

**Sergio Henrique Kiemle Trindade**

**Efeito das diferentes frações do material particulado  
proveniente da emissão de motores movidos a óleo  
diesel sobre o epitélio do palato da rã.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências  
Programa de: Otorrinolaringologia  
Orientador: Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes

São Paulo

2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Trindade, Sergio Henrique Kiemle

Efeito das diferentes frações do material particulado proveniente da emissão de motores movidos a óleo diesel sobre o epitélio do palato da rã / Sergio Henrique Kiemle Trindade. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Otorrinolaringologia.

Orientador: Luiz Ubirajara Sennes.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Emissões de veículos 3.Epitélio 4.Cílios  
5.Material particulado

USP/FM/DBD-024/11

## *Dedicatória*

---

Dedico o presente trabalho ao meu amado filho Henrique, cujo sorriso ilumina minha vida. A sua simples existência, alegria e inocência são grandes estímulos para mim, na busca de uma ciência que contribua de algum modo com o bem estar da sociedade.

## *Agradecimentos*

---

### *A minha família:*

A minha amada esposa Milena, pelo seu apoio e companheirismo fundamentais ao desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao meu pai Alceu Sergio, em quem me espelhei durante toda a minha vida, o seu exemplo de amor e dedicação a família e a vida acadêmica foi determinante para alcançar este momento.

A minha mãe Inge Elly, por todo o amor e incentivo recebidos, também exemplo de dedicação a família, vida universitária e pós-graduação.

O exemplo de meus pais, o ambiente em que cresci, as discussões acerca dos assuntos da vida universitária, acenderam em mim o interesse pela ciência de forma “definitiva”...

À amorosa lembrança de minhas queridas avós Hannelore e Joanna, cujas existências podem ser resumidas nas seguintes palavras: amor incondicional e dedicação integral aos filhos, netos e bisnetos. Ao carinho e incentivos recebidos durante toda minha vida acadêmica, desde o início...

Aos meus queridos irmãos Ivy e Paulo, por todo o amor, companheirismo, estímulo e incentivo em nossa caminhada conjunta pela vida e carreira acadêmica.

Aos meus amados sobrinhos Pedro, Mateus, Marcelo e Giovana, cuja alegria e inocência reforçam a minha disposição na busca de uma sociedade mais justa e que foque o desenvolvimento de forma sustentável.

À Família Nahás Matiello pelo carinho e estímulo recebidos.

## *Agradecimentos*

---

### *Divisão de Clínica Otorrinolaringológica - HC-FMUSP:*

À Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu chefe, o Professor Titular Ricardo Ferreira Bento, pela oportunidade de poder ser um pós-graduando de tão renomado departamento e pela convivência com alguns dos maiores expoentes da otorrinolaringologia brasileira e mundial.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes, também coordenador do Programa de Pós-graduação em Otorrinolaringologia, pelo seu apoio, e exemplo de profissional que consegue aliar o ensino a graduandos, médicos residentes e pós-graduandos, com prática clínica e pesquisa científica de alto nível.

Ao Prof. Dr. João Ferreira de Mello Júnior, que me recebeu desde o início, em meu trajeto pela pós-graduação. A convivência, os ensinamentos recebidos e as oportunidades oferecidas exerceram grande impulso em minha vida acadêmica e abriram portas dentro da otorrinolaringologia brasileira.

Aos Professores Dr. Aroldo Miniti e Dr. Ossamu Butugan, que de maneira tão generosa, me aceitaram como aluno especial no início de meus passos dentro da pós-graduação. O “abrir portas” muda trajetórias...

Ao Dr. Olavo de Godoy Mion, pelo seus ensinamentos e convivência dentro do grupo de “Rinites” da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do HC-FMUSP

Ao Dr. Rui Imamura, pela sua valiosa colaboração no ensino das bases para o planejamento e execução de estudos científicos.

## *Agradecimentos*

---

### *Grupo de Defesa Pulmonar e Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental:*

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, pelo exemplo de pesquisador brilhante, pela sua grandeza e generosidade, sempre disposto a abrir portas. Suas orientações e oportunidades oferecidas desde a minha iniciação científica foram de importância fundamental em minha vida acadêmica.

À Profa. Dra. Mariângela Machionne, meus mais sinceros agradecimentos. Sempre presente durante toda a minha trajetória dentro da vida acadêmica, desde a iniciação científica. Com ela aprendi os passos do raciocínio e método científico. Sua dedicação, seriedade, competência na condução dos experimentos, orientações, paciência e generosidade jamais serão esquecidas.

Ao LIM-05, Grupo de Defesa Pulmonar, na pessoa de sua coordenadora, Prof. Dra. Naomi Kondo Nakagawa, pelo privilégio da convivência com pesquisadores da mais alta categoria e pelas discussões enriquecedoras.



Ao Prof. Dr. Geraldo Lorenzi-Filho, pelo exemplo de médico e pesquisador que consegue aplicar os conhecimentos científicos obtidos na prática clínica. Sua postura resume o perfil generoso do cientista, sempre recebendo de portas abertas alunos e pesquisadores de diferentes áreas e especialidades. Suas orientações e apoio desde minha iniciação científica foram de fundamental importância em minha formação acadêmica.

## *Agradeço ainda:*

---

Às secretárias da Pós-graduação da Otorrinolaringologia, Marilede e Luci por todo seu apoio e paciência, sempre dispostas a colaborar em todos os momentos

Às secretárias da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do HC-FMUSP, Márcia, Kátia e Ofélia, por toda ajuda em minha caminhada dentro do departamento.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, pela suas orientações na leitura e interpretação das análises histológicas.

Ao pós-graduando Robson Seriani, pelo auxílio no desenvolvimento do presente estudo e na captura e interpretação das imagens histológicas.

Ao Dr. Luís Afonso - biotério do LIM-05 e a todos os técnicos. A competência e cuidados com os animais foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Histologia, em especial à Paula, no cuidado com o processamento histológico das amostras.

À toda equipe do Museu da Patologia, pelo auxílio na captura das imagens histológicas.

Ao Hospital Estadual de Bauru, nas pessoas de seu superintendente e coordenadores, Prof. Dr. Antero de Miranda, Prof. Dr. Carlos Alberto Macharelli e Prof. Dr. Írio Gonçalves Júnior.

À Divisão de Otorrinolaringologia do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, nas pessoas de seus coordenadores, Dr. Samir Cahali e Dr. Florisval Meinão.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB UNESP, na pessoa de seu superintendente, o Prof. Dr. Emílio Carlos Curcelli.

Ao Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, em especial, a Prof. Dra. Regina Helena Garcia Martins, Prof. Dr. Jair Cortez Montovani, Prof. Dra. Silke Anna Theresa Weber e Prof. Dr. Onivaldo Bretan.

Os responsáveis pelas instituições supra-citadas, com sua generosidade, sempre dispostos a ajudar, algumas vezes em detrimento dos próprios interesses das instituições, foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas  
Lista de figuras  
Lista de tabelas  
Resumo  
Summary

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>4 MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Obtenção das diferentes frações do material particulado         e composição básica das frações do MP .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Preparação do palato de rã – medida do tempo de         transporte mucociliar (TMC).....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Análise da frequência de batimento ciliar (FBC).....</b>	<b>32</b>
<b>4.4 Microscopia óptica (MO).....</b>	<b>35</b>
<b>4.5 Desenho do estudo.....</b>	<b>40</b>
<b>4.6 Análise estatística.....</b>	<b>42</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>109</b>
<b>9 ANEXO.....</b>	<b>124</b>
<b>9.1 Termo de aprovação CAPPesq.....</b>	<b>125</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AB – alcian blue  
Al – alumínio  
ATP – adenosina tri fosfato  
B – boro  
Be – berílio  
BPED - benzo(a)pirenoepoxidol  
C – carbono  
Ca – cálcio  
CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa  
Cd – cádmio  
CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental  
CO - monóxido de carbono  
CO<sub>2</sub> – gás carbônico  
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente  
Cr – cromo  
Cu – cobre  
DENATRAN - Departamento Nacional de Trânsito  
DNA – ácido desoxirribonucléico  
FBC – frequência de batimento ciliar  
Fe – ferro  
FI – fração insolúvel  
FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
FOS – fração orgânica solúvel  
FOV – fração orgânica volátil  
H – hidrogênio  
H<sub>2</sub>O – água  
HC – hidrocarbonetos  
HEX - hexano  
HNO<sub>3</sub> - ácido nítrico  
hp – horse power  
HPAs – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos  
Hz – hertz  
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
ICAM – molécula de adesão intra-celular  
IgE – imunoglobulina E  
IL- interleucina  
INF – intérferon  
K – potássio

Li – lítio  
LIM – Laboratório de Investigação Médica  
LPAE - Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental  
mEq/l – miliequivalente por litro  
MET – metanol  
Mn – manganês  
MO – microscopia óptica  
MP – material particulado  
N – número  
N<sub>2</sub> – nitrogênio  
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
ng/g – nanogramas por grama  
Ni – níquel  
NO<sub>x</sub> - óxidos de nitrogênio  
O – oxigênio  
O<sub>2</sub> – oxigênio  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
P – fósforo  
p – probabilidade  
PAS – ácido periódico de Schiff  
Pb – chumbo  
pH – potencial hidrogeniônico  
ppm – partes por milhão  
ROS – espécies reativas de oxigênio  
RPM – rotações por minuto  
S – enxofre  
Si – silício  
SO<sub>3</sub> – trióxido de enxofre  
SO<sub>x</sub> - óxidos de enxofre  
T60 – tempo 60 minutos  
T0 – tempo zero minutos  
T30 – tempo 30 minutos  
T90 – tempo 90 minutos  
TH – linfócito T-helper  
Ti – titânio  
TMC – transporte mucociliar  
TNF – fator de necrose tumoral  
V – vanádio  
VCAM – molécula de adesão intra-vascular  
Zn – zinco  
µg – micrograma  
Δs - deslocamento

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Preparação do palato da rã utilizada na mensuração do tempo de transporte mucociliar, onde 1 = nebulizador ultrassônico, 2 = fonte de luz, 3 = câmara acrílica para manutenção da umidade relativa do ar em 100% durante a mensuração do tempo de transporte mucociliar, 4 = lupa binocular equipada com objetiva reticulada.....**29**
- Figura 2** - Preparação do palato da rã, onde 1 = palato de rã dentro da câmara acrílica.....**30**
- Figura 3** - Método estroboscópico para medida da frequência de batimento ciliar (FBC) onde 1 = fonte de luz estroboscópica, 2 = microscópio óptico, 3 = monitor de vídeo para avaliação da frequência de batimento ciliar.....**34**
- Figura 4** – Local da remoção do fragmento do epitélio mucociliar no palato da rã, da espécie *Rana catesbiana* (espaço delimitado pelo retângulo).....**36**
- Figura 5** - Imagem histológica em aumento de 400 vezes do epitélio mucociliar do palato da rã, da espécie *Rana catesbiana*, com coloração de PAS-AB. No detalhe, encontra-se exemplificada estrutura considerada como muco ácido na análise histológica.....**37**



**Figura 6** - Imagem histológica em aumento de 400 vezes do epitélio mucociliar do palato da rã, da espécie *Rana catesbiana*, com coloração de PAS-AB. No detalhe, encontram-se exemplificadas estruturas consideradas como muco misto e neutro na análise histológica.....**38**

**Figura 7** – Variação do tempo relativo de TMC após a submersão dos palatos nas diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L, nos tempos zero, trinta, sessenta e noventa minutos. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\* $p < 0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**46**

**Figura 8** – Volume proporcional de muco ácido – análise histológica da fase I. O eixo Y representa o volume proporcional de muco ácido. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\* $p < 0,001$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**49**

**Figura 9** – Volume proporcional de muco neutro – análise histológica da fase I. O eixo Y representa o volume proporcional de muco neutro. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\* $p < 0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**51**

**Figura 10** – Volume proporcional de muco misto – análise histológica da fase I. O eixo Y representa o volume proporcional de muco misto. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**53**

**Figura 11** – Volume proporcional de cílios – análise histológica da fase I. O eixo Y representa o volume proporcional de cílios. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**55**

**Figura 12** – Volume proporcional de vacúolos – análise histológica da fase I. O eixo Y representa o volume proporcional de vacúolos. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\* $p < 0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**58**

**Figura 13** – Volume proporcional dos núcleos celulares e interstício – análise histológica da fase I. O eixo Y representa o volume proporcional de dos núcleos celulares e interstício. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**60**

**Figura 14** – Espessura epitelial, medida do ápice dos cílios à membrana basal – análise histológica da fase I. O eixo Y representa a espessura epitelial em micrômetros. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\* $p < 0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10..... **62**

**Figura 15** – Valores em tempo relativo de transporte mucociliar após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP tratado com hexano, ácido nítrico e metanol, nos tempos zero, trinta, sessenta e noventa minutos, (eixo X = tempo de exposição ao poluente em minutos, eixo Y = tempo relativo). As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\* $p < 0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10..... **66**

**Figura 16** – Valores da freqüência de batimento ciliar, fase II, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP tratado com hexano, ácido nítrico e metanol, nos tempos zero, trinta, sessenta e noventa minutos (eixo X = tempo de exposição ao poluente em minutos, eixo Y = freqüência de batimento ciliar em Hz). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**72**

**Figura 17** – Valores médios do volume proporcional de muco ácido, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\* $p < 0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**74**

**Figura 18** – Valores médios do volume proporcional de muco neutro, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\* $p < 0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**76**

**Figura 19** – Valores médios do volume proporcional de muco misto, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\* $p < 0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**79**

**Figura 20** – Valores médios do volume proporcional de cílios, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**81**

**Figura 21** – Valores médios do volume proporcional de vacúolos, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\* $p < 0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**83**

**Figura 22** – Valores médios do volume proporcional de núcleos e interstício, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**85**

**Figura 23** – Valores médios da espessura epitelial, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outlyers“. Número de animais avaliados em cada grupo = 10.....**87**



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Concentração de metais (ppm) em partículas de material particulado bruto do diesel, antes e após extração química com metanol, hexano e ácido nítrico, avaliados por espectrometria por fluorescência de RX (Laks et al., 2008).....**26**
- Tabela 2:** Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em partículas de diesel intactas e após procedimentos de extração química. Valores estão expressos em ng/g (Laks et. al., 2008). A análise foi obtida por meio de cromatografia líquida de alta performance.....**27**
- Tabela 3:** Número de animais avaliados e valores médios do tempo de transporte mucociliar, em segundos, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L, nos tempos zero, trinta, sessenta e noventa minutos.....**45**
- Tabela 4:** Número de animais avaliados, médias e desvio padrão dos valores do volume proporcional de muco ácido - análise histológica, fase I do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L (\*p<0,001).....**48**

**Tabela 5:** Número de animais avaliados, médias e desvio padrão dos valores do volume proporcional de muco neutro - análise histológica, fase I do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L (\*p<0,05).....**50**

**Tabela 6:** Número de animais avaliados, medianas e distribuições nos quartis dos valores do volume proporcional de muco misto - análise histológica, fase I do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L.....**52**

**Tabela 7:** Número de animais avaliados, médias e desvio padrão dos valores do volume proporcional de cílios - análise histológica, fase I do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L.....**54**

**Tabela 8:** Número de animais avaliados, medianas e distribuições nos quartis dos valores do volume proporcional de vacúolos - análise histológica, fase I do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L (\*p<0,001).....**57**

**Tabela 9:** Número de animais avaliados, médias e desvio padrão dos valores do volume proporcional dos núcleos celulares e interstício - análise histológica, fase I do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L.....**59**

**Tabela 10:** Número de animais avaliados, medianas e distribuições nos quartis dos valores espessura epitelial na análise histológica, na fase I do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L (\*p<0,05).....**61**

**Tabela 11:** Número de animais avaliados, valores médios do tempo de transporte mucociliar em segundos, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP tratado com hexano, ácido nítrico e metanol, nos tempos zero, trinta, sessenta e noventa minutos.....**65**

**Tabela 12:** Número de animais avaliados e medianas dos valores da frequência de batimento ciliar em Hertz, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas diluições com ringer-rã. Encontram-se descritas as distribuições dos valores nos percentis (25% e 75%).....**67**

**Tabela 13:** Número de animais avaliados, médias e desvio padrão dos valores da frequência de batimento ciliar em Hertz, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas diluições do grupo MP bruto do diesel.....**68**

**Tabela 14:** Número de animais avaliados, médias e desvio padrão dos valores da frequência de batimento ciliar em Hertz, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas diluições do grupo metanol.....**69**

**Tabela 15:** Número de animais avaliados, medianas dos valores da frequência de batimento ciliar em Hertz, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas diluições do grupo ácido nítrico. Encontram-se descritas as distribuições dos valores nos percentis (25% e 75%).....**70**

**Tabela 16:** Número de animais avaliados, médias e desvio padrão dos valores da frequência de batimento ciliar em Hertz, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas diluições do grupo hexano.....**71**

**Tabela 17:** Número de animais analisados, médias e desvio padrão do volume proporcional de muco ácido, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol (\*p<0,05).....**73**

**Tabela 18:** Número de animais analisados, médias e desvio padrão do volume proporcional de muco neutro, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol (\*p<0,05).....**75**

**Tabela 19:** Número de animais analisados, médias e desvio padrão do volume proporcional de muco misto, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol (\*p<0,05).....**78**

**Tabela 20:** Número de animais analisados, médias e desvio padrão do volume proporcional de cílios, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol.....**80**

**Tabela 21:** Número de animais analisados, médias e desvio padrão do volume proporcional de vacúolos, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol (\* $p < 0,05$ ).....**82**

**Tabela 22:** Número de animais analisados, médias e desvio padrão do volume proporcional de núcleos e interstício, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol.....**84**

**Tabela 23:** Número de animais analisados, médias e desvio padrão da espessura epitelial, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol.....**86**

## RESUMO

Trindade SHK. *Efeito das diferentes frações do material particulado proveniente da emissão de motores movidos a óleo diesel sobre o epitélio do palato da rã* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

**INTRODUÇÃO:** A poluição atmosférica é reconhecida como fonte de possíveis agravos à saúde. Estudos tem demonstrado uma clara associação entre aumento da concentração dos poluentes atmosféricos, especialmente o material particulado proveniente de resíduos de exaustão de motores movidos a diesel, com morbidade e mortalidade respiratória e cardíaca na população geral. Até o presente momento, sabe-se que o material particulado possui ações deletérias sobre as vias aéreas superiores e inferiores; contudo, ainda não são completamente conhecidas as ações tóxicas isoladas das diferentes frações do material particulado do diesel.

**OBJETIVO:** O presente estudo teve por finalidade avaliar o grau de toxicidade das frações orgânicas de baixa, média e alta polaridade e da fração inorgânica do material particulado proveniente da emissão de motores movidos a óleo diesel sobre o epitélio mucociliar.

**MÉTODOS:** Para tanto, utilizou-se como modelo experimental a preparação do palato da rã, que possui um epitélio similar ao das vias aéreas de mamíferos. O estudo foi dividido em duas etapas: Fase I - Quarenta palatos foram utilizados com intuito de titular a concentração de material particulado bruto capaz de promover um aumento significativo no tempo relativo de transporte mucociliar. Fase II - Uma vez definida a concentração efetiva, cinquenta palatos foram expostos aos seguintes tratamentos: material particulado bruto do diesel (sem nenhum tipo de tratamento), material particulado do diesel tratado com hexano (solvente que reduz a quantidade dos compostos orgânicos de baixa polaridade), material particulado do diesel tratado metanol (solvente que reduz a quantidade de compostos orgânicos de polaridade intermediária, gerando aumento relativo da concentração de

orgânicos de baixa e alta polaridade) e material particulado do diesel tratado ácido nítrico (solvente que reduz a concentração de compostos inorgânicos, gerando aumento relativo da fração orgânica como um todo). Para fins de controle utilizou-se um grupo com ringer-rã. As variáveis analisadas foram: tempo relativo de transporte mucociliar, frequência de batimento ciliar e análise histológica, na qual foram avaliados o volume proporcional de muco ácido, muco neutro, muco misto, de cílios, vacúolos, dos núcleos celulares e interstício e espessura epitelial. RESULTADOS: Fase I: A concentração de material particulado bruto capaz de promover um aumento significativo no tempo relativo de transporte mucociliar, e também do volume proporcional de muco ácido ( $p < 0,05$ ), correspondeu a 12mg/L. Fase II: Observou-se: a) aumento significativo no tempo relativo de transporte mucociliar e redução significativa do volume proporcional de muco neutro no grupo ácido nítrico; b) maior volume proporcional de muco ácido no grupo metanol ( $p < 0,05$ ); c) ausência de diferenças entre o grupo controle e o grupo hexano, tanto na análise histológica quanto no tempo relativo de transporte mucociliar. CONCLUSÃO: Os dados obtidos sugerem que os compostos orgânicos de baixa polaridade do material particulado proveniente da emissão de motores movidos a óleo diesel desempenham um importante papel na toxicidade aguda ao epitélio ciliado.

