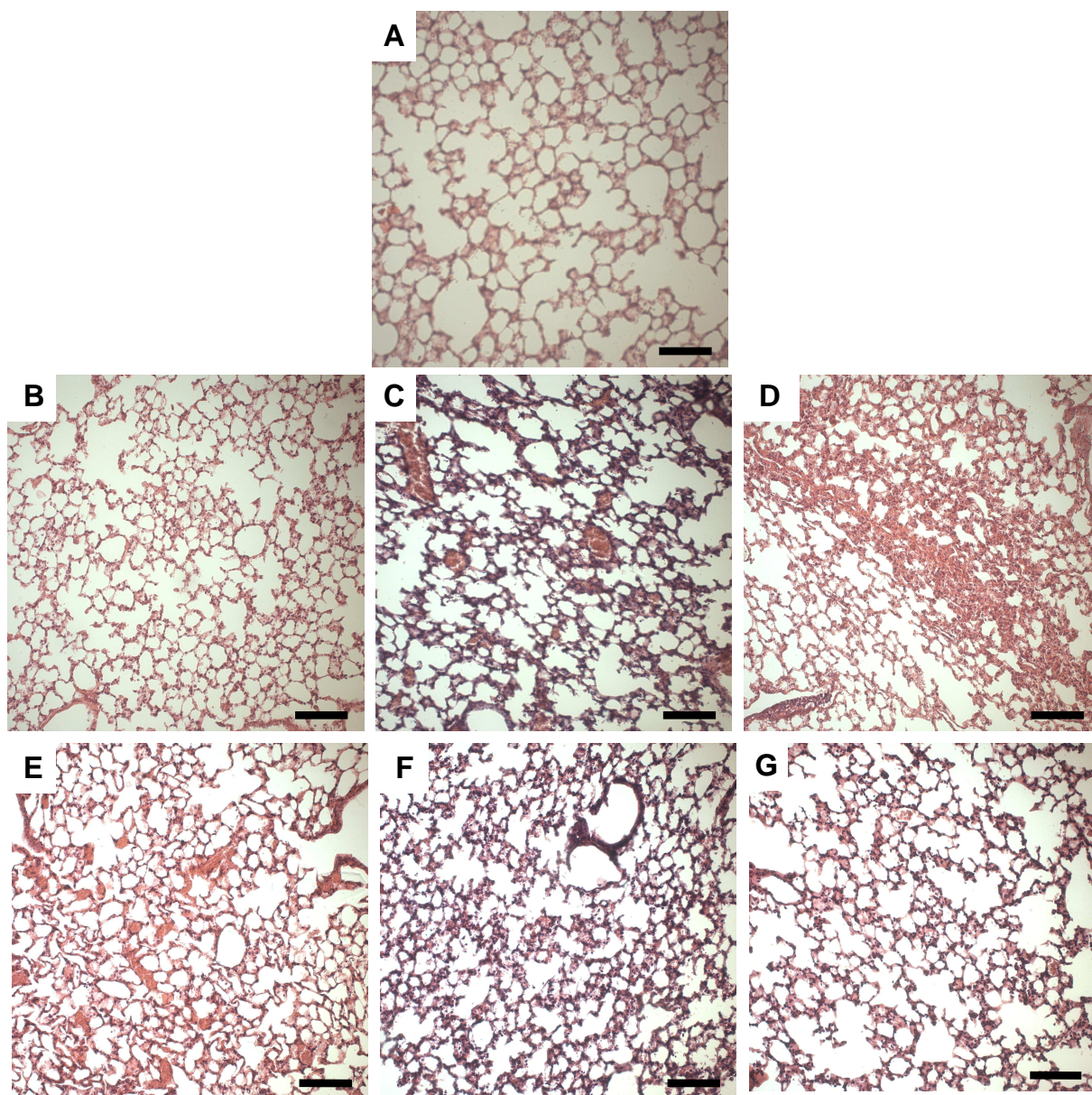


Figura 9: Fotomicrografias do parênquima pulmonar de animais após instilação intranasal de salina (A) ou ROFA e analisados 6 (B), 24 (C), 48 (D), 72 (E), 96 (F) e 120 (G) horas após a instilação, apresentando espessamento do septo e colapso alveolar em 24 horas e mantendo-os até o quinto dia. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina. Aumento original de 200x. Barras com 100 μm.

Tabela 4 – Percentual de células mononucleares e polimorfonucleares por área de tecido pulmonar dos grupos C (controle) e ROFA

Grupos	PMN (%)	MN (%)
C	15,5 ± 0,7	21,5 ± 0,9
ROFA 6	17,8 ± 1,1	18,1 ± 0,1
ROFA 24	30,7 ± 2,8 *	4,2 ± 1,3 *
ROFA 48	27,9 ± 1,4 *	2,9 ± 0,6 *
ROFA 72	26,8 ± 1,5 *	3,1 ± 0,5 *
ROFA 96	24,8 ± 1,3 *	1,9 ± 0,4 *
ROFA 120	14,9 ± 1,2	19,7 ± 1,2

Fração de área de tecido ocupada por células. PMN = polimorfonucleares, MN = mononucleares. Os valores correspondem à média de 10 campos por lâmina de cinco animais de cada grupo ± erro padrão da média dos grupos C e ROFA 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após instilação intranasal. *Valores significativamente diferentes em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Morfometria do parênquima pulmonar dos grupos C e ROFA.

Grupos	Normal (%)	Colapso (%)
C	97,0 ± 1,2	2,9 ± 1,2
ROFA 6	94,5 ± 2,9	5,4 ± 2,9
ROFA 24	73,7 ± 3,8 *	26,2 ± 3,8 *
ROFA 48	76,5 ± 3,9 *	23,4 ± 3,9 *
ROFA 72	73,6 ± 2,9 *	26,3 ± 2,9 *
ROFA 96	73,5 ± 2,9 *	26,4 ± 2,9 *
ROFA 120	91,5 ± 0,7	8,4 ± 0,7

Fração de área de alvéolos normais e colapsados dos grupos controle (C) e ROFA 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após instilação intranasal. Os valores correspondem à média de 10 campos por lâmina de seis animais de cada grupo ± erro padrão.

*Valores significativamente diferentes em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

IV.3 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA

As figuras 10 e 11 mostram a ultramicroscopia do parênquima pulmonar. O grupo controle evidenciou pneumócitos tipo I e tipo II, endotélio e epitélio alveolares preservados (Figura 10), mantendo-se a integridade capilar e da membrana basal. A matriz extracelular apresentou seus componentes estruturais normais e o espaço alveolar encontrava-se aerado. Após 24 h de instilação de ROFA (ROFA 24), encontram-se evidências de lesão endotelial com tumefação e vacuolização e neutrófilos aderidos (Figura 11).