Descritores: poluição do ar, emissões de veículos, epitélio, cílios, material particulado.



## SUMMARY

Trindade SHK. *Effects of different fractions from diesel engines exhaust particles on the frog ciliated epithelium* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011.

**INTRODUCTION:** Air pollution is recognized as a source of potential health problems. Studies have shown a clear association between increasing concentration of atmospheric pollutants, especially particulate matter from waste exhaust of diesel engines, and respiratory and cardiac morbidity and mortality in the general population. To date, it is well known that particulate matter from diesel exhaust has deleterious actions on upper and lower airways; however, the isolated toxic actions of different fractions of the particulate matter are not yet fully understood. **OBJECTIVE:** This study aimed at evaluating the degree of toxicity of the organic fractions of low, intermediate and high polarity and of the inorganic fraction of particulate matter from diesel engines on the ciliated epithelium. **METHODS:** The experimental model used was the frog palate preparation, which has a similar epithelium to that found in mammalian airways. The study was divided into two phases: Phase I - Forty palates were used in order to titrate the concentration of intact diesel particulate matter able to elicit a significant increase in the relative time of mucociliary transport. Phase II – Once defined the optimal concentration, fifty palates were exposed to dilutions with the following treatments: intact diesel particulate material (without any treatment), particulate matter from diesel exhaust treated with hexane (solvent which reduces the amount of organic compounds of low polarity), particulate matter from diesel exhaust treated with methanol (solvent which reduces the amount of organic compounds with intermediate polarity, generating a relative increase in concentration of organic compounds with low and high polarity) and particulate matter from diesel exhaust treated with nitric acid (solvent which removes inorganic compounds, eliciting a relative increase of the organic fraction as a whole). For control purposes, a group of

frog-ringer was used. The following variables were analyzed: relative time of mucociliary transport, ciliary beating frequency and histological analysis, which evaluated proportional volume of acid mucus, neutral and mixed mucus, cilia, vacuoles, cell nuclei and interstice, and epithelial thickness. RESULTS: Phase I: The effective concentration of intact diesel particulate matter in eliciting a significant increase in the relative time of mucociliary transport, and a proportional increase of acid mucus volume ( $p < 0.05$ ), corresponded to 12mg/L. Phase II: a) The nitric acid treatment caused a significant increase in the relative time of mucociliary transport, and decrease in the proportional volume of neutral mucus. b) A higher proportional volume of acid mucus was found in the methanol group ( $p < 0.05$ ). c) There were no differences between control and hexane groups regarding histological findings and relative time of mucociliary transport. CONCLUSION: The results suggest that organic compounds of low polarity from diesel engines exhaust particles play an important role in the acute toxicity on the ciliated epithelium.

Descriptors: air pollution, vehicle emissions, epithelium, cilia, particulate matter.

## *Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

A contaminação do ar nos grandes centros urbanos vem merecendo a atenção da população como fonte de possíveis agravos à saúde pública. De fato, estudos epidemiológicos têm demonstrado uma clara associação entre aumento da concentração dos níveis de poluentes atmosféricos, em especial o material particulado, com morbidade e mortalidade respiratória e cardíaca na população geral (Pope, 1989; Dockery et al., 1993; Souza et al., 1998; Martins et al., 2002).

Os poluentes atmosféricos podem ser basicamente divididos em fração gasosa e material particulado em suspensão, cuja principal fonte, nos grandes centros urbanos, deriva da combustão incompleta de combustíveis fósseis provenientes de motores movidos a óleo diesel. Os compostos de emissão de motores movidos a diesel podem ser classificados em dois tipos: os que não causam danos à saúde como  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $H_2O$  e  $N_2$ , e os que apresentam prejuízos à saúde, sendo estes subdivididos em compostos com emissão regulamentada, que são: monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos (HC), óxidos de nitrogênio ( $NO_x$ ), óxidos de enxofre ( $SO_x$ ) e material particulado (MP), e aqueles que ainda não estão sob regulamentação: aldeídos, amônia, benzeno, cianetos, tolueno e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) (Neeft et al., 1996).

Os efeitos tóxicos agudos dos gases de exaustão automotiva são conhecidos desde o advento das máquinas de combustão interna. Essas máquinas liberam quantidade suficiente de CO para causar a morte por

intoxicação quando funcionando em ambientes fechados, tais como garagens. Por esse motivo, a emissão de CO foi uma das primeiras a ser alvo das regulamentações. Outro exemplo são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) que se ligam ao DNA, formando os adutos HPA-DNA, especialmente o formado pelo benzo(a)pirenoepoxidiol (BPED), (Scheepers et al., 1992; Perera, 1997), o qual está relacionado a um aumento da incidência de câncer de pulmão. Esse composto também atua como estrógeno ambiental, sendo apontado como causador da diminuição da fertilidade em machos de várias espécies de aves e mamíferos (Perera, 1997).

Contudo, os efeitos deletérios do material particulado do diesel sobre a saúde da população são menos conhecidos. O MP produzido por uma máquina movida a diesel consiste basicamente de aglomerados de núcleos de carbono, hidrocarbonetos, SO<sub>3</sub> ou ácido sulfúrico e água, adsorvidos ou condensados sobre esses núcleos carbônicos (Lahaye e Ehrburger-Dole, 1994; Neeft et al., 1996). Ainda sobre os núcleos carbônicos podem se depositar outras partículas orgânicas como alérgenos em suspensão no ar, (Knox, 1997).

A composição básica média do MP do diesel é 70% em massa de carbono, 20% de oxigênio, 3% de enxofre, 1,5% de hidrogênio, menos que 1% de nitrogênio e aproximadamente, 1% de elementos traços. Entretanto, a composição elementar pode variar grandemente dependendo da qualidade do diesel, desempenho do motor e modo de operação da máquina (Ahlström e Odenbrand, 1989; Neeft et al., 1996).

Teoricamente, o material particulado do diesel pode ser subdividido em duas partes: a fração insolúvel (FI), também chamada de porção seca ou fração carbonácea sólida, que é composta por carbono, contendo, ainda, espécies inorgânicas, como sulfatos e metais, sendo os últimos derivados do desgaste do motor ou do aditivo do óleo lubrificante; e a fração orgânica, a qual pode ser subdividida em solúvel (FOS) e volátil (FOV), as quais contêm hidrocarbonetos derivados do combustível e do óleo lubrificante. Dependendo do processo de combustão, a fração orgânica solúvel pode contribuir com cerca de dois terços da emissão total de particulados (Neeft et al., 1996). Foi verificado que os hidrocarbonetos aromáticos e outros componentes mais pesados do combustível, que podem se depositar nas paredes do pistão, são responsáveis pelo alto nível de FOS durante a operação de máquinas com carga intermediária (Neeft et al., 1996).

O Brasil é o quinto país do mundo em população, com cerca de 194 milhões de habitantes, sendo o Estado de São Paulo a unidade da Federação com maior contingente populacional (41 milhões de habitantes), compreendido em uma área de 249.000 Km<sup>2</sup>. Possui uma frota automotiva, com aproximadamente 18,3 milhões de veículos automotores, dos quais 1,1 milhões de veículos são movidos a diesel (CETESB, 2009). A cidade de São Paulo compreende uma área de 1523 km<sup>2</sup>, possui um contingente populacional de 11 milhões de habitantes e uma frota automotiva de 5,5 milhões de veículos, sendo 532.000 movidos a diesel (DENATRAN, 2008; IBGE, 2009). A frota movida a diesel na cidade de São Paulo produz acima de 30% de partículas primárias e 25% de aerossol secundário com um

diâmetro aerodinâmico abaixo de 10  $\mu\text{m}$  (CETESB, 2002). A idade e tecnologia dos motores a diesel são completamente variáveis e sabe-se que quanto mais antigos e desregulados os motores, maiores serão as quantidades de emissão de material particulado (Neeft et al., 1996).

Até o presente momento, é consenso que o material particulado proveniente de resíduos de exaustão de motores movidos a óleo diesel possui ações deletérias sobre o sistema respiratório. Contudo, ainda não são completamente conhecidas as ações tóxicas isoladas das diferentes frações deste material particulado. Conhecendo-se estas ações, medidas específicas podem ser aplicadas com intuito de reduzir a eliminação das frações identificadas como mais tóxicas, o que teria grande impacto sobre a saúde da população.

*Revisão da literatura*

---



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Segundo a OMS, a poluição atmosférica tem sido reconhecida como causadora de efeitos deletérios a saúde. Estima-se a ocorrência de 2 milhões de mortes prematuras por ano no mundo causadas pela poluição atmosférica (Filleul et al., 2005; Forastiere et al., 2005; Goldberg et al., 2006), sendo um dos grandes agentes responsáveis pela emissão de poluentes atmosféricos, os veículos movidos a diesel. Considerando-se que, diariamente, cerca de 12m<sup>3</sup> (15kg) de ar são inalados pela maioria dos indivíduos, quantidade essa que pode variar com a idade e nível de atividade de cada pessoa, é de se esperar que a qualidade do ar inalado afete o metabolismo celular do organismo e, portanto, a saúde do indivíduo de forma global. Os poluentes do ar entram no organismo dos seres humanos e de seres vivos principalmente pelo sistema respiratório, causando grandes desordens não apenas nestes sistemas, pois passam das vias aéreas superiores e pulmões para o sistema circulatório, afetando outras funções fisiológicas (Perera, 1997).

No âmbito experimental, alguns estudos avaliaram os efeitos do MP urbano e do diesel sobre modelos animais. Estudos pioneiros do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, LPAE – FMUSP, avaliaram o efeito da poluição urbana nas vias aéreas superiores de roedores. Böhm et al. (1989) observaram alterações no epitélio nasal de roedores expostos a poluição industrial (Cubatão), e a poluição predominantemente originária de fontes automotivas (cidade de São Paulo), comparativamente a um grupo de

ratos controle, expostos ao ar ambiente, em uma cidade do interior com baixos níveis de poluição, por seis meses. Os ratos expostos aos poluentes atmosféricos de Cubatão, apresentaram uma maior quantidade de muco ácido e os animais que permaneceram em São Paulo apresentaram hiperplasia epitelial e aumento na quantidade muco na cavidade nasal em comparação ao grupo controle. Estes achados evidenciam os efeitos lesivos da poluição atmosférica ao epitélio nasal em exposições crônicas. Subseqüentemente, outro estudo do LPAE verificou um aumento na quantidade de muco ácido e diminuição de cílios na cavidade de nasal de ratos, expostos também por seis meses a poluição urbana da cidade de São Paulo (Lemos et al., 1994). Mais recentemente, Pires-Neto et al. (2006) também avaliaram os efeitos da exposição crônica a poluição de São Paulo, porém neste estudo o foco foi a avaliação dos efeitos do material particulado urbano na mucosa nasal. Camundongos foram expostos desde o nascimento ao ar ambiente de uma avenida de tráfego intenso, em uma câmara sem filtros (câmara suja) e outra com filtros para gases e material particulado (câmara limpa), por cinco meses. Verificou-se que no grupo exposto aos poluentes houve um aumento na quantidade de muco ácido principalmente nas regiões anteriores da cavidade nasal, denotando as ações agressivas do MP urbano sobre a mucosa nasal.

Em relação a exposição crônica a poluição urbana e efeitos nas vias aéreas inferiores em modelos experimentais, um estudo do LPAE verificou que ratos, mantidos em um ambiente poluído com MP urbano, demonstraram aumento da responsividade da via aérea a metacolina,

achado que diminuiu quando estes animais foram mantidos em um ambiente com ar não poluído (Pereira et al., 1995). Avaliando conjuntamente os efeitos da exposição sub-crônica ao MP do diesel nas vias aéreas superiores e inferiores, outro estudo do LPAE, desenvolvido por Yoshizaki et al. (2010), demonstrou que a instilação nasal de pequenas quantidades de MP bruto do diesel, por 60 dias em camundongos, resultou em aumento da expressão da proteína Muc5ac nos pulmões, da quantidade de muco ácido no epitélio nasal, de neutrófilos no lavado bronco-alveolar e de aumento da espessura do epitélio nasal. A exposição ao MP do diesel por 30 dias não foi suficiente para alterar de maneira significativa a espessura do epitélio nasal.

Outros estudos do LPAE demonstraram os efeitos deletérios dos poluentes atmosféricos em exposições agudas. Macchione et al. (1999), utilizando a preparação do palato da rã como modelo experimental, verificaram que a exposição ao MP urbano, por 120 minutos, provocou alterações deletérias na função mucociliar, através de mecanismos mediados por estresse oxidativo. Encontraram em seu estudo diminuição da frequência de batimento ciliar, da diferença de potencial transepitelial, depleção das mucinas neutras e redução da glutathione nos palatos das rãs, expostos a diferentes concentrações de MP urbano. A concentração de muco ácido não apresentou diferenças na comparação entre o grupo exposto ao MP urbano com o grupo controle. Carvalho-Oliveira et al. (2005b), também utilizando o mesmo modelo experimental, verificaram que a exposição aguda (100 minutos) ao ROFA (residual oil fly ash), que trata-se do material particulado proveniente do resíduo de indústrias siderúrgicas,

provocou diminuição do transporte mucociliar e da frequência de batimento ciliar. A utilização de substâncias anti-oxidantes como a vitamina E e o n-propil galato, teve efeito protetor sobre o epitélio, não havendo alterações significativas no TMC e na FBC com administração destes compostos. Este efeito protetor reforça a hipótese de que a agressão ao epitélio, mediada por mecanismos oxidativos, desempenha um papel importante na lesão epitelial.

Estudo subsequente do LPAE, desenvolvido por Carvalho-Oliveira et al. (2005a), avaliou o efeito da exposição aguda ao MP urbano sobre a mutagênese e toxicidade celular em modelos experimentais com plantas, (*Tradescantia pallida* e da *Allium cepa*, respectivamente). Em 2003, durante uma greve geral dos ônibus que circulavam na cidade de São Paulo, foram coletadas amostras do MP urbano nos dias da greve e comparados com o MP urbano coletado em dias fora da greve. Em relação a composição do MP urbano verificaram que as emissões provenientes dos ônibus movidos a diesel exerceram grande influência sobre a sua composição. O MP coletado nos dias da greve apresentou uma menor concentração de elementos traços, enxofre e BTX (Benzeno-Tolueno-Xileno). Em relação à mutagênese, verificaram que a exposição da *Tradescantia pallida* ao MP urbano do dia da greve resultou em uma menor formação de micronúcleos em comparação à exposição MP urbano coletado fora da greve. Estes resultados demonstram o potencial mutagênico em plantas das partículas ambientais coletadas nos dias fora da greve, já que a formação de micronúcleos é causada por quebras no DNA das células das plantas. Em relação à toxicidade, não houve diferenças nos índices de mitoses no meristema primário do ápice

das raízes da *Allium cepa*, na comparação do MP urbano coletado na greve vs. MP urbano coletado fora da greve.

Com intuito de avaliar o efeitos das diferentes frações do MP do diesel sobre sistema respiratório, Laks et al. (2008) avaliaram os efeitos destas partículas, quimicamente modificadas, sobre parâmetros respiratórios (elastância estática e dinâmica pulmonar) e parâmetros histológicos (infiltrado polimorfonuclear no parênquima pulmonar de camundongos). O experimento foi realizado com instilação nasal única das soluções e dividido em cinco grupos: SHAM - com solução salina, MP bruto - sem tratamentos, grupo tratado com hexano (solvente que remove compostos orgânicos de baixa polaridade e HPAs) (Laks et al., 2008), grupo metanol (solvente que remove orgânicos de polaridade intermediária) (Laks et al., 2008) e ácido nítrico, que remove predominantemente metais (Laks et al., 2008). Verificaram que a redução de compostos orgânicos, promovida pelo tratamento com hexano, resultou em um perfil respiratório e histológico muito semelhante ao grupo controle. Estes achados reforçam o papel dos compostos orgânicos na toxicidade aguda ao sistema respiratório. Contudo este estudo não abrangeu todos os mecanismos envolvidos na defesa epitelial, como a avaliação do transporte mucociliar, frequência de batimento ciliar e outros parâmetros histológicos que denotam lesão tecidual resultante da exposição ao material particulado do diesel e suas frações, existindo ainda esta lacuna na literatura.

Outros estudos experimentais avaliaram a relação da exposição ao material particulado do diesel com sensibilização alérgica. O achado mais

consistente destes estudos é a ação nitidamente adjuvante das partículas de exaustão do diesel na sensibilização e aumento da intensidade das reações alérgicas. Estudos animais revelaram um aumento nos níveis de IgE-específica bem como nos níveis de IL-4, IL-5 e GM-CSF, em resposta a exposição ao MP proveniente do diesel (Muranaka et al., 1986; Takano et al., 1997; Nel et al., 1998). Somando-se a estes achados, a exposição a produtos de exaustão do diesel provocou inflamação eosinofílica, aumento na quantidade de células caliciformes, e hiperresponsividade em modelos murinos de asma (Ichinose et al., 2002). Outro trabalho demonstrou que em cobaias sensibilizadas através da instilação nasal de ovoalbumina, a exposição aos produtos de combustão de diesel aumenta a intensidade das reações alérgicas nasais (Kobayashi, 2000).

Estudos em humanos avaliando os efeitos diretos da exposição ao material particulado do diesel são mais complexos de serem executados. Além das limitações éticas, a falta de marcadores biológicos adequados dificultam a realização deste tipo de estudo (Riedl e Diaz-Sanchez, 2005).

Em relação aos efeitos do material particulado nas vias aéreas superiores de humanos, sabe-se que principalmente o MP proveniente do diesel, com diâmetro aerodinâmico ao redor de 10  $\mu\text{m}$ , deposita-se na cavidade nasal causando ações deletérias. Estudos em humanos demonstraram que a exposição prolongada a níveis elevados de produtos de combustão de diesel induz a um processo de inflamação crônica com hiperplasia de células caliciformes e até alterações metaplásicas e displásicas da mucosa nasal. Estes resultados denotam, além de

propriedades irritantes destes compostos gerando uma rinite química, ações citotóxicas e genotóxicas (Glück et al.,2003).

A exposição nasal crônica a agentes irritantes pode se manifestar de diferentes formas. Inicialmente pode ocorrer um processo inflamatório inespecífico. Em exposições persistentes, segue-se a metaplasia escamosa, hiperplasia de células calciformes, erosão da mucosa nasal chegando até a neoplasias (Klimek et al., 2002). Um dos primeiros achados em exposições agudas a irritantes é a perda dos cílios com mínima alteração na arquitetura do epitélio subjacente, Klimek et al. (2002). Subseqüentemente, os próximos eventos são degeneração das células epiteliais e disjunção celular pela lesão das "tight junctions". Inicialmente a membrana basal permanece intacta, porém, com exposições prolongadas ou muito intensas pode haver desagregação de sua estrutura. Com a lesão epitelial permanente, o epitélio mucociliar é substituído por um epitélio estratificado, teoricamente mais resistente a agressões (Klimek et al., 2002).

Ainda nas vias aéreas superiores a exposição ao MP do diesel é capaz de intensificar as reações alérgicas. Em indivíduos submetidos a provocação nasal com 0,3 mg de MP do diesel (equivalente a exposição a 40 horas ao ar da cidade de Los Angeles), notou-se um aumento dos níveis de IgE total circulante (Fujieda et al.,1998; Diaz-Sanchez et al., 1999, 2000). Somando-se a estes efeitos, o MP do diesel pode interagir com alérgenos e atuar como um intensificador das reações alérgicas nasais. Em pacientes alérgicos, a provocação nasal com alérgenos associados ao MP, proveniente das emissões de motores movidos a diesel, gerou um aumento

de cinquenta vezes nos níveis de IgE específica, em comparação a indivíduos expostos somente ao alérgeno (Devousassoux et al., 2002). Em relação a citocinas, a exposição de indivíduos ao MP do diesel sozinho estimulou pouco o aumento na concentração destes mediadores; porém, quando expostos em associação com alérgenos, notou-se uma mudança no perfil das citocinas produzidas para a alça TH<sub>2</sub> e redução nas citocinas da alça TH<sub>1</sub> (Fujieda et al., 1998, 2002). Em indivíduos alérgicos a ácaros, os níveis de histamina nasal, após provocação com ácaros domésticos, triplicou quando expostos ao antígeno em associação com o MP do diesel (Diaz-Sanchez et al., 1999, 2000). Esta intensificação na produção de histamina manifesta-se clinicamente por aumento nos escores de sintomas e por diminuição na concentração de antígenos necessária para o desencadeamento de sintomas. Deste modo, se administrado conjuntamente com o MP do diesel, apenas 20% da quantidade de antígeno necessária ao desencadeamento de sintomas característicos de rinite resulta em sintomas alérgicos nasais.

Alguns estudos observacionais em humanos avaliaram os efeitos da exposição crônica ao MP urbano e efeitos nas vias aéreas inferiores. Verificou-se que existe uma associação consistente entre exposição crônica ao tráfego com sintomas respiratórios inespecíficos e alteração na função pulmonar. Crianças suíças expostas a altas concentrações de PM<sub>10</sub> urbano, apresentaram três vezes mais chance de tosse noturna e crônica que crianças que viviam em áreas menos poluídas (Braun-Fahrländer et al., 1997). Um estudo norte-americano encontrou resultados semelhantes,



verificando um aumento de três vezes na prevalência de tosse crônica nos indivíduos expostos ao material particulado urbano (Dockery et al., 1993). Alguns estudos também demonstraram que viver em proximidade ao tráfego é um fator de risco para chiado no peito, aumento da severidade, evolução e prevalência da asma. Asma diagnosticada por médicos foi mais freqüente em crianças que viviam até 100 metros de uma auto-estrada (van Vliet et al., 1997), e crianças pré-escolares que viviam próximas a vias de alto fluxo de veículos foram mais propensas a internações por crises de asma (Edwards et al., 1994).

Estudos intervencionistas em humanos, avaliando os efeitos da exposição controlada ao MP do diesel nas vias aéreas inferiores também são escassos, porém elucidativos. Estudos de exposição rápida de humanos saudáveis e asmáticos, em câmaras, ao MP proveniente do diesel, demonstraram a indução de respostas inflamatórias tanto da alça TH<sub>1</sub> como da TH<sub>2</sub>. Nestes estudos foi demonstrado o aumento dos níveis circulantes de neutrófilos e plaquetas, contagem de neutrófilos no escarro, e aumento dos número de mastócitos, neutrófilos e linfócitos em lavado brônquico. Em associação a estes achados, observou-se um aumento na concentração de IL-6 E IL-8, e expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 (Nordenhall et al., 2000 , 2001). Em indivíduos com asma alérgica moderada e mesmo em um grupo de indivíduos não asmáticos, também observou-se que uma rápida exposição ao ar misturado a compostos de exaustão de diesel, com concentrações de 108 µg/m<sup>3</sup>, gerou aumento da resistência das vias aéreas inferiores e resposta inflamatória exacerbada (Stenfors, 2004).

Importante é ressaltar que os níveis máximos de concentração de material particulado na atmosfera, de acordo com a padronização americana do National Air Quality Standards, situam-se em  $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , evidenciando o potencial lesivo destas partículas mesmo em exposições breves e com níveis considerados normais. Estes estudos sugerem que o MP proveniente do diesel pode contribuir significativamente na inflamação pulmonar associada à asma alérgica.

Avaliando os estudos previamente citados, verifica-se que, em relação à sensibilização e ao desencadeamento de sintomas alérgicos, tanto nas vias aéreas superiores, quanto nas inferiores, a exposição MP do diesel e urbano é capaz de promover uma piora nas manifestações clínicas, como aumento na intensidade do sintomas de rinite (obstrução nasal, prurido e crises de espirro) e asma (sibilância, tosse, dispnéia), tornando, o que normalmente seria uma resposta leve, uma manifestação clinicamente relevante. Estas considerações podem explicar a alta prevalência de sintomas alérgicos em indivíduos que moram perto de vias de tráfego intenso (Riedl e Diaz-Sanchez, 2005).

Os mecanismos pelos quais o MP do diesel exerce seus efeitos biológicos encontram-se em constante investigação. O maior foco dos estudos, atualmente, tem sido o papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) e o conseqüente estresse oxidativo das células expostas a estes compostos. ROS, como os superóxidos, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, são capazes de reagir com proteínas, lípidos e DNA gerando dano celular. Qualquer processo inflamatório é *per se* um evento mediado

por estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ser definido como depleção da glutathiona reduzida seguida por um aumento da concentração da glutathiona oxidada (Rahman et al., 1999). Alguns marcadores de estresse oxidativo podem ser coletados *in vivo* de maneira não invasiva, como o peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, monóxido de carbono, e 8-isoprostana, que são liberados no ar exalado e podem correlacionar-se com o grau de inflamação em pacientes asmáticos (Horvath et al., 1998; Montuschi et al., 1999; Silkoff et al., 2000; Emelyanov et al., 2001).

Alguns estudos *in vitro*, que avaliaram tecido humano e de modelos experimentais, verificaram que o MP bruto do diesel foi capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio. Macrófagos e células epiteliais brônquicas, cultivadas em meios de cultura, foram capazes de induzir a produção de ROS após a exposição ao MP bruto do diesel ou às suas frações (Hiura et al., 1999, Li et al., 2002). Reforçando ainda o papel das ROS no mecanismo de lesão celular, substâncias anti-oxidantes, como a acetilcisteína, foram capazes de diminuir a liberação de mediadores inflamatórios em estudo experimental (Whitekus et al., 2002).

O ciclo vicioso de agressão celular e geração de espécies reativas de oxigênio geralmente é interrompido pelas defesas celulares anti-oxidantes. Quando a intensidade desta agressão ultrapassa a reserva funcional destes fatores protetores, o dano celular se instala. As primeiras enzimas produzidas frente a um estímulo oxidativo são as de fase 2, como a NADPH, glutathiona S-transferase M1, heme-oxigenase, lipo-oxigenase e outras oxidases do citocromo P450. Se estas enzimas falham em neutralizar os

efeitos das ROS, citocinas e moléculas de adesão como a IL-4, IL-5, IL-13, TNF- $\alpha$ , ICAM-1 e VCAM-1 são produzidas, podendo levar a um aumento do processo inflamatório, que pode culminar em apoptose e/ou necrose celular (Pandya et al., 2002; Cho e Kleeberger, 2010).

Em suma, os estudos supra-citados evidenciam os efeitos deletérios do material particulado proveniente do diesel sobre a saúde dos indivíduos em geral, e em especial ao sistema respiratório. Contudo, a leitura e interpretação destes resultados deve ser feita de maneira cautelosa já que a composição do MP do diesel pode variar de maneira importante, dependendo da composição do diesel e de acordo com o tipo de carga a que o veículo foi submetido. Estes fatores podem explicar algumas discrepâncias entre os estudos.

Analisando a literatura recente, verifica-se que algumas perguntas no campo “material particulado do diesel – efeitos deletérios à saúde”, permanecem sem resposta. Dentre elas destacam-se o papel de alguns mediadores inflamatórios na agressão e lesão epitelial mediada por estresse oxidativo. O papel de substâncias e enzimas anti-oxidantes e como aplicar estes conhecimentos para a prática clínica carecem ainda de maiores investigações. Por fim, a influência da composição do diesel e de seu material particulado na toxicidade ao epitélio respiratório ainda não se encontra completamente elucidada.

O melhor conhecimento dos efeitos das diferentes frações do material particulado do diesel sobre o sistema respiratório pode contribuir para o desenvolvimento de novas políticas públicas que visem o controle da

qualidade do diesel utilizado em países em desenvolvimento, bem como uma mudança nos paradigmas de seus modelos de desenvolvimento energético.

## *Objetivos*

---

### 3 OBJETIVOS

O objetivo principal do presente estudo é avaliar, comparativamente, o grau de toxicidade das frações orgânicas de baixa, média e alta polaridade e da fração inorgânica do material particulado proveniente da emissão de motores movidos a óleo diesel sobre um modelo experimental de epitélio mucociliar - a preparação do palato da rã. Os objetivos secundários do estudo são:

- 1) Estudar o tempo relativo de transporte mucociliar no palato de rã durante a exposição à diluições com concentrações crescentes do material particulado bruto do diesel (0, 3, 6 e 12mg/L), e a seguir, durante exposição à diluições contendo MP do diesel quimicamente tratado com metanol, hexano e ácido nítrico
- 2) Realizar análise morfométrica do epitélio mucociliar do palato da rã após à exposição dos mesmos às diluições supra-citadas, avaliando volume proporcional de muco ácido, neutro e misto, cílios, vacúolos, núcleos de células e do interstício e espessura epitelial.

*Métodos*

---



## 4 MÉTODOS

Para responder aos objetivos propostos, utilizou-se a preparação do palato de rã (Rubin, 1990), como bio-indicador dos efeitos tóxicos das diferentes frações do material particulado coletado de retentores acoplados a motores movidos a diesel. Em uma primeira etapa, os palatos de rã foram expostos a diferentes concentrações de MP bruto a fim de determinar-se a concentração eficaz em aumentar, de maneira significativa o tempo relativo de transporte mucociliar (TMC). Nesta etapa foram realizadas análise do tempo relativo de TMC e análise histológica por meio de microscopia óptica (MO). Na MO avaliou-se volume proporcional de muco ácido, muco neutro e muco com coloração mista, de cílios, vacúolos, do interstício e do núcleo de células e espessura do epitélio mucociliar (mensurado em micrômetros). Após a determinação da concentração capaz de promover um aumento significativo no tempo relativo de TMC, novos palatos foram submetidos aos mesmos testes, apenas com a concentração mais deletéria, somando-se a avaliação da freqüência de batimento ciliar, porém expostos à diferentes tratamentos do MP: tratamento com ácido nítrico, hexano e metanol.

O trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10.05.06, sob o protocolo de pesquisa número 330/06, (anexo 1).

#### **4.1 Obtenção das diferentes frações do material particulado e composição básica das frações do MP**

O material particulado bruto do diesel foi coletado em um filtro bi-metálico acoplado ao escapamento de um ônibus da frota urbana da cidade de São Paulo. Este filtro cria um campo capaz de reter as partículas da exaustão do diesel. O ônibus estava equipado com motor Mercedes-Benz MB 1620, com 210 hp de potência, sem controle de injeção eletrônica de combustível, circulando com diesel comumente utilizado em São Paulo, com 500 ppm de enxofre. Este tipo particular de ônibus foi escolhido devido a ser o mais frequentemente utilizado, segundo informações fornecidas pela Prefeitura Municipal de São Paulo. O material coletado foi obtido após um dia de operação normal do ônibus, do mesmo modo como descrito por Laks et al. (2008). As frações do MP do diesel foram obtidas através de exposição aos seguintes métodos de extração química:

- 1) Extração ácida com ácido nítrico - partículas de MP bruto do diesel foram imersas em 160 ml de água mili-Q contendo  $\text{HNO}_3$  65% para ajustar o pH para 3,0, agitadas em agitador magnético durante 2 horas e a seguir colocadas em um misturador ultrassônico por 60 minutos sendo deixadas em repouso posteriormente por 24 horas. Após este período, a suspensão foi centrifugada por 20 minutos a 1800 rpm (rotações por minuto), a  $5^\circ\text{C}$  e posteriormente por 10

minutos a 5000 rpm a 10°C. O supernadante foi então coletado e secado a 57°C por 48 horas antes de sua utilização.

- 2) Tratamento com hexano e metanol (solventes com diferentes polaridades): partículas de MP bruto do diesel foram imersas em 160ml de soluções contendo hexano e metanol, agitadas em agitador magnético por 2 horas e, a seguir, colocadas em um misturador ultra-sônico por 60 minutos e deixadas posteriormente em repouso por 24 horas. Após este período, a suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm, a 10°C. O supernadante foi descartado e o material precipitado foi estocado em um secador a vácuo por 15 horas.

O material particulado fracionado foi o mesmo utilizado por Laks et al. (2008). Os resultados das análises da composição química do material particulado bruto do diesel e de suas frações estão expostos nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1:** Concentração de metais (ppm) em partículas de material particulado bruto do diesel, antes e após extração química com metanol, hexano e ácido nítrico, avaliados por espectrometria por fluorescência de RX (Laks et al., 2008).

<b>Metais</b>	<b>MP Bruto</b>	<b>Metanol</b>	<b>Hexano</b>	<b>Ácido Nítrico</b>
Níquel (Ni)	0.181 ± 0.037	0.140 ± 0.009	0.319 ± 0.014	0.106 ± 0.026
Enxofre (S)	0.626 ± 0.416	0.000 ± 0.000	0.985 ± 0.145	0.000 ± 0.000
Ferro (Fe)	74.566 ± 2.266	82.064 ± 0.785	63.996 ± 0.544	89.311 ± 1.863
Vanádio (V)	0.037 ± 0.013	0.026 ± 0.001	0.016 ± 0.021	0.026 ± 0.034
Chumbo (Pb)	0.050 ± 0.047	0.035 ± 0.016	0.037 ± 0,021	0.010 ± 0.013
Cádmio (Cd)	0.029 ± 0.008	0.128 ± 0,020	0.125 ± 0.044	0.052 ± 0.003
Cromo (Cr)	0.161 ± 0.116	0.156 ± 0.005	0.166 ± 0,023	0.159 ± 0.008
Cobre (Cu)	0.017 ± 0.001	0.075 ± 0.030	0.147 ± 0.008	0.068 ± 0.013

Valores em média ± erro padrão

**Tabela 2:** Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em partículas de diesel intactas e após procedimentos de extração química. Valores estão expressos em ng/g (Laks et. al., 2008). A análise foi obtida através de cromatografia líquida de alta performance.

HPAs	MP Bruto	Metanol	Hexano	Ácido Nítrico
Naftaleno	49.23	ND	ND	ND
Acenafetileno	179.48	5.08	ND	35.79
Fluoreno	683.94	45.75	ND	80.37
Antraceno	94.73	ND	ND	1.43
Pireno	12838.27	631.31	5.90	4457.30
Benzo[a]antraceno	1162.73	107.23	0.57	346.27
Benzo[b]fluoranteno	789.93	201.21	ND	749.51
Benzo[k]fluoranteno	562.28	10.58	0.03	55.80
Benzo[a]pireno	1642.28	26.42	0.15	68.11

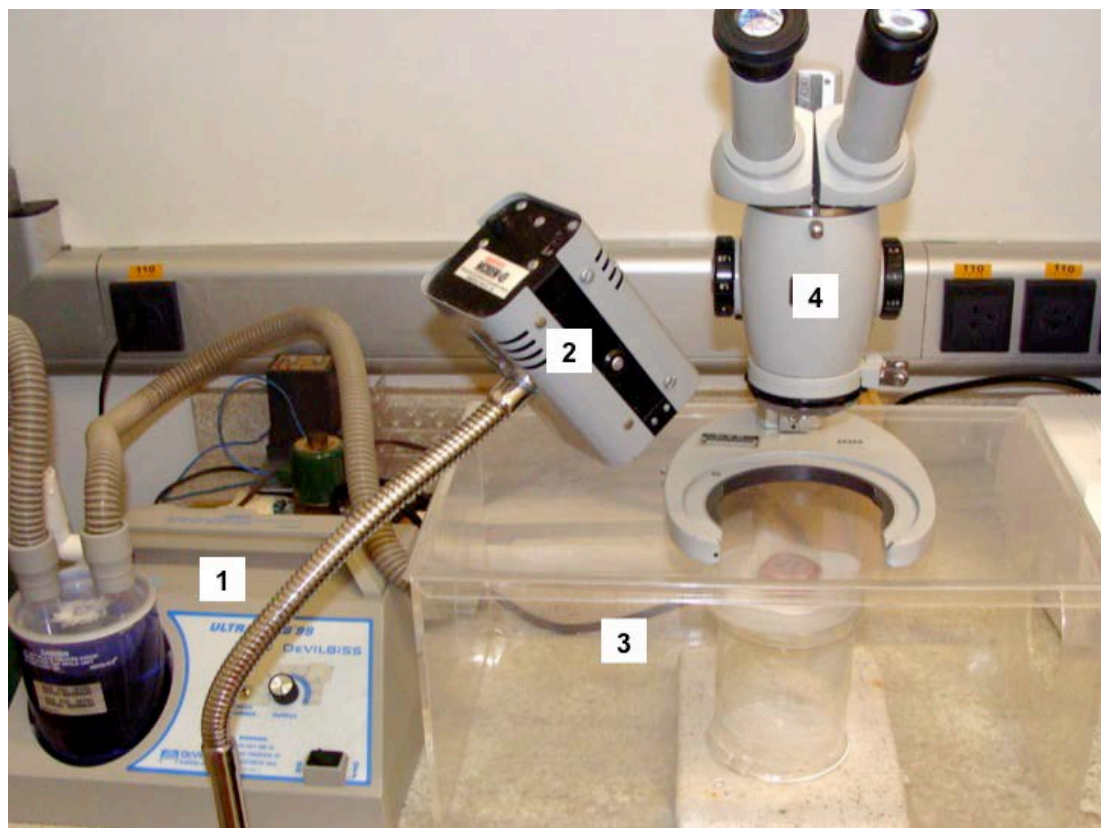
ND= não detectável

Para a análise dos compostos inorgânicos, Ni, S, Fe, V, Pb, Cd, Cr e Cu, utilizou-se a espectrometria por fluorescência de RX, (EDX 700 HS, Shimatzu Corporation Analytical Instruments Division, Kyoto, Japan). A dosagem dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foi efetuada por meio da cromatografia líquida de alta performance. A concentração dos seguintes HPAs foi determinada: Benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[ab]antraceno e ideno[123-cd]antraceno.

#### **4.2 Preparação do palato de rã – medida do tempo de transporte mucociliar (TMC)**

A preparação do palato de rã (Rubin et al., 1990a), constitui um conveniente sistema para o estudo do transporte mucociliar (figuras 1 e 2). A rã possui em seu palato um epitélio mucociliar similar ao encontrado nas vias aéreas de mamíferos, podendo ser utilizado para o estudo do transporte de diferentes amostras de muco ou medidas de ativação ou inibição ciliar.

Foram utilizadas rãs adultas (*Rana catesbiana*) provenientes do ranário municipal de Mogi das Cruzes, pesando aproximadamente 100g. No biotério, os animais receberam uma dieta balanceada e água “ad libitum” até o momento da desarticulação dos palatos, de acordo com as rotinas dos procedimentos veterinários.



**Figura 1** - Preparação do palato da rã utilizada na mensuração do tempo de transporte mucociliar, onde 1 = nebulizador ultrassônico, 2 = fonte de luz, 3 = câmara acrílica para manutenção da umidade relativa do ar em 100% durante a mensuração do tempo de transporte mucociliar, 4 = lupa binocular equipada com objetiva reticulada.