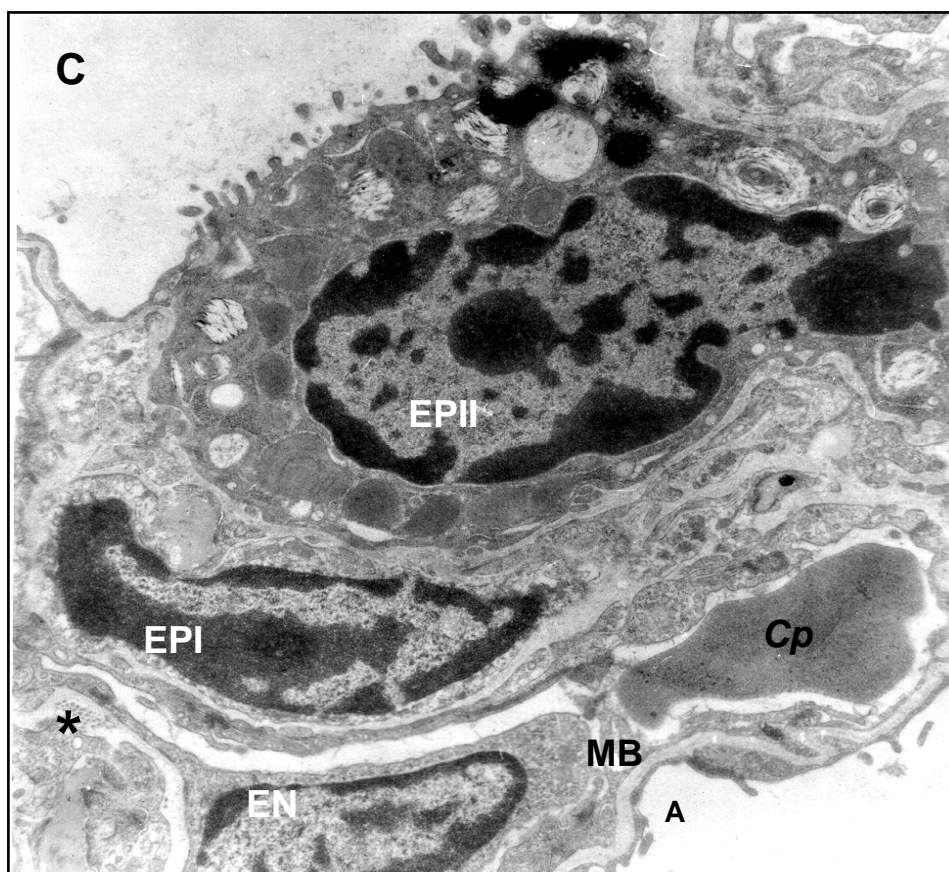


Figura 10: Ultramicrografia do parênquima pulmonar de animal do grupo controle (C). São observados espaços aéreos preservados (A), pneumócitos tipo I e II íntegros (EPI e EPII). Observamos, ainda, componentes da matriz extracelular normais. * = fibras colágenas; EN = célula endotelial; MB = membrana basal; Cp= capilar. Aumento original: 8.400 X.



Figura 11: Ultramicrografia do parênquima pulmonar de animal do grupo submetido à instilação intranasal de ROFA (24 horas). Podemos observar vacuolização e tumefação do endotélio e neutrófilos aderidos. * = célula endotelial; A = alvéolo; N = neutrófilo. Aumento original: 5.500 X.

IV.4 – ANÁLISE DA CELULARIDADE DO LAVADO BRONCOALVEOLAR E DO SANGUE

Os valores obtidos na análise quantitativa dos grupos ROFA encontram-se nas figuras 12 e 13. A análise sanguínea revelou aumento do número de neutrófilos e redução na quantidade de células mononucleares no grupo ROFA analisado 24 e 48 horas após a instilação intranasal em relação ao grupo controle (Figura 12). A celularidade no líquido do lavado broncoalveolar não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 13).

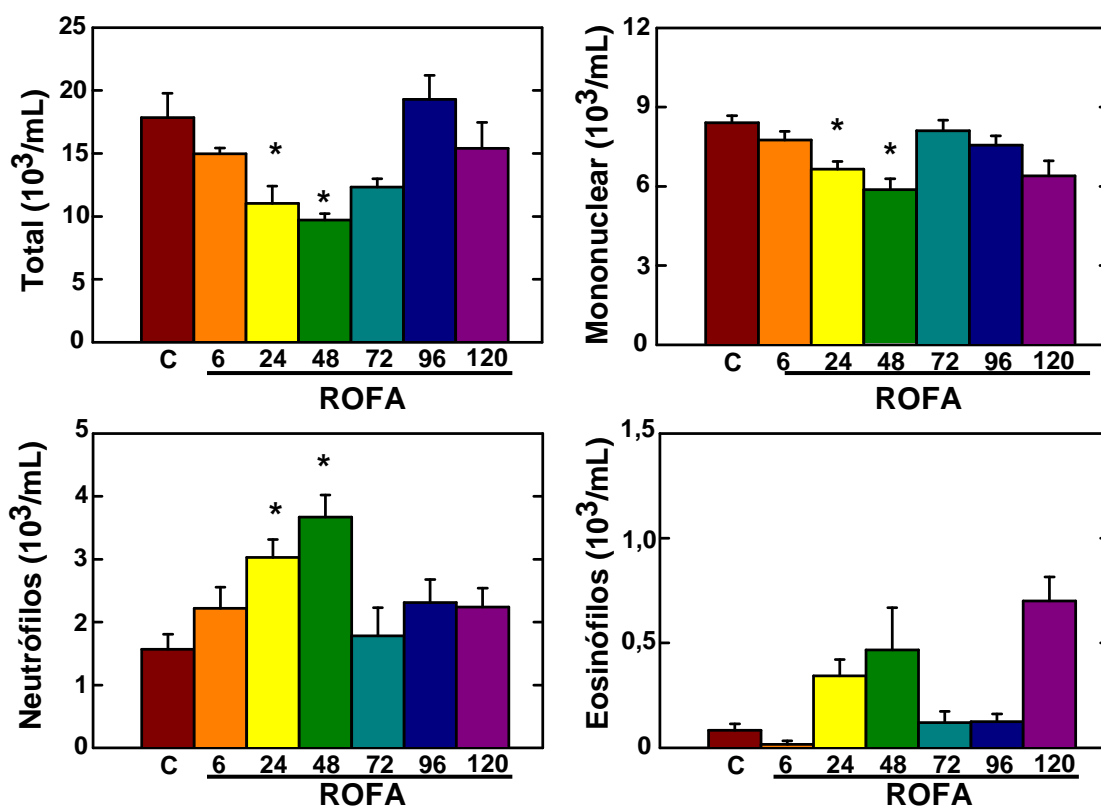


Figura 12 – Gráficos representam celularidade total, células mononucleares, neutr3of3ilos e eosin3of3ilos no sangue de camundongos analisados 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após instilaç3o3o intranasal de salina (C) ou ROFA. Valores representam m3e3dia + EPM de 5 animais em cada grupo. * Valores significativamente diferentes do grupo C ($p < 0,05$).