**Figura 2** - Preparação do palato da rã, onde 1 = palato de rã dentro da câmara acrílica



Utilizando hipotermia como anestesia, as rãs foram rapidamente decapitadas, suas mandíbulas desarticuladas e os palatos removidos, cortando-se desde a junção da faringe com o esôfago até a pele do dorso. Os palatos excisados foram colocados em uma câmara com uma gaze embebida com solução de ringer-rã e armazenados em refrigerador a 4°C, por dois dias, envoltos em filme plástico levemente apertado. Todos os experimentos foram realizados após 48 horas da desarticulação dos palatos das rãs e, no máximo, 5 dias após, de acordo com os procedimentos descritos por Macchione et al (1995;1999). Sob estas condições, a atividade ciliar é preservada (Rubin et al., 1990a). As rãs da espécie *Rana catesbiana* hibernam ou diminuem sua demanda energética nos meses de inverno, possuindo mecanismos de reserva metabólica. Sendo assim, mesmo após a desarticulação, mantém a viabilidade, funções biológicas e capacidade de resposta a diversos estímulos agressores por um período de até cinco dias (Rubin et al., 1990a).

A medida do TMC foi obtida pela análise do tempo de transporte de uma amostra de muco posicionada sobre a superfície lisa e plana do palato da rã com o auxílio de uma lupa estereoscópica com objetiva reticulada. O tempo de deslocamento da amostra entre dois pontos ( $\Delta s=6\text{mm}$ ) foi medido em segundos. Ao menos cinco medidas foram realizadas em cada análise para verificar a consistência dos resultados. Antes das análises, amostras de muco da própria rã foram coletadas e armazenadas em frascos com óleo mineral, visando a não desidratação das amostras. Para a remoção do óleo

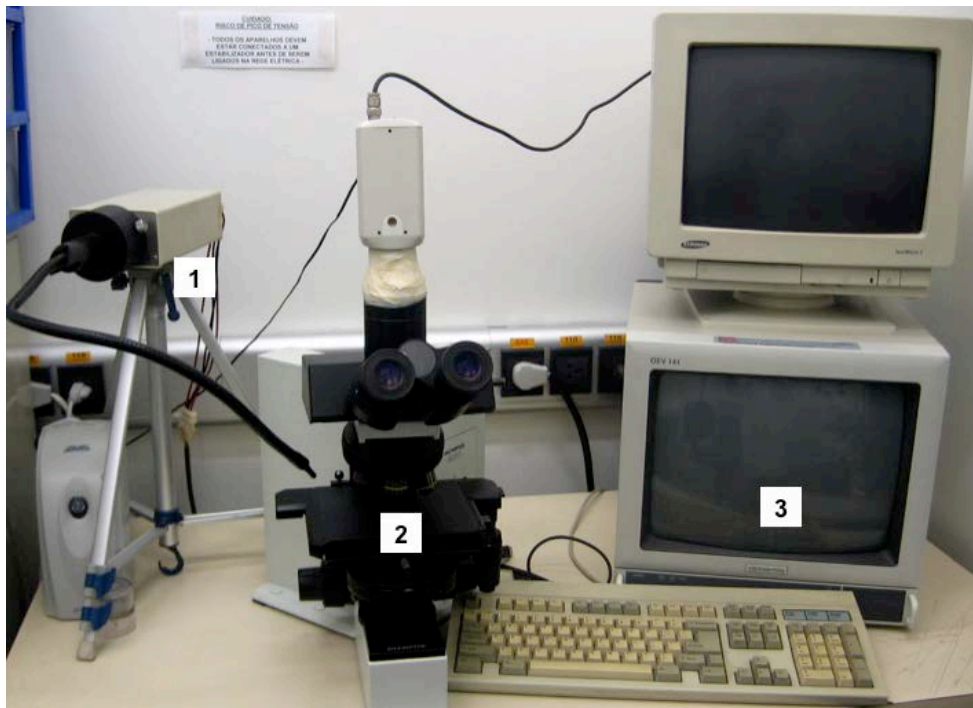
mineral, antes das medidas do tempo de TMC, as mesmas foram imersas em éter de petróleo. Este procedimento, de acordo com Rubin et al. (1990b), não altera as propriedades de transporte e reológicas do muco. Os experimentos foram realizados no LIM 05 - FMUSP sob temperatura controlada (20° C). As medidas do TMC foram realizadas antes e após a imersão dos palatos com as diferentes soluções testadas no tempo zero minutos (T0), trinta minutos após imersão na solução com poluente (T30), sessenta minutos (T60) e noventa minutos (T90). Durante a medida do TMC, os palatos foram mantidos em uma câmara acrílica com 100% de umidade proporcionada por um nebulizador ultrassônico, com solução de ½ Ringer com 73.8 mEq/l Na<sup>+</sup>, 2 mEq/l K<sup>+</sup>, 2.3 mEq/l Ca<sup>2+</sup> e 78mEq/l Cl<sup>-</sup>. Sob estas condições experimentais a preparação do palato de rã tem como único fator de influência as propriedades físicas do muco (Macchione et al., 1995).

#### **4.3 Análise da freqüência de batimento ciliar (FBC)**

A análise da FBC foi realizada por meio de uma modificação da técnica inicialmente descrita por Braga et al. (1973). Com auxílio de um microscópio óptico (Olympus, BX50, Tokyo, Japan), com aumento de 40 vezes, conectado a uma câmara de vídeo (Sony Trinitron, 3CCD, Tokyo, Japan) e a um monitor de vídeo, eram focados grupos de células ciliadas de interesse no epitélio do palato da rã. Uma fonte luz estroboscópica (Machinne Vision Strobe, Cedarhurst, NY) era colocada em frente ao epitélio mucociliar, emitindo flashes de luz com freqüência variando de 0 – 30 Hz

(figura 3). A luz incidente emitida pela fonte de luz era refletida pelo epitélio ciliar e a fina camada de muco que o revestia. Esta reflexão é cíclica, em virtude das mudanças de direção dos cílios. Por controle manual, era possível definir o valor FBC quando a frequência de disparos dos flashes tornava-se idêntica a FBC, e a movimentação na superfície do epitélio deixava de ser visualizada.

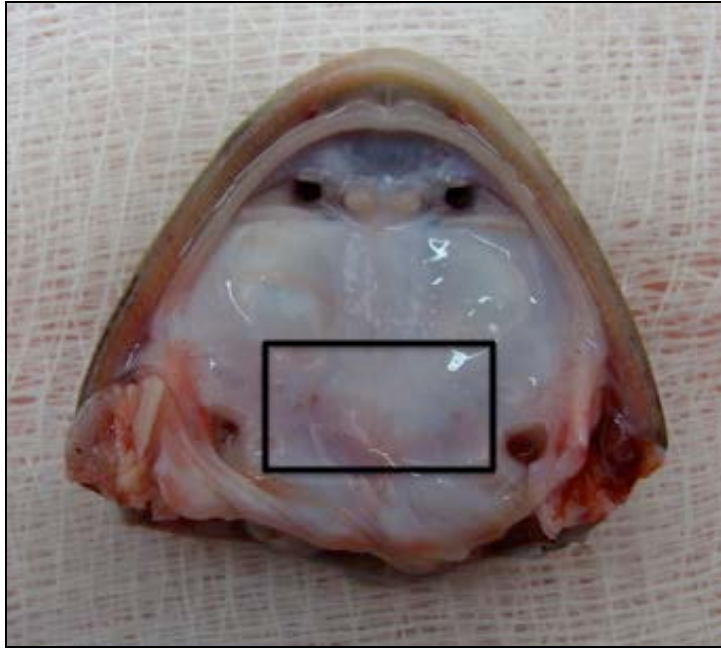
Após a submersão dos palatos com as diferentes soluções e frações do MP foi realizada a análise da FBC nos tempos zero, trinta, sessenta e noventa minutos (T0, T30, T60 e T90), após medida do tempo de TMC.



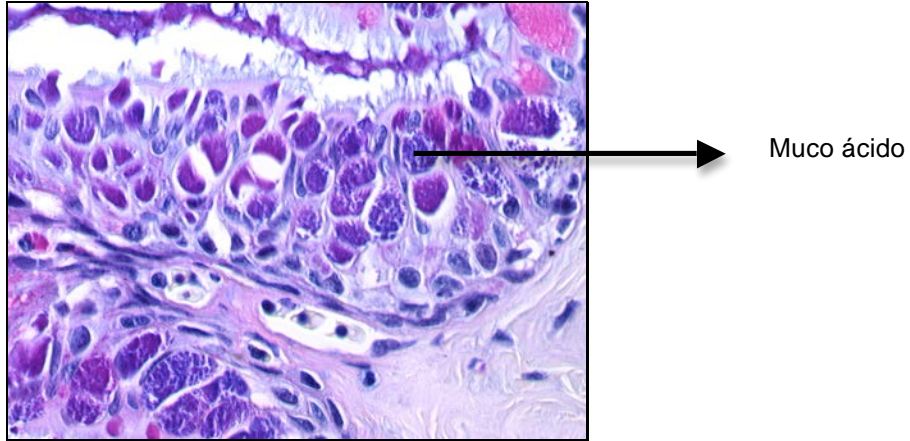
**Figura 3** - Método estroboscópico para medida da freqüência de batimento ciliar (FBC) onde 1 = fonte de luz estroboscópica, 2 = microscópio óptico, 3 = monitor de vídeo para avaliação da freqüência de batimento ciliar.

#### **4.4 Microscopia óptica (MO)**

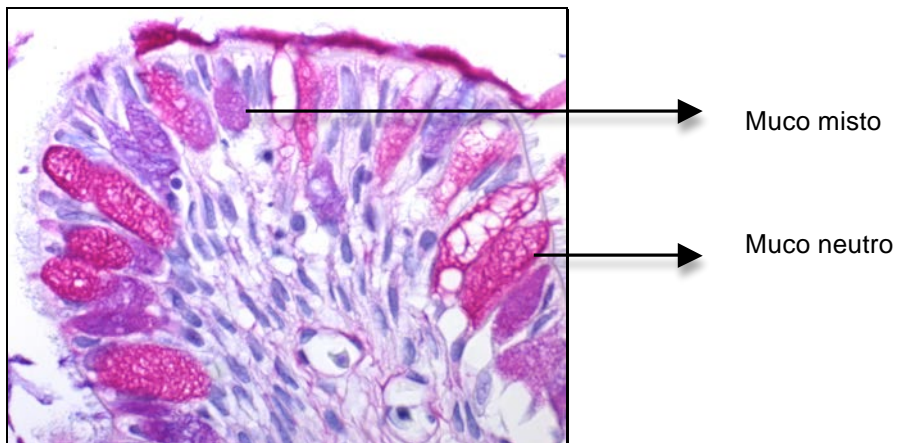
Após a submersão dos palatos nas diferentes concentrações e frações do MP por 90 minutos e completadas as análises do tempo de TMC e FBC, sua superfície epitelial era preparada para MO. Para o estudo histológico, foram coletadas amostras do epitélio de todos os palatos, removidas sempre da sua porção posterior, com dimensões aproximadas de 1,5 por 1,5cm e fixadas em solução de formaldeído tamponado 4% para processamento histológico em blocos de parafina. O local da realização da remoção do fragmento do epitélio do palato da rã está ilustrado na figura 4. As lâminas foram coradas pela solução de ácido periódico Schiff, que cora em tom avermelhado grânulos de muco neutro (PAS+) e Alcian Blue, que cora em azul grânulos de muco ácido (AB+) (Prentø, 2009), (figuras 5 e 6, respectivamente).



**Figura 4** – Local da remoção do fragmento do epitélio mucociliar no palato da rã, da espécie *Rana catesbiana* (espaço delimitado pelo retângulo).



**Figura 5** - Imagem histológica em aumento de 400 vezes do epitélio mucociliar do palato da rã, da espécie *Rana catesbiana*, com coloração de PAS-AB. No detalhe, encontra-se exemplificada estrutura considerada como muco ácido na análise histológica



**Figura 6** - I Imagem histológica em aumento de 400 vezes do epitélio mucociliar do palato da rã, da espécie *Rana catesbiana*, com coloração de PAS-AB. No detalhe, encontram-se exemplificadas estruturas consideradas como muco misto e neutro na análise histológica.



Para a análise histomorfométrica foram capturadas fotografias digitais, no formato jpg, de 10 campos não coincidentes do epitélio do palato de cada rã, no Museu da Patologia – FMUSP, utilizando-se microscópio Leica DMR, com aumento de 400 vezes e câmera fotográfica Zeiss Axio Cam MRc5. Posteriormente à aquisição das imagens, procedeu-se à análise das mesmas, por meio do programa Image pro-plus para PC, com marcação manual das seguintes variáveis:

- 1) número de pontos coincidentes em muco ácido (figura 5),
- 2) número de pontos coincidentes em muco neutro (figura 6),
- 3) número de pontos coincidentes em muco misto (figura 6),
- 4) número de pontos coincidentes em cílios,
- 5) número de pontos coincidentes em vacúolos,
- 6) número de pontos coincidentes em interstício e núcleo de células,
- 7) número de pontos totais (somatória dos pontos coincidentes em muco ácido, neutro, misto, cílios, vacúolos, interstício e núcleos),
- 8) espessura do epitélio mucociliar.

Após a marcação manual do número de pontos coincidentes nas estruturas supra-citadas, realizou-se a média aritmética dos valores obtidos nas diferentes variáveis, nas dez fotos de cada animal, resultando assim, em um resultado único por animal, em número de pontos coincidentes nas estruturas de interesse. Para o cálculo do volume proporcional, procedeu-se à divisão do número de pontos coincidentes em determinada estrutura pelo número de pontos totais obtidos, gerando, assim, resultados em proporção.

#### **4.5 Desenho do estudo**

O estudo foi dividido em duas fases:

**Fase I:** Titulação da concentração do MP do diesel a ser utilizada no protocolo. Para tanto, utilizou-se 40 ratos de rãs, divididos em quatro grupos de 10 animais cada, os quais foram imersos em MP bruto nas seguintes concentrações: 3mg/L, (n=10), 6mg/L, (n=10), 12mg/L, (n=10) e solução de ringer rã (n=10), para fins de controle. Nesta primeira etapa, foi avaliado o tempo relativo de TMC e realizada a análise histológica, de acordo com os procedimentos descritos nos itens 4.2 e 4.4, respectivamente. Após a identificação da concentração que aumentou de maneira significativa o tempo relativo de TMC, procedeu-se à fase II do estudo.

**Fase II:** Cinquenta palatos foram subdivididos em cinco grupos submetidos à imersão em solução contendo o material particulado do diesel com os seguintes tratamentos: 1) MP do diesel bruto, sem tratamentos, a 12mg/L (n=10); 2) MP do diesel submetido a tratamento com ácido nítrico (n=10), a 12 mg/L, 3) MP do diesel submetido a tratamento com hexano (n=10), a 12mg/L, 4) MP do diesel submetido a tratamento com metanol (n=10), a 12mg/L, e 5) grupo controle somente com solução de Ringer-rã. A ordem das soluções testadas foi decidida por sorteio, de maneira cega, de modo a randomizar a segunda fase do experimento, minimizando a possibilidade de vieses de seleção e fazendo com que o examinador não soubesse qual solução havia sido testada em cada animal. A análise histológica também foi realizada de maneira cega na segunda fase do estudo.

#### 4.6 Análise estatística

Para a comparação do resultados do TMC e da FBC foram realizadas análise de variância para medidas repetidas, levando em conta dois fatores: tempo de exposição e concentração. Para a avaliação de normalidade utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição normal foram avaliados pelo teste Two-Way ANOVA e os dados com distribuição não-normal, pelo teste Kruskal Wallis. As comparações em pares entre os grupos foram realizadas pelo teste de Tukey para os dados com distribuição normal e os dados com distribuição não-normal foram comparados pelo método de Dunn. Na análise histológica, na primeira fase do estudo, realizou-se análise de variância para medidas repetidas levando em conta um fator: tipo de poluente. Para a avaliação de normalidade utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição normal foram avaliados pelo teste One-Way ANOVA e para os dados com distribuição não-normal, utilizou-se o teste Kruskal Wallis. As comparações em pares entre os grupos foram realizadas pelo método de Holm-Sidak, para os dados com distribuição normal e para os dados com distribuição não-normal foram comparados pelo método de Dunn. Na segunda fase do experimento, todos os dados apresentaram distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para análise dos dados utilizou-se o teste One-way ANOVA e para comparações múltiplas entre os grupos o teste LSD. Padronizou-se, no presente estudo, o alfa em 5% e o beta em 20% (poder 80%).

## *Resultados*

---

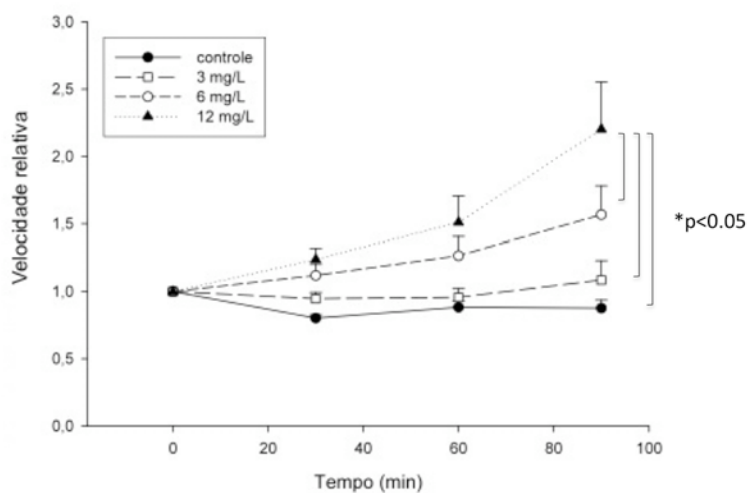
## 5 RESULTADOS

Na fase I do estudo, a análise do tempo de TMC dos 40 primeiros palatos, mostrou que a concentração de 12mg/L foi a mais eficaz em alterar de maneira significativa o TMC. Para essa análise optou-se pela utilização do tempo relativo de TMC, que é obtido dividindo-se o valor do TMC (em segundos) a ser testado pelo valor, também em segundos, do tempo zero minutos. Assim procedendo, os valores do tempo relativo no tempo zero das diferentes concentrações sempre é igual a 1 (tempo zero minutos dividido pelo próprio tempo zero minutos). Os valores abaixo de 1 significam que o TMC foi menor que o controle e os valores acima de 1 expressam TMC maior que o controle.

O grupo 12mg/L apresentou valores médios de tempo relativo de TMC maiores que os grupos controle, 3mg/L e 6mg/L ( $p < 0,05$ ). O grupo 6mg/L apresentou valores médios de tempo relativo de TMC maiores que os grupos controle e 3mg/L ( $p < 0,05$ ). O grupo 3mg/L não apresentou diferenças em relação ao controle. A análise do fator tempo revelou que os valores médios do tempo relativo de TMC no tempo 90 minutos foram significativamente maiores que no tempo zero, trinta e sessenta minutos ( $p < 0,05$ ). Os resultados do TMC são mostrados em segundos na tabela 3. O comportamento do TMC, em tempo relativo, encontra-se ilustrado na figura 7.

**Tabela 3:** Número de animais avaliados e valores médios do tempo de transporte mucociliar, em segundos, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L, nos tempos zero, trinta, sessenta e noventa minutos.

Grupo	Número de animais	Tempo zero	Tempo 30 min	Tempo 60 min	Tempo 90 min
<b>Controle</b>	10	13,25	10,61	11,80	11,90
<b>3mg/L</b>	10	13,98	13,26	13,41	15,73
<b>6mg/L</b>	10	12,98	14,05	15,80	19,21
<b>12m/L</b>	10	13,08	16,48	20,30	28,77



**Figura 7** – Variação do tempo relativo de TMC após a submersão dos palatos nas diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L, nos tempos zero, trinta, sessenta e noventa minutos. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\*p<0,05). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.



Na análise histológica da fase I, a avaliação da variável muco ácido revelou que o grupo 12mg/L apresentou significativamente maior volume proporcional que os grupos controle, 3mg/L e 6mg/L ( $p < 0,001$ ). Os grupos controle, 3mg/L e 6mg/L não apresentaram diferenças entre si ( $p > 0,05$ ). Os valores das médias e desvio padrão são mostrados na tabela 4. Os resultados estão representados graficamente na figura 8.

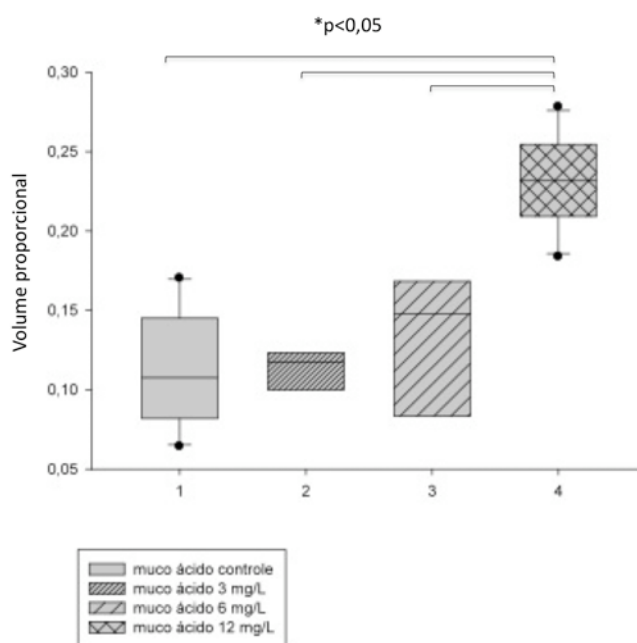
O grupo 12mg/L apresentou volume proporcional de muco neutro significativamente menor que o grupo controle ( $p < 0,05$ ). As comparações entre os demais grupos não demonstraram diferenças. Os valores médios e desvio padrão do volume proporcional de muco neutro são mostrados na tabela 5. A representação gráfica do encontra-se na figura 9.

A análise do volume proporcional de muco misto não demonstrou diferenças significativas nas comparações entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Os valores das medianas e distribuições nos quartis do volume proporcional de muco misto estão demonstrados na tabela 6. A representação gráfica do volume proporcional de muco misto encontra-se na figura 10.

A avaliação do volume proporcional de cílios revelou não revelou diferenças significantes nas comparações entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Os valores das médias e seus respectivos desvio-padrão do volume proporcional de cílios estão na tabela 7. A representação gráfica encontra-se ilustrada na figura 11.

**Tabela 4:** Número de animais avaliados, médias e desvio padrão dos valores do volume proporcional de muco ácido - análise histológica, fase I do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L (\*p<0,001).

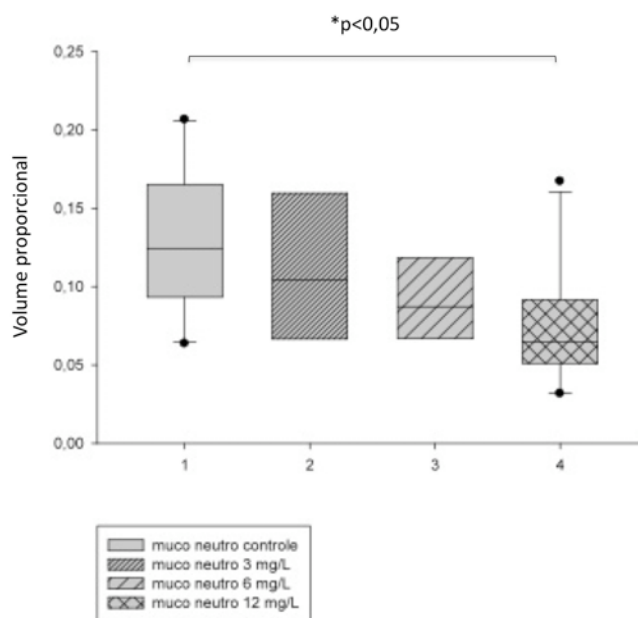
<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>Controle</b>	10	0,113	0,036
<b>3mg/L</b>	10	0,116	0,022
<b>6mg/L</b>	10	0,142	0,058
<b>12mg/L</b>	10	0,232*	0,027



**Figura 8** – Volume proporcional de muco ácido – análise histológica da fase I. O eixo Y representa o volume proporcional de muco ácido. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\*p<0,001). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

**Tabela 5:** Número de animais avaliados, médias e desvio padrão dos valores do volume proporcional de muco neutro - análise histológica, fase I do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L (\*p<0,05).

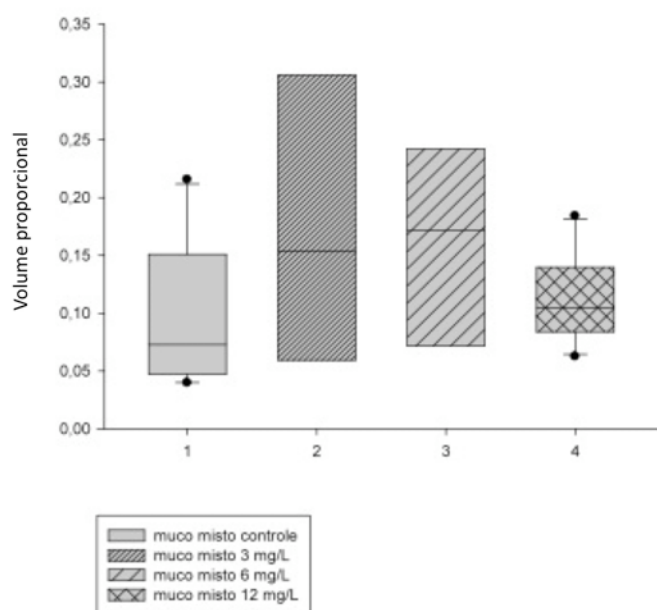
<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>Controle</b>	10	0,128	0,047
<b>3mg/L</b>	10	0,112	0,047
<b>6mg/L</b>	10	0,087	0,036
<b>12mg/L</b>	10	0,075*	0,039



**Figura 9** – Volume proporcional de muco neutro – análise histológica da fase I. O eixo Y representa o volume proporcional de muco neutro. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers“. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes ( $*p<0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

**Tabela 6:** Número de animais avaliados, medianas e distribuições nos quartis dos valores do volume proporcional de muco misto - análise histológica, fase I do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L.

<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
<b>Controle</b>	10	0,072	0,0486	0,142
<b>3mg/L</b>	10	0,153	0,0600	0,306
<b>6mg/L</b>	10	0,172	0,0896	0,228
<b>12mg/L</b>	10	0,105	0,0846	0,134

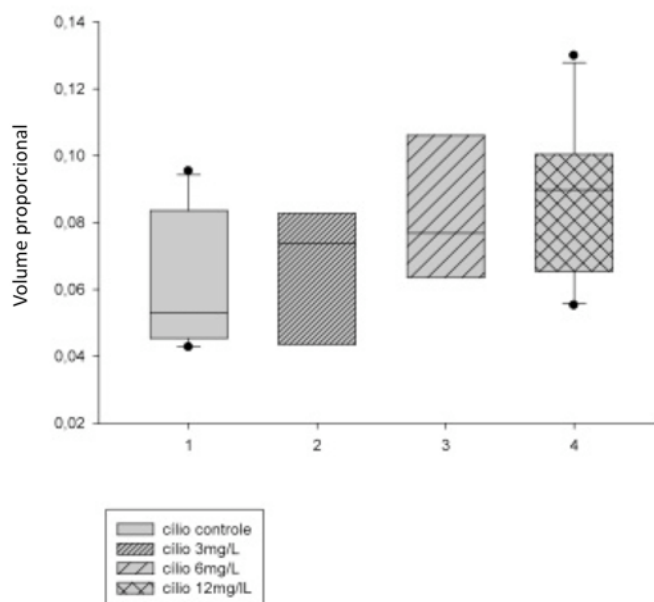


**Figura 10** – Volume proporcional de muco misto – análise histológica da fase I. O eixo Y representa o volume proporcional de muco misto. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers“. Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

**Tabela 7:** Número de animais avaliados, médias e desvio padrão dos valores do volume proporcional de cílios - análise histológica, fase I do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L.

<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>Controle</b>	10	0,0610	0,0195
<b>3mg/L</b>	10	0,0669	0,0206
<b>6mg/L</b>	10	0,0809	0,0323
<b>12mg/L</b>	10	0,0878	0,0229





**Figura 11** – Volume proporcional de cílios – análise histológica da fase I. O eixo Y representa o volume proporcional de cílios. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

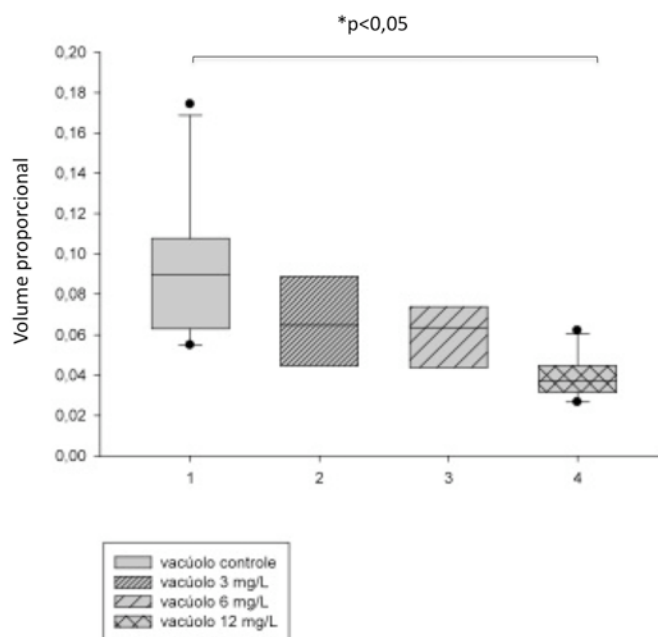
A análise volume proporcional de vacúolos revelou que o grupo controle apresentou maior volume proporcional de vacúolos que o grupo 12mg/L ( $p < 0,05$ ). As comparações entre os outros grupos não revelaram diferenças significativas. Os valores das medianas e distribuições nos quartis do volume proporcional de vacúolos estão na tabela 8. A representação gráfica encontra-se na figura 12.

A análise do volume proporcional dos núcleos de células e do interstício não demonstrou diferenças significativas nas comparações entre os grupos. Os valores das médias e desvio padrão dos volumes proporcionais dos núcleos de células e do interstício encontram-se na tabela 9. A representação gráfica é mostrada na figura 13.

A avaliação da espessura epitelial demonstrou que o grupo 6mg/L apresentou valores significativamente menores que o grupo controle ( $p < 0,05$ ). As comparação entre os outros grupos não demonstraram diferenças significantes. Os dados da espessura epitelial encontram-se detalhados na tabela 10. A representação gráfica dos valores médios da espessura epitelial e distribuição nos percentis são mostrados na figura 14.

**Tabela 8:** Número de animais avaliados, medianas e distribuições nos quartis dos valores do volume proporcional de vacúolos - análise histológica, fase I do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L (\*p<0,05).

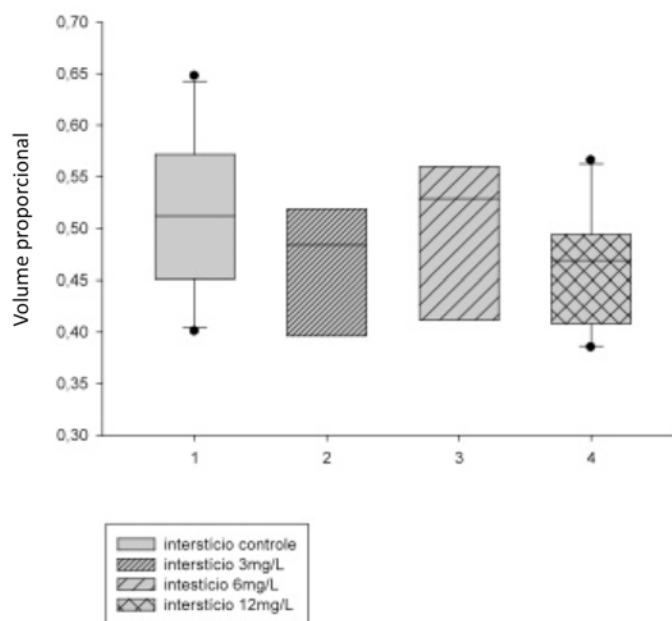
<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
<b>Controle</b>	10	0,0898*	0,0651	0,104
<b>3mg/L</b>	10	0,0649	0,0448	0,0863
<b>6mg/L</b>	10	0,0633	0,0479	0,0736
<b>12mg/L</b>	10	0,0370*	0,0331	0,0444



**Figura 12** – Volume proporcional de vacúolos – análise histológica da fase I. O eixo Y representa o volume proporcional de vacúolos. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes ( $*p<0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

**Tabela 9:** Número de animais avaliados, médias e desvio padrão dos valores do volume proporcional dos núcleos celulares e interstício - análise histológica, fase I do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L.

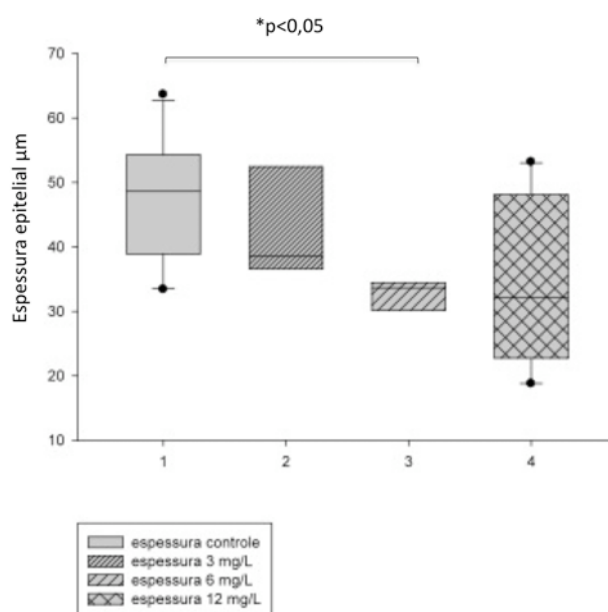
<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>Controle</b>	10	0,516	0,075
<b>3mg/L</b>	10	0,464	0,086
<b>6mg/L</b>	10	0,500	0,076
<b>12mg/L</b>	10	0,461	0,059



**Figura 13** – Volume proporcional dos núcleos celulares e interstício – análise histológica da fase I. O eixo Y representa o volume proporcional de dos núcleos celulares e interstício. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

**Tabela 10:** Número de animais avaliados, medianas e distribuições nos quartis dos valores espessura epitelial na análise histológica, na fase I do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 3mg/L, 6mg/L e 12mg/L (\*p<0,05).

<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
<b>Controle</b>	10	48,625*	40,140	54,110
<b>3mg/L</b>	10	33,645	36,765	49,167
<b>6mg/L</b>	10	33,690*	30,840	34,230
<b>12mg/L</b>	10	32,150	23,910	46,860



**Figura 14** – Espessura epitelial, medida do ápice dos cílios à membrana basal – análise histológica da fase I. O eixo Y representa a espessura epitelial em micrômetros. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes ( $*p<0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.



Na segunda fase do experimento, além de avaliar o tempo relativo de TMC e realizar a análise histológica, determinou-se a FBC. Os animais foram divididos em cinco grupos, com 10 em cada (grupo controle – ringerã, MP bruto do diesel, MP do diesel tratado com hexano, MP do diesel tratado com metanol e MP do diesel tratado com ácido nítrico). Nesta fase, os experimentos foram realizados de maneira cega, de modo com que o examinador não soubesse qual poluente estava sendo avaliado em todos os experimentos. A ordem das diluições a serem testadas foi decida por sorteio, de modo a minimizar a ocorrência de vieses de seleção. Após a análise dos resultados obtidos na primeira fase do experimento, escolheu-se a concentração 12mg/L, como a mais adequada para os testes com as frações. Deste modo, nos testes de tempo de TMC e FBC, as variáveis influenciadoras foram tempo de exposição ao poluente (zero, trinta, sessenta e noventa minutos) e tipo de poluente. Para a análise histológica apenas o tipo de poluente foi variável relevante.

Os resultados da análise do tempo relativo de TMC, na fase II do experimento, revelaram que houve uma diferença significativa nas médias da variável tempo, com tempo relativo de TMC no tempo 90 minutos significativamente maior que no tempo zero e 30 minutos ( $p < 0,05$ ). Quando avaliou-se o fator grupo, verificou-se que os valores médios do grupo ácido nítrico foram significativamente maiores que o grupo MP bruto ( $p < 0,05$ ). As outras comparações entre os grupos não revelaram diferenças significativas.

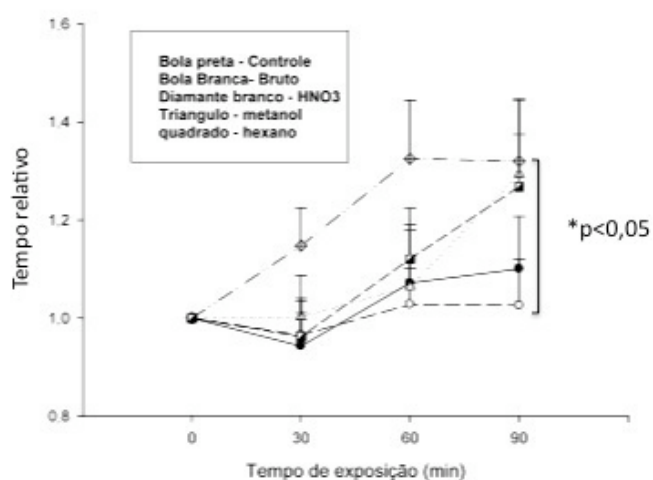
A análise da FBC não demonstrou diferenças significantes, tanto intra como inter grupos. Os valores médios do tempo de TMC em segundos, FBC e o número de animais avaliados encontram-se nas tabelas 11 a 16. O comportamento do tempo relativo de TMC e FBC encontram-se ilustrados nas figuras 15 e 16 respectivamente.

A análise histológica revelou que o grupo metanol teve maior volume proporcional de muco ácido que o grupo controle ( $p < 0,05$ ). As comparações entre os outros grupos não revelaram diferenças significantes. O número de animais avaliados bem como as médias e desvio padrão do volume proporcional de muco ácido da fase II estão na tabela 17. A representação gráfica encontra-se ilustrada na figura 17.

O grupo ácido nítrico foi o que apresentou a menor volume proporcional de muco neutro em comparação aos grupos controle e ao grupo hexano ( $p < 0,05$ ). As comparações entre os outros grupos não revelaram diferenças significantes. O número de animais avaliados bem como as médias e desvio padrão do volume proporcional de muco neutro estão na tabela 18. A representação gráfica do volume proporcional de muco neutro encontra-se ilustrada na figura 18.

**Tabela 11:** Número de animais avaliados, valores médios do tempo de transporte mucociliar em segundos, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP tratado com hexano, ácido nítrico e metanol, nos tempos zero, trinta, sessenta e noventa minutos.

Grupo	Número de animais	Tempo zero	Tempo 30 min	Tempo 60 min	Tempo 90 min
<b>Controle</b>	10	19,06	17,66	19,68	20,29
<b>MP bruto</b>	10	14,81	14,30	14,95	15,13
<b>Hexano</b>	10	18,42	16,62	20,16	23,20
<b>Ácido nítrico</b>	10	14,85	17,18	20,07	20,04
<b>Metanol</b>	10	17,91	17,89	19,11	23,35



**Figura 15** – Valores em tempo relativo de transporte mucociliar após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP tratado com hexano, ácido nítrico e metanol, nos tempos zero, trinta, sessenta e noventa minutos, (eixo X = tempo de exposição ao poluente em minutos, eixo Y = tempo relativo). As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\* $p < 0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

**Tabela 12:** Número de animais avaliados e medianas dos valores da frequência de batimento ciliar em Hertz, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas diluições com ringer-rã. Encontram-se descritas as distribuições dos valores nos percentis (25% e 75%).

<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
<b>Controle T0</b>	10	17,866	17,254	21,034
<b>Controle T30</b>	10	16,360	13,394	19,208
<b>Controle T60</b>	10	16,750	14,296	23,826
<b>Controle T90</b>	10	18,749	14,290	21,210

**Tabela 13:** Número de animais avaliados, médias e desvio padrão dos valores da frequência de batimento ciliar em Hertz, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas diluições do grupo MP bruto do diesel.

<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>MP bruto T0</b>	10	14,387	2,112
<b>MP bruto T30</b>	10	13,969	1,650
<b>MP bruto T60</b>	10	13,621	1,634
<b>MP bruto T90</b>	10	13,574	1,864

**Tabela 14:** Número de animais avaliados, médias e desvio padrão dos valores da frequência de batimento ciliar em Hertz, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas diluições do grupo metanol.