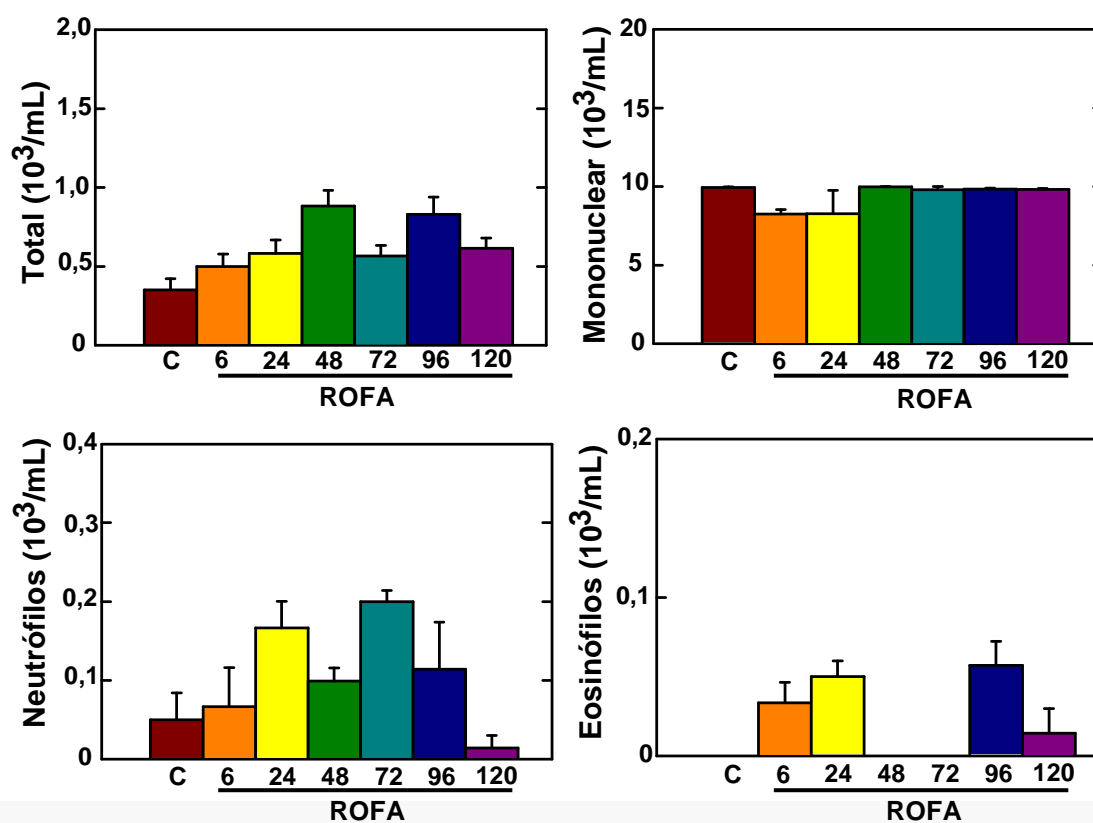


Figura 13 – Gráficos representam celularidade total, células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos do lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos analisados 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após instilação intranasal de salina (C) ou ROFA. Valores representam média + EPM de 5 animais em cada grupo. * Valores significativamente diferentes do grupo C ($p < 0,05$).

IV.5 – ANÁLISE DOS ORGANOCLORADOS E HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Foram encontrados maiores concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em relação aos compostos organoclorados, evidenciando as características das fontes de contaminação encontradas (Tabela 6). Dos vinte compostos clorados analisados, apenas seis foram detectados (Tabela 7). Concentrações mais elevadas foram encontradas para o DDT e seus metabólitos.

Conforme a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA-USA), dezesseis dos HPAs aqui analisados são de elevada importância ambiental. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1983) aponta seis destes HPAs prioritários como compostos com potencial carcinogênico em mamíferos; e são eles: benzo[a]antraceno, benzo[a]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[ah]antraceno e indeno[123cd]pireno. Deste grupo, apenas o benzo[a]fluoranteno não foi detectado em nossas análises. O dibenzo[ah]antraceno apresentou a mais elevada concentração: 13046,7 ng/g (13,0 mg/kg) de fuligem.

IV.6 – ANÁLISE DOS METAIS

Foram descritas as concentrações dos seguintes metais pesados: Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn, sendo o ferro encontrado em maior concentração (Tabela 8).

Tabela 6: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos encontrados na fuligem da queima de óleo (ROFA).

Composto	[] mg/kg
Naftaleno	95,2
Acenaftileno	155,6
Fluoreno	2,6
Acenafteno	67,8
Fenantreno	ND
Antraceno	1,7
Fluoranteno	5,9
Pireno	13,9
Criseno	ND
B[a]Antraceno	3,5
B[b]Fluoranteno	ND
B[k]Fluoranteno	7,1
B[a]Pireno	2,8
DB[ah]Antraceno	13,0
B[ghi]Perile	1,5
Ind[123cd]Pireno	1,7
Σ HPA	372,7

[] mg/kg = concentração em miligrama/ kilograma; ND = não detectável; Σ HPA = somatório de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; em negrito = HPAs com potencial risco carcinogênico em mamíferos (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, EUA).

Tabela 7: Compostos organoclorados presentes na fuligem da queima de óleo (ROFA).

Composto	[] ng/g	Composto	[] ng/g
G-HCH	121,7	PCB-118	ND
HCB	ND	PCB-153	ND
HEPTACLORO	ND	PCB-138	ND
ENDOSULFAN	57,4	PCB-180	ND
ALDRIN	ND	PCB-209	ND
DIELDRIN	40,9	op'-DDE	391,3
ENDRIN	ND	pp'-DDE	ND
HEPTA-EPOX	ND	pp'-DDD	ND
PCB-28	ND	op'-DDT	78,3
PCB-52	ND	pp'-DDT	139,1
		Σ DDT	608,7

[] ng/g = concentração em nanograma/ grama; ND = não detectável; G-HCH = gama-hexacloro-hexano; HCB = hexacloro-benzeno; PCB = bifenilapoliclorada; op' = posição orto; pp' = posição para; DDE = diclorodifenildicloroetileno; DDD = diclorodifenildicloroetano; DDT = diclorodifeniltricloroetileno; Σ DDT = somatório de DDT.

Tabela 8: Concentração de metais na fuligem da queima de óleo (ROFA)

Elemento	Média (ppm) ± Desvio Padrão
COBRE	5,64 ± 1,09
CÁDMIO	0,01 ± 0,00
CROMO	4,20 ± 0,71
NÍQUEL	467,19 ± 9,75
MANGANÊS	32,42 ± 4,60
FERRO	12265,77 ± 2697, 33
CHUMBO	0,58 ± 0,18
ZINCO	21,12 ± 1,34

DISCUSSÃO

V- 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 e maior absenteísmo escolar 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).

Muitas vezes, o estudo do parênquima pulmonar em seres humanos torna-se difícil ou senão impraticável. 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 (Ghio e cols., 2001; Martins e cols., 2002; Souza e cols., 1998). Porém, tais estudos ainda não são realizados em caráter detalhado ou sistemático. Além disso, a presença de processos patológicos coexistentes, idade e consumo de cigarros poderiam impedir a análise precisa das conseqüências da poluição atmosférica sobre o parênquima pulmonar.

Existe uma enorme variedade de espécies animais disponíveis para a pesquisa biológica e um passo importante para a correta interpretação dos resultados recai sobre a cuidadosa seleção da espécie. 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 para cada grupo que inalava ROFA havia um grupo controle, que inalava salina, e posteriormente transformado em um controle único, 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 ROFA 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; Dreher e cols., 1996; 1997; Dye e cols., 1997; Gavett e cols., 1997; 1999; Hamada e cols., 2002; Kodavanti e cols., 1997; 1998; 2002).

A ROFA constitui parte do material particulado emitido pelo produto da combustão de óleo, rica em metais e com poucos componentes orgânicos. É considerada uma partícula fina com diâmetro aerodinâmico menor do que 2,5 μm , e, portanto permanece no ar por longo tempo, podendo, também, depositar-se nas vias aéreas distais (Ghio e cols., 2002; Dreher e cols., 1996).