<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>Metanol T0</b>	10	13,669	1,471
<b>Metanol T30</b>	10	13,326	1,012
<b>Metanol T60</b>	10	13,047	0,992
<b>Metanol T90</b>	10	12,653	1,543

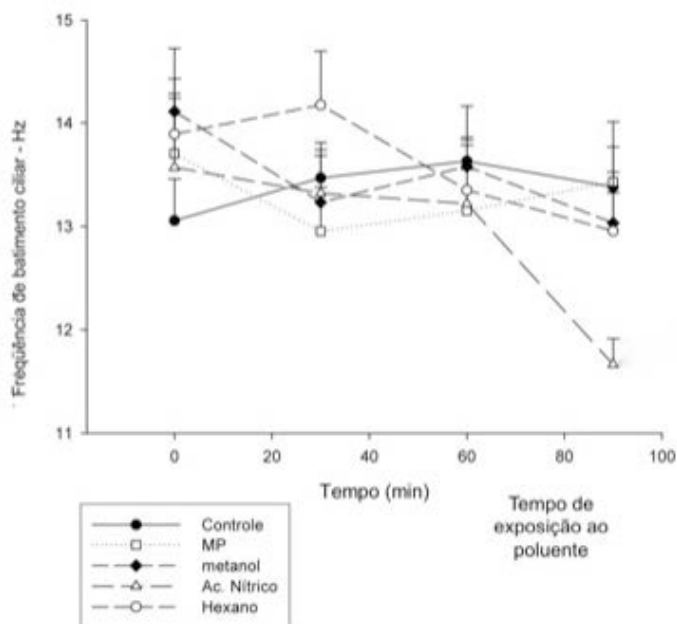
**Tabela 15:** Número de animais avaliados e medianas dos valores da frequência de batimento ciliar em Hertz, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas diluições do grupo ácido nítrico. Encontram-se descritas as distribuições dos valores nos percentis (25% e 75%).

<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
<b>Ácido nítrico T0</b>	10	14,542	12,843	16,480
<b>Ácido nítrico T30</b>	10	13,269	12,430	14,430
<b>Ácido nítrico T60</b>	10	13,500	12,840	15,820
<b>Ácido nítrico T90</b>	10	12,013	11,658	13,630



**Tabela 16:** Número de animais avaliados, médias e desvio padrão dos valores da frequência de batimento ciliar em Hertz, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas diluições do grupo hexano.

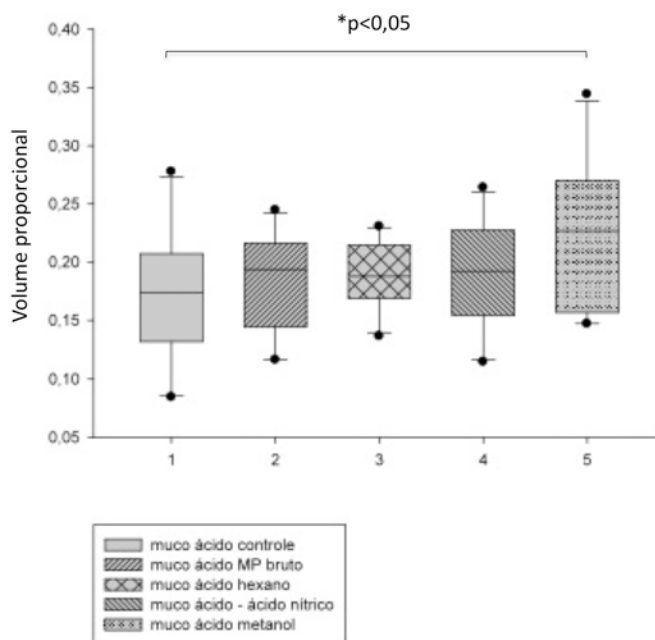
<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>Hexano T0</b>	10	13,906	1,030
<b>Hexano T30</b>	10	14,104	1,149
<b>Hexano T60</b>	10	13,501	1,192
<b>Hexano T90</b>	10	12,849	1,278



**Figura 16** – Valores da freqüência de batimento ciliar fase II após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP tratado com hexano, ácido nítrico e metanol, nos tempos zero, trinta, sessenta e noventa minutos (eixo X = tempo de exposição ao poluente em minutos, eixo Y = freqüência de batimento ciliar em Hz). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

**Tabela 17:** Número de animais analisados, médias e desvio padrão do volume proporcional de muco ácido, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol (\*p<0,05).

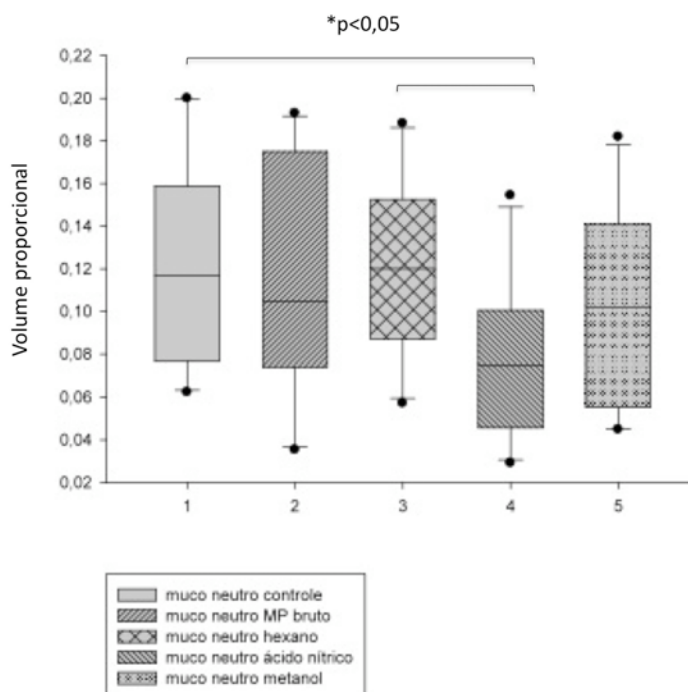
<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Médias</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Controle</b>	10	0,173*	0,058
<b>MP bruto</b>	10	0,181	0,043
<b>Hexano</b>	10	0,189	0,028
<b>Ácido Nítrico</b>	10	0,188	0,045
<b>Metanol</b>	10	0,223*	0,065



**Figura 17** – Valores médios do volume proporcional de muco ácido, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers“. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\*p<0,05). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

**Tabela 18:** Número de animais analisados, médias e desvio padrão do volume proporcional de muco neutro, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol (\*p<0,05).

<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Médias</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Controle</b>	10	0,122*	0,048
<b>MP bruto</b>	10	0,115	0,054
<b>Hexano</b>	10	0,120*	0,042
<b>Ácido Nítrico</b>	10	0,078*	0,035
<b>Metanol</b>	10	0,102	0,044



**Figura 18** – Valores médios do volume proporcional de muco neutro, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers“. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\*p<0,05). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

Em relação ao volume proporcional de muco misto, o grupo ácido nítrico apresentou volume significativamente maior que o grupo MP bruto ( $p < 0,05$ ). As comparações entre os outros grupos não revelaram diferenças. O número animais avaliados bem como as médias e desvio padrão do volume proporcional de muco misto estão na tabela 19. O volume proporcional de muco misto encontra-se ilustrado na figura 19.

A análise do volume proporcional de cílios não revelou diferenças significativas nas comparações entre os grupos. O número animais avaliados bem como as médias e desvio padrão do volume proporcional dos cílios encontram-se na tabela 20. Os resultados encontram-se ilustrados na figura 20.

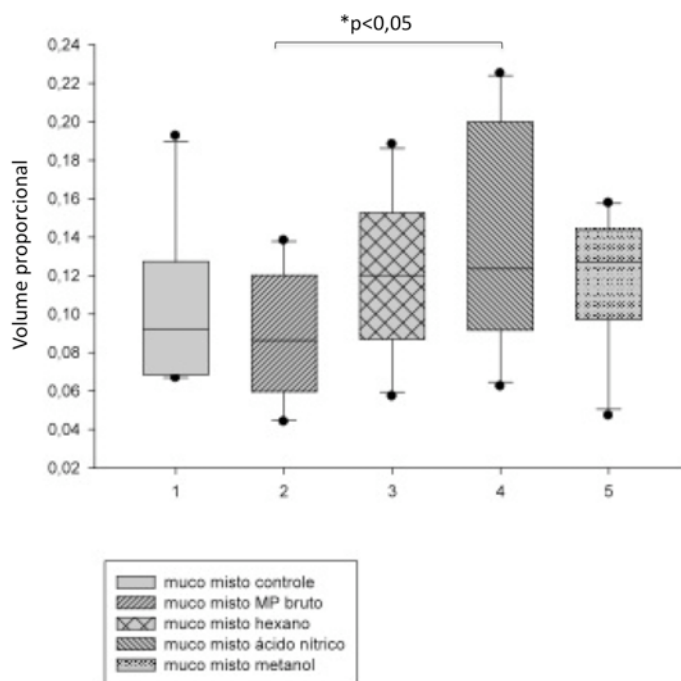
A análise da volume proporcional de vacúolos mostrou que o grupo metanol apresentou valores significativamente menores que o grupo MP bruto ( $p < 0,05$ ). As comparações entre todos os outros grupos não revelaram diferenças significativas. O número animais analisados bem como as médias e desvio padrão do volume proporcional de vacúolos estão na tabela 21. Os resultados encontram-se ilustrados na figura 21.

A análise do volume proporcional dos núcleos e interstício e da espessura epitelial não revelou diferenças significativas nas comparações entre os grupos. O número de animais avaliados bem como as médias e o desvio padrão do volume proporcional dos núcleos e interstício e da espessura epitelial estão nas tabelas 22 e 23, respectivamente. As representações gráficas encontram-se ilustradas nas figuras 22 e 23, respectivamente.

**Tabela 19:** Número de animais analisados, médias e desvio padrão do volume proporcional de muco misto, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol (\*p<0,05).

<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Médias</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Controle</b>	10	0,104	0,043
<b>MP bruto</b>	10	0,089*	0,033
<b>Hexano</b>	10	0,120	0,042
<b>Ácido Nítrico</b>	10	0,136*	0,056
<b>Metanol</b>	10	0,119	0,034

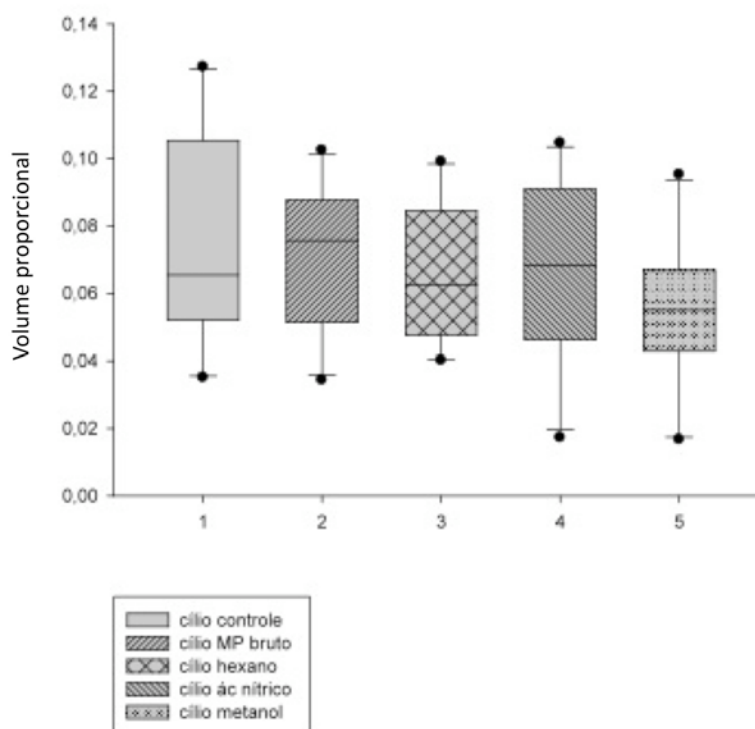




**Figura 19** – Valores médios do volume proporcional de muco misto, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes (\* $p < 0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

**Tabela 20:** Número de animais analisados, médias e desvio padrão do volume proporcional de cílios, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol.

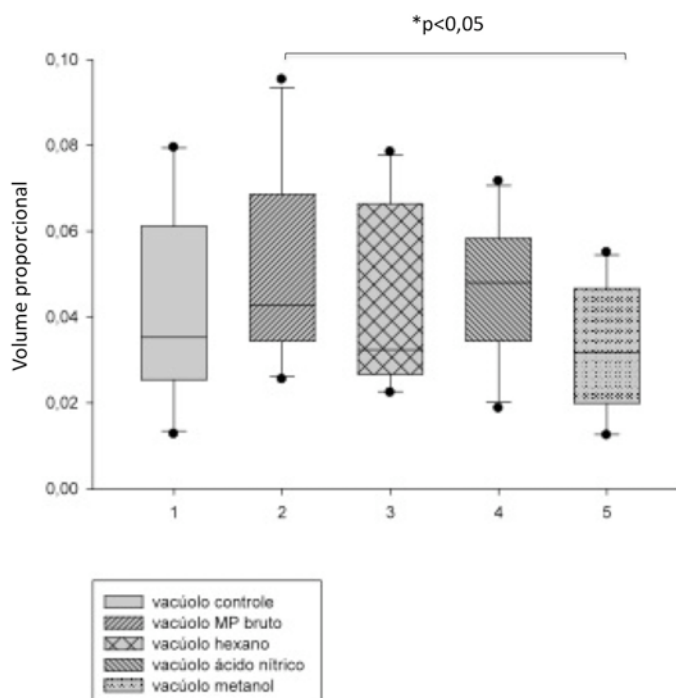
<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Médias</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Controle</b>	10	0,075	0,032
<b>MP bruto</b>	10	0,071	0,021
<b>Hexano</b>	10	0,065	0,020
<b>Ácido Nítrico</b>	10	0,066	0,026
<b>Metanol</b>	10	0,054	0,022



**Figura 20** – Valores médios do volume proporcional de cílios, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers”. Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

**Tabela 21:** Número de animais analisados, médias e desvio padrão do volume proporcional de vacúolos, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol (\*p<0,05).

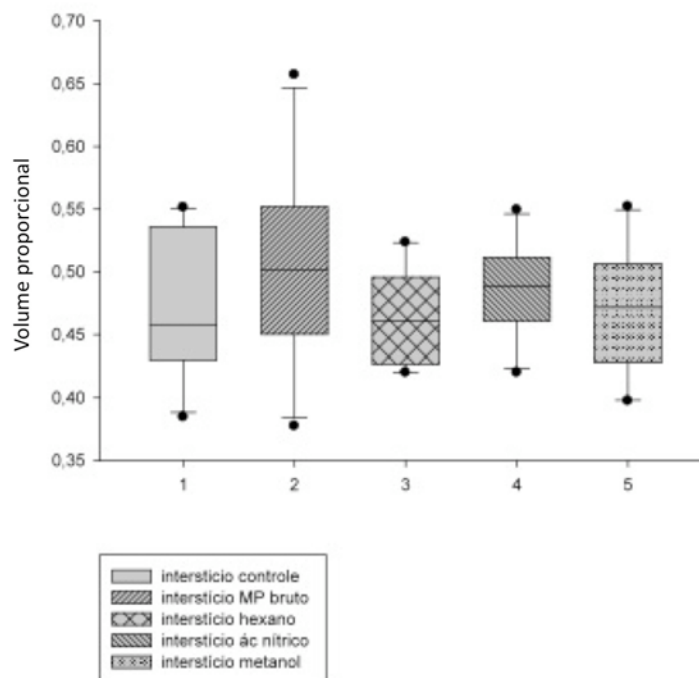
<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Médias</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Controle</b>	10	0,042	0,023
<b>MP bruto</b>	10	0,051*	0,022
<b>Hexano</b>	10	0,044	0,021
<b>Ácido Nítrico</b>	10	0,046	0,015
<b>Metanol</b>	10	0,032*	0,014



**Figura 21** – Valores médios do volume proporcional de vacúolos, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers“. As comparações entre grupos interligados pelos colchetes revelaram diferenças estatísticas significantes ( $*p<0,05$ ). Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

**Tabela 22:** Número de animais analisados, médias e desvio padrão do volume proporcional de núcleos e interstício, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol.

<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Médias</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Controle</b>	10	0,475	0,057
<b>MP bruto</b>	10	0,504	0,077
<b>Hexano</b>	10	0,465	0,037
<b>Ácido Nítrico</b>	10	0,485	0,036
<b>Metanol</b>	10	0,469	0,049

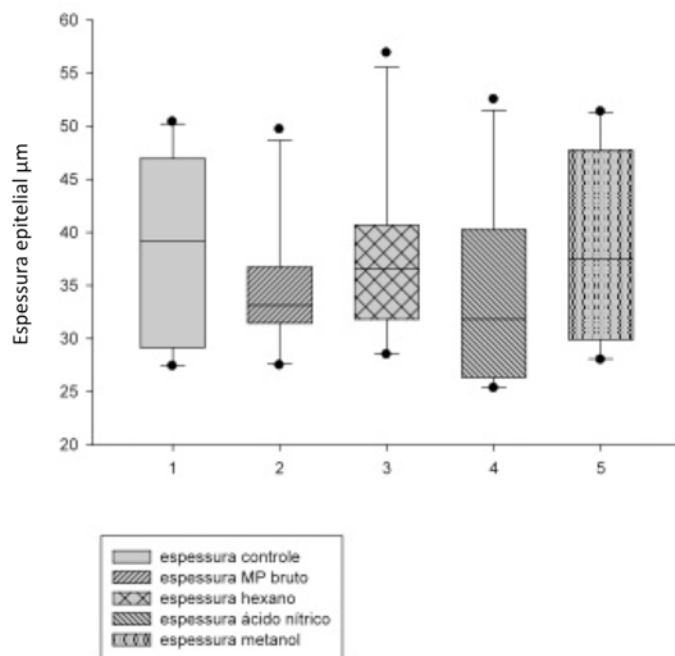


**Figura 22** – Valores médios do volume proporcional de núcleos e interstício, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outlyers”. Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

**Tabela 23:** Número de animais analisados, médias e desvio padrão do espessura epitelial, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol.

<b>Grupo</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Médias</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Controle</b>	10	39,46	8,31
<b>MP bruto</b>	10	34,61	6,20
<b>Hexano</b>	10	37,82	8,14
<b>Ácido Nítrico</b>	10	34,25	8,63
<b>Metanol</b>	10	38,23	8,01





**Figura 23** – Valores médios da espessura epitelial, na fase II do experimento, após a submersão dos palatos das rãs nas seguintes diluições: ringer-rã (grupo controle), MP bruto do diesel com concentração 12mg/L, e MP do diesel tratado com hexano, ácido nítrico e metanol. A linha transversal no meio do box-plot representa o percentil 50%. A linha inferior do box-plot representa o percentil 25% e a acima o percentil 75%. Os círculos em preto representam os “outliers“. Número de animais avaliados em cada grupo = 10.

*Discussão*

---

## 6 DISCUSSÃO

Estudos realizados com o objetivo de avaliar a toxicidade do material particulado da exaustão de diesel ficaram em evidência a partir dos anos 80, devido ao aumento de veículos automotivos movidos a diesel. Contudo as informações disponíveis sobre os efeitos associados à exposição aguda MP do diesel são limitadas para caracterizar todo potencial tóxico destas partículas para a população em geral (Wichmann, 2007). No entanto, com base em estudos experimentais e observacionais em humanos, notou-se que a exposição aguda ao MP do diesel pode causar sintomas irritativos agudos, como prurido ocular e hiperemia conjuntival, prurido e irritação faríngea, tosse e broncoespasmo, e sintomas neurofisiológicos, como náuseas e vertigens. Existem também, evidências de efeitos diretos no sistema imunológico, com a exacerbação das respostas alérgicas à alérgenos conhecidos e sintomas semelhantes à asma. Estudos epidemiológicos foram realizados para investigar os danos à saúde da poluição ambiental de partículas finas (PM 2,5) e ultrafinas (PM menor que 2,5 micra de diâmetro aerodinâmico). Os trabalhos revelaram impacto respiratório e desfechos cardiovasculares, tais como aumento na mortalidade diária, nas internações hospitalares, de sintomas respiratórios, do número de infarto do miocárdio, alterações inflamatórias sistêmicas e de mudanças em parâmetros eletrocardiográficos (American Lung Association, Environmental Defense, 2003).

Existem na literatura estudos que demonstraram que diferentes frações do material particulado da exaustão de diesel como a fuligem, compostos orgânicos associados a partículas e/ou componentes da fase gasosa possuem potencial carcinogênico (Scheepers et al., 1992). Estas frações também retardam o “clearance” mucociliar dos pulmões, levam a inflamação tecidual e ao aumento da proliferação de células inflamatórias no epitélio brônquico. Os compostos orgânicos do MP do diesel são conhecidos por reagirem com macromoléculas, causando peroxidação lipídica, dano no DNA e/ou ativação de outras substâncias genotóxicas como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Scheepers et al., 1992). Somando-se a estas constatações, McClellan (1987), acrescentou a essas considerações, outros efeitos deletérios da exposição a compostos orgânicos do MP do diesel, como atividade mutagênica e carcinogênica em bioensaios com bactérias e com células somáticas de mamíferos.

O foco do presente estudo foi o de avaliar a resposta de um epitélio mucociliar, pela análise de alguns indicadores de toxicidade epitelial, a estímulos agressores proporcionados por diferentes frações de diesel quimicamente tratadas. Em um estudo desenvolvido previamente, demonstrou-se que o tratamento das partículas de MP do diesel com metanol, hexano e ácido nítrico foi eficiente na modificação do perfil químico das mesmas (Laks et al., 2008).

Quanto aos aspectos metodológicos vale ressaltar, primeiramente, que as amostras de MP do diesel utilizadas neste estudo foram coletadas

diretamente do escapamento de um ônibus da frota urbana da cidade de São Paulo, cujo tipo de operação depende das condições de tráfego e perfil de pilotagem do motorista. O ônibus estava equipado com motor Mercedes-Benz MB 1620, com 210 hp de potência, sem controle de injeção eletrônica de combustível, circulando com diesel comumente utilizado em São Paulo, com 500 ppm de enxofre. A tecnologia empregada no motor do ônibus escolhido e a qualidade do diesel utilizado refletem a situação encontrada nos países em desenvolvimento (tecnologia ultrapassada e diesel com alto teor de enxofre).

A avaliação da composição química do material particulado do diesel, após os tratamentos de extração química, revelou uma grande redução da quantidade de compostos orgânicos de baixa polaridade (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPAs) após o tratamento com hexano. O tratamento com metanol resultou em uma redução parcial dos HPAs de média polaridade e remoção total do enxofre. O tratamento com ácido nítrico promoveu um menor grau de remoção dos HPAs e retirada parcial de metais e total do enxofre.

A preparação do palato de rã foi escolhida como modelo experimental para avaliação de agressão aguda ao epitélio mucociliar pois constitui um sistema adequado para o estudo do transporte mucociliar (Rubin et al., 1990a). As rãs, da espécie *Rana catesbiana*, possuem em seu palato um epitélio mucociliar similar ao encontrado nas vias aéreas de mamíferos, que possui excelentes respostas após ensaios de intoxicação aguda ao epitélio, mesmo sendo uma preparação “ex-vivo” (Macchione et al., 1999). As rãs

desta espécie diminuem sua demanda energética nos meses de inverno, possuindo grande reserva metabólica. Sendo assim, mesmo após sua desarticulação, o palato mantém a viabilidade, funções biológicas e capacidade de resposta a diversos estímulos agressores por um período de até cinco dias (Rubin et al., 1990a).

Optou-se pela utilização do tempo relativo na análise do transporte mucociliar pois considerou-se essa variável como mais adequada do que o TMC em segundos, já que o tempo zero torna-se igual para todos os grupos (sempre igual a 1). Estes cuidados reduziram a ocorrência de vieses devido a diferenças entre grupos de rãs, que apresentassem tempos basais de transporte mucociliar diferentes entre si.

A utilização das colorações com ácido periódico de Schiff (PAS) e Alcian Blue (AB) foi escolhida devido a suas características de capacidade de coloração de mucinas com diferentes pH. A coloração com o AB somente é possível em meios com baixo pH, onde a repulsão de cargas exercidas pelas proteínas, associada a alta massa deste corante, o deixa moderadamente seletivo a mucinas ácidas altamente hidratadas. O PAS possui afinidade a mucinas com pH mais alcalino (Prentø, 2009). Sendo assim, quanto mais tóxica for a fração testada, ou maior a agressão ao epitélio mucociliar, espera-se que maiores quantidades de grânulos de muco ácido (AB+) sejam encontradas nos campos estudados.

É bem conhecida a função protetora do muco que recobre o epitélio do sistema respiratório. Sabe-se também que a eficácia deste mecanismo

depende grandemente das propriedades físico-químicas do muco respiratório (Jacquot et al., 1992).

A secreção de mucinas “in vivo”, geralmente iniciada por um secretagogo, é rápida, ocorrendo dentro de segundos a minutos (Verdugo 1991, Davis, 2002). Já a regulação genética e biossíntese destas mucinas, requer de 6 a 24 horas (Neutra et al., 1987). Em palatos de rã podemos sugerir que o material particulado da exaustão do diesel pode funcionar como secretagogo, pois o experimento é realizado em 90 minutos, não havendo tempo para biossíntese de mucinas, que, como mencionado, leva de 6 a 24 horas. Excesso de muco nas vias aéreas pode ser decorrente de três tipos de alteração: (1) produção aumentada através da super expressão de genes da mucina (MUC); (2) excesso de produção secundária à hipertrofia das células mucosas, hiperplasia, ou mesmo metaplasia; (3) hipersecreção de mucina previamente formada e armazenada pelas células caliciformes e glândulas das vias respiratórias (Adler et al., 2001). Baseado no que foi discutido acima, para o palato de rã, à extrusão de muco pode ser causada pela hipersecreção de mucina já formada.

Mucinas têm em sua composição 50-90% de carboidratos e numerosos sítios de O-glicosilação por molécula, (de várias dezenas a centenas), devido ao elevado número de sequências de nucleotídeos repetidos em cada espinha dorsal da proteína MUC. Os estudos para determinar e/ou prever quais serinas ou treoninas, nos nucleotídeos repetidos ou em mucinas, são O-glicosiladas ainda é um desafio (Gerken et al., 2004). Ainda não está estabelecida se a complexidade das estruturas O-

glicanas reflete níveis alterados de mucinas específicas nas secreções das vias aéreas e/ou se alterações na glicosilação de proteína específicas do MUC estão presentes em doenças ou inflamação (Rose et al., 2006). Os açúcares terminais, devido à sua hidrofobicidade ou carga, contribuem ou determinam as características físicas e/ou propriedades biológicas das mucinas. Assim, alterações na glicosilação terminal das mucinas, que podem ocorrer em estados de doença, têm potencial para alterar as propriedades físicas das mucinas e as propriedades reológicas do muco (Rose et al., 2006). Moléculas de ácido siálico e sulfatos transmitem cargas negativas para mucinas que passam a apresentar baixos valores de potencial de ionização e pH, enquanto fucose confere hidrofobicidade (Rose et al., 2006).

A acidificação do muco, proporcionada por alterações nas propriedades físico-químicas das mucinas, pode levar a edema intra e intercelular e ao aumento da viscosidade do muco, o que leva a prejuízos no sistema mucociliar e nas defesas do epitélio respiratório, (Giddens e Fairchild, 1972; Holma et al., 1977; Holma, 1989). Lemos et al. (1994) e Pires-Neto et al. (2006), em seus estudos, observaram que ratos e camundongos, expostos cronicamente a poluição da cidade de São Paulo, demonstraram uma mudança no perfil de suas mucinas intra-epiteliais de pH mais alcalino para acidificado, reforçando a suposição de que quanto maior a agressão ao epitélio, maior quantidade de muco ácido será encontrada. Contudo, em um estudo de exposição aguda ao MP urbano, Macchione et al. (1999) encontram redução na concentração de mucinas neutras, sem



alterações significativas na quantidade de muco ácido no epitélio do palato da rã.

No presente estudo, analisou-se, além do volume proporcional de muco ácido, neutro e misto, cílios, vacúolos, interstício e núcleo de células, a espessura do epitélio ciliar. Lemos et al. (1992) demonstraram que ratos submetidos à exposição crônica (6 meses) de poluentes da cidade de São Paulo apresentaram aumento da espessura epitelial do septo nasal, em decorrência de hipertrofia do epitélio secretor. Contudo, Pires-Neto et al. (2006) não encontraram diferenças na espessura epitelial do septo nasal de camundongos também submetidos à exposição crônica (5 meses) ao ar de uma via de grande fluxo da cidade de São Paulo. Um estudo de exposição sub-crônica ao MP urbano do diesel, desenvolvido por Yoshizaki et al. (2010) revelou que camundongos expostos a instilação nasal de baixas concentrações de MP do diesel por 2 meses apresentaram um aumento significativo da espessura do epitélio nasal, contrariamente ao verificado na exposição por 30 dias que não resultou em alterações significativas na espessura do epitélio do septo nasal. Em verdade, os efeitos de exposições agudas a grandes concentrações de poluentes na preparação do palato da rã, não são completamente conhecidos.

Verificou-se, na primeira etapa do presente estudo, uma redução gradativa das medianas da espessura epitelial com o aumento da concentração do MP bruto do diesel, fato que pode ser explicado por uma possível extrusão do muco dos grânulos das células caliciformes, como mecanismo de defesa inespecífica do epitélio mucociliar. A hiperplasia do

epitélio mucociliar do palato da rã não poderia acontecer por se tratar de uma preparação “ex vivo” e não haveria tempo suficiente para ocorrer hipertrofia, uma vez que requer biossíntese de mucina que leva de 6 - 24 horas (Neutra et al., 1987) e a exposição é de curta duração (90 minutos). Na fase I, as medianas da variável espessura epitelial na fase I diminuíram progressivamente com o aumento da concentração dos poluentes; contudo, somente o grupo 6mg/L apresentou valores significativamente menores que o grupo controle. O grupo 12mg/l, apesar de apresentar mediana menor que o grupo 6mg/L, apresentou maior variância e presença de “outliers”.

Com relação à intoxicação dos palatos optou-se pela utilização de meio aquoso pois é o mais conveniente para experimentos com rãs, necessitando de menores quantidades de partículas em relação ao meio aéreo, o que reduz o tempo dos processos de extração e os riscos de modificação do perfil químico das mesmas (Laks et al., 2008). Como inconveniente, o meio aquoso pode interferir nos padrões de distribuição e tamanho das partículas (Laks et al., 2008). Estes aspectos geram algumas limitações para a extrapolação dos resultados obtidos para o comportamento destas partículas no ar atmosférico e suas interações com os seres vivos (Macchione et al., 1999).

Vale ressaltar que a fase I do experimento foi delineada para a titulação de uma concentração de MP bruto do diesel que fosse realmente eficaz em lesar o epitélio mucociliar. Os resultados obtidos no TMC denotam que o potencial lesivo do MP bruto aumenta gradativamente em concentrações progressivamente crescentes. O grupo 12mg/L apresentou

valores de tempo relativo de TMC significativamente maiores que o controle nos tempos T30, T60 e T90 minutos, sendo então a concentração escolhida para os experimentos da fase II. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Macchione et al. (1999), que também observaram em seu estudo, aumento significativo do tempo de TMC após a exposição, por 120 minutos, dos palatos das rãs ao MP bruto urbano. A análise histológica da fase I confirma o potencial lesivo das partículas de MP bruto do diesel, já que o grupo 12mg/L apresentou valor significativamente maior ( $p < 0,001$ ) de volume proporcional de muco ácido que os grupos controle, 3mg/L e 6mg/L. Macchione et al. (1999) não encontraram alterações significativas na quantidade de muco ácido no palato da rã após a exposição aguda ao MP urbano. Este fato pode ser devido às menores concentrações de MP utilizadas naquele estudo, associadas a diferenças no perfil químico das partículas, que se tratavam de MP urbano e não de MP do diesel somente, como no presente trabalho. Contudo, estudos de exposição sub-crônica e crônica, como os desenvolvidos por Lemos et al. (1994), Pires-Neto et al. (2006) e Yoshizaki et al. (2010), demonstraram uma maior concentração de muco ácido no epitélio nasal de roedores expostos tanto ao MP urbano e como ao MP do diesel.

O grupo 12mg/L foi o que apresentou o menor volume proporcional de muco neutro e de vacúolos, confirmando o potencial lesivo desta concentração. A redução do volume proporcional de muco neutro confirma o achado do estudo de Macchione et al. (1999), no qual se demonstrou que

quanto maior a concentração de MP urbano, menor a concentração de mucinas neutras no epitélio mucociliar do palato da rã.

A avaliação do volume proporcional de cílios não revelou diferenças significativas entre os grupos. Lemos et al. (1994) verificaram que em ratos expostos cronicamente a poluição urbana, houve uma redução na quantidade de cílios nas porções superficiais do epitélio. Contrariamente aos resultados apresentados por Lemos et al. (1994) o grupo 12mg/L não apresentou diferenças significativas em relação grupo controle quanto a variável volume proporcional de cílios. Estas discrepâncias ocorrem provavelmente devido a diferenças no delineamento dos dois estudos. O presente trabalho avaliou a resposta do epitélio mucociliar do palato da rã, uma preparação "ex vivo", frente a uma agressão aguda com concentrações maiores que as do ar ambiente. Lemos et al. (1994) avaliaram a resposta de ratos expostos cronicamente a poluição urbana de São Paulo. Nossos resultados demonstram que exposições agudas do palato da rã nas concentrações utilizadas não foram capazes de alterar significativamente a quantidade de cílios na superfície do epitélio mucociliar.

A análise de tempo relativo de TMC na segunda fase, por sua vez, demonstrou que os valores médios do grupo ácido nítrico foram significativamente maiores que o grupo MP bruto. Estes achados reforçam a hipótese que os compostos orgânicos desempenham um papel relevante na toxicidade aguda ao epitélio mucociliar, pois o ácido nítrico é um solvente que gera um aumento relativo da fração orgânica como um todo. Os grupos metanol e hexano não apresentaram diferenças em relação ao controle e ao

grupo MP bruto. Nesta fase, ao contrário do ocorrido na fase I, o grupo controle não apresentou diferenças em relação ao grupo MP bruto (com concentração de 12mg/L). O grupo MP bruto reagiu de modo diferente, não havendo aumento dos valores médios do tempo relativo como esperado, sem a ocorrência de diferenças significantes entre estes grupos. A análise individualizada do grupo MP bruto na fase II, revelou que em 5 animais do grupo MP bruto a 12mg/L, houve redução do tempo de TMC no tempo noventa minutos, em relação ao tempo zero. A presença de “outliers” pode ser explicada por eventuais diferenças entre os lotes de rãs. O biotério da FMUSP tem capacidade para 20 rãs; como no presente estudo foram utilizados 90 animais, eventuais diferenças entre os lotes podem justificar estes achados. No intuito de minimizar este possível fator de viés, as rãs foram sempre obtidas do mesmo ranário, com peso ao redor de 100 gramas, e alimentadas da mesma forma. Rãs com aspecto visivelmente alterado ou com tempo de transporte mucociliar maior que trinta segundos no tempo zero foram excluídas dos experimentos. O grupo controle, nesta fase, teve o comportamento esperado, não havendo diferenças do tempo zero para o tempo noventa minutos.

A análise da FBC não revelou alterações significativas tanto na análise do fator tempo, ou seja, não houve variação significativa nos tempos zero, trinta, sessenta e noventa minutos, quanto a análise da variação entre os grupos. Macchione et al. (1999) encontraram resultados semelhantes aos nossos, não observando variações significativas na FBC após a exposição dos palatos das rãs ao MP urbano por 120 minutos. Estes achados sugerem

que, mesmo na presença de alterações no TMC e na análise histológica, a FBC pode não variar de maneira significativa.

A análise histológica da segunda fase revelou dados interessantes. Observou-se que alterações histopatológicas podem preceder modificações no tempo de TMC e na FBC, já demonstrando os efeitos lesivos das soluções testadas mesmo na ausência de alterações nos testes de transporte e frequência.

A fase II do estudo, por sua vez, sugere que os compostos orgânicos de baixa polaridade desempenham um papel importante na toxicidade aguda ao epitélio mucociliar, já que no grupo metanol, um solvente capaz de extrair compostos orgânicos de média polaridade, observou-se um aumento significativo do volume proporcional de muco ácido em relação ao grupo controle. O grupo metanol apresentou volume proporcional de vacúolos significativamente menor que o grupo controle. Os achados sugerem que o tratamento com metanol resultou em uma maior agressividade ao epitélio mucociliar. O maior volume proporcional de muco ácido, aliado ao menor volume proporcional de vacúolos denota agressão epitelial. Estudos de exposição crônica e sub-crônica demonstraram acidificação das mucinas intra-epiteliais em roedores expostos ao MP urbano e do diesel (Lemos et al., 1994; Pires-Neto et al., 2006; Yoshizaki et al., 2010).

A redução dos compostos de polaridade intermediária gerada pelo metanol resulta em um aumento relativo da concentração de orgânicos de baixa e alta polaridade, evidenciando o potencial tóxico destas frações. Reforçando ainda estes achados, o grupo hexano, um solvente que extrai

predominantemente compostos orgânicos de baixa polaridade, não apresentou diferenças quanto ao volume proporcional de muco ácido, muco neutro, muco misto, cílios, vacúolos, núcleo e interstício e espessura epitelial em relação ao controle. Deste modo, verificou-se que a redução de compostos orgânicos de baixa polaridade foi fator de proteção ao epitélio. O aumento relativo dos orgânicos de média e alta polaridade não teve influencia na toxicidade aguda ao epitélio. Estes achados comprovam o potencial deletério dos compostos orgânicos de baixa polaridade e estão de acordo com os achados de Laks et al. (2008) os quais observaram que a redução da fração orgânica do diesel foi fator de proteção ao sistema respiratório de roedores, não gerando alterações significativas em parâmetros de função pulmonar, como o grau de elastância e dinâmica pulmonar, e em parâmetros histológicos, como o grau de infiltração de neutrófilos no parênquima pulmonar.

Na segunda fase, ainda em relação ao volume proporcional de muco ácido, a comparação entre os grupos controle e MP bruto não apresentou diferenças significativas ao contrário do ocorrido na fase I. Estes achados, apesar de inesperados, ocorrem de forma coerente com os resultados do tempo relativo de TMC, que também não revelaram diferenças na fase II entre o grupo MP bruto e o controle. Macchione et al. (1999) também não encontraram alterações na concentração de muco ácido no palato da rã exposto a concentrações de MP urbano capazes de alterar de maneira significativa o TMC e diminuir a concentração de mucinas neutras intra-epiteliais.

O tratamento com ácido nítrico promoveu um aumento significativo do tempo relativo de TMC em relação ao grupo MP bruto. Aliado a isto, o grupo ácido nítrico apresentou uma redução significativa no volume proporcional de muco neutro em comparação ao controle e ao grupo hexano. A análise do volume proporcional de muco misto revelou que o grupo ácido nítrico apresentou uma quantidade significativamente maior que o grupo MP bruto. Contudo, não alterou o volume proporcional de muco ácido em relação ao controle. A redução da fração inorgânica, resultante do tratamento com ácido nítrico, com aumento da concentração relativa de todos os orgânicos, foi fator de agressão ao epitélio. Em conformidade com estes achados, Li et al. (2002) demonstraram que as frações orgânicas do MP do diesel promoveram agressão oxidativa a macrófagos alveolares, especialmente para partículas com alto teor de HPAs. Hidrocarbonetos aromáticos provenientes do MP urbano também foram capazes de induzir mutagênese e alterações cromossômicas, traduzidos por maior formação de adultos de DNA, associada a aberrações cromossômicas em linfócitos no sangue de cordão umbilical, de mães expostas no período pré-natal, ao ar ambiente com diferentes níveis de HPAs (Bocksay et al., 2005).