A ROFA utilizada no presente estudo foi coletada do incinerador de material hospitalar do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo e lançado na atmosfera diariamente. A dose utilizada de ROFA (10 μL i.n. de solução a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi inferior aos níveis máximos recomendados pelos órgãos competentes. Em nosso

modelo experimental, estes níveis foram menores do que, teoricamente, seria depositado nos pulmões ao longo de 24 horas em uma cidade com as características de São Paulo, que exibe uma média de concentração anual de $PM_{2,5}$ de aproximadamente $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Na literatura encontram-se várias vias de administração de ROFA, tais como: instilação intratraqueal (Antonini e cols., 2002; 2004; Campen e cols., 2002; Dreher e cols., 1997; Gavett e cols., 1997; 1999; Ghio e cols., 2001; Kodavanti e cols., 1997; 1998; Lewis e cols., 2003; Nurkiewicz e cols., 2006), inalação via aerossol (Hamada e cols., 2002) e a instilação intranasal (Kodavanti e cols., 2002; Medeiros Jr. e cols., 2004). No presente trabalho, optamos pelo uso de ROFA por instilação intranasal, por mimetizar a exposição aguda a poluentes encontrados no ar ambiente (Chrétien & Nébut, 1996).

Os efeitos biológicos das partículas inaladas são determinados pelo seu tamanho e suas propriedades físico-químicas. Estudos toxicológicos demonstraram que a composição e a quantidade de outros componentes agregados às partículas podem modificar sua toxicidade (Medeiros Jr e cols., 2004; Kodavanti e cols., 1997, 1998; Seagrave e cols., 2006; Kreyling e Scheuch, 2000). Um recente estudo analisou a composição, as fontes e a relativa toxicidade de $PM_{2,5}$ coletados em diferentes cidades dos Estados Unidos e observou associação de toxicidade pulmonar em áreas urbanas com número de veículos e indústrias (Seagrave e cols., 2006).

A biodisponibilidade e a composição dos metais de transição também estão fortemente implicadas como um dos mecanismos pelo qual a ROFA pode lesar os pulmões. A fase inicial da resposta pulmonar após a exposição parece ser influenciada por metais individualizados, porém a persistência da resposta parece

refletir a complexidade da interação entre os metais ou qualidades únicas de um metal comparado a outros (Antonini e cols., 2004; Dreher e cols., 1997; Gavett e cols., 1997; Kodavanti e cols., 1997). O mecanismo de lesão pulmonar após exposição ao material particulado ainda se mostra uma incógnita. Segundo Ghio e colaboradores (Ghio e cols, 2002), a lesão pode ser mediada pela geração de oxidantes catabolizada por metais, pela desregulação do íon do metal do metabolismo da fosfotirosina ou possivelmente por elementos de ambos os mecanismos. Esses eventos resultariam na ativação de fatores de transcrição específicos tais como NF- κ B e AP-1, um aumento da expressão de proteínas pró-inflamatórias cujos genes possuem locais de ligação para esses fatores de transcrição em suas regiões promotoras, e, finalmente, ocorreria uma lesão inflamatória para o pulmão. Em nosso estudo, dos metais analisados, o ferro apresentou maior concentração (Tabela 8), um importante metal envolvido na geração de radicais livres (Lay e cols., 1999). A ROFA pode conter uma enorme variedade de metais, porém, em modelos experimentais dos efeitos da poluição, o ferro, o níquel e o vanádio, representam aqueles mais freqüentemente estudados. Dreher e colaboradores demonstraram que os metais de transição, contendo principalmente esses três metais, são provavelmente os agentes causadores da lesão pulmonar induzida pela ROFA instilada intratraquealmente em doses elevadas em ratos (Dreher e cols., 1997).

As concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) se mostraram maiores em relação aos organoclorados (Tabelas 6 e 7). Os HPAs originam-se da combustão incompleta de matéria orgânica, como na queima de carvão, madeira e óleo combustível e sua presença faz-se mais intensa em grandes centros urbanos (Torres e cols., 2002). A exposição humana a estes poluentes pode

ocorrer no contato com o fumo, na inalação de poluentes atmosféricos originários de emissões como queima de combustíveis fósseis ou ingestão de alimentos ou água contaminados. As concentrações de HPAs relatadas no presente estudo são consideradas de potencial risco carcinogênico de acordo com Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), e estão, em sua maioria, dentro dos níveis onde se verificam efeitos deletérios em animais experimentais, tais como alterações reprodutivas e aparecimento de tumores, assim como efeitos mutagênicos (Nafstad e cols., 2003; Nyberg e cols, 2000).

Alguns HPAs considerados de potencial risco carcinogênico: benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[ah]antraceno e indeno[123cd]pireno. Dentre eles, somente o benzo[b]fluoranteno não foi detectado em nossas análises. De acordo com a IARC, a administração de doses entre 3 e 90 mg/kg de peso de dibenzo[ah]antraceno na ingestão de óleo de gergelim reduz a taxa de crescimento de jovens (Haddow e cols., 1937). Dosagens de 5,0 mg por animal deste mesmo composto, administradas no primeiro dia de gravidez em camundongos resultaram na morte e posterior reabsorção fetal, interferindo posteriormente na fertilidade dos animais (Wolfe & Bryan, 1939). Concentrações acima de 2,0 mg/kg de fuligem de benzo[a]pireno foram encontradas na amostra. Efeitos sobre a reprodução e toxicidade pré-natal, foram evidenciados por Wolfe e Bryan (Wolfe & Bryan, 1939), onde a dosagem diária de 5,0 mg/kg de benzo[a]pireno em ratas grávidas, administradas por injeções subcutâneas diárias, induziu a morte de seus respectivos fetos. A concentração de benzo[a]antraceno de 3,5 mg/kg de fuligem encontrada nesta amostra pode gerar efeitos tóxicos, tomando como base outros trabalhos que evidenciaram o crescimento de célula de sarcoma em ratos tratados com 1 $\mu\text{mol/mL}$ de benzo[a]antraceno (1 mol = 236 g) dissolvido

em dimetil sulfóxido (Pilloti e cols., 1975). O benzo[a]antraceno pode gerar alterações em cultura de epitélio pulmonar de ratos (Dirksen & Crocker, 1968), e efeitos indesejáveis sobre a reprodução e toxicidade pré-natal em dosagens de 5 mg/kg, quando tratadas com injeções subcutâneas (Wolfe & Bryan, 1939). Os valores de 7,1 mg/kg de fuligem encontrados para benzo[k]fluoranteno estão acima das concentrações administradas para testes de toxicidade que utilizam injeções subcutâneas em ratos, as quais geram tumores (1,8 mg/animal) (Lacassagne e cols., 1963). De acordo com a IARC, a presença de indeno[123cd]pireno também é apontada como carcinogênica em animais experimentais.

De fato, vários estudos epidemiológicos sugerem que a poluição atmosférica, principalmente aquela devida à queima de combustíveis fósseis, pode ser responsável pelo aumento das taxas de câncer de pulmão (Cohen & Pope, 1995; Nafstad e cols, 2003; Nyberg e cols., 2000; Samet & Cohen, 1999). Entre os animais, somente roedores foram expostos por longos períodos a partículas, o que revelou o surgimento tardio de câncer. Todos os agentes conhecidos considerados carcinogênicos inalados por seres humanos demonstraram o mesmo efeito em uma ou mais espécies de roedores, quando adequadamente testados. Porém, há duas diferenças entre a resposta neoplásica pulmonar primária de roedores e a humana: a proporção de neoplasias benignas mostra-se maior em roedores e as neoplasias pulmonares raramente metastatizam em roedores, ao contrário do que ocorre comumente em seres humanos (Mauderly, 1996). Recentes estudos epidemiológicos observaram aumento de 30-50% nas taxas de câncer de pulmão associado com exposição a partículas inaláveis (Cohen & Pope, 1995; Nafstad e cols, 2003; Nyberg e cols, 2000). O material particulado com diâmetro menor do que 10 µm é um importante poluente que atualmente desperta grande interesse,

porquanto suas partículas podem ser absorvidas pelo pulmão e, ademais, possivelmente carregam substâncias carcinogênicas em sua superfície (Samet & Cohen, 1999).

A exposição à poluição atmosférica altera o comportamento mecânico do sistema respiratório, uma vez que a morfologia do espaço aéreo sofre modificações. Somente um estudo descreve queda da complacência e aumento da resistência do sistema respiratório, porém esses dados foram observados em camundongos hiperresponsivos após instilação de metacolina (Gavett e cols., 1999). Nenhum estudo, até a presente data, avaliou as alterações da mecânica respiratória em camundongos saudáveis expostos à ROFA.

Diante desses achados, optou-se, no presente experimento, por utilizar o método de oclusão ao final da inspiração. Há várias técnicas desenvolvidas para a análise da mecânica respiratória, porém o método de oclusão das vias aéreas ao final da inspiração foi empregado pela possibilidade de 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).

Em nosso experimento, não obtivemos os valores referentes à mecânica da parede torácica e do sistema respiratório, pois retiramos a porção anterior do gradil costal. Logo, avaliamos os componentes resistivo, elástico e viscoelástico pulmonares. Em presença de tórax intacto, 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).

Esse tipo de preparação está sujeita a alterações, principalmente ao nível hemodinâmico (Nash e cols, 1956; Vatner, 1980). Em relação aos efeitos da toracotomia sobre a mecânica respiratória, é descrito aumento da elastância e da resistência tecidual pulmonar e da parede torácica, sendo que a elevação da resistência pode ser prevenida pelo uso de pressão positiva ao final da expiração (PEEP) (Rodrigues e cols., 1993). 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, tais modificações mecânicas não ocorrem quando é realizada a retirada de toda a parede torácica anterior, como no presente estudo.

A utilização de PEEP se torna necessária, após a retirada do diafragma e do gradil costal, a fim de evitar o desenvolvimento de colapso pulmonar e atelectasias. 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 acarretar 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 presença de PEEP também é capaz de alterar parâmetros da mecânica respiratória, levando à redução da resistência e da elastância pulmonar e da elastância de parede torácica, porém sem afetar o comportamento dinâmico dos tecidos (D'Angelo e cols., 1989). Como a resistência pulmonar representa essencialmente a resistência das vias aéreas, e esta diminui com o aumento do volume pulmonar, a queda de tal resistência com o uso de PEEP provavelmente reflete um aumento do diâmetro das vias aéreas secundário ao

incremento do volume pulmonar. Já 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).

Em nosso experimento o nível de PEEP utilizado, 2 cmH₂O, foi apenas o justo necessário para evitar o colapso das vias aéreas e manter a CRF fisiológica (Saldiva e cols., 1992). Além disso, os efeitos da PEEP se tornam menos acentuados na presença de tórax aberto, uma vez que na ausência da parede torácica não há compressão da veia cava e nem da aorta com conseqüente redução dos fluxos sanguíneos.

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 alterações da viscoelasticidade pulmonar em decorrência da exposição à ROFA foram relatadas pela primeira vez no presente estudo. O trabalho que estudou a mecânica pulmonar após a instilação intratraqueal de ROFA em camundongos considerou somente a elasticidade e a viscosidade, isto é, sem determinar o

componente viscoelástico e demonstrou apenas redução da complacência dinâmica e aumento da resistência do sistema respiratório em animais hiperresponsivos (Gavett e cols., 1999).

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. Tal assertiva é corroborada por Similowski e colaboradores (Similowski e cols., 1989) que relataram que os valores das resistências observadas durante a insuflação com fluxo constante dependem, na realidade, da duração da inspiração.

Em nosso experimento, houve incremento do componente elástico do pulmão, refletido na elastância estática (E_{st}) e na diferença de elastâncias (ΔE) 24 horas após a instilação intranasal de ROFA (88,4% e 67,9%, respectivamente) (Figura 8). Essa alteração pode ser explicada por um aumento no percentual de alvéolos colapsados, espessamento dos septos alveolares e por elevação no percentual de células polimorfonucleares na análise histopatológica e morfométrica (Figura 9 e Tabelas 4 e 5). No quinto dia de lesão, entretanto, o valor da elastância estática já retornava a valores semelhantes ao do grupo controle, ou seja, uma tendência à redução no percentual de alvéolos colapsados e um maior número de alvéolos normais (Figura 5). Cumpre ressaltar que a elastância é o inverso da complacência. As medidas da complacência estática do sistema respiratório refletem melhor as mudanças que ocorrem no parênquima pulmonar, pois refletem as variações ocorridas na pressão elástica do sistema respiratório, enquanto que a complacência dinâmica é uma medida mais geral da mecânica respiratória, pois abrange as variações de pressões elásticas, viscoelásticos e não homogêneos, porém possui

uma contaminação dos componentes resistivos, e não nos informa qual dos componentes do sistema se encontra alterado. Por esse motivo, calculou-se ΔE , que torna possível discriminar os componentes elásticos e viscoelásticos.

O componente viscoelástico (ΔP_2) aumentou significativamente em relação ao grupo controle em 24, 48, 72 e 96 horas após a instilação de ROFA (68,3% em 24 h, 70,4% em 48 h, 55,7% em 72 h e 67,2% em 96 h) (Figura 7). Essa elevação poderia ser atribuída ao aumento do colapso alveolar, espessamento dos septos alveolares e maior aporte de células inflamatórias ao tecido pulmonar, acarretando inhomogeneidade pulmonar (Figura 9 e Tabelas 4 e 5).

A análise da morfometria dos grupos submetidos à instilação de ROFA demonstrou, ainda, um percentual elevado da fração de área de colapso em ROFA 24 (803,4 %) permanecendo superior até 96 horas (810,3 %), e retornando a valores próximos ao do grupo controle no quinto dia (Tabela 5).

A atelectasia pulmonar sabidamente afeta os valores de elastância, pois é necessária maior pressão para a manutenção de um mesmo volume corrente. Além do mais, nos casos em que há aumento das desigualdades de constantes de tempo, o “pendelluft” pode exercer uma influência maior na dissipação da pressão pelo componente viscoelástico do pulmão. Essa correlação entre colapso alveolar e alterações dos parâmetros viscoelásticos foi bem definida por Bates e colaboradores (Bates e cols., 1988) ao realizarem a medida da pressão alveolar em cães com tórax aberto, bem como em outros modelos experimentais (Contador e cols., 2003; Faffe e cols., 2000).

O aumento de ΔP_1 (Figura 3) reflete elevação da resistência das vias aéreas (Bates e cols., 1988b; Saldiva e cols., 1992) e surgiu já nas primeiras 6 horas (186,3%) no grupo ROFA, mantendo-se alterado até 96 horas (67,2%) em relação

ao grupo C. Os alvéolos, vasos e vias aéreas estão unidos pelo tecido conjuntivo, determinando desse modo a interdependência pulmonar. O espessamento do interstício pelo excessivo influxo de PMNs comprimiria a via aérea, reduzindo o calibre da mesma e dificultando a ventilação. Vários fatores podem levar ao aumento da resistência de via aéreas, entre eles: processo inflamatório intersticial e perivascular, resistência tecidual aumentada por inflamação, e alveolite pulmonar focal (Kodavanti e cols., 1997; Medeiros Jr e cols., 2004; Nurkiewicz e cols., 2006). Esse aumento significativo, tanto em ΔP_1 como em ΔP_2 , levou a um aumento de ΔP_{tot} .