Nossos achados corroboram os resultados do estudo previamente desenvolvido por Laks et al. (2008) que obtiveram na fração hexano, ausência de efeitos deletérios sobre a elastância e dinâmica pulmonar e grau de infiltrado de neutrófilos no parênquima pulmonar, utilizando camundongos como modelo experimental. Outros estudos apresentam os metais como os possíveis agentes desencadeantes de toxicidade induzida



por partículas. Gurgueira et al. (2002), por exemplo, demonstrou que a toxicidade cardíaca e pulmonar em ratos expostos a fuligem de indústrias petroquímicas estava altamente relacionada a metais. Gavett et al. (2003) demonstrou que os metais do material particulado urbano induziram inflamação alérgica em camundongos, especialmente, zinco, magnésio, chumbo, cobre, cádmio e arsênio. Os achados de nosso estudo não demonstraram o efeito tóxico dos metais verificados em outros estudos.

Os resultados observados no presente estudo são, provavelmente, decorrentes da baixa qualidade do diesel utilizada nos ônibus da frota urbana de São Paulo (diesel 500 ppm de enxofre), aliada à queima incompleta do diesel, resultante da ausência de controle eletrônico de injeção de combustível, que gera maior liberação de compostos orgânicos (Khan et al., 2006; Liang et al., 2006).

Por outro lado, os resultados apresentados no presente estudo, evidenciam que quanto maior foi o estímulo agressor ao epitélio, maior o grau de acidificação do muco intra-epitelial. A utilização de óleo diesel com baixa qualidade, com maior teor de enxofre, e conseqüentemente, maior liberação de compostos orgânicos do MP do diesel, resulta portanto, em alterações mais deletérias ao epitélio mucociliar e sobre a saúde dos indivíduos (Khan et al., 2006; Liang et al., 2006).

Uma grande fração do enxofre orgânico do diesel encontra-se sob a forma de HPAs, que têm, sabidamente, potencial mutagênico e carcinogênico (Liang et al., 2006; Kampa e Castanas, 2008). O enxofre no diesel pode agir como um facilitador da formação de material particulado e

SO<sub>2</sub>; por esta razão, o teor de enxofre no diesel vem sendo alvo de regulamentações pelo mundo. O estudo desenvolvido por Liang et al. (2006) demonstrou que quanto maior a concentração de enxofre no diesel, maiores são as emissões de material particulado, compostos orgânicos sulfurosos e HPAs. No presente estudo, verificou-se que a fração orgânica do MP do diesel, particularmente, os compostos de baixa polaridade, apresentaram efeitos deletérios sobre o epitélio mucociliar. Estes achados reforçam a necessidade de aplicação de políticas mais restritivas em relação a concentração do enxofre no diesel comercializado no Brasil.

A problemática da qualidade do diesel comercializado no Brasil e de seus efeitos sobre a saúde da população vem sendo discutida há alguns anos. Em 2002, a resolução 315 do Conama (Conselho Nacional do Meio Ambiente) previa a produção do diesel S50 para o início de 2009, isto é, um diesel com 50 partes por milhão (ppm) de enxofre. Contudo, esta regulamentação não foi cumprida. Hoje, o diesel produzido no país apresenta 2000 ppm de enxofre, no interior, e 500 ppm nas regiões metropolitanas, proporções marcadamente superiores às observadas a Europa, onde a concentração de enxofre no diesel é de 10 ppm e nos Estados Unidos da América, onde corresponde a 15 ppm (Saldiva e Vormittag, 2010). Diante do não cumprimento da resolução do Conama, estima-se que, somente na cidade de São Paulo, cerca de três mil pessoas morram anualmente, em decorrência da poluição atmosférica, resultante da má qualidade do diesel comercializado na capital (Saldiva e Vormittag, 2010).

Frente ao exposto, os achados do presente estudo podem contribuir para o desenvolvimento de novas políticas públicas que visem a modernização da frota urbana de transporte coletivo e para o estabelecimento de novas políticas de regulamentação da qualidade do diesel utilizado em países em desenvolvimento.

*Conclusão*

---

## 7 CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo mostram que o material particulado bruto, proveniente das emissões de motores movidos a diesel, apresenta efeitos deletérios sobre o epitélio mucociliar do palato da rã.

As análises das frações do material particulado do diesel revelaram que os compostos orgânicos de baixa polaridade apresentaram maior grau de toxicidade aguda ao epitélio mucociliar do palato da rã, comparativamente às frações de polaridade média e alta e à fração inorgânica, devido as seguintes constatações:

- 1) Maior quantidade de volume proporcional de muco ácido no grupo metanol (solvente que reduz a quantidade de orgânicos de polaridade intermediária, gerando aumento relativo da concentração de orgânicos de baixa e alta polaridade).
- 2) Ausência de diferenças entre o grupo controle e o grupo hexano em todas as variáveis analisadas (solvente que reduz a quantidade dos orgânicos de baixa polaridade).
- 3) Aumento do tempo relativo de transporte mucociliar na fase II e redução do volume proporcional de muco neutro, promovida pelo grupo ácido nítrico (solvente que reduz predominantemente compostos inorgânicos, gerando aumento relativo da fração orgânica como um todo).

## *Referências*

---

## 8 REFERÊNCIAS

Adler KB, Li Y. Airway. Epithelium and mucus intracellular signaling pathways for gene expression and secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:397–400.

Ahlström AF, Odenbrand CUI. Combustion characteristics of soot deposits from diesel engines. *Carbon* 1989;27:475-83.

American Lung Association, Environmental Defense (2003). *Closing the diesel divide—Protecting public health from diesel air pollution*. [Disponível em: <http://www.environmentaldefense.org/documents/2738DieselDivide.pdf>.]

Bocksay KA, Tang D, Orjuela MA, Liu X, Warburton DP, Perera FP. Chromosomal alterations in cord blood are associated with pre-natal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:506-11.

Böhm GM, Saldiva PH, Pasqualucci CA, Massad E, Martins ME, Zin WA, Cardoso WV, Criado PM, Komatsuzaki M, Sakae RS et al. Biological effects of air pollution in São Paulo and Cubatão. *Environ Res* 1989;49:208-16.

Braga PC, Allegra L, King M. Mathematically analysis of dynamic measures. In: Gabelnick HL, Litt M, editors. *Rheology of Biological Systems*. Springfield: Thomas; 1973.p.119-57.

Braun-Fahrlander C, Vuille JC, Sennhauser FH, Neu U, Kunzle T, Grize L, Gassner M, Minder C, Schindler C, Varonier HS, Wütrich B. Respiratory health and long-term exposure to air pollutants in Swiss schoolchildren. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1042-9.

Brechun N, Diaz-Sanches D, Nel AE. Thiol antioxidants inhibit the adjuvant effects of aerosolized diesel exhaust particles in a murine model for ovoalbumin sensitization. *J Immunol* 2002;168:2560-7.

Carvalho-Oliveira R, Pozo RM, Lobo DJ, Lichtenfels AJ, Martins-Junior HA, Bustilho JO, Saiki M, Saito IM, Saldiva PH. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. *Environ Res* 2005(a);98:1-7.

Carvalho-Oliveira R, Saiki M, Pires-Neto RC, Lorenzi-Filho G, Macchione M, Saldiva PH. Anti-oxidants reduce the acute adverse effects of residual oil fly ash on the frog palate mucociliary epithelium. *Environ Res* 2005(b);98:349-54.



CETESB. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. In: *Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo*. São Paulo, 2009;p.354.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. In *Relatório da Qualidade do Ar na Região Metropolitana de São Paulo*. São Paulo, 2002.

Cho HY, Kleeberger SR. Nrf2 protects against airway disorders. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;244:43-56.

Davis CW. Regulation of mucin secretion from in vitro cellular models. *Novartis Found Symp* 2002;248:113–25.

DENATRAN. Departamento Nacional de Trânsito. *Dados da frota veicular de São Paulo*, 2008. [Disponível em [www.denatran.gov.br/frota.htm](http://www.denatran.gov.br/frota.htm)]

Devouassoux G, Saxon A, Metcalfe DD, Prussin C, Colomb MG, Brambilla S, Diaz-Sanchez D. Chemical constituents of diesel exhaust particles induce IL-4 production and histamine release by human basophils. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:847-53.

Diaz-Sanchez D, Garcia MP, Wang M, Jyrala M, Saxon A. Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1183-8.

Diaz-Sanchez D, Penichet-Garcia M, Saxon A. Diesel exhaust particles directly induce activated mast cells to degranulate and increase histamine levels and symptom severity. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:1140-6.

Dockery DW, Pope CA 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG Jr, Speizer FE. An association between air pollution and mortality in six US cities. *New Engl J Med* 1993;329:1753-9.

Edwards J, Walters S, Griffiths RK. Hospital admissions for asthma in preschool children: relationship to major roads in Birmingham, United Kingdom. *Arch Environ Health* 1994;49:223-7.

Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A, Rudinski K, Fedoulov A, Karbanov A, Barnes PJ. Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients. *Chest* 2001;120:1136-9.

Filleul L, Rondeau V, Vandentorren S, Le Moual N, Cantagrel A, Annesi-Maesano I, Charpin D, Declercq C, Neukirch F, Paris C, Vervloet D, Brochard P, Tessier JF, Kauffmann F, Baldi I. Twenty five year mortality and air pollution: results from the French PAARC survey. *Occup Environ Med* 2005;62:453-60.

Forastiere F, Stafoggia M, Picciotto S, Bellander T, D'Ippoliti D, Lanki T, von Klot S, Nyberg F, Paatero P, Peters A, Pekkanen J, Sunyer J, Perucci CA. A case-crossover analysis of out-of-hospital coronary deaths and air pollution in Rome, Italy. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1549-55.

Fujieda S, Diaz-Sanchez D, Saxon A. Combined nasal challenge with diesel exhaust particles and allergen induces in vivo IgE isotype switching. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:507-12.

Gavett SH, Haykal-Coates N, Copeland LB, Heinrich J, Gilmour MI. Metal composition of ambient PM 2.5 influences severity of allergic airways diseases in mice. *Environ Health Perspect* 2003;111:1471-7.

Gerken TA, Tep C, and Rarick J. Role of peptide sequence and neighboring residue glycosylation on the substrate specificity of the uridine 5 diphosphate-alpha-N-acetylgalactosamine:polypeptide - acetylgalactosaminyl transferases T1 and T2: kinetic modeling of the porcine and canine submaxillary gland mucin tandem repeats. *Biochemistry* 2004;43:9888–900.

Giddens WE, Fairchild GA. Effects of sulfur dioxide on the nasal mucosa of mice. *Arch Environ Health* 1972;25:166-72.

Glück U, Schutz R, Gebbers JO. Cytopathology of the nasal mucosa in chronic exposure to diesel engine emission: a five-year survey of Swiss customs officers. *Environ Health Perspect* 2003;111:925-9.

Goldberg MS, Burnett RT, Yale JF, Valois MF, Brook JR. Associations between ambient air pollution and daily mortality among persons with diabetes and cardiovascular disease. *Environ Res* 2006;100:255-67.

Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GG, González-Flecha B. Rapid increase in steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ Health Perspect* 2002;110:749-55.

Hiura TS, Kazubowsky MP, Li N, Nel AE. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol* 1999;163:5582-91.

Holma B. Effects of inhaled acids on airway mucus and its consequences for health. *Environ Health Perspect* 1989;79:109-13.

Holma B, Lindegren M, Morkholdt Anderson J. pH effects on ciliomotility and morphology of respiratory mucosa. *Arch Environ Health* 1977;32:216-26.

Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme-oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. *Thorax* 1998;53:668-72.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento. IBGE, *Cidades*, 2009. [disponível em [www.ibge.gov.br/cidades/default.php](http://www.ibge.gov.br/cidades/default.php)].

Ichinose T, Takano H, Miyabara Y, Sadakaneo K, Sagai M, Shibamoto T. Enhancement of antigen-induced eosinophilic inflammation in the airways of mast-cell deficient mice by diesel exhaust particles. *Toxicology* 2002;180:293-301.

Jacquot J, Hayem A, Galabert C. Protein and lipid function in airway secretions. *Eur Respir* 1992;5:343-58.

Kampa M, Castanas E. Human health effects of air pollution. *Environ Pollution* 2008;151:362-7.

Khan AB, Clark NN, Thompson GJ, Wayne WS, Gautam M, Lyons DW, Hawelti D. Idle emissions from heavy duty diesel vehicles. Review and recent data. *J Air Waste Manag Assoc* 2006;56:1404-19.

Klimek L, Hundorf I, Delank KW, Hörmann K. Assessment of rhinological parameters for evaluating the effects of airborne irritants to the nasal epithelium. *Int Arch Occup Environ Health* 2002;75:291-7.

Knox RB, Suphioglu C, Taylor P, Desai R, Watson HC, Peng JI, Bursil LA. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin Exp Allergy* 1997;27:246-51.

Kobayashi T. Exposure to diesel exhaust aggravates nasal allergic reaction in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:352-6.

Lahaye J, Ehrburger-Dole F. Mechanisms of carbon black formation. Correlation with the morphology of aggregates. *Carbon* 1994;32:1319-24.

Laks D, Oliveira RC, André PA, Macchione M, Lemos M, Faffe D, Saldiva PH, Zin WA. Composition of diesel particles influences acute pulmonary toxicity: an experimental study in mice. *Inhal Toxicol* 2008;20:11,1037-42.

Lemos M, Lichtenfelds AJ, Amaro Júnior E, Macchione M, Martins MA, King M, Böhm GM, Saldiva PH. Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban levels of air pollution. *Environ Res* 1994;66:87-95.

Levine SJ, Larivee P, Logun C, Angus CW, Ognibene FP, Shelhamer JH. Tumor necrosis factor-alpha induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:196–204.

Li N, Wang M, Oberley TD, Sempf JM, Nel AE. Comparison of pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemical in bronchial epithelial cells and macrophages. *J Immunol* 2002;169:4531-41.

Liang F, Mingming L, Birch ME, Keener TC, Zifei L. Determination of polycyclic aromatic sulfur heterocycles in diesel particulate matter and diesel fuel by gas chromatography with atomic emission detection. *Journal of Chromatography A* 2006;1114:145–53

Macchione M, Guimarães ET, Saldiva PH, Lorenzi-Filho G. Methods for studying respiratory mucus and mucus clearance. *Braz J Med Biol Res* 1995;28:1347-55.

Macchione M, Oliveira AP, Gallafrio CT, Muchão FP, Obara MT, Guimarães ET, Artaxo P, King M, Lorenzi-Filho G, Junqueira VC, Saldiva PH. Acute effects of inhalable particles on the frog palate mucociliary epithelium. *Environ Health Perspect* 1999;107:829-33.

Martins LC, Latorre MR, Cardoso MR, Gonçalves FL, Saldiva PH, Braga AL. Poluição atmosférica e atendimentos por pneumonia e gripe em São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública* 2002;36:88-94.

McClellan RO. Health effects of exposure to diesel exhaust particles. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1987;27:279-300.

Montuschi P, Corradi M, Ciabattini G, Nightingale J, Kharitanov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:216-20.

Muranaka M, Suzuki S, Koizumi K, Takafuji S, Myamoto T, Ikemori R, Tokiwa H. Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1986;77:616-23.



Neeft, JP, Makkee, M, Moulijn, J.A. Fuel Process. *Technol* 1996;47-1.

Nel AE, Diaz-Sanchez D, Ng D, Hiura T, Saxon A. Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:539-54.

Neutra MR, Forstner JF. Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion, and function. In: Johnson LR, editor. *Proceedings of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven;1987.p.975–1009.

Nordenhall C, Pourazar J, Blomberg A, Levin JO, Sandstrom T, Alderoth E. Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. *Eur Respir J* 2000;15:1046-51.

Nordenhall C, Pourazar J, Ledin MC, Levin JO, Sandstrom T, Alderoth E. Diesel exhaust enhances airway responsiveness in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 2001;17:909-15.

Pandya RJ, Solomon G, Kinner A, Balmes JR. Diesel exhaust and asthma: hypothesis and molecular mechanisms of action. *Environ Health Perspect* 2002;110:103-12.

Perera FP. Environment and cancer: who are susceptible? *Science* 1997; 278:1068-73.

Pereira P, Saldiva PH, Sakae RS, Böhm GM, Martins MA. Urban levels of air pollution increase lung responsiveness in rats. *Environ Res* 1995;69:96-101.

Pires-Neto RC, Lichtenfels AJ, Soares SR, Macchione M, Saldiva PH, Dolnikoff M. Effects of São Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environ Res* 2006,Jul;101:356-61.

Pope CA 3rd. Respiratory disease associated with community air pollution and a steel mill, Utah Valley. *Am J Public Health* 1989;79:623-8.

Prentø P. Staining of macromolecules: possible mechanisms and examples. *Biotech and Histochem* 2009;84:139-58.

Rahman Q, Abidi P, Afaq F, Schiffmann D, Mossman BT, Kamp DW, Athar M. Glutathione redox system in oxidative lung injury. *Crit Rev Toxicol* 1999;29:543-68.

Riedl M, Diaz-Sanchez D. Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:221-8.

Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 2006;86: 245–78.

Rubin BK, Ramirez O, King M. Mucus-depleted frog palate as a model for the study of the mucociliary clearance. *J Appl Physiol* 1990-a;69:424-9.

Rubin BK, Ramirez O, Finegan B, King M. Analysis of airway mucus collected from healthy subjects at the time of surgery. *Am Rev Respir Dis* 1990-b;141:1040-3.

Saldiva PH, Vormittag E. A saúde precária de uma velha senhora. Especial São Paulo. *Scientific American Brasil* 2010;28-39.

Scheepers PT, Bos R. Combustion of diesel fuel from a toxicological perspective. II. Toxicity. *Int Arch Occup Environ Health* 1992;64:163-77.

Silkoff PE, Robbins RA, Gaston B, Lundberg JO, Townley RG. Endogenous nitric oxide in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:438-48.

Souza MB, Saldiva PH, Pope CA 3rd. Respiratory changes due to long-term exposure to urban levels of air pollution: a histopathologic study in humans. *Chest* 1998;113:1312-8.

Stenfors N, Nordenhäll C, Salvi SS, Mudway I, Söderberg M, Blomberg A, Helleday R, Levin JO, Holgate ST, Kelly FJ, Frew AJ, Sandström T. Different airway inflammatory responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. *Eur Respir J* 2004;23:82-6.

Takano H, Yoshikawa T, Ichinose T, Miyabara Y, Imaoka K, Sagai M. Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:36-42.

van Vliet P, Knape M, de Hartog J, Janssen N, Harssema H, Brunekreef B. Motor vehicle exhaust and chronic respiratory symptoms in children living near freeways. *Environ Res* 1997;74:112-32.

Verdugo P. Mucin exocytosis. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:33-7.

Whitekus MJ, Li N, Zhang M, Wang M, Horwitz MA, Nelson SK, Horwitz LD. Thiol antioxidants inhibit the adjuvant effects of aerosolized diesel exhaust particles in a murine model for ovalbumin sensitization. *J Immunol* 2002;168:2560-7.

Wichmann HE. Diesel exhaust particles. *Inhal Toxicol* 2007;19:241-4.

Yoshizaki K, Brito JM, Toledo AC, Nakagawa NK, Piccin VS, Junqueira MS, Negri EM, Carvalho AL, Oliveira AP, Lima WT, Saldiva PH, Mauad T, Macchione M. Subchronic effects of nasally instilled diesel exhaust particulates on the nasal and airway epithelia in mice. *Inhal Toxicol* 2010;22:610-7.

*Anexo*

---

## 9.1 Termo de aprovação da CAPPesq.



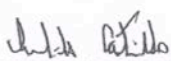
### **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10.05.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **330/06**, intitulado: "Efeito das diferentes frações do material particulado proveniente da emissão de motores movidos a óleo diesel sobre o epitélio do palato da rã" apresentado pelo Departamento de **OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Dr. João Ferreira de Mello Júnior**

CAPPesq, 10 de Maio de 2006.

  
**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
 Presidente da Comissão de Ética para Análise  
 de Projetos de Pesquisa