Observou-se, também, na análise morfométrica um aumento significativo da celularidade do parênquima pulmonar dos camundongos 24 horas após a exposição à ROFA em relação ao controle, mantendo-se elevada até 96 horas (2,9 % em C, 26,2% em 24h, 23,4% em 48 h, 23,6% em 72 h e 26,4% em 96 h) (Tabela 4). Essa elevação deveu-se ao maior afluxo de polimorfonucleares. Esse comportamento assemelha-se ao relatado por Dreher e colaboradores em experimento utilizando ROFA instilada intratraquealmente em ratos saudáveis, quando obtiveram aumento do número de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos no pulmão (Dreher e cols., 1997).

A análise ultraestrutural do parênquima pulmonar analisada 24 horas após instilação de ROFA evidenciou maior quantidade de neutrófilos aderidos e lesão endotelial com tumefação e vacuolização (Figura 10 e 11). A lesão inflamatória pulmonar obtida em nosso modelo caracterizou-se pelo aumento do número total de polimorfonucleares, regiões de colapso alveolar e lesão endotelial. Esse comportamento está de acordo com o observado por Kodavanti e colaboradores (Kodavanti e cols., 1997), que demonstraram lesão pulmonar aguda caracterizada por inflamação, espessamento da parede alveolar e edema 3 horas após instilação

intratraqueal de ROFA, evoluindo para maior grau de lesão em 24 horas, sendo ela ainda evidente em 96 horas.

Neste estudo foi analisada a celularidade no fluido do lavado broncoalveolar (Figura 12) e no sangue (Figura 13). O lavado broncoalveolar não foi sensível o suficiente para detectar mudanças inflamatórias após a instilação intranasal. Este achado está de acordo com Medeiros Jr. e colaboradores (Medeiros Jr e cols., 2004) que não observaram diferença significativa no lavado entre o grupo controle e 24 horas após instilação intranasal de ROFA. Contrariamente, Gavett e colaboradores (Gavett e cols. 1999), em seu estudo em camundongos após instilação intratraqueal de ROFA, observaram alterações inflamatórias no lavado broncoalveolar, porém nesse trabalho foram usadas doses maiores do que as utilizadas em nosso estudo.

Analisando a celularidade no sangue, observamos aumento significativo no número de neutrófilos 24 e 48 horas após a instilação intranasal de ROFA em relação ao grupo controle. Estes achados nos levam a observar que, uma vez presentes com maior intensidade na circulação sistêmica 24 e 48 horas após a indução da lesão, essas células tendem a migrar para os sítios de lesão, neste caso específico, para o pulmão, mostrando que o aumento da celularidade no parênquima pulmonar foi mais acentuada também nesses dois tempos. As mudanças sistêmicas no sangue estão provavelmente seguindo reações inflamatórias de um ou mais órgãos devido extravasamento de neutrófilos ou de outras respostas imunes. Gordon e colaboradores observaram que a inalação de partículas ambientais concentradas (CAP) em ratos causou um aumento agudo de neutrófilos circulante e diminuição de linfócitos (Gordon e cols., 1998). Da mesma maneira, Kodavanti e colaboradores

demonstraram aumento de neutrófilos no sangue de ratos hipertensos exposto à ROFA (Kodavanti e cols., 2002).

Este foi o primeiro estudo a analisar o comportamento temporal histológico, funcional e morfométrico em um modelo de poluição atmosférica induzida por ROFA. Em geral, a piora evidenciada pelas variáveis medidas ocorreu precocemente, retornando o sistema aos valores normais no quinto dia pós-agressão. Estes dados podem ser de grande importância devido ao fato de que neste trabalho foi utilizada dose inferior aos níveis recomendados pelos órgãos competentes, apontando para um possível risco de desenvolvimento das alterações pulmonares aqui relatadas pela população saudável exposta diariamente a níveis semelhantes, ou maiores, de poluentes no ar inspirado.

CONCLUSÕES

VI – CONCLUSÕES

- O presente estudo foi pioneiro em detalhar temporalmente alterações funcionais e ultraestruturais do parênquima pulmonar em um modelo de poluição atmosférica induzida por ROFA. A instilação intranasal de ROFA acarretou alteração precoce do componente viscoso do pulmão (6 horas), enquanto as alterações do componente viscoelástico e/ou inhomogêneo e elástico do pulmão ocorreram no período de 24 horas em camundongos BALB/c. No quinto dias não foram observadas alterações em todos os parâmetros.
- Os achados de microscopia óptica e eletrônica de parênquima pulmonar, explicam as alterações da mecânica pulmonar, isto é, áreas de colapso alveolar, espessamento do epitélio alveolar, aumento da celularidade e lesão endotelial.
- As concentrações de alguns dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos encontrados na nossa amostra são consideradas de potencial risco carcinogênico, segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC).
- Foram encontrados vários tipos de metais na amostra de ROFA, sendo o ferro o mais abundante, um importante metal envolvido na geração de radicais livres.
- Constatou-se mobilização de células inflamatórias no sangue, observando-se aumento do número de neutrófilos em 24 horas, que perdurou até 48 horas após a indução da lesão. Já no fluido do lavado broncoalveolar não houve alteração significativa entre os grupos, provavelmente devido à dose utilizada em nosso estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONINI, J.M.; ROBERTS, J.R.; JERNIGAN, M.R.; YANG, H-M.; MA, J.Y.C.; CLARKE, R.W. Residual oil fly ash increases the susceptibility to infection and severely damages after pulmonary challenge with a bacterial pathogen. **Toxicol. Scienc.**, 70: 110-119, 2002.

ANTONINI, J.M.; TAYLOR, M.D.; LEONARD, S.S.; LAWRYK, N.J.; SHI, X.; CLARKE, R.W. ; ROBERTS, J.R. Metal composition and solubility determine lung toxicity induced residual oil fly ash collected from different sites within a power plant. **Mol. Cell. Bioch.**; 255: 257-265, 2004.

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.

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.

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.

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

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.

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.

BRUNEKREEF, B. & SUNYER, J. Asthma, rhinitis and air pollution: is traffic to blame? **Eur. Respir. J.**, 21: 913-915, 2003.

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.

CETESB. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo. Publicação CETESB. Série de relatórios/ CETESB ISSN 0103-4103, São Paulo, 1997.

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

CHRÉTIEN, J. & NÉBUT, M. Environmental injuries of the airway: overview of mechanisms and pathology. In: **Environmental Impact on the Airways. From Injury to Repair**. CHRÉTIEN, J & DUSSER, D., ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1996, vol.93, cap.1.

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

COHEN, A.J. & POPE, C.A.III. Lung cancer and air pollution. **Environ. Health Perspect.**, 103: 219-224, 1995.

CONTADOR, R.S.; CHAGAS, P.S.C.; VASCONCELLOS, F.P.; FEIJÓO, M.; FAFFE, D.S.; ROCCO, P.R.M.; ZIN, W.A. Evaluation of respiratory mechanics and lung histology in a model of atelectasis. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, 137: 61-68, 2003.

CORRÊA, F.C.F.; CIMINELLI, P.B.; FALCÃO, H.; ALCÂNTARA, B.J.C.; CONTADOR, R.; MEDEIROS, A.S.; ZIN, W.A.; ROCCO, P.R.M. Respiratory mechanics and lung histology in normal rats anesthetized with sevoflurane. **J. Appl. Physiol.**, 91: 803-810, 2001.

CROWELL, R.E.; HEAPHY, E.; VALDEZ, Y.E.; MOLD, C.; KEHNERT, B.E. Alveolar and interstitial macrophage populations in the murine lung. **Exp. Lung Res.**, 18: 435-446, 1992.

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

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

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.

DANEL, C.J. Morphological characteristics of human airway structures: diversity and unity. In: **Environmental Impact on the Airways. From Injury to Repair**. CHÉTIEN, J & DUSSER, D., ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1996, vol.93, cap.2.

DIRKSEN, E.R. & CROCKER, T.T. Ultrastructural alterations produced by polycyclic aromatic hydrocarbons on rat tracheal epithelium in organ culture. **Cancer Res.**, 28: 906-923, 1968.

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, 1980, p.289-314.

DREHER, K.; JASKOT, R.; KODAVANTI, U.; LEHMANN, J.; WINSETT, D.; COSTA, D. Soluble transition metals mediate the acute pulmonary injury and airway hyperreactivity induced by residual oil fly ash particles. **Chest**, 109: 33S-34S, 1996.

DREHER, K.L.; JASKOT, R.H.; LEHMANN, J.R.; RICHARDS, J.H.; MCGEE, J.K.; GHIO, A.J.; COSTA, D.L. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. **J. Toxicol. Environ. Health**, 50: 285-305, 1997.

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.

DYE, J.A.; ADLER, K.B.; RICHARDS, J.H.; DREHER, K.L. Epithelial injury induced by exposure to residual oil fly-ash particles: role of reactive oxygen species? **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 17: 625-633, 1997

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.

EVANAS, M.J. & SHAMI, S.G. Lung cell kinetics. In: **Lung Cell Biology**. MASSARO, D., ed. Marcel Dekker, Inc., 1989, vol 41, cap.1.

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

FAFFE, D.S.; SEIDLL, V.R.; CHAGAS, P.S.; GONÇALVES DE MORAES, V.L.; CAPELOZZI, V.L.; ROCCO, P.R.M.; ZIN, W.A.. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. **Eur. Respir. J.**, 15: 85-91, 2000.

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.

FÖRSTNER, U. & WITTMANN, G.T.W. **Metal pollution in the aquatic environment**. FÖRSTNER, U., ed. Springer-Verlag, Berlin, 1979, cap. 6.

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, S.H.; MADISON, S.L.; DREHER, K.L.; WINSETT, D.W.; MCGEE, J.K.; COSTA, D.L. Metal and sulfate composition of residual oil fly ash determines airway hyperreactivity and lung injury in rats. **Environ. Res.**, 72: 162-172, 1997.

GAVETT, S.H.; MADISON, S.L.; STEVENS, M.A.; COSTA, D.L. Residual oil fly ash amplifies allergic cytokines, airway responsiveness, and inflammation in mice. **Am. J. Respi. Crit. Care Med.**, 160: 1897-1904, 1999.

GHIO, A.J.; GILBEY, J.G.; ROGGLI, V.L.; RICHARDS, J.H.; MCGEE, J.K.; CARSON, J.L.; DEVLIN, R.B.; CASCIO, W.E. Diffuse alveolar damage after exposure to oil fly ash. **Am. J. Respi. Crit. Care Med.**, 164: 1514-1518, 2001.

GHIO, A.J.; SILBAJRIS, R.; CARSON, J.L.; SAMET, J.M. Biologic effects of oil fly ash. **Environ. Health Perspect.**, 110: 89-94, 2002.

GOLDSMITH, C.-A.; FREVERT, C.; IMRICH, A.; SIOUTAS, C.; KOBZIK, L. Alveolar macrophages interaction with air pollution particulates. **Environ. Health Perspect.**, 105: 1191-1195, 1997.

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.

GORDON, T.; NADZIEJKO, C.; SCHLESINGER, R.; CHEN, L.C. Pulmonary and cardiovascular effects of acute exposure to concentrated ambient particulate matter in rats. **Toxicol. Lett.**, 96-97: 285-288, 1998.

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.

HADDOW, A.; SCOTT, C.M.; SCOTT, J.D. The influence of certain carcinogenic and other hydrocarbons on body growth in the rat. **Proc. R. Soc. London Ser. B.**, 122: 477-507, 1937.

HAMADA, K.; GOLDSMITH, C-A.; SUZAKI, Y.; ALEJANDRA, G.; KOBZIK, L. Airway hiperresponsiveness caused by aerosol exposure to residual oil fly ash leachate in mice. **J. Toxicol. Environ. Health**, 65: 1351-1365, 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.

HEINRICH, J.; PITZ, M.; BISCHOF, W.; KRUG, N.; BORM, P.J. Endotoxin in fine (PM_{2.5}) and coarse (PM_{2.5-10}) particles mass of ambient aerosols. A temporo-spatial analysis. **Atmosp. Environ.**, 37: 3659-3667, 2003.

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

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.

JAPENGA, J.; WAGENAAR, W.J.; SMEDES, F.; SALOMONS, W. A new, rapid clean-up procedure for the simultaneous determination of different groups of organic micropollutants in sediments; application in two European estuarine sediment studies. **Environ. Tech. Lett.**, 8: 9-20, 1987.

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.

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.

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.

KODAVANTI, U.P.; HAUSER, R.; CHRISTIANI, D.C.; MENG, Z.H.; MCGEE, J.; LEDBETTER, A.; RICHARDS, J.; COSTA, D.L. Pulmonary responses to oil fly ash particles in the rat differ by virtue of their specific soluble metals. **Toxicol. Sci.**, 43: 204-212, 1998.

KODAVANTI, U.P.; JASKOT, R.H.; COSTA, D.L.; DREHER, K.L. Pulmonary proinflammatory gene induction following acute exposure to residual oil fly ash: roles of particle-associated metals. **Inhal. Toxicol.**, 9: 679-701, 1997.

KODAVANTI, U.P.; SCHLADWEILER, M.C.; LEDBETTER, A.D. Temporal association between pulmonary and systemic effects of particulate matter in healthy and cardiovascular compromised rats. **J. Toxicol. Environ. Health**, 65: 1545-1569, 2002.

KREYLING, W.G. & SCHEUCH, G. Clearance of particles deposited in the lungs. In: **Particle- Lung Interactions**. GEHR, P. & HEYDER, J., ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 2000, vol.143, cap.7.

LACASSAGNE, A.; BUU-HOI, N.P.; ZAJDELAI, F.; LAVIT-LAMY, D.; CHALVET, O. Carcinogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons in the cigarette tar produced by human smoking. **Gann**, 57: 317-322, 1963.

LAY, J.C.; BENNETT, W.D.; GHIO, A.J.; BROMBER, P.A.; COSTA, D.L.; KIM, C.S.; KOREN, H.S.; DEVLIN, R.B. Cellular and biochemical response of human lung after intrapulmonary instillation of ferric oxide particles. **Am. J. Cell. Mol. Biol.**, 20: 631-642, 1999.

LEE, Y-L.; SHAW, C-K.; SU, H-J.; LAI, J-S.; KO, Y-C.; HUANG, S-L.; SUNG, F-C.; GUO, Y.L. Climate, traffic-related air pollutants and allergic rhinitis prevalence in middle-school children in Taiwan. **Eur. Respir. J.**, 21: 964-970, 2003.

LEWIS, A.B.; TAYLOR, M.D.; ROBERTS, J.R.; LEONARD, S.S.; SHI, X.; ANTONINI, J.M. Role of metal-induced reactive oxygen species generation in lung responses caused by residual oil fly ash. **J. Biosci.**, 28: 13-18, 2003.

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.

LIN, C.A.; MARTINS, M.A.; FARHAT, S.C.; POPE, C.A. 3rd; CONCEIÇÃO, G.M.; ANASTÁCIO, V.M.; HATANAKA, M.; ANDRADE, W.C.; HAMAUE, W.R.; BOHM, G.M.; SALDIVA, P.H. Air pollution and respiratory illness of children in São Paulo, Brazil. **Paediatr. Perinat. Epidemiol.**, 13: 475-488, 1999.

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.

LONGPHRE, M.; LI, D.; LI, J.; MATOVINOVIC, E.; GALLUP, M.; SAMET, J.M.; BASBAUM, C.B. Lung mucin production is stimulated by the air pollutant residual oil fly ash. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 162: 86-92, 2000.

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

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.

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.

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.

MAUDERLY, J.L. Usefulness of animal models for predicting human responses to long-term inhalation of particles. **Chest**, 109: s65-s68, 1996.

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

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

MEDEIROS Jr, N.; RIVERO, D.H.R.F.; KASAHARA, D.I.; SAIKI, M.; GODLESKI, J.J.; KOUTRAKIS, P.; CAPELOZZI, V.L.; SALDIVA, P.H.N.; ANTONANGELO, L. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. **Environ. Res.**, 95: 62-70, 2004.

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

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.

NAFSTAD, P.; HÅHEIM, L.L.; OFTEDAL, B.; GRAM, F.; HOLME, I.; HJERMANN, I.; LEREN, P. Lung cancer and air pollution: a 27 year follow up of 16209 Norwegian men. **Thorax**, 58: 1071-1076, 2003.

NAGASE, T., DALLAIRE, M.J., LUDWIG, M.S. Airway and tissue behavior during early response in sensitized rats: role of 5-HT and LTD4. **J. Appl. Physiol.**, 80: 583-590, 1996.

NASH, C.B.; DAVIS, F.; WOODBURY, R.A. Cardiovascular effects of anesthetic doses of pentobarbital sodium. **Am. J. Physiol.**, 185: 107-112, 1956.

NEMERY, B; HOET, P.H.M.; NEMMAR, A. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. **Lancet**, 357: 704-708, 2001.

NICOLAI, T.; CARR, D.; WEILAND, S.K.; DUHME, H.; VON EHRENSTEIN, O.; WAGNER, C.; VON MUTIUS, E. Urban traffic and pollutant exposure related to respiratory outcomes and atopy in a large sample of children. **Eur. Respir. J.**, 21: 956-963, 2003.

NIEBOER, E. & RICHARDSON, D.H.S. The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metals ions. **Environ. Pollution**, 1: 3-26, 1980.

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, 2006.

NYBERG, F.; GUSTAVSSON, P.; JÄRUP, L.; BELLANDER, T.; BERLIND, N.; JAKOBSSON, R.; PERSHAGEN, G. Urban air pollution and lung cancer in Stockholm. **Epidemiology**, 11: 487-495, 2000.

OLIVIER, D.; PESCI, A.; BERTORELLI, G. Immunological defenses in airways. In: **Environmental Impact on the Airways. From Injury to Repair.** CHRÉTIEN, J & DUSSER, D., ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1996, vol.93, cap 3, p. 43-70.

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.

PASTOR, A.; VÁSQUEZ, E.; CISCAR, R.; GUARDIA, M. Efficiency of the microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments. **Analytica Chimica Acta.**, 344: 241 - 249, 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.

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.

PILLOTI, A.; ANCKER, K.; ERRHENIUS, E.; ENZELL, C. Effect of tobacco and tobacco smoke constituents on cell multiplication in vitro. **Toxicology**, 5: 49-62, 1975.

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.

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.

RAABE, O.G. Respiratory exposure to air pollutants. In: **Air Pollutants and the Respiratory Tract**. SWIFT, D.W. & FOSTER, W.M., ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1999, vol.128, cap.2, p. 39-74.

RAHMAN, I. & MACNEE, W. Role of transcription factors in inflammatory lung disease. **Thorax**, 53: 601-612, 1998.

RANIERI, V.M.; GIULIANI, R.; FIORE, T.; DAMBROSIO, M.; MILIC-EMILI, J. Volume-pressure curve of the respiratory system predicts effects of 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, 1986; vol. 3, cap. 10, p. 131-144.

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.; 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.; 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.; 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.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.

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.

SAMET, J.M. & COHEN, A.J. Air pollution and lung cancer. In: **Air Pollutants and the Respiratory Tract**. SWIFT, D.W. & FOSTER, W.M., ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1999, vol.128, cap.7.

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.

SCHIFF, L.J. & GRAHAN, J.A. Citotoxic effect of vanadium and oil-fired ash on hamster tracheal epithelium. **Environ. Res.**, 34: 390-402, 1984.

SCHULZ, H.; BRAND, P.; HEYDER, J. Particles deposition in the respiratory tract. In: **Particle- Lung Interactions**. GEHR, P. & HEYDER, J., ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 2000, vol.143, cap.5.

SEAGRAVE, J.; MCDONALD, J.D.; BEDRICK, E.; EDGERTON, E.S.; GIGLIOTTI, A.P.; JANSEN, J.J.; KE, L.; NAEHER, L.P.; SEILKOP, S.K.; ZHENG, M.; MAUDERLY, J.L. Lung toxicity of ambient particulate matter from southeastern U.S. sites with different contributing sources: relationships between composition and effects. **Environ. Health Perspect.**, 114:1387-1393, 2006.

SIBILLE, Y. & REYNOLD, H.Y. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 141: 471-501, 1990.

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.

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.

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.

STEIN-STREILEIN, J. & TOEWS, G.B. Leukocytes in the lung. In: **Lung Cell Biology**. MASSARO, D., ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1996, vol. 41, cap. 9.

STONE, V. Environmental air pollution. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 162: S44-S47, 2000.

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.

TORRES, J.P.M.; MALM, O.; VIEIRA, E.D.R.; JAPENGA, I.; KOOPMANS, G.F. Organic micropollutants on river sediments from Rio de Janeiro state, Southeast Brazil. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, 18: 109-118, 2002.

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.

VATNER, S.F. Correlation between acute reductions in myocardial blood flow and function in conscious dogs. **Cir. Res.**, 47: 201-207, 1980.

WEIBEL, E.R. Morphometry: stereological theory and practical methods. In J. Gil editor. **Models of Lung Disease – Microscopy and Structural Methods**. Vol. 47. Marcel Dekker. New York. 1990, 199-247.

WEST, J.B. Estrutura e função. In: **Fisiologia Respiratória Moderna**. Ed. Manole Ltda, 1996, 5^a ed., p. 1-10.

WOLFE, J.M. & BRYAN, W.R. Effects induced in pregnant rats by injection of chemical pure carcinogenic agents. **Am. J. Cancer**, 36: 359-368, 1939.

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.

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

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](#)